Contribution à l'évaluation du risque pour l'homme lors de l'apparition de neurotoxines émergentes : analyse de réponses cellulaires et sélection de modèles expérimentaux de criblage.

Aurélie Ledreux

▶ **To cite this version:**

Aurélie Ledreux. Contribution à l'évaluation du risque pour l'homme lors de l'apparition de neurotoxines émergentes : analyse de réponses cellulaires et sélection de modèles expérimentaux de criblage.. Ecotoxicologie. AgroParisTech, 2010. Français. NNT : 2010AGPT0024 . pastel-00594239

HAL Id: pastel-00594239

https://pastel.hal.science/pastel-00594239

Submitted on 19 May 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture
Alimentation
Biologie
Environnement
Santé

Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

présentée et soutenue publiquement par

Aurélie LEDREUX

le 12 mars 2010

Contribution à l'évaluation du risque pour l'homme lors de l'apparition de neurotoxines émergentes : analyse de réponses cellulaires et sélection de modèles expérimentaux de criblage

Directrice de thèse : **Cécile BERNARD**
Co-encadrement de la thèse : **Sophie KRYS**

Jury :

Mme Armelle BAEZA, Docteur, Laboratoire de Cytophysiologie et Toxicologie Cellulaire, Univ. Denis Diderot	Rapporteur
M. Jorge DIOGENE, Docteur, Institut de Recherche et Technologies Agroalimentaires	Rapporteur
Mme Sylviane DRAGACCI, Docteur, AFSSA-Lerqap	Examinateur
M. Philipp HESS, Docteur, Département Environnement, Microbiologie et Phycotoxines, IFREMER	Examinateur
M. Jordi MOLGO, Directeur de recherche, Institut Fédératif de Neurobiologie Alfred Fessard, CNRS	Président
Mme Cécile BERNARD, Professeur, FRE3206 CNRS-MNHN, Muséum National d'Histoire Naturelle	Directrice de thèse
Mme Sophie KRYS, Docteur, Unité Caractérisation des Toxines, AFSSA-Lerqap	Co-directrice de thèse

Résumé :
Les toxines phytoplanctoniques présentent une large diversité, tant du point de vue de leurs structures chimiques que de leurs effets biologiques. La multiplicité des familles de toxines ainsi que l'observation de plus en plus fréquente d'épisodes toxiques non expliqués ont rendu l'interprétation des tests *in vivo* très délicate. Des méthodes complémentaires aux tests *in vivo* telles que les analyses chimiques ont été développées et permettent une détection spécifique des toxines connues dans un cadre réglementaire. En vigilance, il est nécessaire de pouvoir détecter de nouvelles toxines et analogues. Les lignées cellulaires font partie des méthodes complémentaires prometteuses pour ce faire. Les réponses obtenues à l'échelle cellulaire donnent des informations sur les cibles moléculaires et les mécanismes de toxicité associés aux molécules ou extraits testés. Ces connaissances sont un support pour (i) la meilleure évaluation du risque pour l'homme et (ii) l'apport de connaissances sur les épisodes toxiques.
Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte en se focalisant spécifiquement sur l'analyse des réponses de modèles cellulaires exposés à des neurotoxines.
La lignée cellulaire Neuro-2a (neuroblastomes de souris) a été sélectionnée comme modèle cellulaire pour étudier les réponses face à différentes neurotoxines pour lesquelles les niveaux de connaissances des modes d'action sont bien ou peu décrits.
L'objet de la première partie de ce travail est de caractériser les réponses de ce modèle cellulaire exposé aux saxitoxines, neurotoxines agissant sur le site 1 de la sous unité α du canal sodium voltage-dépendant. Cette démarche nous a permis de mettre en évidence, pour la première fois en France, des saxitoxines en eau douce et de discuter le risque pour l'homme.
Dans une seconde partie, les réponses du modèle Neuro-2a exposé à la palytoxine et à ses analogues, neurotoxines émergentes agissant sur la pompe Na^+, K^+-ATPase, ont été caractérisées.
Enfin, dans la troisième partie de la thèse, les effets à l'échelle cellulaire du 13-desméthyle-C spirolide, neurotoxine émergente sur les côtes françaises pour laquelle les études toxicologiques sont limitées, ont été investigués.
La discussion générale associée aux perspectives permet de replacer l'ensemble des données acquises au cours de cette thèse dans un contexte plus général de l'utilisation des modèles cellulaires pour contribuer à une meilleure connaissance des épisodes de toxicité du phytoplancton et du risque qu'ils représentent pour l'homme.

Mots clés : neurotoxines, lignée cellulaire Neuro-2a, méthode complémentaire, évaluation du risque, test fonctionnel, coquillage.

Abstract :
Phytoplanktonic toxins present a wide diversity of chemical structures and biological effects. The increasing number of families of toxins as well as the frequency of unexplained toxic periods makes the *in vivo* assays difficult to interpret. As a consequence, complementary methods such as chemical analyses have been developed, and allow the specific detection of known toxins for regulatory purposes. But, it is important to be able to detect new toxins or new analogs of known toxins in order to protect human health. Therefore, new approaches have to be implemented to (i) contribute to a better assessment of the risk related to emerging toxins and (ii) to improve knowledge on toxic periods. One of the approaches relies on the development of cellular models sensitive to different types of toxicities in order to use them when unknown toxicity occurs.
This work is a contribution to the risk assessment related to unknown toxins, based on the analysis of cellular responses when cells are exposed to neurotoxic toxins.
The cell line Neuro-2a was selected as a model for the study of cellular responses to different neurotoxins for which knowledge on the modes of action differ. The first part of the work was to characterize the responses of this model exposed to saxitoxins, neurotoxins acting the site 1 of the voltage-gated sodium channel. This approach has allowed the first description of saxitoxins in French freshwaters and to discuss the risk for human health.
We next investigate the responses of the Neuro-2a model exposed to palytoxin and analogs which are emerging neurotoxins targeting the Na^+, K^+-ATPase pump.
Finally, the cellular effects of 13-desmethyl-C spirolide, an emerging neurotoxin for which few toxicological studies are available, were investigated.
As a discussion, the whole data obtained are replaced in a more general context dealing with the use of cellular models to contribute to a better understanding of phytoplanktonic toxic periods and the risk they may represent for human.

Key words: neurotoxins, Neuro-2a cell line, complementary method, risk assessment, functional assay, shellfish.

Remerciements

Les deux premières personnes à qui je souhaite adresser mes chaleureux remerciements sont mes deux directrices de thèse : Cécile Bernard et Sophie Krys. Merci à vous deux de m'avoir soutenue et encouragée tout au long du chemin de la thèse, pour la qualité de votre encadrement et pour avoir pris le temps de me former.
Cécile, merci de m'avoir accordé ta confiance durant toutes ses années. Quand je pense au chemin parcouru depuis mon arrivée au labo, j'ai presque du mal à y croire ! Sophie, merci pour ton soutien et tes encouragements au long de ces trois années et pour m'avoir initiée à la pensée « afssa-ienne » !

Je souhaite ensuite remercier Armelle Baëza et Jorge Diogène qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail. J'adresse également mes remerciements à Sylviane Dragacci, Philipp Hess et Jordi Molgo qui ont accepté d'examiner ce travail malgré un emploi du temps déjà bien rempli !

Je souhaite remercier Andrew Humpage de l'AWQC qui a posé les premières briques de ce travail et a supporté sans broncher mes fautes d'anglais et les nombreuses questions que je lui ai adressées. Je remercie également Sandrine Leiba-Magnin qui a eu la patience, il y a quelques années maintenant, de me former à la culture cellulaire alors que je débarquais de nulle part !

J'ai croisé de nombreuses personnes au cours de ce travail de thèse. Aussi, dans le désordre, je souhaite remercier…
…l'ensemble de l'équipe Toxines Naturelles de l'AFSSA-LERQAP qui m'a toujours accueillie avec gentillesse et bonne humeur quand je leur rendais visite,
…Arul et Lionel de la plateforme Spectrométrie de masse du Muséum pour leur bonne humeur,
…les filles de l'Afssa Fougères : Valérie, Anne-Laure, Rachelle. Les HepG2 du Muséum vous sont éternellement reconnaissantes !! Merci pour votre accueil lors de ma venue au pays des vaches et des canards, pour vos oreilles attentives et pour votre bonne humeur !
…Claude pour sa très grande disponibilité, pour sa bonne humeur et aussi ses raleries qui font qu'il est irremplaçable,

…Marie-Claude, pour ses éclats de rire, son soutien dans les moments difficiles, les virées shopping que nous avons partagées. Désolée de t'avoir ennuyée si souvent avec des histoires de commande et surtout avec mes états d'âme !
…mes autres collègues de l'équipe CCE du Muséum : Sahima qui est nettement plus patiente que moi, Solène qui est la prochaine sur la liste, Charlotte, heureuse maman de la petite Océane mais également des médakas et de la collection de cyanobactéries, Nico et Arnaud qui partagent souvent leurs pauses cigarettes avec moi, Selma, Mélodie, Katia, Marc, Jean, Alain, Gégé d'A., Max et Philippe, qui va bientôt être obligé de me supporter un peu plus qu'avant, Catherine, Simone que j'admire pour son dynamisme et qui s'est toujours rendue disponible pour discuter ou relire ma prose, Damien, mon tout premier stagiaire, Céline, Hélène, Enora et Karim, anciens thésards du labo, et tous les stagiaires de passage, trop nombreux pour être tous cités, que j'ai croisé depuis le début de l'aventure.
…Muriel, pour toutes les discussions partagées dans la bonne humeur.

Je tiens également à remercier mon père et Claire qui m'ont soutenu chacun à leur façon et m'ont encouragée à aller toujours plus loin. J'ai une pensée pour ma mère qui, je n'en doute pas, veille sur moi de là où elle est.

Enfin, je remercie Romain pour son infinie patience, ses encouragements, ses petits plats préparés quand je rentrais tard, son soutien et pour le réconfort qu'il m'a apporté quand j'en avais besoin.

A Romain

Table des matières

Liste des figures.....v
Liste des tableaux.....vii
Liste des encarts.....viii
Liste des publications et communications.....ix
Liste des abréviations…….xi

Avant-propos……..……1

Chapitre 1 Etat des connaissances.....5

I. Généralités.....7

II. Diversité des principales toxines phytoplanctoniques.....7

II.1. Diversité chimique des toxines phytoplanctoniques.....7

II.2. Voies de biosynthèse des toxines phytoplanctoniques.....8
II.2.1. Voies de biosynthèse des polykétides marins.....9
II.2.2. Voies de biosynthèse non ribosomale des cyanotoxines.....9

II.3. Diversité des cibles biologiques et des effets des toxines.....10
II.3.1. Toxines aux cibles biologiques connues.....10
II.3.2. Toxines dont la cible moléculaire n'est pas connue.....36

III. Impacts environnementaux et sanitaires des efflorescences phytoplanctoniques toxiques.....45

III.1. Efflorescences, biodiversité et réseau trophique.....45
III.1.1. Efflorescences et facteurs de contrôle.....45
III.1.2. Impacts environnementaux des efflorescences.....46
III.1.3. Impacts des toxines sur les écosystèmes.....47

III.2. Risques pour la santé humaine et animale et conséquences économiques.....47
III.2.1. Risques liés à la contamination directe.....47
III.2.2. Risques liés à la bioaccumulation des toxines.....49

IV. Réglementation européenne et/ou française et méthodes d'analyse.....50

IV.1. Recommandations liées aux cyanobactéries : le cas de la France.....51

IV.2. Réglementation et méthodes officielles d'analyse pour les toxines d'origine marine.....52
IV.2.1. Aspects réglementaires relatifs aux phycotoxines.....52
IV.2.2. Méthodes d'analyses.....53

Contexte et objectifs 57

Chapitre 2 Contribution à l'évaluation du risque lié à la présence de saxitoxines par un test sur lignée cellulaire 63

Chapitre 3 Caractérisation du modèle expérimental Neuro-2a en réponse à l'exposition aux palytoxines..... 110

Chapitre 4 Investigations des effets toxiques à l'échelle cellulaire du 13-desméthyle-C spirolide..... 128

I. Revue bibliographique 130

I.1. Généralités..... 130

I.2. Organismes producteurs et répartition mondiale 130

I.3. Relation structure / toxicité..... 131

I.4. Aspects toxicologiques chez l'animal 132

I.5. Une action au niveau des récepteurs nicotiniques et/ou muscariniques ? 133
I.5.1. Les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine 133
I.5.2. Les récepteurs muscariniques à l'acétylcholine..... 137

I.6. Aspects réglementaires et méthodes de détection 139

II. Questions 141

III. Matériel et méthodes 145

III.1. Les lignées cellulaires 145
III.1.1. La lignée de neuroblastomes Neuro-2a..... 145
III.1.2. La lignée M1WT3 146

III.2. Tests utilisés..... 146
III.2.1. Le test de cytotoxicité au MTT 146
III.2.2. Le test de cytotoxicité avec l'Alamar Blue 147
III.2.3. Mesure du taux de glutathion réduit intracellulaire avec un marqueur fluorescent : le dibromobimane..... 147
III.2.4. Evaluation de la baisse du potentiel de membrane mitochondriale sur la lignée de neuroblastomes Neuro-2a..... 148
III.2.5. Effet du SPX-dC sur la fragmentation des acides nucléiques des cellules Neuro-2a 149

IV. Résultats..... 150

IV.1. Effet du 13-desméthyle-C spirolide (SPX-dC) sur la viabilité des lignées cellulaires Neuro-2a et M1WT3 150
IV.1.1. Evaluation de la cytotoxicité du SPX-dC avec le test au MTT sur les lignées cellulaires Neuro-2a et M1WT3 150
IV.1.2. Evaluation de la cytotoxicité du SPX-dC avec l'Alamar Blue sur la lignée cellulaire Neuro-2a 151

IV.2. Effets d'antagonistes ou d'agonistes des récepteurs muscariniques et du SPX-dC sur la survie des cellules Neuro-2a évaluée avec le test au MTT 151

IV.3. Effets du SPX-dC sur le taux de glutathion réduit de la lignée Neuro-2a 151
IV.3.1. Evaluation de la cytotoxicité de la BSO et de la tBHQ par le test au MTT sur la lignée Neuro-2a 152
IV.3.2. Evaluation de l'effet de la BSO et de la tBHQ sur le taux de GSH 152
IV.3.3. Evaluation de l'effet du SPX-dC et de l'OA sur le taux de GSH des cellules Neuro-2a 153

IV.4. Effets du SPX-dC et de l'OA sur les changements de potentiel de membrane mitochondriale sur la lignée Neuro-2a 154

IV.5. Effet du SPX-dC et de l'OA sur la fragmentation des acides nucléiques sur la lignée Neuro-2a 155

V. Discussion 156

Chapitre 5 Discussion générale et perspectives 160

Références bibliographiques 174

Annexes 196

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique de l'anatoxine-a et de l'homoanatoxine-a
Figure 2 : Mode d'action de l'anatoxine-a au niveau d'une jonction neuromusculaire. A : état normal. B : en présence d'anatoxine-a. (d'après Carmichael, 1994).
Figure 3 : Structure chimique de la gymnodimine-A
Figure 4 : Structure chimique des analogues de saxitoxines et toxicité chez la souris par voie i.p. (d'après Oshima, 1995 ; Onodera et al., 1997). nd : non déterminé.
Figure 5 : Transformation chimique des toxines paralysantes par hydrolyse acide (d'après Ledoux, 1991).
Figure 6 : Principaux sites impliqués dans la formation du complexe toxine / récepteur
Figure 7 : Structure chimique des brévétoxines
Figure 8 : Structure des ciguatoxines
Figure 9 : Anémones coloniales du genre *Palythoa*
Figure 10 : Structure de la palytoxine isolée de *Palythoa toxica* dans le Pacifique (Katikou, 2007) et de l'ostréocine-D isolée d'*Ostreopsis siamensis* (Ukena et al., 2001).
Figure 11 : Structure chimique de l'acide domoïque et des acides aminés apparentés
Figure 12 : Mécanisme par lequel l'acide domoïque induit une neurotoxicité sur des cellules nerveuses (d'après Lefebvre et Robertson, 2009).
Figure 13 : Structure chimique des azaspiracides
Figure 14 : Structure chimique des pecténotoxines (d'après Miles, 2007)
Figure 15 : Structure chimique des yessotoxines (d'après Amzil et al., 2007)
Figure 16 : (a) Efflorescence à *Planktothrix aghardii* de la Base nautique de Viry-Châtillon (Essonne)
Figure 17 : Exemple de voies de transmission des saxitoxines dans les chaînes alimentaires pélagiques (d'après Bourdeau et al., 2001)
Figure 18 : Structure chimique de la vératridine (1) et de l'ouabaïne (2)
Figure 19 : Schéma représentant l'action du couple Ouabaïne / Vératridine sur le flux d'ions
Figure 20 : Relation entre les CE50 moyennes déterminées par le test sur Neuro-2a et les toxicités spécifiques pour chaque analogue (ou couple d'analogues). Le couple C1/C2 n'a pas été pris en compte car il n'y a pas de valeur de toxicité sur souris disponible.
Figure 21 : Récapitulatif des résultats moyens obtenus par le test Neuro-2a, par HPLC-FD et par LC-MS/MS pour les 10 extraits d'efflorescences à cyanobactéries (selon l'article 1)
Figure 22 : *Alexandrium ostenfeldii* – dissection (E. Nezan, Ifremer)
Figure 23 : Structure chimique des composés de la famille des spirolides (A) Composés biologiquement actifs contenant un motif spiro-imine (*). (B) Composés biologiquement inactifs, issus du métabolisme des bivalves et dans lesquels le système bicyclique incluant le motif spiro-imine (*) est ouvert. (d'après Marrouchi et al., 2008).
Figure 24 : Structure du récepteur nicotinique de l'acétylcholine situé dans la plaque motrice musculaire
Figure 25 : Fonctionnement d'une synapse cholinergique
Figure 26 : La transduction du signal au niveau des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine (modifié d'après Bartolami, 2006)
Figure 27 : Les différents sous-types de récepteurs muscariniques de l'acétylcholine (modifiée d'après Fruchart-Gaillard et al., 2008)
Figure 28 : Principe du test d'inhibition reposant sur la mesure de la polarisation de fluorescence
Figure 29 : Structure chimique du glutathion réduit (le groupement thiol R-SH est impliqué dans des réactions avec les radicaux libres et les groupements électrophiles d'autres molécules).

Figure 30 : Viabilité des cellules Neuro-2a (évaluée par le test au MTT) exposées à une gamme de SPX-dC pendant 48 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie (± écarts-types) par rapport au contrôle solvant et correspondent à la moyenne de trois expériences réalisées en triplicats.
Figure 31 : Viabilité des cellules M1WT3 (évaluée par le test au MTT) exposées à une gamme de SPX-dC pendant 24 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie (± écarts-types) par rapport au contrôle solvant et correspondent à la moyenne de trois expériences réalisées en triplicats.
Figure 32 : Viabilité des cellules Neuro-2a (évaluée par le test avec l'Alamar Blue) exposées à une gamme de SPX-dC pendant 24 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie (± écarts-types) par rapport au contrôle solvant et correspondent à la moyenne de trois expériences réalisées en triplicats.
Figure 33 : Effets de la BSO (a) et de la tBHQ (b) sur la survie des cellules Neuro-2a exposées pendant 24 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie (± écarts-types) par rapport au contrôle et correspondent à la moyenne de deux expériences réalisées en triplicats.
Figure 34 : Evolution du taux de GSH des cellules Neuro-2a exposées pendant 24 heures à la BSO (a) ou à la tBHQ (b). Les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence (± écarts-types) par rapport au contrôle et correspondent à la moyenne de deux expériences réalisées en quintuplicats. * indique une différence significative à $p<0,05$ par rapport au contrôle.
Figure 35 : Evolution du taux de GSH des cellules Neuro-2a exposées pendant 24 heures à tBHQ, à BSO, à SPX-dC et à OA. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence (± écarts-types) par rapport au contrôle et correspondent à la moyenne de trois expér iences réalisées en quintuplicats. * indique une différence significative à $p<0,05$ par rapport au contrôle.
Figure 36 : Effets de l'OA et du SPX-dC sur le potentiel de membrane mitochondriale des cellules Neuro-2a exposées 24 heures aux toxines. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence (± SEM) par rapport au contrôle solvant et correspondent à la moye nne de quatre expériences réalisées en triplicats.
Figure 37 : Effets du SPX-dC et de l'OA sur la fragmentation des acides nucléiques des cellules Neuro-2a exposées pendant 24 ou 48 heures. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un ratio d'intensité de fluorescence finale après illumination des cellules par rapport à la fluorescence initiale et correspondent à la moyenne de deux expériences réalisées en triplicats.
Figure 38 : Schéma récapitulatif des effets du SPX-dC à l'échelle cellulaire

Liste des tableaux

Tableau I : DL_{50} par voie orale de la STX chez différentes espèces animales (d'après Van Egmond et al., 1993)
Tableau II : Facteurs de toxicité relative (TEF : Toxicity Equivalency Factor) sur la souris des standards certifiés de saxitoxines (d'après Oshima, 1995 et EFSA, 2009a).
Tableau III : Doses toxiques (en µg) de toxines paralysantes (d'après Gessner, 2000)
Tableau IV : Espèces d'*Ostreopsis* produisant des analogues de PlTX et répartition mondiale
Tableau V : Occurrences de palytoxines dans des organismes marins. Les cas avérés d'intoxications humaines apparaissent en gras.
Tableau VI : Symptômes relevés dans la littérature chez les personnes exposées par inhalation à *Ostreopsis ovata* (Kermarec et al., 2008)
Tableau VII : Symptômes observés après exposition à l'AD par voie orale de différentes espèces
Tableau VIII : Doses létales par voie i.p. chez la souris pour cinq analogues d'AZAs
Tableau IX : Diversité des effets à l'échelle cellulaire d'AZA1 en fonction des types cellulaires (d'après EFSA, 2008a)
Tableau X : Effets de YTX sur des lignées cellulaires (modifié d'après EFSA, 2008b)
Tableau XI : Valeurs seuils en vigueur en Europe et méthodes d'analyse préconisées pour les différents groupes de phycotoxines contaminant les coquillages
Tableau XII : Comparaison des CE_{50} obtenues pour différents analogues de STXs sur la lignée Neuro-2a et une culture primaire de neurones (CGC).
Tableau XIII : Effets sur le temps de survie de souris de différentes drogues (d'après Richard et al., 2001)
Tableau XIV : Exemples de procédures de clean-up d'extraits de coquillages décrites dans la littérature

Liste des encarts

Encart 1 - Le canal sodium voltage-dépendant

Encart 2 - La pompe sodium/potassium ATPase

Encart 3 - Principales méthodes de détection et de quantification des saxitoxines

Encart 4 - Méthodes de détection des palytoxines

Encart 5 - Effets de la buthionine sulfoximine et de la tert-butyle hydroquinone sur la synthèse du GSH

Encart 6 - Principe méthodologique pour le SYTO13

Encart 7 - Démarche permettant de valider une méthode *in vitro*

Liste des annexes

Annexe 1 - Phycotoxines, organismes producteurs, voies d'intoxication et zones géographiques concernées

Annexe 2 - Organismes producteurs de saxitoxines et répartition mondiale

Annexe 3 - Toxicités exprimées en DL_{50} chez la souris pour la toxine botulique, les cyano- et les phycotoxines

Annexe 4 - Schéma récapitulatif de la méthode d'extraction de la brévétoxine PbTx-3 à partir de chair de poisson supplémentée. (a) d'après Dickey et al. (1999). (b) d'après Bottein Dechraoui et al. (2005)

Annexe 5 - Aráoz R, Herdman M, Rippka R, Ledreux A, Molgó J, Changeux J-P, Tandeau de Marsac N, Nghiêm H-O, 2008. A non-radioactive ligand-binding assay for detection of cyanobacterial anatoxins using Torpedo electrocyte membranes. *Toxicon* 52: 163-174.

Annexe 6 - Gugger M, Lenoir S, Berger C, Ledreux A, Druart JC, Humbert JF, Guette C, Bernard C, 2005. First identification in a French river of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* 45: 919-928.

Liste des publications et communications

Publications acceptées

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 (***Article 3***)

Aráoz R, Herdman M, Rippka R, **Ledreux A**, Molgó J, Changeux J-P, Tandeau de Marsac N, Nghiêm H-O, 2008. A non-radioactive ligand-binding assay for detection of cyanobacterial anatoxins using Torpedo electrocyte membranes. *Toxicon* 52: 163–174 (Annexe 5)

Humpage AR, **Ledreux A**, Fanok S, Bernard C, Briand J-F, Eaglesham G, Papageorgiou J, Nicholson B, Steffensen D, 2007. Application of the neuroblastoma assay for paralytic shellfish poisons to neurotoxic freshwater cyanobacteria. Interlaboratory calibration and comparison with other methods of analysis. *Environ. Toxicol. Chem*. 6: 1512-1519 (***Article 1***)

Gugger M, Lenoir S, Berger C, **Ledreux A**, Druart JC, Humbert JF, Guette C, Bernard C, 2005. First identification in a French river of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* 45: 919-928 (Annexe 6)

Publication soumise

Ledreux A, Thomazeau S, Catherine A, Duval C, Yéprémian C, Marie A, Bernard C. First report of saxitoxins produced by the cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in a French recreational water body. Soumis à *Harmful Algae*. (***Article 2***)

Communications orales

Ledreux A. Les lignées cellulaires : un atout essentiel pour l'appréciation du risque pour l'homme et une alternative au bioessai sur souris pour la détection de neurotoxines marines émergentes - Cas des palytoxine-like. Journée des doctorants de l'AFSSA, Paris, Décembre 2007.

Ledreux A. Les lignées cellulaires : un outil pour la détection de neurotoxines marines émergentes et l'appréciation du risque pour l'homme. Journées du GIS Cyanobactéries, Saint Malo, Janvier 2008.

Ledreux A. Les lignées cellulaires : un outil pour la détection de neurotoxines marines et l'appréciation du risque pour l'homme. Colloque de l'ARET, Paris, Juin 2008.

Ledreux A, Krys S, Bernard C. Suitability of the Neuro-2a cell line for the detection of an additional family of neurotoxic phycotoxins: palytoxin and analogs. 13th International Conference on Harmful Algae, Hong Kong, Novembre 2008.

Ledreux A, Krys S, Bernard C. Functional cell-based assays as a tool for risk assessment associated with phyco- and cyanotoxins. 14th International Symposium on Toxicity Assessment, Metz, Septembre 2009.

Communications affichées

Ledreux A, Humpage AR, Fanok S, Bernard C. Application of the neuroblastoma assay for paralytic shellfish poisons to neurotoxic freshwater cyanobacteria: interlaboratory calibration and comparison with other methods of analysis. International Symposium on Algal Toxins, Trieste, Italie, Mai 2007.

Ledreux A, Krys S, Bernard C. In vitro methods for the detection of algal neurotoxins. International Congress of Zoology, Paris, Aout 2008.

Ledreux A, Krys S, Bernard C. In vitro methods for the detection of algal neurotoxins. 7th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Nantes, Juin 2009.

Liste des abréviations

α-BgTx: alpha-bungarotoxine
AC: adénylate cyclase
ACh : acétylcholine
AChBP : *Acetylcholine Binding Protein* (protéine liant l'acétylcholine)
AChE: acétylcholine estérase
AD : acide domoïque
AFSSA : Agence Française de Sécuritaire Sanitaire des Aliments
AlB : Alamar Blue
ALAT : alanine amino transférase
AMPA : α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
AOAC : *Association of Official Analytical Chemists*
ASAT : aspartate amino transférase
ATCC : *American Type Culture Collection*
AWQC : *Australian Water Quality Centre*
AZP : azaspiracide
BMAA : β-N-méthylamino-L-alanine
BSO : buthionine sulfoximine
CE_{50} : concentration efficace 50%
CGC : culture primaire de neurones en grain du cervelet
ChAT : choline acétyletransférase
CK : créatinine kinase
CSHFP : Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France
CSP : Code de Santé Publique
CTX : ciguatoxine
CYN : cylindrospermopsine
dBBr : dibromobimane
DCE : Directive Cadre sur l'Eau
DGS : Direction Générale de la Santé
DL_{50} : dose létale 50%
DMSO : diméthyle sulfoxide
DO : densité optique
E.C. : écart-type
EFSA : *European Food Safety Authority* (Agence européenne de sécurité des aliments)
ELISA : *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
GCS : γ-glutamylcystéine synthase
GLU : glutamate
GS : glutathion synthétase
GSH : glutathion
GTX : gonyautoxine
GYM : gymnodimine
HPLC-FD : chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par fluorescence
IAFM : Intoxication Amnésiante par Fruits de Mer
I_{fin} : mesure de fluorescence finale
I_{ini} : mesure de fluorescence initiale
INFM : Intoxication Neurologique par Fruits de Mer

i.p. : intrapéritonéale
IP3 : inositol triphosphate
IPFM : Intoxication Paralysante par Fruits de Mer
LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LDH : lactate déshydrogénase
LWTX : lyngbyatoxine
MCYST : microcystine
MeOH : méthanol
MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle
MS : *mass spectrometry*
MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium
MTX : maïtotoxine
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NRPS : polykétide synthétase non ribosomale
OA : acide okadaïque
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OSD : ostréocine-D
PBS : *phosphate buffered saline* (tampon phosphate salin)
PbTx : brévétoxine
PKS : polykétide synthétase
PLC : phospholipase C
PlTX : palytoxine
PMM : potentiel de membrane mitochondriale
PPase : protéine phosphatase
PTX : pecténotoxine
REACH : Règlement sur l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques
RmACh : récepteur muscarinique de l'acétylcholine
RN : rouge neutre
RnACh : récepteur nicotinique de l'acétylcholine
SEM : *standard error of the mean*
SPE : extraction sur phase solide
SPX : spirolide
SPX-dC : 13-desméthyle C spirolide
STX : saxitoxine
SVF : sérum de veau fœtal
tBHQ : tert-butyle-hydroquinone
TEF : *Toxicity Equivalent Factor* (facteur de toxicité relative)
US : unité souris
UV : ultra violet
VAChT : vésicule de transport de l'acétylcholine
WG : *work group* (groupe de travail)
YTX : yessotoxine

Avant-propos

La prolifération massive de phytoplancton[1] toxique en milieu marin, saumâtre ou dulçaquicole est un phénomène naturel dont la première description remonte à l'Antiquité (Hallegraeff, 1993).

Dans certaines conditions environnementales (température, salinité, richesse en nutriments, stabilité de la colonne d'eau, luminosité, etc.) et selon un processus biologique naturel, des microorganismes photosynthétiques ont, pour certains, la capacité de se développer en très grand nombre, jusqu'à plusieurs millions de cellules par litre d'eau (Hallegraeff, 1993). En milieu marin, ce sont des microalgues appartenant aux classes des dinoflagellés et des diatomées qui forment des efflorescences alors qu'en eau douce, ce sont les cyanobactéries, microorganismes procaryotes.

Ces dernières décennies, les phénomènes d'efflorescences algales ont augmenté en intensité, en fréquence et en distribution géographique (e.g. Araoz et al., 2009 ; Anderson, 2009). Quatre hypothèses sont avancées pour expliquer cet accroissement : (i) une augmentation des pressions anthropiques dans les zones côtières (e.g. l'aquaculture), (ii) les changements climatiques (Moore et al., 2008), (iii) le transport du phytoplancton toxique sous forme de cystes dans les ballasts des bateaux ou associés au transfert de stocks de coquillages d'un lieu à un autre (Hallegraeff et Bolch, 1991) et de façon concomitante, (iv) une attention accrue de la part des scientifiques.

Il est actuellement reconnu que la cause de ces efflorescences est souvent d'origine anthropique (e.g. rejets massifs de phosphates par les industries, ce qui conduit à une eutrophisation des milieux) ou encore liée à des changements de facteurs environnementaux (e.g. lumière, température, salinité, richesse en nutriments) (Heisler et al., 2008).

Cette biomasse présente un risque pour la faune aquatique et pour l'homme à plusieurs titres. D'une part, la quantité abondante de phytoplancton peut occasionner la raréfaction de l'oxygène dissous ou obstruer les branchies des poissons, provoquant la mort massive de poissons et d'invertébrés aquatiques (Fernández et al., 2003). D'autre part, certaines espèces ont la capacité de synthétiser des toxines. Les phycotoxines produites en milieu marin par les dinoflagellés et les diatomées sont connues depuis plus d'une quarantaine d'années tandis que les cyanotoxines produites en eau douce par les cyanobactéries ont été mises en évidence plus

[1] Le terme « phytoplancton » utilisé dans ce manuscrit se rapporte aux cyanobactéries, aux dinoflagellés et à certaines diatomées. Le terme de microalgues se réfère essentiellement aux espèces de phytoplancton d'origine marine.

récemment. Les phyco- et les cyanotoxines ont en commun de présenter plusieurs familles de toxines comptant chacune de nombreux analogues, dont certains restent encore inconnus. Elles représentent un risque pour l'homme du fait de leur possible bioaccumulation dans les coquillages en milieu marin, dans les poissons en eau douce. Les cyanotoxines représentent un risque direct pour l'homme via la consommation d'eau contaminée.

En marge des épisodes de toxicité attribués aux phycotoxines connues, ces dernières années montrent une expansion mondiale d'épisodes toxiques non expliqués (Van Dolah, 2000). Ces derniers sont dus à des toxines émergentes ou sont révélés par une toxicité chez l'animal sans que l'agent toxique responsable ait pu être mis en évidence par des analyses chimiques. Face à une alerte sanitaire liée à l'apparition d'une nouvelle toxicité, détectée par une réponse sur souris (i.p.[2]) au travers des contrôles officiels des toxines, il est très difficile d'extrapoler la toxicité observée chez l'animal au risque pour l'homme. Dans ce contexte, de nouvelles approches sont nécessaires. L'une d'elles s'appuie sur le développement de modèles expérimentaux sensibles à différents types de toxicité en vue de les utiliser comme outils de criblage en situation d'alerte toxique inconnue et ainsi améliorer notre capacité à évaluer un potentiel toxique pour l'homme.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le travail de thèse présenté dans ce manuscrit. L'objectif est de contribuer à l'évaluation du risque pour l'homme lié à des neurotoxines émergentes. Pour cela, des modèles cellulaires expérimentaux ont été sélectionnés et leurs réponses suite à l'exposition à des neurotoxines ont été caractérisées.

Le manuscrit s'organise en plusieurs chapitres. Une revue bibliographique, centrée sur les neurotoxines phytoplanctoniques, présente la diversité chimique et la diversité des cibles biologiques (de l'échelle cellulaire à l'organisme), puis les impacts sanitaires et les aspects réglementaires. Suite à ce contexte bibliographique, les objectifs et les questions scientifiques abordées lors ce travail de thèse sont précisés. Les deuxième, troisième et quatrième chapitres portent sur les trois familles de neurotoxines étudiées : les saxitoxines, les palytoxines et les spirolides. Le choix des saxitoxines et palytoxines s'appuie sur la connaissance de leurs cibles cellulaires et sur l'utilisation d'une seule lignée cellulaire pour les détecter. Les effets à l'échelle cellulaire sur cette même lignée des spirolides, neurotoxines émergentes, sont ensuite présentés. Enfin, la discussion générale associée aux perspectives a pour objectif de replacer l'ensemble des données acquises au cours de cette thèse dans un contexte plus

[2] i.p. : injection par voie intrapéritonéale

général de l'utilisation de modèles cellulaires pour contribuer à une meilleure connaissance des épisodes de toxicité.

Ce travail de thèse est basé sur les résultats obtenus au cours des trois années passées d'une part, dans l'équipe "Cyanobactéries, Cyanotoxines et Environnement" dirigée par le Professeur Cécile Bernard et appartenant à la FRE 3206 CNRS/MNHN "Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes" (MCAM) du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris et d'autre part, dans l'équipe "Toxines Naturelles" appartenant à l'unité "Caractérisation des Toxines" dirigée par le Dr Sophie Krys au Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur la Qualité des Aliments et des Procédés agro-alimentaires (LERQAP) de l'AFSSA de Maisons-Alfort. Cette double appartenance m'a permis d'aborder des questions scientifiques dans un contexte d'évaluation des risques pour l'homme liés aux toxines phytoplanctoniques.

Chapitre 1

Etat des connaissances

I. Généralités

Les exigences fortes des consommateurs en matière d'alimentation portent sur la qualité nutritionnelle des produits et sur l'absence de risque pour leur santé. Or il arrive que les aliments soient contaminés au cours de leur production ou de leur transformation par des substances potentiellement dangereuses pour la santé, résultant des activités anthropiques (e.g. pesticides, métaux lourds). Si les consommateurs sont globalement sensibilisés à cette problématique, il n'en va pas toujours de même pour les contaminants d'origine naturelle. En effet, de nombreux micro-organismes, mais également certaines plantes supérieures, peuvent produire des substances qui représentent un danger potentiel pour le consommateur. Ainsi, les mycotoxines et les toxines bactériennes, tout comme les phycotoxines et les cyanotoxines font partie de ces substances naturelles pouvant contaminer les aliments. Il faut toutefois noter que de nombreuses molécules d'origine naturelle et marine en particulier font l'objet de recherches afin de tester leur pouvoir bénéfique pour la santé humaine (Mayer et Hamann, 2005).

Ces toxines contaminant les aliments ont plusieurs points communs : (i) elles présentent une grande diversité du point de vue de leur structure chimique et de leurs effets et (ii) elles ont une incidence économique importante puisque du fait du caractère non prédictible de leur présence, elles doivent faire l'objet d'une surveillance systématique dans les aliments concernés.

II. Diversité des principales toxines phytoplanctoniques

La diversité des toxines phytoplanctoniques[3] sera ici abordée en fonction de leurs structures, de leurs voies de biosynthèse et de leurs cibles biologiques mais sans distinguer les organismes producteurs, cyanobactéries, dinoflagellés et diatomées.

II.1. Diversité chimique des toxines phytoplanctoniques

Les cyanotoxines et les phycotoxines présentent des structures chimiques très diverses[4] qui peuvent être des :

- alcaloïdes hydrosolubles (saxitoxines et anatoxine-a),

[3] Les toxines qui ne sont pas mentionnées dans le paragraphe II.3 sont présentées sous forme de tableaux en Annexe 1.

[4] Les structures chimiques des toxines sont illustrées dans le paragraphe II.3.

- peptides cycliques (microcystines et nodularines),
- analogues d'acides aminés (acide domoïque),
- imines cycliques (e.g. spirolides, gymnodimines, prorocentrolides),
- molécules polyhydroxylées complexes (palytoxine et analogues),
- polyéthers liposolubles (acide okadaïque et dinophysistoxines, azaspiracides, brévétoxines, ciguatoxines, pecténotoxines).

Bien que moins nombreuses que les métabolites secondaires de bactéries, les toxines de dinoflagellés n'ont pas d'équivalent en terme de complexité structurale (Rein et Borrone, 1999). Ainsi, les seules molécules d'origine naturelle possédant entre cinq et neuf cycles contigus sont les brévétoxines et les ciguatoxines produites respectivement par *Karenia* spp. et *Gambierdiscus* spp.

II.2. Voies de biosynthèse des toxines phytoplanctoniques

La diversité des structures chimiques des phyco- et cyanotoxines résulte de voies de biosynthèse complexes. Pour certaines toxines, les précurseurs chimiques et les gènes impliqués dans la biosynthèse ont été recherchés de façon approfondie (e.g. Méjean et al. (2009a) pour l'anatoxine-a et l'homoanatoxine-a ; Kellmann et al. (2008) pour les saxitoxines). La connaissance des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des toxines rend possible le développement de sondes moléculaires spécifiques qui peuvent être utilisées pour détecter les organismes toxiques dans l'environnement (Pearson et Neilan, 2008). Mais le fait que certaines cultures de microalgues ne puissent pas être axénisées, qu'elles puissent avoir des taux de croissance relativement faibles ou bien que la production de toxines soit limitée en quantité, ont largement contribué à freiner les avancées dans ce domaine. Toutefois, des expériences d'ajout de précurseurs comportant des isotopes radioactifs stables au milieu de culture des microalgues, couplées à des analyses en résonance magnétique nucléaire et en spectrométrie de masse, ont permis d'élucider les précurseurs de la biosynthèse de certaines toxines (e.g. Rein et Snyder, 2006). Par ailleurs, les apports récents des techniques de biologie moléculaire ont contribué à identifier certains composés impliqués dans la voie de biosynthèse des toxines.

II.2.1. Voies de biosynthèse des polykétides marins

La majorité des toxines de dinoflagellés sont des polykétides, c'est-à-dire des métabolites secondaires résultant de la condensation itérative (condensation de Claisen) de sous-unités acétyle et malonyle catalysées par des enzymes spécialisées : les polykétides synthases (PKS) (Rein et Snyder, 2006 ; Kalaitzis et al., 2009). Les PKS sont des complexes enzymatiques de grande taille arrangés en modules. Chaque module de PKS contient plusieurs domaines ayant chacun des fonctions définies de démarrage, d'élongation ou de terminaison.

La diversité structurale des polykétides de dinoflagellés s'explique notamment par le fait que les PKS utilisent un grand nombre de substrats différents (acétate, malonate, propionate, butyrate, etc.) et que des modifications peuvent survenir après élongation du squelette carboné (Rein et Borrone, 1999).

A l'heure actuelle, les gènes codant pour les PKS n'ont été que peu caractérisés en raison notamment de l'extrême complexité du génome des dinoflagellés (Kalaitzis et al., 2009).

II.2.2. Voies de biosynthèse non ribosomale des cyanotoxines

L'essentiel des métabolites secondaires toxiques produits par les cyanobactéries trouve son origine dans des voies de synthèse non-ribosomales (Welker et von Döhren, 2006). Ils sont produits à travers l'activité biochimique de complexes multi-enzymatiques de grande taille arrangés en structures modulaires et composés de NRPS (peptide synthétase non ribosomale) ou NRPS/PKS (Welker et von Döhren, 2006). Chaque étape de la biosynthèse requiert l'activité d'un module du complexe. Chaque module est composé de plusieurs domaines et contient au minimum (i) un domaine d'adénylation pour l'activation des acides aminés, (ii) un domaine de thiolation pour le transfert des formes intermédiaires du peptide formé et (iii) un domaine de condensation. Une diversité d'autres domaines a également été décrite (pour revue : Moffit et Neilan (2000) ; Welker et von Döhren (2006)). Les peptides produits sont de petite taille et peuvent présenter des groupements acyle, glycosyle, méthyle (Moffit et Neilan, 2000). Les peptides issus de ce mode de synthèse peuvent présenter des acides aminés atypiques absents des protéines conventionnelles. Ces particularités sont à l'origine de la diversité des molécules produites par ces voies de biosynthèse.

Récemment, le cluster de gènes impliqués dans la synthèse des saxitoxines a été mis en évidence chez la cyanobactérie *Cylindrospermopsis raciborskii* productrice de saxitoxines. Ce cluster compte environ 35000 paires de bases et code pour 26 protéines impliquées dans la biosynthèse des saxitoxines (Kellmann et al., 2008 ; Moustafa et al., 2009).

II.3. Diversité des cibles biologiques et des effets des toxines

A la diversité des structures chimiques s'ajoute la diversité des cibles biologiques et des effets des toxines à différentes échelles, depuis l'échelle cellulaire jusqu'aux effets toxiques chez l'homme. Une attention particulière sera portée aux effets des toxines sur les modèles cellulaires.

II.3.1. Toxines aux cibles biologiques connues

II.3.1.1. Toxines agissant sur des récepteurs membranaires

De façon globale, les toxines phytoplanctoniques agissant sur des récepteurs membranaires produisent des symptômes majeurs de type neurotoxique. Toutefois, il faut considérer l'exception des ciguatoxines, à l'origine de la ciguatera plus communément connue sous le nom de « maladie de la gratte » qui regroupe des symptômes de type neurologiques, cutanés et gastro-intestinaux.

II.3.1.1.1. Récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine

Deux familles de neurotoxines agissent sur les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine : les anatoxines et les gymnodimines. Une autre famille, les spirolides, est également supposée agir sur ces récepteurs.

- Les **anatoxines** (anatoxine-a et homoanatoxine-a ; Figure 1) sont des alcaloïdes produits en eau douce par plusieurs genres de cyanobactéries tels que *Anabaena*, *Aphanizomenon Oscillatoria* et *Phormidium*.

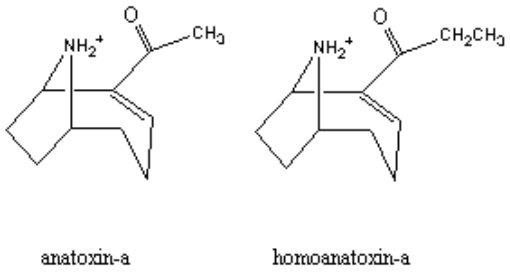


Figure 1 : Structure chimique de l'anatoxine-a et de l'homoanatoxine-a

Ces toxines sont distribuées sur toute la surface du globe (Osswald et al., 2007, Thomazeau et Bernard, soumis). Méjean et al. (2009b) ont récemment mis en évidence la présence

d'homoanatoxine-a chez la cyanobactérie benthique marine *Hydrocoleum lyngbyaceum* récoltée en Nouvelle-Calédonie.

Les anatoxines sont très solubles dans l'eau, ce qui les rend difficiles à extraire des milieux aqueux (Osswald et al., 2007).

Mode d'action des anatoxines

Au niveau des jonctions neuromusculaires, l'anatoxine-a et l'homoanatoxine-a se lient au récepteur nicotinique de l'ACh mais ne sont pas dégradées par l'acétylcholinestérase. Cela entraine une sur-stimulation du récepteur nicotinique qui reste de façon prolongée à l'état ouvert et perturbe la transmission de l'influx nerveux, provoquant ainsi la mort par arrêt respiratoire (Figure 2) (Aronstam et Wiktop, 1981 ; Aas et al., 1996).

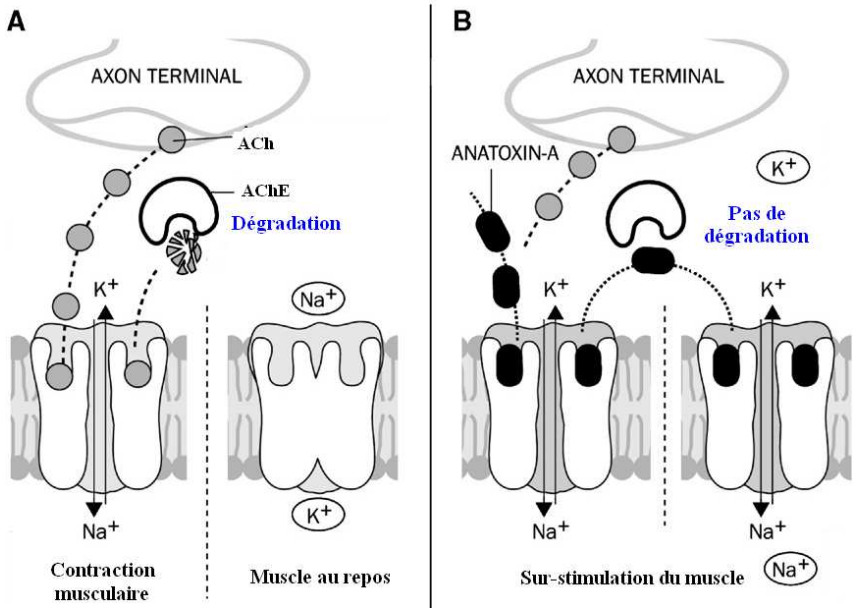


Figure 2 : Mode d'action de l'anatoxine-a au niveau d'une jonction neuromusculaire. A : état normal. B : en présence d'anatoxine-a. (d'après Carmichael, 1994).

Rao et al. (2002) ont mis en évidence des effets cytotoxiques (libération de la LDH, perte des fonctions mitochondriales) et apoptotiques (e.g. activation de la caspase 3) de l'anatoxine-a sur une lignée cellulaire de thymocytes de rat et des cellules Vero. Ces auteurs suggèrent que les effets apoptotiques de l'anatoxine-a sont liés aux espèces réactives de l'oxygène et à l'activation des caspases. Toutefois, les concentrations d'anatoxine-a appliquées aux cellules dans cette étude sont élevées, comprises entre 1 et 10 µg/mL.

Aspects toxicologiques chez l'animal

Les signes cliniques observés chez différentes espèces animales (souris, rat, oiseau, chien et veau) comprennent une diminution des mouvements, une respiration abdominale exagérée, une cyanose, des convulsions suivies par la mort. Les animaux intoxiqués ne présentent aucune lésion interne (James et al., 2007).

Les DL_{50} chez la souris par voie intrapéritonéale de l'anatoxine-a et l'homoanatoxine-a sont de l'ordre de 200 à 250 µg par kg de poids corporel, le temps de survie des animaux n'excédant pas 30 minutes (Osswald et al., 2007).

L'administration par voie orale sur 28 jours de doses sublétales d'anatoxine-a à des souris ne provoque aucune toxicité observée cliniquement (Fawell et al., 1999).

Effets toxiques chez l'homme

Aucune intoxication humaine liée à la présence d'anatoxine-a n'a été rapportée à ce jour.

▪ Les **gymnodimines** ont été mises en évidence en 1993 en Nouvelle-Zélande dans le cadre du plan de surveillance des coquillages. Elles appartiennent au groupe des imines cycliques. Ce sont des dérivés pentacycliques complexes comportant un motif imine cyclique (Figure 3), caractéristique de la famille des toxines à action rapide. Trois analogues (GYM-A, GYM-B et GYM-C) sont produits en milieu marin par le dinoflagellé *Karenia selliformis* (Miles et al., 2000 ; 2003).

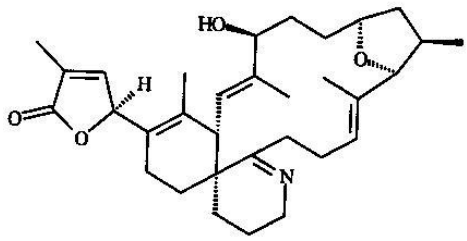


Figure 3 : Structure chimique de la gymnodimine-A

Mode d'action des gymnodimines

Kharrat et al. (2008) ont récemment mis en évidence que la GYM se liait aux récepteurs nicotiniques de l'ACh avec une forte affinité, ce qui explique sa neurotoxicité par voie i.p.

Aspects toxicologiques chez l'animal

Des études toxicologiques menées chez la souris ont montré que la DL_{50} par voir orale de la GYM est de 755 $\mu g.kg^{-1}$ tandis que la toxicité par voie intrapéritonéale est plus élevée (DL_{50}

de 96 µg.kg^{-1}) (Munday et al., 2004). Les symptômes des animaux injectés par voie i.p. incluent une hyperactivité, des sauts, une paralysie des pattes arrière, une dyspnée sévère. La mort survient rapidement, entre 6 et 15 minutes après l'injection, suggérant une atteinte neurologique.

Effets toxiques chez l'homme

Les gymnodimines ont été mises en évidence dans des palourdes en Tunisie (Biré et al., 2002) et sur les cotes européennes et nord-américaines (Molgo et al., 2007) sans qu'aucun cas d'intoxication humaine n'ait été rapportée suite à l'ingestion de coquillages (Toyofuku, 2006).

▪ Les **spirolides** ont été identifiés récemment comme le troisième groupe de toxines à action rapide agissant au niveau des récepteurs nicotiniques à l'ACh. Les spirolides font l'objet d'une revue bibliographique détaillée dans le Chapitre 4.

II.3.1.1.2. Canal sodium voltage-dépendant

Trois familles de toxines phytoplanctoniques agissent au niveau de la sous-unité α du canal sodium voltage-dépendant : les saxitoxines (STXs), les brévétoxines (PbTXs) et les ciguatoxines (CTXs).

▪ La famille des saxitoxines (STXs)[5] comprend 27 analogues (Llewellyn, 2006) dont la structure de base est constituée de trois cycles : pyrimidine (A), imidazol (B) et pyrrole (C) (Figure 4).

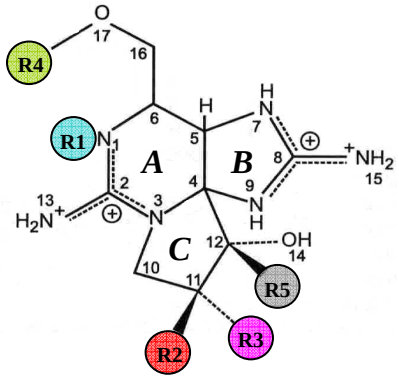
La position de cinq substituants sur les différentes positions variables de la molécule permet de classer les saxitoxines en quatre grands groupes, en fonction de leur structure chimique :

- les saxitoxines non sulfatées (STX et NéoSTX),
- les gonyautoxines (GTXs) sulfatées une fois en R2 / R3 ou R4,
- les toxines C, molécules sulfatées deux fois en R2 / R3 et R4,
- les lyngbyatoxines (LWTXs) isolées de la cyanobactérie *Lyngbya wollei* aux Etats-Unis. Les LWTX 1, 2, 3, 5 et 6 sont toutes des saxitoxines désaminées en R4. La LWTX 4 est une décarbamoyl-déoxy-saxitoxine (Onodera et al., 1997).

Pour certains analogues, des dérivés décarbamoylés (dcSTX et dcGTXs) ont également été décrits (Llewellyn, 2006).

[5] Le terme saxitoxines (STXs) utilisé dans le mémoire comprend la saxitoxine et l'ensemble des molécules dérivées.

En 2002, Molica et al. ont mis en évidence par analyse HPLC-FD[6] l'existence d'un nouvel analogue de saxitoxine isolé d'une souche brésilienne de la cyanobactérie *Cylindrospermopsis raciborskii*.



Analogue	R1	R2	R3	R4	R5	Toxicité spécifique ($US^{7}.\mu mole^{-1}$)	Pouvoir relatif par rapport à STX
STX	H	H	H	$CONH_2$	OH	2483	1
NeoSTX	OH	H	H	$CONH_2$	OH	2295	0,9
GTX1	OH	H	OSO_3^-	$CONH_2$	OH	2468	1
GTX2	H	H	OSO_3^-	$CONH_2$	OH	892	0,4
GTX3	H	OSO_3^-	H	$CONH_2$	OH	1584	0,6
GTX4	OH	OSO_3^-	H	$CONH_2$	OH	1803	0,7
GTX5	H	H	H	$CONHSO_3^-$	OH	160	0,1
GTX6	OH	H	H	$CONHSO_3^-$	OH	nd	-
C1	H	H	OSO_3^-	$CONHSO_3^-$	OH	15	0
C2	H	OSO_3^-	H	$CONHSO_3^-$	OH	239	0,1
C3	OH	H	OSO_3^-	$CONHSO_3^-$	OH	33	0,01
C4	OH	OSO_3^-	H	$CONHSO_3^-$	OH	143	0,1
LWTX1	H	H	OSO_3^-	$COCH_3$	H	<10	0
LWTX2	H	H	OSO_3^-	$COCH_3$	OH	178	0,07
LWTX3	H	OSO_3^-	H	$COCH_3$	OH	52	0,02
LWTX4	H	H	H	H	H	<10	0
LWTX5	H	H	H	$COCH_3$	OH	346	0,1
LWTX6	H	H	H	$COCH_3$	H	<10	0
dcSTX	H	H	H	OH	OH	1274	0,5
dcNeoSTX	OH	H	H	OH	OH	nd	-
dcGTX1	OH	H	OSO_3^-	OH	OH	nd	-
dcGTX2	H	H	OSO_3^-	OH	OH	382	0,2
dcGTX3	H	OSO_3^-	H	OH	OH	935	0,4
dcGTX4	OH	OSO_3^-	H	OH	OH	nd	-
GC1	H	H	OSO_3^-	hydroxybenzoate	OH	nd	-
GC2	H	OSO_3^-	H	hydroxybenzoate	OH	nd	-
GC3	H	H	H	hydroxybenzoate	OH	nd	-

Figure 4 : Structure chimique des analogues de saxitoxines et toxicité chez la souris par voie i.p. (d'après Oshima, 1995 ; Onodera et al., 1997). nd : non déterminé.

[6] HPLC – FD : chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par fluorescence.
[7] Une unité souris (US) correspond à la quantité de toxine qui tue une souris de 20 g en 15 minutes.

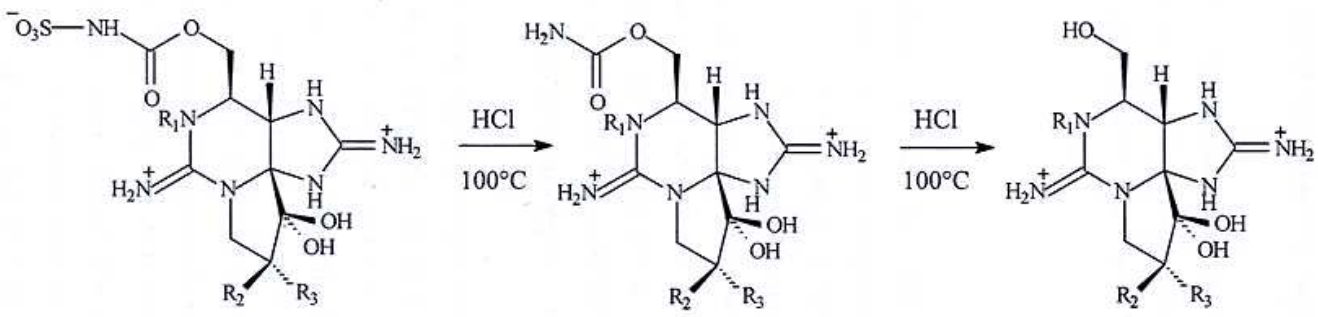
En milieu marin, Negri et al. (2003) rapportent avoir isolé du dinoflagellé *Gymnodinium catenatum* trois nouveaux analogues de saxitoxines : GC3 qui dérive de la dcSTX et contient un groupement hydroxybenzoate tandis que GC1 et GC2 sont des dérivés sulfatés de la GC3 (Figure 4).

A ce jour, une dizaine d'espèces de dinoflagellés marins et onze espèces de cyanobactéries dulçaquicoles ont été rapportés comme producteurs de STXs (Annexe 2).

Propriétés chimiques des saxitoxines

Les saxitoxines sont des molécules de nature non protéique de faible poids moléculaire (de 258 à 491 Da). Elles sont solubles dans l'eau, partiellement solubles dans l'éthanol, le méthanol et l'acide acétique glacial mais insolubles dans les solvants organiques (Ledoux, 1991).

Les STXs sont instables et facilement oxydables à pH alcalin. A l'inverse, elles sont stables en milieu légèrement acide, mais à des degrés divers. En effet, Alfonso et al. (1994) ont montré que la saxitoxine est plus stable en solution acide que la néosaxitoxine et peut donc être conservée plus longtemps sans être dégradée. L'hydrolyse acide (Figure 5) est un phénomène dont il faut tenir compte (Ledoux, 1991) car elle induit des conversions chimiques qui peuvent modifier le profil toxinique et de ce fait influer sur la toxicité des extraits de coquillages en augmentant leur potentiel toxique. De plus, ce phénomène peut intervenir lors des procédures d'extraction (Vale et al., 2008).



	R1	R2	R3			R1	R2	R3			R1	R2	R3
B1	-H	-H	-H	→	**STX**	-H	-H	-H	→	**dcSTX**	-H	-H	-H
B2	-OH	-H	-H	→	**NEO**	-OH	-H	-H	→	**dcNEO**	-OH	-H	-H
C1	-H	$-OSO_3^-$	-H	→	**GTX2**	-H	$-OSO_3^-$	-H					
C2	-H	-H	$-OSO_3^-$	→	**GTX3**	-H	-H	$-OSO_3^-$					
C3	-OH	$-OSO_3^-$	-H	→	**GTX1**	-OH	$-OSO_3^-$	-H					
C4	-OH	-H	$-OSO_3^-$	→	**GTX4**	-OH	-H	$-OSO_3^-$					

Figure 5 : Transformation chimique des toxines paralysantes par hydrolyse acide (d'après Ledoux, 1991).

En milieu naturel, les STXs peuvent persister dans l'eau douce pendant trois mois (Negri et al., 1997). De plus, certains analogues de cette famille peuvent faire l'objet de transformations chimiques telles que la conversion dans le milieu naturel des toxines C en analogues plus toxiques comme les dcGTXs (Jones et Negri, 1997).

Différents procédés thermiques testés afin d'étudier la résistance des STXs à la température ont mis en évidence que ces toxines sont relativement thermorésistantes (e.g. Nagashima et al., 1991 ; Vieites et al., 1999).

Mode d'action des saxitoxines

Les STXs agissent au niveau du canal sodium voltage-dépendant (Encart 1).

Encart 1 - Le canal sodium voltage-dépendant

Il est présent à la surface des cellules excitables. Il s'agit d'une protéine transmembranaire comportant une sous unité α et deux sous unités auxiliaires β1 et β2 (Catterall, 2000). Cette protéine transmembranaire joue un rôle important dans le fonctionnement cellulaire puisque c'est par son intermédiaire que transitent les ions sodium impliqués dans de nombreux processus physiologiques dont la genèse des potentiels d'action. La sous-unité α forme un pore dans la membrane plasmique permettant l'entrée des ions sodium dans la cellule.

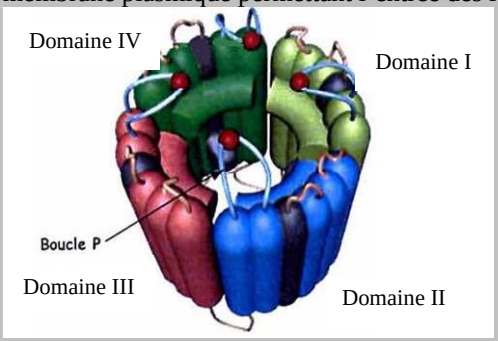


Figure A : Structure de la sous-unité α du canal sodium

Cette entrée génère un potentiel d'action qui se propage le long des axones et des terminaisons nerveuses. Cette impulsion nerveuse crée un courant Ca^{2+} entrant, au niveau de la terminaison nerveuse présynaptique, ce qui a pour conséquence la libération de l'acétylcholine. La libération de ce neurotransmetteur au niveau de la jonction musculaire permet de générer et d'entretenir le phénomène de contraction musculaire au niveau de la plaque motrice. Entre deux cellules nerveuses, la libération de l'acétylcholine permet la propagation de l'influx nerveux le long des axones.

La sous-unité α du canal sodium comprend quatre domaines homologues (I à IV) (Figure A), chacun comportant six segments transmembranaires (S1 à S6) reliés entre eux par des boucles intra et extra cellulaires (Cestèle et Catterall, 2000).

Les boucles extracellulaires (boucles P) reliant les segments S5 et S6 forment le pore du canal (Figure B). La nature des acides aminés de ces boucles joueraient un rôle important au niveau de la conductance des ions et de la sélectivité du canal (Terlau et al., 1991; Catterall, 2000).

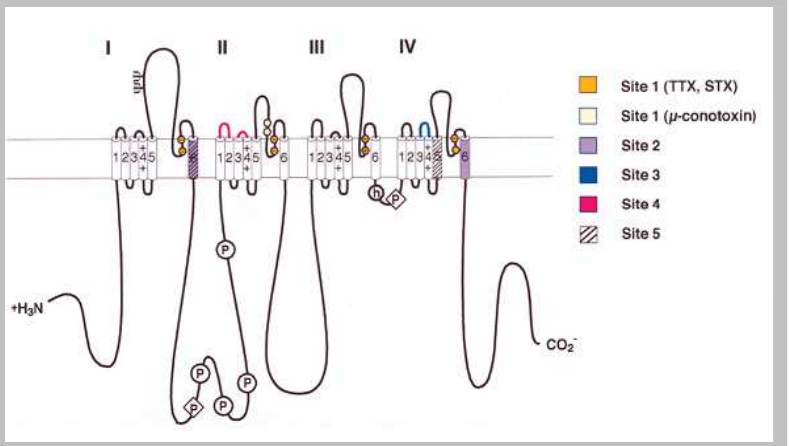


Figure B : Localisation des sites récepteurs aux neurotoxines sur la sous-unité α du canal sodium (Cestèle et Catterall, 2000)

Les saxitoxines provoquent une paralysie du système neuromusculaire. En se fixant au site 1 des canaux sodium voltage-dépendants, elles inhibent l'augmentation de la perméabilité membranaire aux ions sodium (Catterall, 1980). Selon Puiseux-Dao et al. (2001), les STXs se fixent de manière réversible avec une affinité de l'ordre du nanomolaire au site 1 du canal sodium. L'inhibition du courant sodium résulte d'un blocage « tout ou rien », les canaux non touchés par les toxines s'ouvrent et se ferment normalement.

La STX forme des interactions faibles (de type liaisons hydrogène et interactions électrostatiques) avec des acides aminés de la boucle P entre les segments S5 et S6 (Catterall et al., 2007). Le groupe 7, 8, 9-guanidium et les deux hydroxyles en C12 sur la toxine seraient les principaux sites impliqués dans la formation du complexe toxine/récepteur (Lippkind et Fozzard, 1994 ; Llewellyn, 2006) (Figure 6).

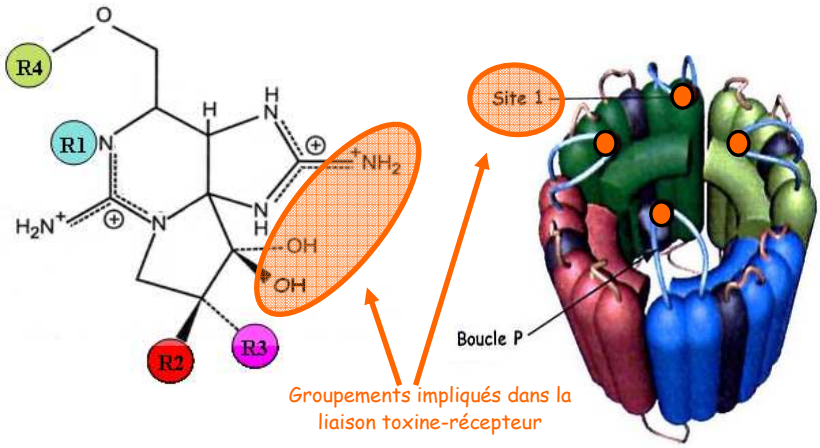


Figure 6 : Principaux sites impliqués dans la formation du complexe toxine / récepteur

Le site récepteur est constitué de deux anneaux d'acides aminés localisés dans le segment ré-entrant entre les segments S5 et S6 (*cf.* Figure B de l'Encart 1), sur la partie N-terminale du segment transmembranaire S6, dans chacun des quatre domaines de la sous-unité α (Cestèle et Catterall, 2000). Le premier anneau ayant un rôle dans la liaison de la toxine sur le récepteur comprend les résidus d'acides aminés Glu387 dans le domaine I, Glu945 dans le domaine II, Asp1426 dans le domaine III et Asp1717 dans le domaine IV. Le second anneau est formé par les résidus Asp384 et Glu942 dans les domaines I et II, par le résidu basique Lys1422 et par le résidu neutre Ala1714 dans le domaine IV.

Les effets neurotoxiques *in vivo* et *in vitro* des STXs sont principalement attribués à leur action sur les canaux sodiques. Mais il a été montré que les STXs pourraient agir :

- au niveau des canaux calciques et potassiques mais pour des concentrations de l'ordre du micromolaire, soit mille fois plus élevées que pour les canaux sodiques (Wang et al., 2003 ; Su et al., 2004).
- en se liant avec une forte affinité à la saxiphiline, protéine soluble de la famille des transferrines présente dans les fluides de nombreux invertébrés (Llewellyn et Doyle, 2001).

Aspects toxicologiques chez l'animal

C'est par la voie intraveineuse que la STX est la plus toxique chez la souris avec une DL_{50} de 3,4 $\mu g.kg^{-1}$ (Wiberg et Stephenson, 1960). Chez le lapin ou le chat, pour des doses de 4 à 5 $\mu g.kg^{-1}$, les animaux injectés présentent une grave détresse respiratoire conduisant à la mort si aucune assistance n'est prodiguée. Pour des doses plus faibles, la respiration redevient normale spontanément. Selon Mons et al. (1998), il est généralement considéré que la STX n'a pas d'effet direct sur le système cardiovasculaire. En revanche, des doses faibles (1 à 2 $\mu g.kg^{-1}$) chez le lapin ou le chat provoquent un affaiblissement rapide et des contractions musculaires.

Chez la souris, la DL_{50} pour la STX administrée par voie orale est de l'ordre de 260 $\mu g.kg^{-1}$.
Les DL_{50} pour d'autres espèces animales sont présentées dans le Tableau I.

Tableau I : DL_{50} par voie orale de la STX chez différentes espèces animales (d'après Van Egmond et al., 1993)

Espèces animales	DL_{50} ($\mu g.kg^{-1}$)
Singe	277-800
Souris	260-263
Chat	254-280
Rat	192-212
Lapin	180-200
Chien	180-200
Cochon d'Inde	128-135
Pigeon	91-100

Il est à noter que la sensibilité inter-espèce présente des variations assez faibles.
A ce jour, aucune étude ne permet de comparer les toxicités des différents analogues par voie orale chez la souris.

La DL_{50} de la STX chez la souris par voie intrapéritonéale est de l'ordre de 10 $\mu g.kg^{-1}$, ce qui fait de la STX une des plus puissantes phycotoxines (*cf.* Annexe 3). Sur la base de cette valeur de 10 $\mu g.kg^{-1}$, une unité souris (US) correspond à 0,2 µg STX.

Vale et al. (2008) ont déterminé la toxicité relative de plusieurs standards certifiés disponibles commercialement. Sur la base de ces travaux et des études antérieures basées sur l'utilisation de standards certifiés, des facteurs de toxicités relatives (TEF : Toxicity Equivalent Factor) ont récemment été proposées pour les STXs (Tableau II) qui équivalent à ceux déterminés par Oshima (1995).

Tableau II : Facteurs de toxicité relative (TEF : Toxicity Equivalency Factor) sur la souris des standards certifiés de saxitoxines (d'après Oshima, 1995 et EFSA, 2009a).

Analogue	Facteur de toxicité relative (Oshima, 1995)	Facteur de toxicité relative (EFSA, 2009a)
STX	1	1
NEO	0,9	1
GTX1	1	1
GTX2	0,4	0,4
GTX3	0,6	0,6
GTX4	0,7	0,7
GTX5	0,1	0,1
GTX6	-	0,1
C2	0,1	0,1
C4	0,1	0,1
dcSTX	0,5	1
dcNEO	-	0,4
dcGTX2	0,2	0,2
dcGTX3	0,4	0,4
11-hydroxy-STX	-	0,3

Seule la toxicité de dcSTX semble avoir été sous-estimée dans l'étude d'Oshima.

Effets toxiques chez l'homme

La consommation de fruits de mer contaminés par les STXs est à l'origine de l'Intoxication Paralysante par Fruits de Mer (IPFM). Ce type d'intoxication par les coquillages est considéré comme la plus anciennement connue (Marcaillou-Le Baut et al., 2001). Depuis les années 1940, des cas d'intoxications ont été rapportés dans différents pays (e.g. Canada, Chili, Etats-Unis, Japon, Norvège, etc.).

La consommation de coquillages marins contenant des toxines paralysantes provoque, entre 5 et 30 minutes après l'ingestion, l'apparition de symptômes variables selon la sensibilité

individuelle et la dose ingérée. On distingue trois degrés d'intoxication en fonction de la gravité des symptômes observés (Ledoux, 1991, Tréguer, 1998) :

- bénin : paresthésie buccale pouvant s'étendre au visage et au cou, puis aux extrémités des doigts et des orteils ; céphalées, nausées et vomissements parfois observés ;
- sévère : paresthésie s'étendant aux bras et aux jambes, incohérence de la parole, sensation de flotter dans les airs, difficultés respiratoires et sensations d'étouffement ;
- extrême : sensation de choc, paralysie motrice et respiratoire pouvant conduire à la mort sans assistance respiratoire.

Le premier cas d'IPFM aurait eu lieu en 1689 en France (Halstead, 1965) ; néanmoins, selon Tréguer (1993), les symptômes observés à l'époque ne sont pas totalement en accord avec le tableau clinique caractéristique des toxines paralysantes.

Les données épidémiologiques concernant les IPFM sont à considérer avec une grande prudence puisqu'elles dépendent largement de la surveillance sanitaire et des rapports effectués par des médecins confrontés à des patients souffrant d'une IPFM. De plus, un certain nombre de biais sont introduits dans les données épidémiologiques. Par exemple, des personnes souffrant d'une intoxication modérée ne rapporteront pas nécessairement leur intoxication aux autorités sanitaires et donc n'apparaîtront pas dans les statistiques.

Les doses toxiques peuvent être exprimées en plusieurs unités : ($US.g^{-1}$, $\mu g.g^{-1}$ ou $\mu g.mL^{-1}$). Le Tableau III ci-après résume les informations concernant les doses toxiques minimales et les doses létales minimum chez l'homme mais elles ne permettent pas de conclure de façon définitive. Une synthèse complète des données obtenues après plusieurs cas d'intoxications est disponible (EFSA, 2009a).

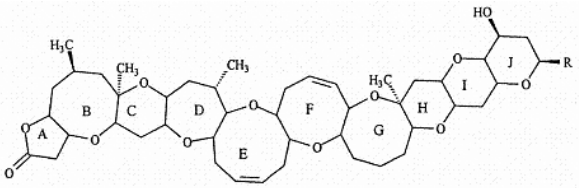
Tableau III : Doses toxiques (en µg) de toxines paralysantes (d'après Gessner, 2000)

	Alaska	Guatemala	Angleterre	Canada
Nombre de cas recensés	n = 54	n = 5	n = 71	n = 37
Dose toxique minimum	13		558	160
Dose létale minimum	5863	2046		
Dose non létale maximum	123457		5580	8272
Dose maximum asymptomatique	36580		5580	3000

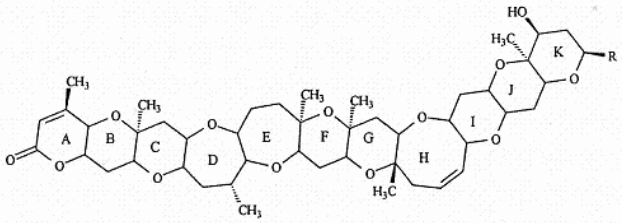
Une voie possible de métabolisation des STXs chez l'homme a été mise en évidence par Garcia et al. (2004 et 2009). Les STXs seraient métabolisées par une glucuronosyl transférase (enzyme de la phase II de la voie de détoxification) en vue d'être éliminées par voie rénale.

▪ Les **brévétoxines** (PbTXs), produites en milieu marin par le dinoflagellé sans thèque *Karenia brevis*, sont des composés polycycliques comportant un groupement lactone au niveau du cycle A et plusieurs cycles éthers organisés en une chaine hydrocarbonée (Figure 7).

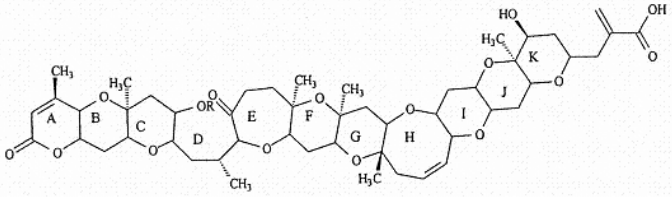
Brévétoxines de type 1 (ou A)



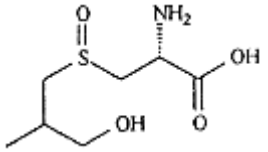
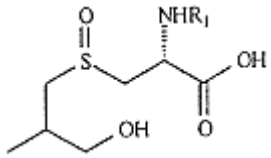
Brévétoxines de type 2 (ou B)



Brévétoxine B3



R = $CH_3(CH_2)_{12}CO$; $CH_3(CH_2)_{14}CO$

Brévétoxines de type 1	R (cycle J)	Autre
PbTx-1 (Brévétoxine A, GB-1)	CH_2-C(=CH_2)CHO	
PbTx-7	CH_2-C(=CH_2)CH_2OH	
PbTx-10	CH_2-C(-CH_3)CH_2OH	
Brévétoxines de type 2	**R (cycle K)**	
PbTx-2 (Brévétoxine B, GB-2)	CH_2-C(=CH_2)CHO	
PbTx-3 (GB-3)	CH_2-C(=CH_2)CH_2OH	
PbTx-5 (GB-5)	CH_2-C(=CH_2)CHO	37-$COCH_3$
PbTx-6 (GB-6)	CH_2-C(=CH_2)CHO	27,28-B-époxide
PbTx-8 (Brévétoxine C, GB-8)	CH_2-C(=CH_2)CHO	
PbTx-9	CH_2-CO-CH_2Cl	
PbTx-10	CH_2-C(-CH_3)CH_2OH	
BTX-B1	CH_2-C(CH_2)CO-NH-$(CH_2)_2$-SO_3Na	
BTX-B2		
BTX-B4		

R_1 = $CH_3(CH_2)_{12}CO$; $CH_3(CH_2)_{14}CO$

Figure 7 : Structure chimique des brévétoxines

Elles se répartissent en deux grands motifs structuraux : les brévétoxines de type A qui possèdent 10 cycles contigus, et les brévétoxines de type B qui en possèdent 11 (Baden et Adams, 2000).

Leur répartition géographique inclut la Floride, la Caroline du Nord, le Golfe du Mexique, le Japon, la Nouvelle Zélande.

Les PbTXs ont été mises en évidence dans de nombreuses espèces de coquillages et différents métabolites de PbTXs ont été identifiés par spectrométrie de masse en tandem (e.g. Plakas et al., 2002 ; Dechraoui Bottein et al., 2010).

Mode d'action des brévétoxines

Les PbTXs agissent au niveau du site 5 de la sous unité α du canal sodium voltage-dépendant. Les brévétoxines activent le canal sodium. La fixation des brévétoxines sur le site 5 provoque divers effets en cascade et contribue notamment à l'augmentation de la perméabilité membranaire aux ions Na^+ tout en produisant un déplacement de l'activation du courant sodium vers des potentiels de membrane plus négatifs (Sheridan et Adler, 1989). Parallèlement à cette augmentation de la perméabilité membranaire au repos, les brévétoxines suppriment une partie de l'inactivation du courant sodium, ce qui potentialise leurs effets (Puiseux-Dao et al., 2001). Les brévétoxines provoquent une augmentation de l'excitabilité membranaire, ce qui a des conséquences sur la libération de neurotransmetteurs et donc sur le phénomène de contraction musculaire. Les brévétoxines sont également responsables de l'augmentation du volume cellulaire des nœuds de Ranvier, des fibres nerveuses myélinisées et des terminaisons motrices innervant le muscle squelettique (Mattéi et al., 1999). Cette augmentation de volume est due à un influx d'eau dans les cellules nerveuses visant à compenser le déséquilibre osmotique créé par l'entrée massive d'ions Na^+ dans les cellules.

Aspects toxicologiques chez l'animal

Chez la souris, en fonction des analogues, la DL_{50} par voie i.p. est comprise entre 170 $\mu g.kg^{-1}$ et 400 $\mu g.kg^{-1}$ (Plakas et Dickey, 2009), l'analogue le plus toxique étant PbTx-3. Chez le rat ou la souris, les PbTxs sont rapidement absorbées et distribuées dans tous les organes après ingestion (Cattet et Geraci, 1993), injection intraveineuse (Poli et al., 1990) ou instillation intratrachéale (Tibetts et al., 2006). Indépendamment de la voie d'exposition, les muscles, le tractus gastro-intestinal et le foie sont les organes accumulant le plus de toxines.

Des expériences menées chez des souris ont montré que la PbTX-3, principal analogue responsable des troubles respiratoires liés à l'exposition par voie aérienne lors de l'épisode de

Floride, et ses métabolites pouvaient être transportés, depuis les voies respiratoires, par voie placentaire jusqu'au fœtus (Benson et al., 2006) mais les conséquences sur le développement du fœtus restent à établir.

Les brévétoxines ont également un potentiel ichtyotoxique avéré (Landsberg, 2002). Elles ont par ailleurs causé la mort d'organismes marins tels que des lamantins ou des dauphins, parfois en grand nombre (e.g. 150 lamantins morts sur les cotes de Floride en 1996 suite à une efflorescence toxique de *Karenia brevis*, Bossart et al., 1998).

Effets toxiques chez l'homme

Les brévétoxines sont responsables chez l'homme de deux types d'intoxications, en fonction de la voie d'exposition.

D'une part, la consommation de coquillages contaminés est à l'origine de l'Intoxication Neurologique par Fruits de Mer (INFM, NSP : Neurotoxic Shellfish Poisoning). Les symptômes apparaissent entre 15 minutes et 18 heures après ingestion des coquillages contaminés, selon la dose ingérée et la sensibilité de l'individu. Il s'agit de troubles neurologiques (picotements et engourdissements autour de la bouche, vertiges, malaises, frissons, inversion des sensations chaud/froid et céphalées) accompagnés souvent de troubles gastro-intestinaux (crampes abdominales, nausées, diarrhées et vomissements). Malgré la sévérité des symptômes, aucun décès n'a été rapporté à ce jour. Les patients se rétablissent complètement 24 à 48 heures après la consommation de fruits de mer contaminés (Marcaillou-Le Baut et al., 2001).

D'autre part, les PbTXs sont responsables de problèmes respiratoires survenant après exposition à des aérosols contenant les toxines créés en bordure de mer par les embruns (Backer et al., 2003 ; 2005).

- Les **ciguatoxines** sont produites par le dinoflagellé benthique *Gambierdiscus* spp. et sont bioaccumulées *via* la chaine trophique dans des poissons des zones tropicales (Antilles, Océan Indien et Océan Pacifique). Les CTXs sont des polyéthers lipophiles dont la structure de base diffère selon l'origine géographique (Figure 8).

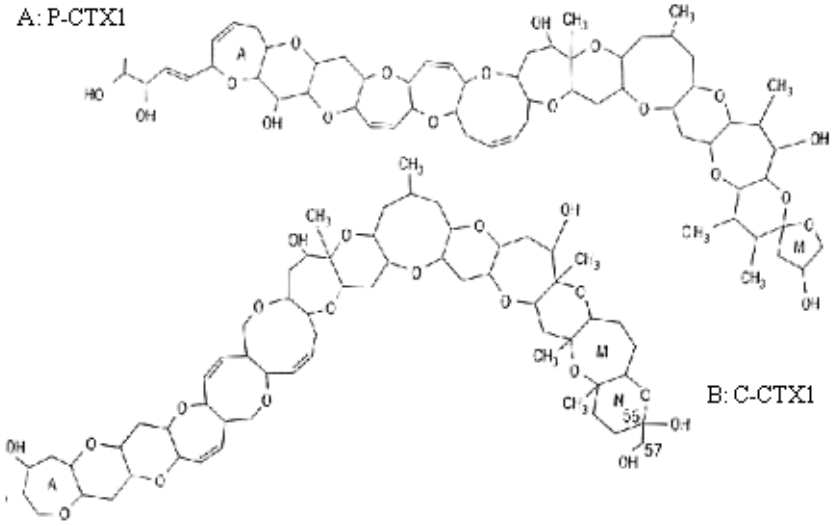


Figure 8 : Structure des ciguatoxines
(A : isolée de poissons de l'Océan Pacifique, B : isolée de poissons des Caraïbes)

Mode d'action des ciguatoxines

Les ciguatoxines, tout comme les brévétoxines, agissent au niveau du site 5 de la sous unité α du canal sodium voltage-dépendant (Lombet et al., 1987). Un grand nombre d'études a également mis en évidence d'autres effets pharmacologiques des CTXs (pour revue, voir Dickey et Plakas, 2009).

Aspects toxicologiques chez l'animal

L'injection par voie i.p. de P-CTX1 à des souris provoque l'apparition de symptômes caractéristiques incluant hypothermie, piloérection, hyper salivation, dyspnée. La mort survient rapidement par arrêt respiratoire. La DL_{50} pour la P-CTX1 est de 0,25 $\mu g.kg^{-1}$ (Lewis et al., 1991).

Après administration par voie i.p. ou voie orale de P-CTX1 (0,7 $\mu g.kg^{-1}$) à des souris, des changements visibles en microscopie optique et électronique affectent notamment le cœur, le tissu pulmonaire, les glandes surrénales, le système nerveux autonome et le foie (Terao et al., 1991).

Effets toxiques chez l'homme

Les CTXs sont à l'origine de la ciguatera, plus communément appelée « maladie de la gratte ». Entre 20000 et 60000 personnes sont affectées chaque année par cette pathologie spécifique des régions concernées où le poisson est l'un des aliments de base (Lehane et

Lewis, 2000). La ciguatera est caractérisée par un ensemble de symptômes gastro-intestinaux, neurologiques et cardiologiques (Dickey et Plakas, 2009). Selon Kumar-Roine et al. (2008), le large spectre de symptômes provoqué par l'ingestion de poissons ciguatériques ne peut pas être expliqué uniquement par la liaison des CTXs sur le canal sodium voltage-dépendant.

II.3.1.1.3. La pompe Na^+,K^+-ATPase

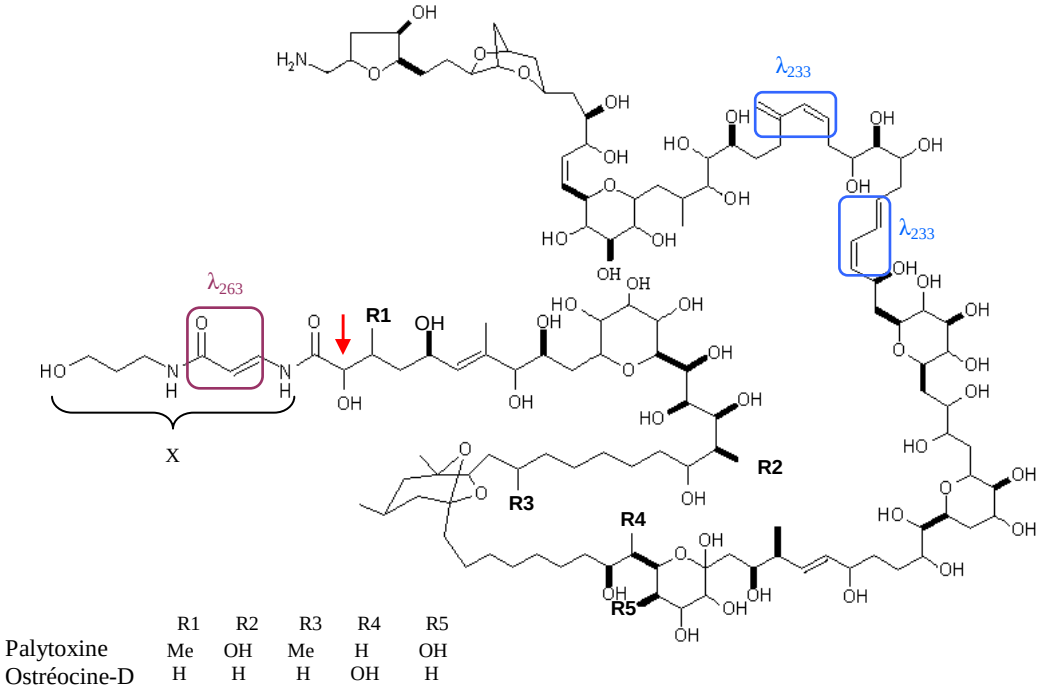
Historiquement, la **palytoxine** (PlTX) *stricto sensu* a été découverte, isolée et purifiée pour la première fois à partir d'un cœlentéré (zoanthaire) hawaïen du genre *Palythoa, Palythoa toxica* (Moore et Scheuer, 1971). Depuis, elle a été mise en évidence chez de nombreuses espèces de cœlentérés marins des genres *Palythoa (*Figure 9*)* et *Zoanthus* présents dans la ceinture tropicale et subtropicale (Oku et al., 2004 ; Lenoir, 2006).

Palythoa toxica | *Palythoa vestitus* | *Palythoa tuberculosa*

Figure 9 : Anémones coloniales du genre *Palythoa*

Uemura et al. (1985) sont les premiers à émettre l'hypothèse selon laquelle la PlTX serait produite par un des microorganismes symbiotiques des cœlentérés.

C'est à la suite d'un cas d'intoxication fatale survenue à Madagascar en 1994 que des microorganismes marins ont été suspectés d'être responsables de la production de composés analogues à la PlTX (Onuma et al., 1999). Des analyses des restes du poisson ayant provoqué l'intoxication mortelle ont mis en évidence la présence du dinoflagellé benthique *Ostreopsis siamensis*. L'ostréocine-D, analogue de la PlTX a par la suite été isolée d'*Ostreopsis siamensis* (Usami et al., 1995), ne différant de la PlTX que par cinq groupements (*cf*. Figure 10) (Louzao et al., 2008).



	R1	R2	R3	R4	R5
Palytoxine	Me	OH	Me	H	OH
Ostréocine-D	H	H	H	OH	H

Figure 10 : Structure de la palytoxine isolée de *Palythoa toxica* dans le Pacifique (Katikou, 2007) et de l'ostréocine-D isolée d'*Ostreopsis siamensis* (Ukena et al., 2001).
La flèche rouge indique le carbone 8. Les chromophores UV sont mis en évidence. Une diminution de la longueur du segment X provoque une perte d'affinité de la toxine pour son récepteur (selon Tosteson et al., 1995).

Depuis, d'autres analogues de PlTX ont été mis en évidence dans plusieurs espèces d'*Ostreopsis* (O. *lenticularis, O. ovata* et *O. mascarenensis*) dans diverses régions tropicales et tempérées. Considéré initialement comme un genre épiphytique présent en zone tropicale et subtropicale, *Ostreopsis* a gagné le pourtour méditerranéenen en étant transporté dans les eaux de ballast et s'est installé en Méditerranée, vraisemblablement en raison de l'augmentation des températures (Lejeusne et al., 2009). Selon Shears et Ross (2009), les efflorescences d'*Ostreopsis* sont globalement assez éphémères mais dans des zones calmes, protégées des vagues et sujettes à une stratification thermique, elles peuvent perdurer.

Actuellement, une dizaine d'espèces d'*Ostreopsis* sont répertoriés. Pour l'heure, 4 espèces sont connues comme productrices potentielles de palytoxines (Tableau IV).

Tableau IV : Espèces d'*Ostreopsis* produisant des analogues de PlTX et répartition mondiale

Dinoflagellé producteur	Toxine	Distribution géographique	Références
O. siamensis	Ostréocine-D	Espagne	Penna et al. (2005)
		Grèce	Aligizaki et Nikolaidis (2006)
		Japon	Ukena et al. (2001)
		Nouvelle-Zélande	Rhodes et al. (2002)
O. mascarenensis	Mascarenotoxine A Mascarenotoxine B	Océan Indien	Turquet et al. (2002) Lenoir et al. (2004)
O. ovata	Ovatoxine-a	Espagne (cote est)	Penna et al. (2005)
		France (Frioul)	Kermarec et al. (2008)
		Italie (toutes les côtes sont touchées)	Ciminiello et al. (2006 ; 2008) Guerrini et al. (2009) Totti et al. (2009)
		Grèce	Aligizaki et Nikolaidis (2006)
O.lenticularis	Ostréotoxine Ostréotoxines 1 et 3	Caraïbes	Tindall et al. (1990) Mercado et al. (1994)

La PlTX de formule brute $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$ isolée de *Palythoa toxica* dans l'Océan Pacifique est une macromolécule complexe. Sa structure a été élucidée par RMN par deux groupes (Moore et Bartolini, 1981 ; Uemura et al., 1981). La structure de base de la molécule consiste en un long squelette aliphatique partiellement insaturé de plus d'une centaine de carbones, polyéthéré, comprenant 62 centres chiraux, 40 à 42 groupements hydroxyles, 54 atomes d'oxygène et seulement 3 atomes d'azote (Figure 10).

Mode d'action des PlTXs

En 1982, Habermann et Chhatwal ont mis en évidence que la PlTX provoquait une hémolyse retardée des érythrocytes. Des expériences complémentaires ont montré que la PlTX se lie à la pompe Na^+,K^+-ATPase (*cf.* Encart 2) avec une affinité de 20 pM (Böttinger et al., 1986).

Encart 2 - La pompe sodium/potassium ATPase

La pompe sodium/potassium ATPase (Na^+,K^+-ATPase) appartient à la famille des P-type ATPases, une famille d'enzymes qui catalyse la phosphorylation à partir de l'ATP d'un résidu acide aspartique localisé dans la pompe (Scheiner-Bobis, 2002).

La pompe Na^+,K^+-ATPase est une enzyme transmembranaire constituée de deux sous unités catalytiques α et de deux sous unités β. La sous-unité α traverse la membrane plasmique une dizaine de fois, formant les domaines transmembranaires M1 à M10, les parties N- et C-terminales étant localisées du côté cytosolique (Antolovic et al., 1991).

La Na,K-ATPase assure trois fonctions essentielles :

(i) maintenir à l'intérieur de la cellule une faible concentration de sodium et une forte concentration de potassium. C'est une pompe électrogène qui crée une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane cytoplasmique.

(ii) assurer la polarisation des tissus excitables ou contractiles : la dépolarisation et la repolarisation correspondent respectivement à une entrée de sodium et une sortie de potassium. La Na/K ATPase rétablit l'équilibre antérieur.

(iii) créer une énergie potentielle, liée au gradient ionique de part et d'autre de la membrane plasmique.

Cette énergie est utilisée notamment pour les transports actifs secondaires, le plus souvent couplés à celui du sodium.

La pompe Na^+,K^+-ATPase utilise l'énergie issue de la dégradation de l'ATP en ADP $+P_i$ pour transporter contre leur gradient de concentration des ions Na^+ et K^+. Elle fait entrer dans la cellule 3 ions Na^+ et fait sortir 2 ions K^+ (Scheiner-Bobis, 2002) en passant d'un état conformationnel E1 à un état E2 (Figure C).

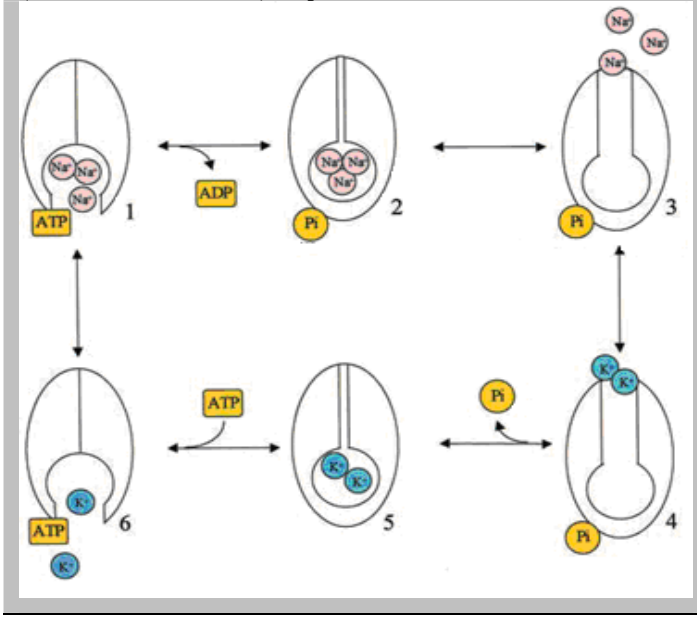


Figure C : Fonctionnement de la pompe Na^+,K^+-ATPase.
A l'étape 1, la pompe en conformation E1 lie Na^+ et ATP. Elle est phosphorylée au niveau d'un résidu aspartate par le γ-phosphate de l'ATP. Cela provoque l'occlusion de trois ions Na^+ (étape 2) puis leur libération du côté extracellulaire (étape 3). Dans ce nouvel état conformationnel E2-P, la pompe lie K^+ (étape 4). Cela conduit à la déphosphorylation de l'enzyme et à l'occlusion de deux ions K^+ (étape 5). Les ions K^+ sont ensuite libérés dans le cytosol après qu'un ATP ait lié la pompe (étape 6). (D'après Scheiner-Bobis, 2002).

En 1991, Kim et al. (cité par Wu, 2009) ont clairement établi l'antagonisme entre la PlTX et l'ouabaïne, un glycoside cardiaque connu pour agir sur la pompe Na^+,K^+-ATPase. La liaison de l'ouabaïne à la pompe Na^+,K^+-ATPase est un processus lent. Ainsi, pour que l'antagonisme soit effectif, il faut laisser le temps à l'ouabaïne de se lier à la pompe avant d'ajouter la PlTX (Wu, 2009).

La PlTX transforme la pompe Na^+,K^+-ATPase en un canal cationique non sélectif en se liant à sa partie extracellulaire, empêchant ainsi la « porte » extracellulaire de se fermer (Hirsh et Wu, 1995).

En présence de PlTX, les deux « portes » de la pompe Na^+,K^+-ATPase sont donc ouvertes en même temps, provoquant un déséquilibre osmotique. La chute du potentiel de membrane en résultant conduit à une perte des fonctions de base de la cellule donc à sa mort.

Une diminution de la longueur du segment terminal de la PlTX (noté X sur la Figure 10) diminue l'affinité de la molécule pour la pompe Na^+,K^+-ATPase, mettant ainsi en évidence que cette partie terminale joue en rôle dans l'interaction entre la toxine et son récepteur (Tosteson et al., 1995).

Les segments transmembranaires 4, 5 et 6 interviennent en partie dans le canal formé par l'action de la PlTX (Horisberger et al., 2004). Le diamètre de ce canal a été estimé à environ 7,5 Å à son point le plus étroit (Artigas et Gadsby, 2004).

De part son effet sur la pompe Na^+,K^+-ATPase, la PlTX provoque un flux entrant d'ions Na^+. La dépolarisation ainsi provoquée engendre une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} pour divers types cellulaires (e.g. cellules de rate de souris (Satoh et al., 2003), cultures primaires de neurones (Vale-Gonzales et al., 2007)), ce qui aurait pour effet de provoquer la mort cellulaire.

Sur la lignée de neuroblastomes humains BE(2)-M17, la PlTX inhibe la prolifération cellulaire, provoque un arrondissement des cellules ainsi que la dépolymérisation de l'actine F. Parmi les marqueurs de l'apoptose, des concentrations de PlTX de l'ordre du nanomolaire provoquent une chute du potentiel de membrane mitochondriale mais pas d'activation des caspases ni de fragmentation de l'ADN (Valverde et al., 2008).

Enfin, la PlTX est un promoteur tumoral (Fujiki et al., 1986). A ce titre, elle est utilisée comme un outil permettant de mieux comprendre les voies de signalisation mises en jeu dans la cancérogénèse (Zeliadt et al., 2003).

La PlTX engendre à l'échelle cellulaire une variété d'effets dont certains restent difficiles à interpréter et qui semblent dépendre du temps d'exposition et de la dose appliquée (e.g. Valverde et al. (2008)). Toutefois, il est maintenant acquis que la PlTX agit au niveau de la pompe Na^+,K^+-ATPase par un mécanisme qui est unique (Wu, 2009) et que l'ouabaïne est un antagoniste de la PlTX.

Aspects toxicologiques chez l'animal

L'injection par voie intrapéritonéale de PlTX (1,5 $\mu g.kg^{-1}$) provoque la mort des souris entre 3 et 5 heures après injection (Ito et al., 1996). Des symptômes tels qu'étirement des pattes arrière, spasmes musculaires, détresse respiratoire, dyspnée et paralysie musculaire progressive apparaissent très rapidement après l'injection (Riobo et al., 2008). Les animaux injectés avec 1 $\mu g.kg^{-1}$ (dose définie par Ito et al. comme la dose maximale ne causant pas la mort) présentent des diarrhées faibles. Les animaux survivent mais présentent une perte de poids significative. A l'autopsie, les organes abdominaux adhèrent les uns aux autres. Une perte de poids est observée pour le foie, le thymus et la rate. Dans ces deux derniers organes lymphoïdes, des nécroses des lymphocytes sont visibles (Ito et al., 1996).

En comparaison, l'injection par voie i.p. de 5 µg d'ostréocine-D (OSD) par kg, l'analogue de la PlTX produit par *Ostreospsis siamensis*, cause la mort des souris en quelques heures (Ito et Yasumoto, 2009). L'OSD est donc moins toxique par voie i.p. que la PlTX. La DL_{50} de la PlTX par voie i.p. chez la souris serait de 295 $ng.kg^{-1}$ (Riobo et al., 2008).

Les effets de la PlTX et de l'OSD sur le système respiratoire de la souris ont été étudiés par administration intratrachéale (Ito et Yasumoto, 2009). Pour des doses de PlTX supérieures à 2 $\mu g.kg^{-1}$, les souris meurent en moins de deux heures avec une paralysie importante. L'autopsie révèle des saignements importants au niveau des alvéoles pulmonaires, des œdèmes des poumons ainsi qu'une érosion du tractus gastro-digestif. Des symptômes identiques sont observés avec des doses d'ostréocine-D de l'ordre de 11 $\mu g.kg^{-1}$.

L'administration par voie orale de 200 µg de PlTX ou de 300 µg d'OSD par kg ne provoque pas la mort des animaux, ni de dommages macroscopiques aux organes (Ito et Yasumoto, 2009). La DL_{50} chez la souris est de 767 µg PlTX par kg, soit près de 1000 fois plus que la DL_{50} par voie i.p (Sosa et al., 2009). Le faible pouvoir toxique par voie orale de la PlTX serait dû en partie à son caractère hydrophile qui ne lui permet pas d'être absorbée au travers des épithéliums. Néanmoins les symptômes observés chez la souris (sauts, paralysie des pattes arrière et détresse respiratoire) suggèrent que les muscles squelettiques sont les premières cibles de la PlTX. Ces observations sont en accord avec les symptômes observés chez l'homme (myalgie et concentrations élevées des créatines kinases).
Afin de se rapprocher au mieux des conditions d'ingestion des denrées contaminées par les PlTXs chez l'homme, Ito et Yasumoto (2009) ont administré la PlTX et l'OSD à des souris par voie sublinguale, ce qui permet aux toxines d'être en contact avec la bouche et l'œsophage. Les deux toxines provoquent des dommages aux organes (estomac, poumons et reins) 24 heures après l'administration de 200 µg de toxine par kg. L'administration répétée de cette même dose deux ou trois fois est létale, la cause de la mort semblant être un dysfonctionnement cardiaque.

Effets toxiques chez l'homme

L'homme peut être exposé aux PlTXs de trois façons : (i) par consommation de produits de la mer, (ii) par inhalation d'aérosols contenant les toxines et enfin (iii) de façon plus anecdotique par contact cutané avec des zoanthaires producteurs de PlTXs (Deeds et Schwartz, 2009).

Au cours des 20 dernières années, seule une dizaine d'études scientifiques a montré la présence de PlTXs dans des poissons et des crustacés, parfois reliée à des cas d'intoxications humaines sévères[8] (Tableau V). Le tableau clinique varie en fonction de l'organisme marin

[8] Le clupéotoxisme est une forme d'empoisonnement consécutive à l'ingestion de sardines, de harengs ou d'anchois, appartenant respectivement aux familles des Clupeidae et des Engraulidae (e.g. Randall, 2005).

contaminé ingéré. Les premiers symptômes sont une faiblesse musculaire et des malaises avec une hypotension artérielle, des crampes abdominales et des nausées.

Tableau V : Occurrences de palytoxines dans des organismes marins. Les cas avérés d'intoxications humaines apparaissent en gras.

	Source	Zone géographique	Références
Poissons	*Melichthys vidua*	Micronésie	Fukui et al. (1987)
	Ypsiscarus ovifrons	Japon	Okano et al. (1998)
	Sphoeroides spengleri	Caraïbes	Mebs (1998)
	Herklotsichthys quadrimaculatus	Madagascar	Onuma et al. (1999)
	Tetraodon sp.	Bangladesh	Taniyama et al. (2001)
	***Epinephelus* sp.**	Japon	Taniyama et al. (2002)
	Scarus ovifrons	Japon	Taniyama et al. (2003)
	Lactoria diaphana	Japon	Shintazo et al. (2008)
Crabes	***Demania reynaudii***	Philippines	Alcala et al. (1988)
	Lophozozymus pictor	Singapour	Lau et al. (1995)
Bivalves	*Mytilus galloprovincialis, Venus verrucosa, Modiolus barbatus*	Grèce	Aligizaki et al. (2008)

Plusieurs cas rapportés font également part d'un gout métallique dans la bouche faisant suite à l'ingestion de poissons contaminés. Dans un second temps, des vomissements, des diarrhées sévères, des paresthésies des extrémités sont observés ainsi que des spasmes musculaires importants et des difficultés respiratoires (e.g. Fukui et al., 1987 ; Yasumoto et al., 1986 ; Alcala et al., 1988). Dans les cas les plus graves, des complications systémiques peuvent apparaître, telle que une rhabdomyolyse (Deeds et Schwartz, 2009). Les analyses sanguines de deux cas décrits par Okano et al. (1998) et Shintazo et al. (2008) mettent en évidence des taux élevés de plusieurs enzymes (CK, ASAT, ALAT et LDH) en relation avec des dommages tissulaires. Il n'a pas d'antidote pour les intoxications aux PlTXs, le traitement est avant tout symptomatique (*e.g.* lavage gastrique, administration de soluté physiologique, de mannitol).

Des effets sanitaires ont été enregistrés sur le pourtour méditerranéen depuis 2002 et la première description précise retrouvée dans la littérature concerne les épisodes de Bari, en Italie du sud, mi-août 2003 et début septembre 2004 (Gallitelli et al., 2005).

Comme le montre le tableau VI, les symptômes observés concernent essentiellement la sphère ORL et consistent en des phénomènes irritatifs, les cas les plus graves ayant présenté des difficultés respiratoires.

Sur l'ensemble des incidents décrits dans le tableau VI, les concentrations d'*Ostreopsis* mesurées dans l'eau varient entre quelques milliers à un million de cellules par litre. Par ailleurs, aucune donnée n'est disponible quant à la relation existant entre les concentrations en

Ostreopsis et les quantités de toxines présentes dans les embruns. Dans ces conditions, il est difficile de préconiser un seuil de déclenchement d'un système de surveillance.

Tableau VI : Symptômes relevés dans la littérature chez les personnes exposées par inhalation à *Ostreopsis ovata* (Kermarec et al., 2008)

	Sud baie Adriatique (Italie) 2002	Bari (Italie) 2003-2004	Barcelone (Espagne) 2004	Gênes (Italie) 2005	Gênes, La Spezia (Italie) 2006	Frioul (France) 2006
Population touchée	Nageurs	Promeneurs	Riverains	Promeneurs	-	Plongeurs
Nombre de personnes touchées	-	28	200	209	19	4
Hospitalisations	-	0		21%		
Rhinorrhée		100%	74%	21%	26%	
Toux		43%	60%	40%	74%	
Irritation peau	x			5%		
Irritation yeux		11%	41%	16%	5%	
Irritation lèvres et langue						100%
Irritation nez			66%			
Irritation gorge			63%	50%	37%	25%
Expectoration			52%			
Difficultés respiratoires		25%		39%	37%	
Céphalées			40%	32%	10%	100%
Fièvre	x	14%		64%	32%	25%
Nausées				24%	16%	
Diarrhées						25%
Références	Zingone et al. (2006)	Gallitelli et al. (2005)	Maso repris par Kermarec et al. (2008)	Durando et al. (2007)		Kermarec et al. (2008)

- : information manquante x : pas de données chiffrées

Il n'est pas possible de savoir si les effets sanitaires observés sont attribuables aux toxines d'*O. ovata* ou à d'autres molécules présentes lors des efflorescences. Selon de Haro (2007), les symptômes décrits résulteraient plutôt d'un phénomène aspécifique lié à la présence de grandes quantités de protéines au niveau respiratoire lors d'inhalations d'embruns contaminés. Cela provoquerait un syndrome pseudo-grippal qui ne serait pas en soi une conséquence directe de la toxicité des palytoxines. Durando et al. (2007) ont d'ailleurs montré dans le sang des personnes intoxiquées dans le golfe de Gênes la présence de neutrophiles et leucocytes qui semblent témoigner en faveur d'une réaction inflammatoire, donc aspécifique.

Certains coraux mous peuvent provoquer des effets plus ou moins graves lorsqu'ils sont manipulés sans protection par des aquariophilistes. Deux personnes ont ainsi été intoxiquées après avoir manipulé des coraux mous. Une sensation de gout métallique dans la bouche, un

état de faiblesse, des myalgies et des frissonnements accompagnés d'un œdème des mains et des érythèmes prurigineux ont été décrits (Hoffmann et al., 2008 ; Nordt et al., 2009).

II.3.1.1.4. Les récepteurs glutamatergiques

A ce jour, une seule famille de toxines algales a été répertoriée comme agissant sur les récepteurs glutamatergiques : l'acide domoïque (AD) et ses analogues.

L'acide domoïque, structurellement apparenté à l'acide kaïnique, l'acide glutamique et l'acide aspartique (Figure 11) est le représentant majoritaire des toxines amnésiantes. L'AD est un acide aminé cyclique comportant trois groupements carboxyliques qui lui confèrent son hydrosolubilité. Une dizaine d'isomères de l'AD ont été mis en évidence (Amzil et al., 2001). Les phycotoxines amnésiantes sont produites en milieu marin par des Diatomées appartenant essentiellement au genre *Pseudo-nitzschia* et également par plusieurs genres d'algues rouges macroscopiques (pour revue, voir Lefebvre et Robertson, 2009).

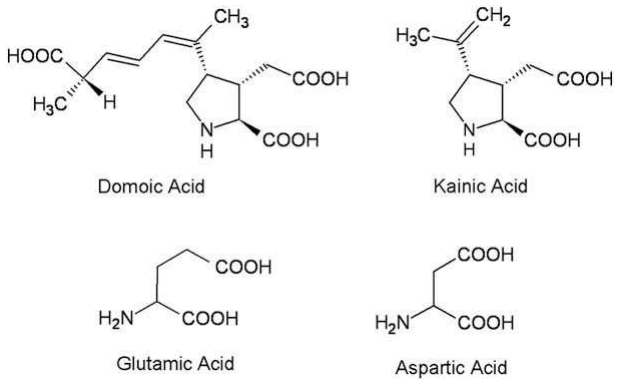


Figure 11 : Structure chimique de l'acide domoïque et des acides aminés apparentés

Mode d'action de l'acide domoïque

L'AD active des récepteurs glutamatergiques au niveau du système nerveux central. Les différents types de récepteurs ionotropiques activés par le glutamate (GLU) ont été nommés d'après leur agoniste le plus sélectif. Ils comprennent les récepteurs AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate), kaïnate et NMDA (N-méthyle-D-aspartate). L'AD est un agoniste des récepteurs ionotropiques glutamatergiques. Sur des cellules en culture de la couche granuleuse du cervelet de rat, l'AD tout come le GLU provoque une cytotoxicité mise en évidence par la libération de la lactate déshydrogénase. La cytotoxicité induite par l'AD est réduite d'environ 70% lorsque les cellules sont prétraitées avec des antagonistes compétitifs et non compétitifs des récepteurs NMDA (Larm et al., 1997).

Le mécanisme d'action de l'AD est présenté sur la Figure 12. La dépolarisation de la cellule présynaptique active la libération de Ca^{2+} endogène, ce qui a pour effet d'entrainer les vésicules contenant le GLU vers la surface de la cellule. Le GLU est alors libéré dans l'espace synaptique où il peut interagir avec les différents récepteurs. L'AD exogène peut également agir avec les différents récepteurs glutamatergiques.

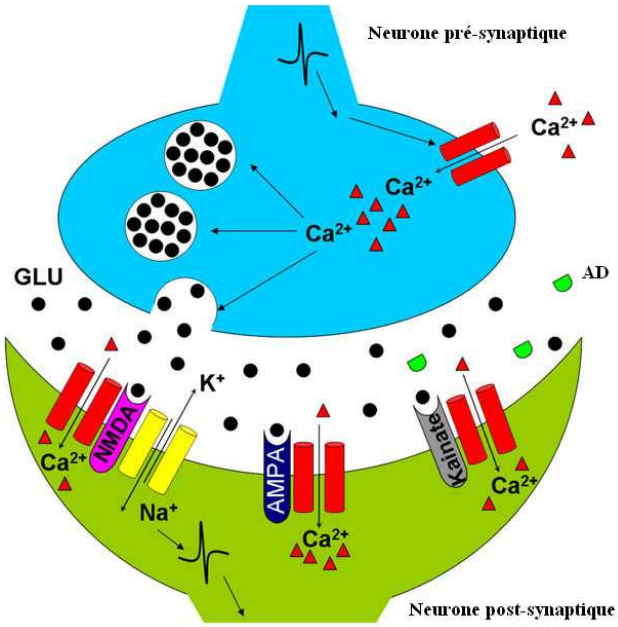


Figure 12 : Mécanisme par lequel l'acide domoïque induit une neurotoxicité sur des cellules nerveuses (d'après Lefebvre et Robertson, 2009).

L'activation des récepteurs kaïnate et AMPA provoque un flux d'ions Ca^{2+}, tandis que l'activation des récepteurs AMPA et NMDA entraine un influx de Na^{+} et de Ca^{2+} dans la cellule post-synaptique. A la différence du GLU, l'AD prolonge l'activation des récepteurs, entrainant un influx d'ions constant qui provoque au final un dysfonctionnement cellulaire et la lyse cellulaire.

Aspects toxicologiques chez l'animal

L'administration d'AD par voie orale a été réalisée sur plusieurs espèces animales dont la souris, le rat, le singe et le saumon. Des susceptibilités différentes ont ainsi été mises en évidence (Tableau VII).

Bien que des différences de susceptibilité entre les espèces aient été mises en évidence, des études histopathologiques de cerveaux d'animaux traités oralement avec de l'AD ont montré que la région la plus spécifiquement touchée est l'hippocampe. Pour une revue plus détaillée des effets histopathologiques, se reporter à Pulido (2008).

Tableau VII : Symptômes observés après exposition à l'AD par voie orale de différentes espèces

Organisme	Dose orale administrée (mg AD/kg poids corporel)	Symptômes observés	Références
Singes (*Macaca fascicularis*)	0,75	aucun	Truelove et al. (1997)
	1	vomissements	
	5-10	salivation, vomissements, nausées	Tryphonas et al. (1990)
Souris	28	aucun	Iverson et al. (1989)
	35	convulsions, grattement des épaules avec les pattes arrière	
	71-83	mort	
Rats	60	aucun	Iverson et al. (1989)
	80	convulsions	
Saumons	10-12	aucun	Lefebvre et al. (2007)

L'injection par voie intrapéritonéale d'AD à la souris provoque selon la dose injectée l'apparition de symptômes spécifiques tels que le grattement des épaules avec les pattes arrière, suivi de convulsions et de la mort. La DL_{50} pour la toxine pure est comprise entre 3,6 et 4 mg AD par kg de poids corporel (Peng et Ramsdell, 1996).

Les effets à long terme d'expositions répétées par voie orale à de faibles doses d'AD sont peu renseignés : une étude chez le singe *Macaca fascicularis* (Truelove et al., 1997) et une chez le rat (Truelove et al., 1996). Dans cette dernière étude, les animaux ont été gavés quotidiennement pendant 64 jours avec 0,1 ou 5 mg d'AD par kg de poids corporel. Aucun effet clinique ou histopathologique (microscopie optique) n'a été observé. Toutefois, bien que la dose 5 mg AD/kg ne provoque pas d'effets cliniques neurologiques, des changements morphologiques au niveau de l'hippocampe (vacuolisations des neurones et des astrocytes, dommages aux cellules pyramidales) ont été observés en microscopie électronique chez les animaux traités (Pulido, 2008).

Effets toxiques chez l'homme

L'ingestion de coquillages ayant bioaccumulé de l'AD provoque l'Intoxication Amnésiante par Fruits de Mer (IAFM ou ASP pour Amnesic Shellfish Poisoning). En 1989, Wright et al. ont identifié l'AD comme agent toxique responsable d'une centaine d'intoxications dont 4 cas fatals sur l'île du Prince Edouard (Canada). Les atteintes cliniques sont essentiellement neurologiques pour les patients les plus âgés (confusion, pertes d'équilibre et de mémoire, coma pour les cas les plus graves), tandis que les plus jeunes ont présenté des troubles gastro-intestinaux. Les symptômes sont apparus entre 15 minutes et 38 heures après l'ingestion de moules contaminées.

Il a été estimé que la dose toxique consommée par les personnes ayant été intoxiquées se situe dans une fourchette allant de 0,9 à 4,2 mg d'AD par kg de poids corporel, soit entre 60 et 290 mg d'AD ingérés.

Des séquelles neurologiques (troubles de la mémoire plus ou moins graves) ont été observées chez les patients les plus atteints 6 mois après l'incident (Teitelbaum et al., 1990).

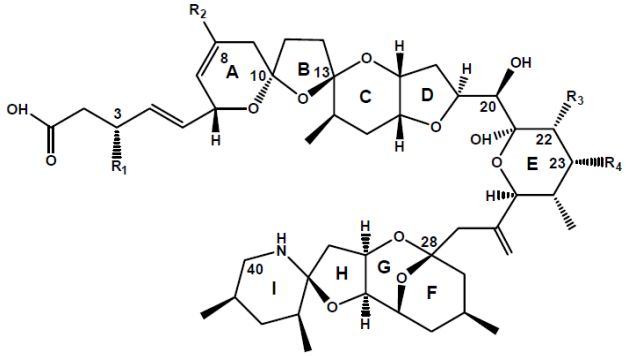
Chez les patients décédés, des lésions dans le cerveau au niveau de l'hippocampe et du noyau amygdaloïde ont été mises en évidence (Teitelbaum et al., 1990).

II.3.2. Toxines dont la cible moléculaire n'est pas connue

Les azaspiracides, les pecténotoxines et les yessotoxines ont été mises en évidence il y a moins d'une quinzaine d'années. Bien qu'ayant fait l'objet d'un nombre d'études important, leur cible moléculaire n'a pas encore été clairement identifiée. L'apparition d'effets toxiques chez l'homme ou bien une réponse atypique du bioessai sur souris ont souvent permis de mettre en évidence ces nouvelles familles de toxines.

II.3.2.1. Les azaspiracides

Les **azaspiracides** (AZAs) sont des polyéthers (Figure 13) produits en milieu marin par le dinoflagellé *Azadinium spinosum* (Tillmann et al., 2009). Ils ont été mis en évidence en 1995 en Irlande.



	R_1	R_2	R_3	R_4
AZA1	H	H	CH_3	H
AZA2	H	CH_3	CH_3	H
AZA3	H	H	H	H
AZA4	OH	H	H	H
AZA5	H	H	H	OH

Figure 13 : Structure chimique des azaspiracides

Une vingtaine d'analogues d'AZAs ont été identifiés mais seuls AZA1 et AZA2 ont été isolés du dinoflagellé producteur, suggérant une métabolisation importante de ces toxines par les coquillages (Rehmann et al., 2008).

Effets toxiques chez l'homme

La contamination de coquillages liée ou non à des intoxications humaines a été rapportée dans différents pays dont l'Espagne, la France, l'Irlande, l'Italie, le Maroc, la Norvège, les Pays Bas, le Portugal et la côte est du Canada (Twiner et al., 2008a). Les symptômes chez l'homme de l'AZP (Azaspiracid Poisoning) ressemblent à ceux causés par l'OA et incluent des nausées, des vomissements, des diarrhées et des crampes d'estomac (McMahon et Silke, 1996). Cinq incidents liés aux AZAs ont été décrits aux Pays-Bas, en Irlande, en Italie, en France et au Royaume-Uni (Twiner et al., 2008a). Toutefois, au vu de la ressemblance entre les symptômes provoqués par l'AZP et ceux dus à l'OA et ses analogues, il est vraisemblable qu'il y ait une sous-estimation du nombre d'intoxications liées aux AZAs.

Aspects toxicologiques chez l'animal

Bien que la consommation de coquillages contaminés par les AZAs provoque chez l'homme des symptômes de type diarrhéique, l'injection par voie i.p. d'extraits de coquillages contaminés à des souris provoque l'apparition de symptômes de type neurologique incluant des difficultés respiratoires, des spasmes et une paralysie progressive (Twiner et al., 2008a). La mort survient entre 20 et 90 minutes après l'injection (McMahon et Silke, 1998).

Les doses létales pour cinq analogues d'AZAs sont présentées dans le tableau VIII. En raison de la difficulté d'approvisionnement en toxines purifiées, le nombre d'animaux injectés est faible, ces valeurs doivent être considérées comme indicatives.

Tableau VIII : Doses létales par voie i.p. chez la souris pour cinq analogues d'AZAs

Analogue	Dose létale par voie i.p. chez la souris ($\mu g.kg^{-1}$)	Références
AZA1	200	Satake et al. (1998)
AZA2	110	Ofuji et al. (1999)
AZA3	140	
AZA4	470	Ofuji et al. (2001)
AZA5	1000	

La toxicité par voie orale n'a été étudiée que pour l'analogue AZA1. La dose létale minimum est d'environ 450 $\mu g.kg^{-1}$. D'après Ito et al. (2000), l'administration orale de 300 $\mu g.kg^{-1}$ provoque une érosion des microvilli de l'intestin grêle et une atrophie de la *lamina propria* moins de 4 heures après l'administration. Pour des doses allant de 500 à 700 $\mu g.kg^{-1}$, ces effets sont accentués. Le poids du foie a augmenté de 38% pour la dose 500 $\mu g.kg^{-1}$. Par

rapport aux lésions provoquées par l'OA, les lésions induites par l'AZA1 apparaissent plus lentement et le temps de récupération est allongé (Twiner et al., 2008a). Aucun effet toxique n'a été mis en évidence pour 12 analogues tronqués d'AZAs obtenus au cours de la synthèse chimique d'AZA1, suggérant ainsi que l'orientation et la longueur de la molécule sont des facteurs impliqués dans le potentiel toxique d'AZA1 (Ito et al., 2006).

Au cours d'une étude à long terme, des souris ont été exposées par voie orale à 1, 5, 20 ou 50 $\mu g.kg^{-1}$ d'AZA1, deux fois par semaine sur une durée de 145 jours (Ito et al., 2002). Les animaux traités avec les deux plus faibles doses n'ont montré aucune symptomatologie. Les souris traitées avec les deux plus fortes doses sont devenues faibles et présentaient une perte de poids et beaucoup de gaz au niveau de leurs organes gastro-intestinaux. Des modifications pathologiques ont été observées au niveau des poumons, du foie, de l'intestin grêle et de l'estomac. Dans quelques cas, des tumeurs au niveau des poumons ont été mises en évidence mais une étude complémentaire n'a pas permis de conforter ce résultat, l'incidence de tumeurs chez les animaux traités n'étant pas significativement différente de celle des animaux témoins (EFSA, 2008a).

Effets à l'échelle cellulaire

L'AZA1 est cytotoxique sur différentes lignées cellulaires pour des concentrations de l'ordre du nanomolaire et des temps d'exposition de 48 heures (Twiner et al., 2008a). En terme de cytotoxicité, la seule lignée cellulaire qui semble insensible à l'AZA1 est la lignée Caco2 (cellules épithéliales humaines du colon), ce qui va à l'encontre des effets observés *in vivo* chez la souris après administration orale. La lignée Caco2 peut être utilisée comme un modèle *in vitro* mimant la barrière épithéliale et permet ainsi d'étudier le transport de substances au travers de la barrière intestinale. Hess et al. (2007) ont montré sur les cellules Caco2 qu'une concentration de 5 nM d'AZA1 provoque une diminution significative de la résistance électrique transépithéliale, mettant ainsi en évidence les effets d'AZA1 sur la fonction barrière de ces cellules. Ces résultats sont en accord avec les travaux *in vivo* d'Ito et al. (2000 ; 2002 et 2006).

Selon Twiner et al. (2005), la lignée cellulaire Jurkat (lymphocytes T) serait la plus sensible aux effets cytotoxiques de l'AZA1. Ces cellules exposées à l'AZA1 montrent une rétractation de leurs pseudopodes, associée à une réorganisation des filaments d'actine F (Twiner et al., 2005). Plusieurs études ont montré que l'AZA1 induit une cytotoxicité et peut affecter différents processus cellulaires (Tableau IX).

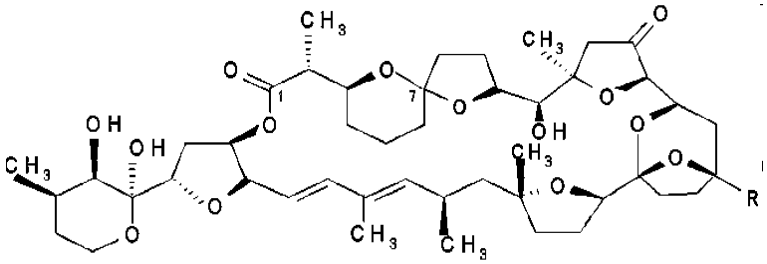
Tableau IX : Diversité des effets à l'échelle cellulaire d'AZA1 en fonction des types cellulaires (d'après EFSA, 2008a)

Effets	Lignées cellulaires	Concentrations d'AZA1 (CE_{50}, M)	Références
Augmentation de la $[Ca^{2+}]$ intracellulaire	Lymphocytes	10^{-7} - 10^{-6}	Roman et al. (2002)
	Neurones en culture primaire	10^{-6}	Vale et al. (2007)
Augmentation de l'AMPc	Lymphocytes	10^{-7} - 10^{-6}	Roman et al. (2002)
Cytotoxicité	Jurkat	10^{-9}	Twiner et al. (2005)
	BE(2)-M17	5.10^{-8}	Vilarino et al. (2006)
	MCF-7	10^{-9}	Ronzitti et al. (2007)
	Culture primaire de neurones	10^{-9}	Vale et al. (2007)
Altération de l'actine F du cytosquelette	BE(2)-M17	10^{-5}	Roman et al. (2002)
	Jurkat	10^{-8}	Twiner et al. (2005)
	Caco2	5.10^{-8}	Vilarino et al. (2006)
Adhésion cellulaire	Caco2	5.10^{-8}	Vilarino et al. (2006)
	MCF-7	10^{-9}	Ronzitti et al. (2007)
	Fibroblastes	10^{-9}	Ronzitti et al. (2007)

Les effets mis en évidence à l'échelle cellulaire de l'AZA1 sont complexes et sont pour la plupart difficilement reliables aux effets observés *in vivo*. Les effets *in vivo* et *in vitro* ne permettent pas d'appréhender précisément le mode d'action de cette famille de toxines.

II.3.2.2. Les pecténotoxines

Les pecténotoxines (PTXs) sont des polyéthers lipophiles (Figure 14) qui s'accumulent dans les bivalves filtreurs en milieu marin.



	R	7
PTX1	CH_2OH	*R*
PTX2	CH_3	*R*
PTX3	CHO	*R*
PTX4	CHO	*S*
PTX6	COOH	*R*

Figure 14 : Structure chimique des pecténotoxines (d'après Miles, 2007)

Elles ont été détectées en Australie, au Japon, en Nouvelle-Zélande et dans plusieurs pays européens. Elles sont produites par plusieurs espèces de *Dinophysis* (e.g. *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata*, *D. norvegica*) (Dominguez et al., 2009). Une quinzaine d'analogues de PTXs ont été caractérisés à ce jour (Miles, 2007). La PTX2 est le précurseur métabolisé dans les coquillages pour donner les différents analogues (Draisci et al., 1996 ; Miles et al., 2004).

Dans les moules et les coquilles Saint-Jacques, la PTX2 est métabolisée et forme le PTX2-SA PTX2 seco acid) et son épimère le 7-épi-PTX2-SA.

Effets toxiques chez l'homme

Aucun cas d'intoxication humaine n'a été attribué aux PTXs. Toutefois, cette famille de toxines est souvent trouvée en association avec les toxines diarrhéiques (OA et analogues), il est donc difficile de dissocier les intoxications recensées et les toxines responsables (PTXs ou toxines diarrhéiques).

Aspects toxicologiques chez l'animal

Par voie intrapéritonéale, les DL_{50} de la PTX2 et de la PTX6 sont de 219 et 500 $\mu g.kg^{-1}$, respectivement (Miles et al., 2004 ; Ito et al., 2008). Les souris ayant reçu des doses létales de PTX2 deviennent léthargiques, leur respiration ralentit et le rythme respiratoire décroit jusqu'à la mort des animaux (Miles et al., 2004). Des changements pathologiques ont été observés chez les souris injectées avec 500 $\mu g.kg^{-1}$ de PTX6 : accumulation de sang dans le foie, érosion de l'estomac et de l'intestin grêle tandis que la PTX2 ne provoque pas de saignements dans le foie (Ito et al., 2008).

Il est maintenant admis que les PTXs ne provoquent pas de symptômes diarrhéiques chez l'animal après administration par voie orale (Miles et al., 2004). La DL_{50} de la PTX2 par voie orale est supérieure à 5000 $\mu g.kg^{-1}$. A cette dose, la PTX6 ne provoque pas de lésions des organes de la souris (Ito et al., 2008).

La différence de toxicité observée ente la voie i.p. et la voie orale peut s'expliquer soit par une faible absorption de la toxine au niveau du tractus gastro-intestinal, soit par la conversion de la PTX2 en un analogue moins toxique.

Effets à l'échelle cellulaire

Un potentiel cytotoxique de la PTX2 sur plusieurs lignées cellulaires (e.g. A549, HT29, MCF-7) a été montré dès 1995 par Jung et al.

La PTX2 induit de l'apoptose (activation de la caspase 3, fragmentation de l'ADN, augmentation du taux de protéines pro-apoptotiques Bax) (Fladmark et al., 1998 ; Kim et al., 2008).

Plusieurs études ont montré que les PTX1, PTX2, PTX6 et PTX11 provoquent une dépolymérisation de l'actine F (Ares et al., 2005 ; Ares et al., 2007 ; Leira et al., 2002b). La PTX2SA qui ne possède pas de groupement lactone n'induit pas de dépolymérisation de

l'actine-F, ce qui suggére l'importance du groupement lactone pour l'activité des PTXs sur le cytosquelette (Ares et al., 2007).

La structure en cristallographie du complexe PTX2-actine étudiée par Allingham et al. (2007) a montré que la PTX2 forme un complexe 1:1 avec l'actine monomérique, empêchant ainsi la polymérisation de l'actine.

II.3.2.3. Les yessotoxines

Les yessotoxines (YTXs) sont des polyéthers disulfatés structurellement apparentés aux brévétoxines et ciguatoxines (Hess et Aasen, 2007) (Figure 15).

Elles sont produites en milieu marin par les dinoflagellés *Protoceratium reticulatum*, *Lingoludinium polyedrum* et *Gonyaulax spinifera* (Paz et al., 2008).

La yessotoxine YTX a été isolée au Japon en 1986 à partir de glandes digestives de coquilles Saint-Jacques *Patinopecten yessoensis* (Murata et al., 1987). Une centaine d'analogues de YTXs ont été isolés à partir d'une souche de *Protoceratium reticulatum* mais l'élucidation de la structure n'a été réalisée que pour quelques uns d'entre eux (Miles et al., 2005). De plus, comme c'est le cas pour d'autres familles de toxines, les YTXs sont métabolisées dans les coquillages, ce qui contribue à augmenter le nombre d'analogues.

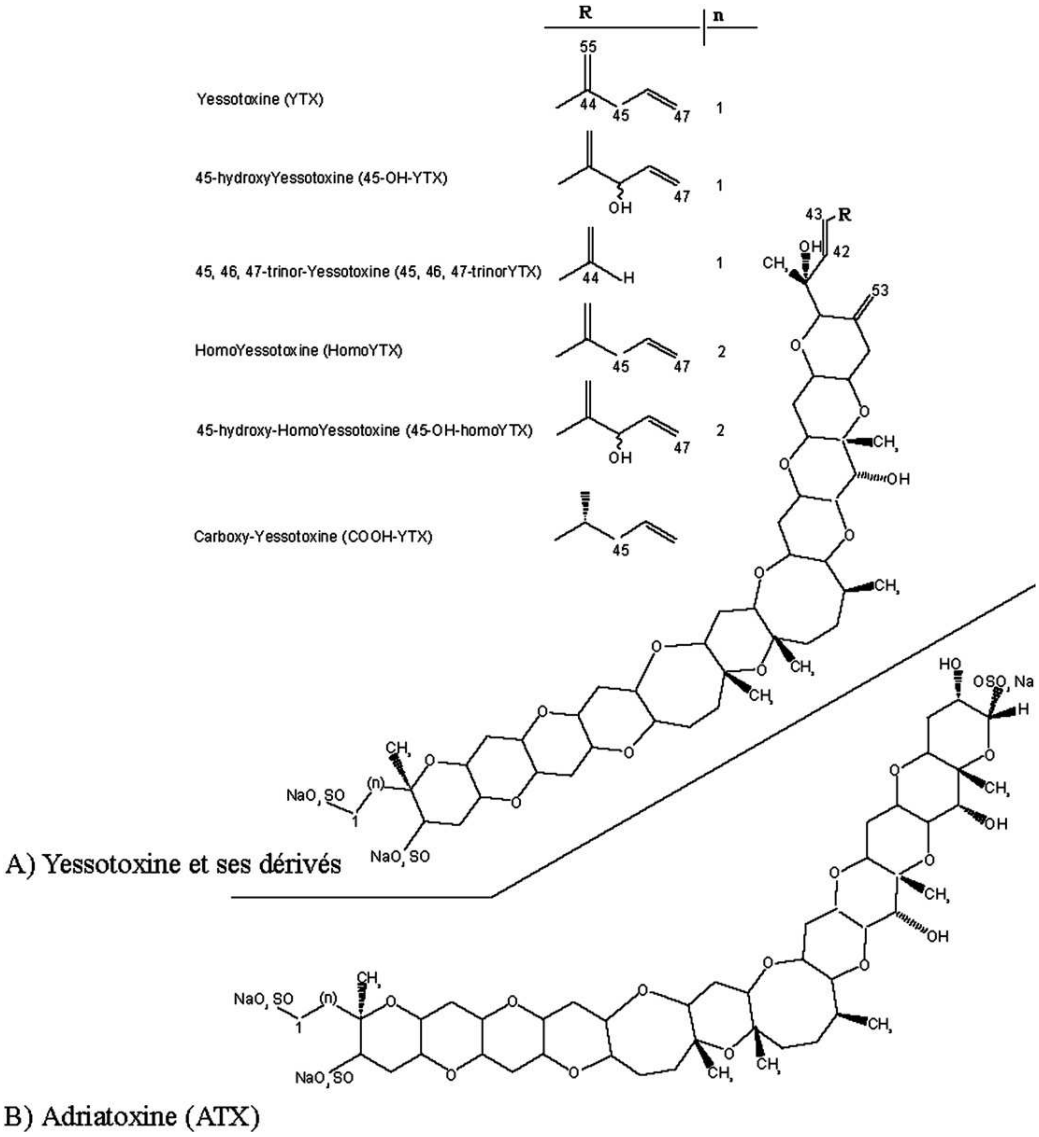


Figure 15 : Structure chimique des yessotoxines (d'après Amzil et al., 2007)

Effets toxiques chez l'homme

A ce jour, aucun incident connu lié à l'ingestion de coquillages contaminés par les YTXs n'a été répertorié, bien que les YTXs aient été mises en évidence dans divers coquillages parfois à des concentrations élevées en divers endroits du globe (Paz et al., 2008).

Aspects toxicologiques chez l'animal

Après injection par voie i.p. de YTX à des souris, les symptômes observés sont de type neurologique (dyspnée suivie d'une mort rapide), semblables à ceux décrits pour les toxines paralysantes (STXs) (Tubaro et al., 2003). La DL_{50} par voie i.p. pour ce composé varie selon les auteurs entre 80 et 750 $\mu g.kg^{-1}$ (Tubaro et al., 2009). Selon Aune et al. (2008), la variabilité observée pour la DL_{50} ne peut être imputée uniquement aux différences entre les

souches de souris utilisées. Plus vraisemblablement, les différences observées sont liées aux conditions de stockage de la toxine puisque Loader et al. (2007) ont montré que l'YTX est instable après 6 mois de stockage.

Après injection i.p. d'YTX (1 $mg.kg^{-1}$) ou administration de 10 $mg.kg^{-1}$ de YTX par voie orale, des lésions au niveau du myocarde ont été observées en microscopie (Aune et al., 2002). Les YTXs sont moins toxiques par voie orale que par voie i.p. avec une DL_{50} pour YTX supérieure à 54 $mg.kg^{-1}$ (Tubaro et al., 2009). L'administration par voie orale d'YTX, homoYTX ou 45-hydroy-homoYTX ne provoque aucun signe de toxicité, ni de diarrhée.

Après administration orale de 1 ou 2 $mg.kg^{-1}.j^{-1}$ d'YTX sur 7 jours, des changements ultra structuraux des cardiomyocytes sont observés et sont réversibles en 90 jours (Tubaro et al., 2009).

Effets à l'échelle cellulaire

De nombreuses études se sont intéressées aux effets à l'échelle cellulaire et moléculaire des YTXs (pour une revue détaillée, voir Tubaro et al. 2009). Celles-ci sont résumées dans le Tableau X.

Tableau X : Effets de YTX sur des lignées cellulaires (modifié d'après EFSA, 2008b)

Effets	Lignées cellulaires	Concentration (M)	Temps	Références
Activation des phosphodiestérases	Lymphocytes humains, neurones	10^{-6}	secondes/minutes	Alfonso et al. (2003)
Modulation des mouvements calciques	Lymphocytes humains	10^{-6}	secondes/minutes	De la Rosa et al. (2001)
	Cultures primaires de neurones de rat	10^{-8}	minutes/heures	Perez-Gomez et al. (2006)
Diminution de l'AMPc dépendante du Ca^{2+}	Lymphocytes humains	10^{-6}	secondes/minutes	Alfonso et al. (2003)
Apoptose et mort cellulaire	HeLa	10^{-10}	jours	Malaguti et al. (2002a)
	BE(2)-M17	10^{-8}	jours	Leira et al. (2002)
	Myoblastes (souris et rat)	10^{-7}	jours	Suarez Korsnes et al. (2006 ; 2007)
	Cultures primaires de neurones de rat	10^{-8}	jours	Perez-Gomez et al. (2006)
	Cultures primaires de cardiomyocytes de rat	10^{-8}	jours	Dell'Ovo et al. (2008)
Diminution du taux d'actine F	MCF-7	10^{-9}	jours	Ronzitti et al. (2004)
	Cultures primaires de neurones de rat	10^{-8}	jours	Perez-Gomez et al. (2006)
	Fibroblastes de souris NIH3T3	10^{-7}	jours	Malagoli et al. (2006)
	Myoblastes de rat L6 Myoblastes de souris BC3H1	10^{-7}	jours	Suarez Korsnes et al. (2007)
Inhibition de la voie de dégradation de la E-cadhérine	MCF-7	10^{-9}	heures	Pierotti et al. (2003)

La diversité chimique des toxines ainsi que les effets multiples qu'elles produisent depuis l'échelle cellulaire jusqu'à l'organisme entier ont des conséquences en terme d'impacts environnementaux et sanitaires.

III. Impacts environnementaux et sanitaires des efflorescences phytoplanctoniques toxiques

III.1. Efflorescences, biodiversité et réseau trophique

III.1.1. Efflorescences et facteurs de contrôle

Les microalgues sont présentes dans tous les biotopes aquatiques (marins, saumâtres et dulçaquicoles). Elles jouent dans ces différents milieux un rôle essentiel puisqu'elles assurent une grande partie de la production primaire à la base du réseau trophique (Mur et al., 1999).

En milieu marin, sur environ 5000 espèces phytoplanctoniques marines connues, 80 à 100 espèces sont potentiellement néfastes pour l'homme et la faune aquatique (Landsberg, 2002). En milieu marin côtier, si les conditions sont favorables, ces espèces phytoplanctoniques peuvent proliférer et former des efflorescences. Les facteurs présumés de ces proliférations sont d'origine anthropique (e.g. apports en nutriments liés aux pratiques agricoles, introduction d'espèces par les eaux de ballast) et climatique (e.g. effets des pluies, des eaux de ruissellement, courantologie océanique) (Lassus, 2003). Selon Anderson (2009), si l'augmentation en fréquence et en intensité des proliférations de dinoflagellés observée ces trente dernières années est une des conséquences des activités anthropiques, il faut ajouter à cela l'expansion de l'aquaculture qui a contribué à une surveillance accrue des zones de production et donc à l'observation de phytoplancton toxique jusqu'alors passé inaperçu.

En eau douce, les cyanobactéries, organismes procaryotes photosynthétiques, peuvent former des proliférations massives, colorant la colonne d'eau (Figure 16) ou s'accumulant en écumes plus ou moins épaisses.

Le déterminisme de ces efflorescences fait l'objet d'un grand nombre de travaux et il semblerait qu'un certain nombre de paramètres conditionne l'apparition des efflorescences, en particulier des teneurs élevées en azote et phosphore, la température, l'éclairement et le pH (Mur et al., 1999).

(a) (b)

Figure 16 : (a) Efflorescence à *Planktothrix agardhii* de la Base nautique de Viry-Châtillon (Essonne)
(b) Efflorescence à *Planktothrix rubescens* de l'étang du Corra (Yvelines)
(Clichés : C. Bernard)

Sur plus de 2000 espèces de cyanobactéries actuellement connues, 50 produisent des cyanotoxines (Sivonen et Jones, 1999 ; Thomazeau et Bernard, soumis). Selon un rapport de l'OMS (1998), la fréquence et l'intensité des efflorescences de cyanobactéries se sont accrues lors des dernières décennies. Cet accroissement est principalement attribué à (i) l'impact des pressions anthropiques ayant conduit à l'eutrophisation des masses d'eau et à la création de milieux aquatiques favorables aux cyanobactéries (e.g. Heisler et al., 2008) et, dans une moindre mesure, (ii) aux effets du changement climatique favorisant le développement des cyanobactéries et leur dispersion au sein de zones géographiques nouvelles (Wiedner et al., 2007 ; Paerl et Huisman, 2008). De plus, ces phénomènes ont reçu ces dernières années une attention croissante de la part de la communauté scientifique, comme en témoigne l'augmentation des travaux publiés dans des revues à comité de lecture (Thomazeau et Bernard, soumis).

III.1.2. Impacts environnementaux des efflorescences

En eau douce tout comme en milieu marin, les efflorescences de microalgues sont le plus souvent mono- ou oligospécifiques et induisent une diminution de la biodiversité du milieu (Crossetti et al., 2008). En effet, une compétition directe pour la lumière et / ou les nutriments ou indirecte par des phénomènes d'ombrage peut entrainer la disparition d'habitats pour les invertébrés et les poissons (Paerl et Huisman, 2008). De plus, les proliférations de microalgues peuvent avoir des conséquences sur la stabilité des paramètres physico-chimiques et donc des effets néfastes sur l'équilibre des écosystèmes. Ainsi, des anoxies,

résultant de la décomposition des microalgues par des bactéries hétérotrophes sont parfois associées aux efflorescences, provoquant une forte mortalité de populations de poissons (Hudnell, 2008).

III.1.3. Impacts des toxines sur les écosystèmes

En milieu marin, le zooplancton peut consommer des dinoflagellés producteurs de phycotoxines. Selon Kozlowsky-Suzuki et al. (2009), des copépodes nourris avec des cultures de dinoflagellés toxiques voient leur taux de fécondité et leur croissance diminuer sans que l'on puisse pour autant attribuer ces effets aux toxines elles-mêmes ou à d'autres composés inhibiteurs.

En eau douce, le développement d'efflorescences toxiques peut perturber le fonctionnement des écosystèmes, notamment par inhibition des fonctions de croissance, d'alimentation et de reproduction des organismes (Wiegand et Pflugmacher, 2005).

Les cyanotoxines en eau douce et les phycotoxines en milieu marin sont donc susceptibles de gagner les réseaux trophiques supérieurs par accumulation dans le zooplancton phytophage puis par transfert dans des bivalves filtreurs.

III.2. Risques pour la santé humaine et animale et conséquences économiques

III.2.1. Risques liés à la contamination directe

En milieu dulçaquicole, les biomasses phytoplanctoniques peuvent être importantes, avec des concentrations en chlorophylle a supérieures à 100 $\mu g.L^{-1}$. Une augmentation de la biomasse en cyanobactéries peut provoquer une augmentation de la concentration en toxines dans le milieu. En milieu marin, les biomasses phytoplanctoniques sont en général plus faibles, de l'ordre de 10 à 20 µg de chlorophylle par litre d'eau. Mais, en dépit de faibles biomasses, les concentrations en phycotoxines peuvent être importantes.

Dans ce contexte, le risque de contamination directe intervient essentiellement par ingestion d'eau contaminée ou par contact.

Dès 1878, en Australie, Francis fut le premier à relier la présence d'efflorescences à cyanobactéries à la mortalité d'animaux domestiques. Récemment, la mort de chiens dans le Jura et dans les gorges du Tarn a été directement imputée à la présence d'anatoxine-a, neurotoxine produite par des cyanobactéries benthiques du genre *Phormidium* (Gugger et al., 2005 ; Cadel-Six et al., 2007). Le cas le plus grave d'intoxication humaine par des

cyanotoxines s'est produit en 1996 dans un hôpital du Brésil où cinquante personnes sont décédées suite à une hémodialyse effectuée par voie intraveineuse avec de l'eau contaminée par des microcystines (Jochimsen et al., 1998 ; Carmichael et al., 2001).

Les cyanotoxines engendrent également des problèmes dans les exploitations agricoles ou dans les parcs zoologiques pour les animaux s'abreuvant dans une réserve d'eau contaminée. De plus, le problème de la salubrité des cultures maraîchères a été soulevé lorsque celles-ci sont arrosées avec de l'eau contenant des cyanotoxines (Codd et al., 1999).

Par ailleurs, la majorité des eaux de boisson provient de réservoirs d'eau de surface et leur contamination par des cyanobactéries potentiellement toxiques représentent un souci permanent pour les gestionnaires de traitement et de distribution des eaux (Hoeger et al., 2004 ; Orr et al., 2004). Dans les filières de traitement d'eau potable, les proliférations de cyanobactéries peuvent provoquer un encrassement des filtres, ce qui complique le processus de traitement des eaux.

Les aires de baignade et d'activités nautiques avec des efflorescences à cyanobactéries toxiques représentent le danger majeur pour l'homme. Ce risque est plus élevé pour les enfants qui sont susceptibles d'avaler d'importantes quantités d'eau en nageant ou en jouant (AFSSA, 2006). Il faut également tenir compte des sports nautiques tels que le ski nautique, l'aviron, le canoë, etc. qui produisent des aérosols pouvant contenir des toxines qui sont alors inhalées et sont au contact de la muqueuse des voies aériennes. Des études menées chez la souris ont montré que les effets toxiques de l'anatoxine-a étaient plus importants si la toxine était administrée par instillation nasale plutôt que par absorption orale (Sivonen, 2000).

En milieu marin, Backer et al. (2003) rapportent également en Floride le cas d'une centaine de personnes qui ont présenté des atteintes des voies respiratoires (gêne respiratoire, toux) après avoir été en contact avec des aérosols contenant des brévétoxines. En effet, les cellules de *Karenia brevis*, dinoflagellé producteur de brévétoxines ne possèdent pas de thèque protectrice et se lysent aisément libérant alors les toxines sous forme d'aérosols. Lorsque les brévétoxines sont inhalées, elles provoquent des difficultés respiratoires d'autant plus importantes chez les personnes souffrant d'asthme par exemple (Fleming et al., 2009). Des études complémentaires ont été menées afin d'évaluer la dispersion de ces toxines sous l'effet du vent à l'intérieur des terres. Kirkpatrick et al. (2009) ont détecté des quantités non négligeables de brévétoxines jusqu'à 4 km à l'intérieur des terres, mettant ainsi en évidence un risque chronique lié aux brévétoxines pour les personnes ne vivant pas nécessairement à proximité de la côte et souffrant d'insuffisance respiratoire ou d'asthme.

III.2.2. Risques liés à la bioaccumulation des toxines

Le phytoplancton constitue la nourriture de base des mollusques bivalves filtreurs. En milieu marin, les saxitoxines contaminent différents niveaux de la chaîne alimentaire (Figure 17).

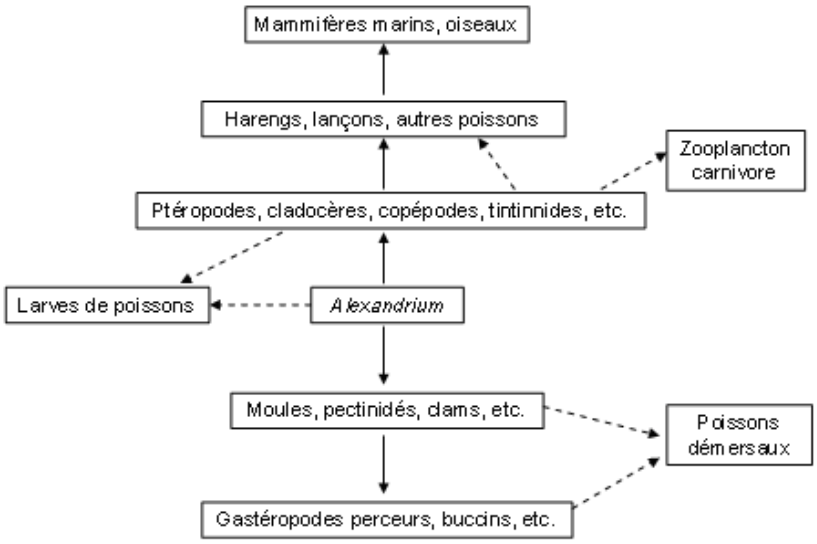


Figure 17 : Exemple de voies de transmission des saxitoxines dans les chaînes alimentaires pélagiques (d'après Bourdeau et al., 2001)
(Les flèches pleines représentent les voies connues et les flèches en pointillés les voies possibles).

A ce titre, les toxines produites peuvent être bioaccumulées dans les coquillages consommés par l'homme et ainsi représenter un problème de santé publique et de sécurité alimentaire.
En milieu marin, les efflorescences toxiques ont donc des conséquences sanitaires sur des filières très importantes comme les produits de la pêche et de l'aquaculture mais également sur les activités touristiques (eaux colorées, production de mucilage). Outre le risque que ces toxines naturelles représentent pour l'homme, les répercussions économiques de ces phénomènes ne sont pas négligeables. En effet, l'apparition d'efflorescences peut :

- modifier les caractéristiques du milieu (pH, taux d'oxygène…) et ainsi provoquer un ralentissement de la croissance des bivalves, voire provoquer des mortalités importantes (Fernández et al., 2003),

- produire des composés néfastes qui rendent les coquillages impropres à la vente, soit parce qu'ils prennent une couleur inhabituelle (due par exemple au cilié *Mesodinium rubrum*) ou un goût inhabituel (dû à la présence de diatomées du genre *Rhizosolenia* (Fernández et al., 2003)).

Les phycotoxines sont également responsables de par le monde de nombreuses intoxications humaines. Celles-ci sont essentiellement causées par l'ingestion de coquillages contaminés ou

par la consommation de poissons rendus toxiques par bioaccumulation de toxines, comme dans le cas de la ciguatera.

D'un point de vue épidémiologique, il est très difficile d'avancer des chiffres concernant l'incidence des phycotoxines. En France, les spécialistes s'accordent à dire qu'il y a une extension des zones littorales touchées (Harvey et La Vieille, 2003). Malgré la volonté de mettre en place des réseaux de surveillance, les données épidémiologiques sont fragmentaires du fait que les personnes intoxiquées présentant des troubles modérés ne consultent pas de médecin et se rétablissent rapidement. De plus, les intoxications liées aux phycotoxines sont souvent méconnues du corps médical en dehors des zones littorales.

Les phycotoxines sont responsables de pertes financières importantes dans les filières de l'aquaculture et de la conchyliculture. En mai 2005, le bassin d'Arcachon a connu un épisode noir sur le plan financier lorsque la commercialisation des huîtres a été suspendue pendant plus de 5 semaines, suite à la détection de microalgues toxiques. Depuis 2005, des épisodes de toxicité atypique ont été décrits de nouveau en 2007 et 2008, perturbant considérablement la commercialisation des huitres et des moules du bassin d'Arcachon et entrainant de vives protestations de la part des conchyliculteurs.

Si les cyanotoxines sont connues pour s'accumuler dans les coquillages filtreurs, le risque d'intoxication suite à une ingestion de bivalves d'eau douce est faible puisqu'ils ne sont consommés qu'exceptionnellement. Par contre, les cyanobactéries vendues comme compléments alimentaires peuvent présenter un risque potentiel pour le consommateur ainsi que l'a démontré une étude récente (Rellan et al., 2009). Les poissons d'eau douce sont également susceptibles de bioaccumuler des cyanotoxines comme l'ont montré des études récentes (e.g. Ibelings et Chorus, 2007 ; Galvao et al., 2009). Le risque pour l'homme lié à la consommation de poissons contaminés est pour l'heure peu pris en compte car les données manquent pour réaliser une évaluation du risque.

IV. Réglementation européenne et/ou française et méthodes d'analyse

La prise en compte du danger que représentent les cyanotoxines en eau douce est récente. De ce fait, il n'y a, pour l'heure pas de réglementation en vigueur. Des recommandations ont cependant été émises par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Elles sont présentées au paragraphe IV.1.

En milieu marin, la reconnaissance du risque que représentent les phycotoxines a conduit à la mise en place de plans de surveillance et de mesures de gestion.

IV.1. Recommandations liées aux cyanobactéries : le cas de la France

La reconnaissance à l'échelle européenne de l'importance qu'il faut accorder à la préservation des eaux de surface est illustrée par la Directive Cadre sur l'Eau (DCE ; 2000/60/EC). Cette directive propose un cadre administratif pour la gestion intégrée des bassins versants des cours d'eau. L'objectif de la DCE est d'atteindre un niveau de "bonne qualité" des masses d'eau à travers l'Europe à l'horizon 2015. La DCE n'intègre pas la problématique des cyanobactéries mais propose un cadre général pour mieux gérer l'impact de l'eutrophisation issue de l'intensification des activités humaines.

La prise en compte du risque sanitaire issu des proliférations de cyanobactéries est quant à elle relativement récente. L'identification et la caractérisation des métabolites toxiques de cyanobactéries remontent au milieu des années 1980, tandis que les connaissances sur leurs effets toxiques sur les organismes vivants ont majoritairement été produites dans la seconde moitié des années 90. Le rapport de 1998 de l'organisation mondiale de la santé (OMS), faisant suite à l'étude épidémiologique de Pilotto et al., (1997), est encore à l'heure actuelle le document de référence en ce qui concerne les recommandations relatives aux cyanobactéries (OMS, 2003).

Ces recommandations se basent sur trois types d'indicateurs afin de faciliter les possibilités de mise en œuvre en fonction des moyens disponibles. L'OMS a également recommandé depuis 1998 de ne pas dépasser 1 $\mu g.L^{-1}$ d'équivalent microcystine-LR totale pour l'eau potable (OMS 1998, 2004). Cette valeur correspond à la concentration maximale, après traitement, considérée comme protégeant le consommateur d'une intoxication aigüe.

Au plan national, le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France s'est basé sur les recommandations de l'OMS pour émettre un avis (avis du CSHPF du 6 mai 2003) concernant les activités de baignade. Cet avis a ensuite fait l'objet d'une circulaire produite par la Direction Générale de la Santé applicable aux zones de baignades et d'activités nautiques (circulaire DGS/SD7A 2003/270[34], 2004/364[35], 2005/304[36]). Ces textes réglementaires reprennent en majeure partie les recommandations de l'OMS.

En ce qui concerne l'eau de boisson, les recommandations de l'OMS ont fait l'objet d'un arrêté au sein du Code de Santé Publique (arrêté du CSP du 11 janvier 2007) qui mentionne, aux articles R.1321-2, R.1321-3, R.1321-7 et R.1321-38, les paramètres qualitatifs de l'eau de

boisson à respecter au regard de la présence de microcystines (le seuil est fixé à 1 $\mu g.L^{-1}$ d'équivalent microcystine-LR totale pour l'eau potable). A l'heure actuelle, malgré le risque pour la santé publique que représentent les neurotoxines de cyanobactéries, aucune recommandation n'a été mise en place par l'OMS pour ces toxines. Seuls l'Australie, le Brésil et la Nouvelle-Zélande ont proposé récemment des concentrations seuils pour les saxitoxines (3 $\mu g.L^{-1}$) et les anatoxines (de 1 à 6 $\mu g.L^{-1}$).

Contrairement aux phycotoxines, aucune méthode d'analyse n'est préconisée concernant la détection des cyanotoxines.

IV.2. Réglementation et méthodes officielles d'analyse pour les toxines d'origine marine

En milieu marin, du fait des risques pour la santé humaine liés à la présence des phycotoxines dans les mollusques bivalves, les autorités compétentes ont établi des plans de surveillance et mis en place des mesures de gestion afin de garantir la santé publique.

Ces mesures s'appuient sur des données issues de l'évaluation des risques, telles que :

- l'identité des toxines et leurs conditions de stabilité (au regard des processus de cuisson ou de transformation),
- le potentiel toxique des phycotoxines considérées (d'après des études chez l'animal ou d'après des données épidémiologiques lorsqu'elles existent), de la voie d'exposition (ingestion, contact, inhalation),
- le risque aigu,
- l'identité du microorganisme toxinogène, sa répartition mondiale, son profil toxinique,
- les animaux susceptibles de bioaccumuler les toxines et la distribution de celles-ci dans les différents organes,
- les processus de transformation des toxines par les animaux,
- les habitudes alimentaires des populations humaines concernées, notamment au regard des portions consommées.

IV.2.1. Aspects réglementaires relatifs aux phycotoxines

Dans l'Union Européenne, la présence des phycotoxines dans les coquillages vivants est réglementée depuis 1991 par la Directive du Conseil 91/492/CEE qui fixe les règles sanitaires

régissant la production et la mise sur le marché de ces organismes marins. Cette directive prévoit un double système de surveillance :

- en amont : la surveillance des espèces phytoplanctoniques toxiques dans les eaux de production et de reparcage des bivalves vivants et le contrôle des niveaux de phycotoxines dans les coquillages,

- en aval : le contrôle de la salubrité des coquillages mis sur le marché (production nationale et communautaire ainsi que produits importés) par des tests biologiques.

La directive a été reprise dans les nouveaux règlements du « Paquet hygiène », en particulier dans le règlement 854/2004 qui fixe les seuils de salubrité réglementaires pour les phycotoxines réglementées et les différents textes qui sont ensuite venus compléter cette directive. Le règlement CE 2074/2005 précise notamment les méthodes de détection pour chaque famille de phycotoxines.

Les valeurs seuils pour les différents groupes de phycotoxines ainsi que les méthodes d'analyse préconisées sont résumées dans le Tableau XI.

Tableau XI : Valeurs seuils en vigueur en Europe et méthodes d'analyse préconisées pour les différents groupes de phycotoxines contaminant les coquillages

Groupe de toxine	OA et analogues	AZA	PTX	YTX	STX	AD
Valeur seuil (par kg de chair de coquillage)	160 µg éq.OA	160 µg éq. AZA1	160 µg éq. OA	1 mg éq.YTX	800 µg éq.STX	20 mg AD
Méthode d'analyse	Bioessai sur souris et LC-MS/MS				Bioessai souris / HPLC-FD[9]	HPLC-UV / ELISA

IV.2.2. Méthodes d'analyses

Pour la détection et la quantification des phycotoxines, la difficulté réside dans le fait que chaque famille de toxines comprend de nombreux analogues de structures moléculaires proches mais de niveaux de toxicité très variables.

Dans le contexte de sécurité sanitaire visant à protéger le consommateur, il est important de pouvoir prendre en compte la toxicité correspondant aux effets toxiques de tous les analogues présents dans un échantillon pour la comparer aux valeurs seuils en vigueur. Depuis de nombreuses années, la sécurité sanitaire du consommateur est donc assurée par une démarche

[9] La méthode de Lawrence (HPLC-FD) a fait l'objet d'une validation internationale (méthode AOAC 2005.06).

réglementaire basée sur des bioessais sur souris dont l'un des avantages est d'estimer la toxicité *in vivo* d'un échantillon. Des méthodes telles que la LC-MS/MS, des tests immunologiques et des tests fonctionnels basés sur le mode d'action ont également été développés.

IV.2.2.1. Le bioessai sur souris

Le bioessai sur souris est un test de toxicité aiguë (24 h maximum) qui permet d'estimer une toxicité *in vivo*. Il repose sur l'injection intrapéritonéale d'un mL d'extrait susceptible d'être toxique à un lot de trois à cinq souris. L'observation des symptômes et du délai de survie permet d'identifier le type de toxicité de l'échantillon.

Famille des saxitoxines

Le bioessai sur souris est actuellement le test toxicologique de référence pour la détection des saxitoxines dans les coquillages destinés à la consommation. Les échantillons sont obtenus après une extraction spécifique (extraction à chaud en présence d'HCl 0,1 M (selon le protocole AOAC 959.08). Les souris sont ensuite observées pendant une heure afin de noter les symptômes et les temps de survie. La limite de détection de ce bioessai est de l'ordre de 370 µg éq.STX pour 1 kg de chair, ce qui correspond à la moitié de la valeur réglementaire. Le bioessai doit au préalable être calibré avec un standard de STX afin d'établir une relation entre le temps de survie et la quantité de toxine, ce qui permet de définir une unité souris (US). Le délai de survie est ensuite transformé en unité souris en s'appuyant sur le tableau de correspondance préalablement établi. Les US sont ensuite converties en quantité d'équivalent STX en s'appuyant sur le facteur de conversion déterminé à partir de l'étalonnage des temps de survie des souris par la STX.

Des études ont mis en évidence que les coefficients de variation intra- et inter-laboratoires de ce test sont de l'ordre de 20 % (Jellett et al., 1992). Ceci est en partie lié au fait que l'utilisation d'animaux introduit une variabilité liée à leur réponse individuelle.

Plusieurs paramètres sont maintenant reconnus comme pouvant interférer avec les résultats fournis par le bioessai sur souris. Ainsi, une concentration élevée en sels ou un pH inapproprié dans l'extrait injecté aux souris provoque une augmentation de la toxicité apparente (EFSA, 2009a).

Toxines lipophiles

Concernant la détection des quatre familles de toxines lipophiles (OA et analogues, AZAs, YTXs et PTXs), le bioessai sur souris repose sur l'injection par voie i.p. d'un extrait d'hépatopancréas ou de chair totale à un lot de 3 souris. La mort d'au moins deux souris sur trois dans les 24 heures est considérée comme critère de la présence d'une ou plusieurs toxines dans des proportions supérieures aux valeurs seuils fixées.

Ce test présente l'avantage de pouvoir détecter en routine la présence d'une toxicité nouvelle ou émergente ou de nouveaux analogues d'une toxine déjà connue. Il permet d'obtenir une réponse quantitative aux niveaux seuils et donne des indications sur les toxines impliquées par l'observation des symptômes de la souris.

Néanmoins, les protocoles d'extraction pour les toxines lipophiles n'ont pas fait l'objet d'une validation. De plus, les toxines du groupe des imines cycliques (e.g. spirolides, gymnodimines) peuvent être détectées par le bioessai sur souris pour les toxines lipophiles, compliquant ainsi l'interprétation des résultats.

Enfin, ces dernières années, au vu des difficultés d'interprétation des résultats du bioessai sur souris concernant le nombre croissant de familles de toxines lipophiles répondant à ce test,, la décision 2002/225/CE établit la possibilité d'utiliser des méthodes complémentaires pour la détection des familles de toxines lipophiles.

L'une des approches retenues est basée sur l'utilisation de la LC-MS/MS.

IV.2.2.2. Méthodes analytiques

Elles sont basées sur un couplage entre la chromatographie liquide et une détection spécifique pour chaque famille de toxines (e.g. fluorescence pour les saxitoxines, spectrométrie de masse en tandem pour les toxines lipophiles).

Concernant la détection des toxines lipophiles, une méthode multi-toxines a été développée. Le principal problème est l'indisponibilité des standards pour tous les analogues de toxines lipophiles. En effet, un seul fournisseur (National Research Council, Canada) commercialise un petit nombre de standards certifiés.

Les techniques analytiques permettent donc de détecter et quantifier les analogues pour lesquels des standards sont disponibles. Pour les autres, la quantification est faite par extrapolation par rapport au standard disponible représentatif de la famille de toxines.

Les quantités de toxines ainsi déterminées doivent ensuite être converties au moyen des facteurs de toxicité relative (Toxicity Equivalent Factor: TEF) pour obtenir une toxicité en

équivalent à la toxine utilisée pour la calibration. Mais, ces facteurs ne sont pas disponibles pour tous les analogues d'une famille, du fait notamment de l'indisponibilité commerciale d'un grand nombre de standards.

Les techniques analytiques sont très sensibles avec des limites de quantification inférieures aux valeurs réglementaires. Mais, en routine, elles ne permettent pas d'identifier une nouvelle toxine ou de nouveaux analogues d'une toxine déjà connue. Enfin, seuls un petit nombre de méthodes ont fait l'objet d'une procédure de validation inter-laboratoire.

IV.2.2.3. Méthodes immunologiques

Ces méthodes sont basées sur une reconnaissance structurale des toxines par des anticorps ; le couplage de l'anticorps avec un chromophore permet leur détection. Différents formats sont commercialisés actuellement. Une méthode ELISA a été officiellement validée pour la détection de l'acide domoïque (méthode AOAC 2006.02) et son utilisation est officiellement autorisée dans l'Union européenne à des fins de dépistage.

Contexte et objectifs

L'accroissement en fréquence et en intensité des efflorescences phytoplanctoniques (e.g. Araoz et al., 2009 ; Anderson, 2009) a conduit à la mise en place de dispositifs de surveillance permettant de protéger le consommateur. Dans cet objectif, des réglementations ont donc été mises en place au début des années 1990 pour les phycotoxines contaminant les coquillages. Concernant les cyanotoxines, la France a mis en place des recommandations pour la surveillance des plans d'eau à usage récréatif et de production d'eau potable (d'après les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé ; Falconer et al., 1999).

En première approche, l'observation et l'identification des espèces phytoplanctoniques présentes dans le milieu sont un indicateur de contamination. D'un point de vue historique et dans un souci de protection du consommateur, la détermination du niveau de toxicité des coquillages s'est appuyée sur une approche *in vivo* en raison d'un manque de connaissances de l'ensemble des analogues toxiques des familles. Les tests sur animaux, et en particulier les bioessais sur souris, apparaissent donc comme l'approche la plus globale et la plus rapide pour mettre en évidence une toxicité. Cependant, l'interprétation des résultats des tests *in vivo* s'est complexifiée au cours de ces dernières années car de nouvelles familles de toxines, pour lesquelles les modes d'action ne sont pas connus, répondent à ce test peu spécifique. Pour une meilleure compréhension des épisodes toxiques, les scientifiques ont alors développé des méthodes plus spécifiques telles que les méthodes chimiques en utilisant les standards disponibles. Cela a contribué à compléter les connaissances des nouvelles familles de toxines, à s'interroger sur les effets toxiques et les risques qu'elles représentent pour l'homme (EFSA, 2007 ; 2008a ; 2008b ; 2009a ; 2009b ; 2009c et 2009d).

En 2010, au niveau européen, les méthodes *in vivo* utilisées pour la surveillance des phycotoxines sont amenées à changer au profit des méthodes spécifiques telles que la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Ces méthodes ont pour principe d'identifier et de quantifier individuellement les toxines contaminant les échantillons et ainsi de fournir le profil toxinique des extraits. Néanmoins, ces méthodes chromatographiques ne permettent pas, dans un cadre de vigilance, de détecter de nouveaux analogues de toxines connues et de nouvelles toxines.

Face à l'expansion mondiale des épisodes toxiques non expliqués, il est nécessaire d'adopter une démarche globale qui vise à apporter des connaissances complémentaires (e.g. toxicités *in vivo* et *in vitro*, chimie des toxines, identification du phytoplancton) permettant de mieux caractériser le danger pour l'homme lié aux toxicités nouvelles ou émergentes et de mieux comprendre les épisodes toxiques. Pour les toxines phytoplanctoniques, les modèles cellulaires constituent une alternative en plein développement.

En effet, dès 1954, Pomerat et Leake ont décrit les principaux avantages de l'utilisation des cultures de cellules pour étudier l'activité de substances toxiques : (i) un contrôle plus précis des conditions expérimentales, (ii) du matériel biologique uniforme permettant de multiplier les expériences afin d'avoir des résultats statistiquement exploitables, (iii) une relative simplicité expérimentale. Au cours des deux dernières décennies, les techniques *in vitro* ont connu des avancées importantes pour l'étude de la toxicité de composés chimiques (Hartung, 2009). L'utilisation des lignées cellulaires a notamment permis d'acquérir des connaissances sur des phénomènes biologiques jusque là accessibles uniquement sur des animaux de laboratoire. Elles sont également utilisées de longue date pour rechercher les composés d'origine marine présentant un intérêt pharmaceutique ou thérapeutique potentiel (e.g. Mayer et Hamman, 2005 ; Blunt et al., 2008). Dans le domaine des toxines de microalgues, les lignées cellulaires ont été employées dès la fin des années 1980 pour étudier les cibles biologiques et les mécanismes d'action à l'échelle cellulaire de différentes toxines. A l'heure actuelle, les modèles cellulaires s'inscrivent comme un outil complémentaire pour (i) l'étude dans un cadre fondamental des effets à l'échelle cellulaire des toxines de microalgues et l'apport de connaissances pour caractériser des épisodes toxiques inconnus, (ii) la mise en évidence de toxicités atypiques, en complément des bioessais sur souris, dans le cadre d'un dispositif de vigilance (iii) et la mise au point de méthodes de détection complémentaires des toxines.

Ce travail de thèse a pour objet d'apporter une contribution à l'évaluation du risque pour l'homme que représentent les toxines phytoplanctoniques à effet neurotoxique, en se basant spécifiquement sur l'analyse des réponses de modèles cellulaires.

Le choix du modèle cellulaire Neuro-2a (neuroblastomes de souris) s'appuie sur l'état des connaissances bibliographiques quant à son utilisation la détection des saxitoxines dans des coquillages (e.g. Jellett et al., 1992). La démarche expérimentale a été d'utiliser ce modèle cellulaire pour étudier les réponses face à différentes toxines pour lesquelles les niveaux de connaissances sont différents, notamment au niveau des modes d'action.

Ainsi, dans la première partie, nous avons commencé avec la famille des saxitoxines dont le mode d'action sur le canal sodium voltage-dépendant est bien connu (Kogure et al., 1988) avec l'objectif de répondre aux questions suivantes :

- La lignée cellulaire Neuro-2a répond-elle de façon sensible et spécifique à différents analogues de saxitoxines ?

- Quelle est la spécificité de réponse du test sur Neuro-2a avec des matrices complexes d'origine phytoplanctonique ?
- Quelle est la variabilité des réponses obtenues à l'échelle intra-laboratoire et inter-laboratoires ?
- Quelles informations complémentaires le test sur Neuro-2a permet-il d'obtenir par rapport à d'autres méthodes d'analyse ?
- Peut-on utiliser le test Neuro-2a comme un outil de gestion du risque lié au saxitoxines dans le cadre de la surveillance d'un plan d'eau à usage récréatif ?

Puis, dans une deuxième partie, nous avons utilisé ce même modèle cellulaire Neuro-2a pour investiguer une autre famille neurotoxique ayant un mode d'action différent (pompe Na^+,K^+-ATPase) : la palytoxine et ses analogues. Notre objectif est de caractériser les réponses du modèle cellulaire pour pouvoir, *in fine*, proposer une méthode basée sur l'action des PlTXs sur la pompe Na^+,K^+-ATPase qui pourrait être intégrée à une batterie de tests *in vitro*. Les questions suivantes ont donc été abordées :

- Quelle est la sensibilité de la lignée Neuro-2a en réponse à un traitement avec la PlTX standard et quel est le temps de traitement optimal ?
- Sur la base du mode d'action de la PlTX sur la pompe Na^+,K^+-ATPase et de l'effet antagoniste connu de l'ouabaïne, quelles sont les conditions optimales permettant de détecter spécifiquement la PlTX ?
- Peut-on détecter spécifiquement et quantifier en équivalent PlTX des analogues de la PlTX produits notamment par une efflorescence d'*Ostreopsis* dont on sait qu'elle contient de l'ovatoxine-a ?
- Quel est, dans nos conditions expérimentales et après une extraction méthanolique peu spécifique, l'effet matrice de chair totale de moules supplémentées avant ou après extraction en PlTX de façon à approcher la valeur seuil proposée en 2005 de 250 µg éq.PlTX par kg de chair ?

Enfin, l'objet du troisième chapitre de la thèse est d'étudier les effets à l'échelle cellulaire du 13-desméthyle-C spirolide (SPX-dC) sur le modèle cellulaire Neuro-2a et sur un autre modèle. Notre objectif est donc d'améliorer les connaissances des effets des spirolides à l'échelle cellulaire en répondant à plusieurs questions :

- Quelle est la réponse des modèles cellulaires choisis à une exposition au SPX-dC ?

- Des agonistes ou des antagonistes des récepteurs nicotiniques ou muscariniques ont-ils un effet sur la mortalité cellulaire ?
- Quels paramètres peut-on mesurer pour évaluer l'effet toxique du SPX-dC sur lignée cellulaire ?

Chapitre 2

Contribution à l'évaluation du risque lié à la présence de saxitoxines par un test sur lignée cellulaire

La présence des STXs en milieu marin tout comme en eau douce représente un danger pour l'homme du fait de leur potentiel neurotoxique. En milieu marin, les risques d'intoxication sont principalement liés à la consommation de coquillages contaminés par les STXs tandis qu'en milieu dulçaquicole, plusieurs voies d'exposition peuvent être envisagées (e.g. par ingestion d'eau contaminée ou par ingestion de poissons contaminés).

Du fait du risque pour la santé humaine représenté par les STXs, cette famille de toxines fait l'objet d'une réglementation, notamment à l'échelle européenne, concernant la teneur maximale de STXs présente dans les coquillages destinés à la consommation et les méthodes d'analyse autorisées pour le contrôle officiel.

Différentes méthodes de détection ont été développées pour le contrôle et pour la compréhension des épisodes toxiques, basées soit sur le mode d'action, soit sur la reconnaissance structurale des STXs (Encart 3).

Encart 3 – Principales méthodes de détection et de quantification des saxitoxines

Les méthodes basées sur ***le mode d'action*** reposent sur la liaison des saxitoxines à des cibles sensibles.

Le **bioessai sur souris** est la méthode de référence pour la détection des STXs dans les bivalves, c'est un test de toxicité qui est encore très pratiqué à l'échelle mondiale.

Les **tests sur lignées cellulaires** se développent largement. Ils reposent sur l'utilisation de la lignée Neuro-2a pour la détection spécifique des STXs (Kogure et al., 1988).

Les **tests de liaison** sont basés sur l'utilisation de synaptosomes isolés de cerveaux de rat riches en canaux sodium et sur la compétition entre de la STX radiomarquée avec de la STX froide pour la liaison au récepteur. L'emploi de ce type de test reste limité du fait de l'utilisation de marqueurs radioactifs.

Les tests immunologiques et les techniques de chimie analytique sont basés sur la ***reconnaissance structurale*** des toxines.

Les **tests immunologiques** basés sur la reconnaissance des toxines par des anticorps polyclonaux (Micheli et al., 2001) ou monoclonaux (e.g. Usleber et al., 1991) sont de principe rapides à mettre en œuvre. Cependant, les anticorps utilisés sont sujets à des différences voire à l'absence de réactivité croisée en fonction des analogues présents dans un échantillon et peuvent donc conduire à une sous-estimation du contenu en saxitoxines. De plus, ils sont sujets à des effets matrice significatifs.

Les méthodes **HPLC-FD** (pré- ou post-colonnes) présentent l'avantage de fournir des indications sur le profil toxinique d'un extrait mais sont longues à mettre en œuvre et souffrent du manque de standards certifiés, tout comme la LC-MS/MS.

La méthode **LC-MS/MS** (e.g. Dell'Aversano et al., 2005) repose sur l'utilisation de colonnes chromatographiques à interactions hydrophiles, adaptées à des composés polaires tels que les STXs. La complexité des profils obtenus et les faibles intensités des ions obtenus en spectrométrie de masse font que les limites de détection sont assez élevées (100 µg $STX.kg^{-1}$). Une limite de détection plus basse (e.g. pour STX : 23-42 µg eq $STX.kg^{-1}$) a été obtenue par Sayfritz et al. (2008) en améliorant les conditions d'extraction.

Pour les méthodes analytiques, les quantités de toxines totales doivent être calculées en utilisant les TEF, avec les limites décrites plus haut.

	Méthodes basées sur mode d'action			**Méthodes basées sur structure chimique**		
	Bioessai sur souris	Tests de liaison	Tests sur lignée cellulaire	Tests immunologiques	HPLC-FD	LC-MS/MS
Sensibilité	++	++	+++	+/-	++	+
Spécificité	++	++	+++	+/-	++	+++
Variabilité	+	++	++	+	++	++
Quantification	+	++	++	+/-	++	++
Technicité	++	+++	++	+	+++	+++
Coût	++	++	+	+++	+++	+++
Ethique	-	+	+++	++	+++	+++

Les tests sur lignées cellulaires, en tant que méthodes basées sur le mode d'action, vont prendre en compte l'ensemble des analogues agissant sur la cible et présentent l'avantage de fournir un résultat exprimé en équivalent STX, par rapport au standard utilisé.

A l'échelle cellulaire, le mode d'action des STXs sur la sous-unité α des canaux sodium voltage-dépendants est bien documenté. Cela a permis à Kogure et al. (1988) de proposer un test permettant de détecter la présence des toxines paralysantes en étudiant leurs effets sur une lignée de neuroblastomes murins (Neuro-2a). En présence de toxines bloquant les canaux sodium, il est possible d'observer des variations de la viabilité des cellules. Cependant, les réponses détectables, morphologiques ou colorimétriques, sont de faible ampleur. Afin de quantifier plus facilement la réponse, deux autres molécules toxiques sont utilisées : la vératridine et l'ouabaïne (Figure 18).

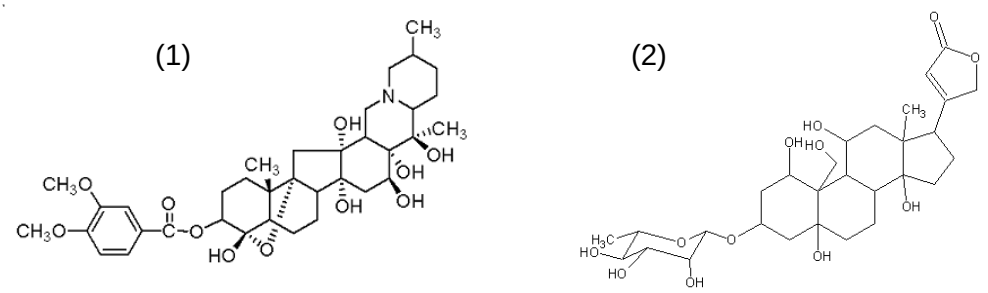


Figure 18 : Structure chimique de la vératridine (1) et de l'ouabaïne (2)

La première provoque un flux entrant d'ions sodium dans la cellule tandis que la seconde inhibe les pompes sodium / potassium, ce qui permet d'accroître l'effet de la vératridine.

En présence de ces deux molécules, l'accumulation d'ions Na^+ augmente la pression osmotique intracellulaire et provoque l'éclatement des cellules, donc leur mort (Figure 19).

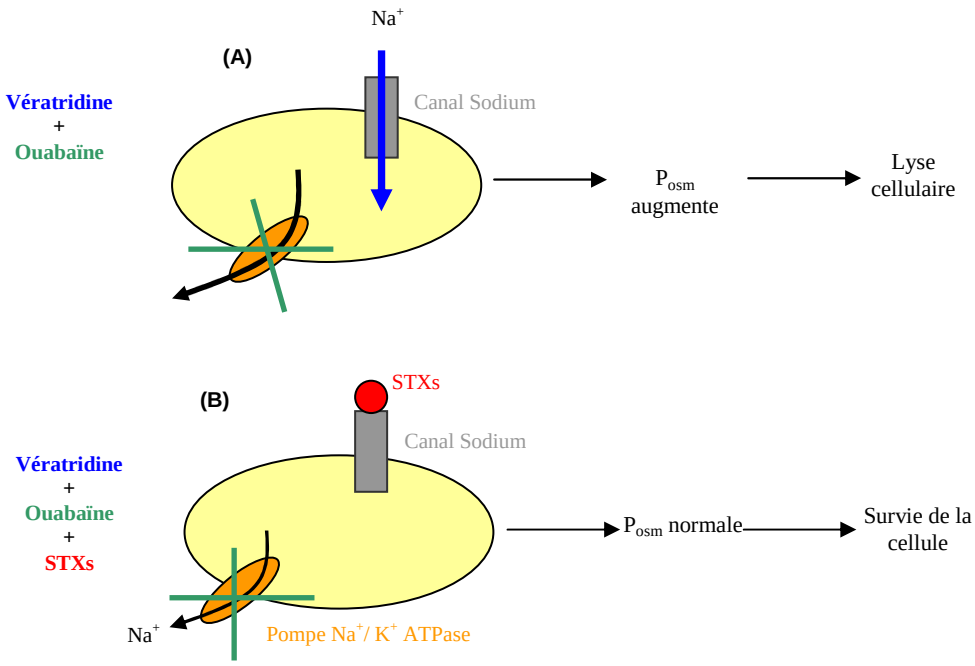


Figure 19 : Schéma représentant l'action du couple Ouabaïne / Vératridine sur le flux d'ions sodium, en absence (A) et en présence (B) de STXs.
(P_{osm} : pression osmotique intracellulaire)

En présence de STXs, toxines bloquant les canaux sodium, l'effet de la vératridine est inhibé, ce qui a pour conséquence la survie des cellules. Au contraire, en présence de brévétoxines activatrices des canaux sodiques, la viabilité des cellules diminue. La mesure du nombre de cellules viables se fait au moyen d'une méthode colorimétrique basée sur la capacité de ces cellules à métaboliser un marqueur au niveau mitochondrial.

L'objectif de notre travail est de tester l'hypothèse selon laquelle ce test sur lignée cellulaire, développé initialement pour la détection des STXs produites par les dinoflagellés en milieu marin et bioaccumulées dans les coquillages, pourrait être appliqué à la détection des STXs produites en eau douce par les cyanobactéries. En effet, les dinoflagellés et les cyanobactéries produisent des analogues différents de STXs, ces dernières produisant généralement des analogues moins toxiques tels que les toxines C.

Dans ce contexte, il est intéressant de voir si le test sur la lignée cellulaire de neuroblastomes initialement développé par Kogure et al. (1988), puis amélioré par Jellett et al. (1992) et Manger et al. (1993 ; 1995) répond qualitativement de façon équivalente pour les STXs de cyanobactéries.

Dans ce but, notre démarche expérimentale comprend les étapes suivantes :

1. Peut-on distinguer dans nos conditions expérimentales différents analogues de STXs avec le test sur la lignée cellulaire de neuroblastomes Neuro-2a ?	**Article 1** Application of the neuroblastoma assay for Paralytic Shellfish Poisons to neurotoxic freshwater cyanobacteria: Interlaboratory calibration, and comparison with other methods of analysis.
2. Quelle est la spécificité de réponse du test sur Neuro-2a avec des matrices complexes d'origine phytoplanctonique, *i.e.* des extraits d'efflorescences à cyanobactéries ?	
3. Quelle est la variabilité des réponses à l'échelle intra-laboratoire puis inter-laboratoires ? (en collaboration avec un laboratoire australien)	
4. Quelles informations complémentaires le test sur Neuro-2a permet-il d'obtenir par rapport à d'autres méthodes de détection (HPLC-FD, LC-MS/MS, Jellett Rapid Test for PSP™) ?	
5. Dans le cadre de la surveillance d'un plan d'eau à usage récréatif, le test sur lignée cellulaire de neuroblastomes peut-il être utilisé comme un outil de gestion du risque lié aux STXs ?	**Article 2** First report of saxitoxins produced by the cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in a French recreational water body.

Les résultats obtenus au travers de ces deux études sont ensuite discutés.

Article 1 : Application of the neuroblastoma assay for paralytic shellfish poisons due to neurotoxic freshwater cyanobacteria: Interlaboratory calibration and comparison with other methods of analysis

publié dans Environmental Toxicology and Chemistry

SETAC PRESS

Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 26, No. 7, pp. 1512–1519, 2007
© 2007 SETAC
Printed in the USA
0730-7268/07 $12.00 + .00

APPLICATION OF THE NEUROBLASTOMA ASSAY FOR PARALYTIC SHELLFISH POISONS TO NEUROTOXIC FRESHWATER CYANOBACTERIA: INTERLABORATORY CALIBRATION AND COMPARISON WITH OTHER METHODS OF ANALYSIS

ANDREW R. HUMPAGE,*† AURÉLIE LEDREUX,‡ STELLA FANOK,† CÉCILE BERNARD,‡ JEAN-FRANÇOIS BRIAND,§ GEOFF EAGLESHAM,‖ JOHN PAPAGEORGIOU,† BRENTON NICHOLSON,† and DENNIS STEFFENSEN†
†Australian Water Quality Centre, Private Mail Bag 3, Salisbury, South Australia 5108, Australia
‡Muséum National d'Histoire Naturelle, Unité Scientifique du Muséum 505, 12 Rue Buffon, 75231 Paris Cedex 05, France
§Laboratoire des Sciences de l'Eau et de l'Environnement, Faculté des Sciences, 123 Avenue Albert Thomas, 87 060 Limoges Cedex, France
‖Queensland Health Scientific Services, 39 Kessels Road, Coopers Plains, Queensland 4108, Australia

(*Received* 6 *February* 2006; *Accepted* 8 *February* 2007)

Abstract—Paralytic shellfish poisons (PSPs) are produced by freshwater cyanobacteria and pose a threat to human and animal drinking-water supplies. The wide range of toxin analogues (and the likelihood that further analogues remain to be discovered) means that chromatographic methods are not always reliable indicators of toxicity. Although the mouse bioassay remains the method of choice in the seafood industry, its use is increasingly being questioned on ethical grounds. The cell-based Neuro-2A neuroblastoma toxicity assay is an alternative bioassay validated for testing shellfish extracts, so it was of interest to determine its applicability with the different suite of toxin analogues produced by cyanobacteria. Cyanobacterial bloom samples from Australia, Brazil, and France were assayed using the neuroblastoma assay, liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection, and the Jellett Rapid Test for PSP[TM]. To assess interlaboratory variability, the neuroblastoma assay was set up in laboratories in Paris (France) and Adelaide (Australia). Neuroblastoma and chromatographic methods gave comparable results except in the case of the neurotoxic Brazilian samples: LC-MS/MS did not detect the putative new PSPs contained in these samples. Inter- and intralaboratory variability of the neuroblastoma assay was typical of biological assays but no greater than that found for interassay variability between different chromatographic determinations. The batch of Jellett Rapid Tests for PSP used did not yield quantitative results. Overall, the neuroblastoma assay was useful as a screening assay for determination of toxicity caused by saxitoxin neurotoxins in freshwater cyanobacteria, having the advantage of being sensitive to unidentified toxins that currently cannot be quantified by chromatographic means.

Keywords—Cyanobacteria Saxitoxin Neuroblastoma assay Chromatographic methods Drinking water

INTRODUCTION

Paralytic shellfish poisons (PSPs) are a well-known cause of human and animal poisoning in a marine context; however, it is now known that they also are one of various toxin types that can be produced by freshwater cyanobacteria and, therefore, can pose a threat to drinking-water quality. Paralytic shellfish poisons produced by freshwater cyanobacteria were first detected at the beginning of the 1980s in North America in a bloom of *Aphanizomenon* sp. [1]. In Australia, a massive *Anabaena* bloom occurred in 1991 along 1,000 km of the Darling River, which caused extensive stock deaths. Bloom samples were collected and analyzed to identify the toxins responsible. A range of PSPs were identified, including saxitoxin (STXs), gonyautoxins (GTXs), and C-toxins [2]. Paralytic shellfish poisons produced by *Anabaena circinalis* have been responsible for other livestock deaths in Australia [3,4]. Moreover, their bioaccumulation in edible freshwater shellfish has been demonstrated [3]. The same authors showed that PSPs can persist in waters for three months and that some congeners can undergo chemical transformations during this time and become more toxic [5].

To date, seven cyanobacterial species have been unambiguously identified as PSP producers in freshwater. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales) produces PSPs in Brazil [6,7], *Aphanizomenon gracile* and *A. issatschenkoi* (Nostocales) in Portugal and the United States [8], *Lyngbia wollei* (Oscillatoriales) in the United States [9], *Planktothrix* sp. (Oscillatoriales) in Italy [10], and *Anabaena circinalis* (Nostocales) in Australia [11,12]. Paralytic shellfish poisons also were identified in Danish freshwater blooms dominated by *Anabaena lemmermannii* [13], and more recently, Rapala et al. [14] confirmed that this species produces PSPs in Finnish freshwater sites.

Paralytic shellfish poisons are a family of at least 25 compounds based on a tetrahydropurine structure. They can be divided into four groups depending on the substitutions in five variable positions: STXs, GTX1 to GTX6 and decarbamoyl (dc)-GTX1 to dcGTX4, C-toxins (C1 to C4), and six variants identified in American *L. wollei* strains [9,15]. In addition, new putative PSPs recently were identified in Brazilian *C. raciborskii* strains [6,7]. It also has been demonstrated that the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* produces a group of novel hydrophobic PSPs [16]. This chemical variability has meant that until recently, the standard high-performance liquid chromatography (HPLC) method of analysis required three separate runs [17], although a single-run liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) method recently was developed [18]. The number of known variants is likely to increase in the future, necessitating continuing revision of these methods.

Paralytic shellfish poisons are potent neurotoxins that act

* To whom correspondence may be addressed (andew.humpage@sawater.com.au).

Table 1. Cyanobacterial samples used in the present study[a]

Location	Date	Toxicity (mouse)	Dominant species[b]
Australian samples			
Burrinjuck Dam	May 1991	Neurotoxic	*Anabaena circinalis*, *Microcystis aeruginosa*
Chaffey Dam	May 1991	Neurotoxic	*A. circinalis*
Clydesdale Lake	Nov 1994	Non-Toxic	*A. circinalis*
Pejar Dam	March 1995	Hepatotoxic	*M. aeruginosa*, *A. circinalis*
River Darling	July 1992	Neurotoxic	*A. circinalis*
River Murray Lock 2	Jan 1992	Neurotoxic	*A. circinalis*
Wongulla Lagoon	April 1992	Neurotoxic	*A. circinalis*, *M. aeruginosa*
Wyong Farm Dam, NSW	May 1995	Hepatotoxic	*A. circinalis*, *M. aeruginosa*
Brazilian samples			
Taquecetuba reservoir, São Paulo	1994	Neurotoxic	*Cylindrospermopsis raciborskii* culture (strain T3)
Urban lagoon in Confins town, Minas Gerais State	1999	Neurotoxic	*C. raciborskii* culture (strain CP-1)
Small reservoir in Custódia town, Pernambuco State	1998	Nontoxic	*C. raciborskii* culture (strain CS-1)
French sample			
La Loue	Sept 2003	Neurotoxic	*Phormidium favosum*

[a] Information regarding Australian samples is from Velzeboer et al. [31] and data regarding Brazilian samples from Sandra Azevedo (University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil). The French sample is described by Gugger et al. [33].
[b] Genera listed in order of dominance.

on voltage-gated sodium channels of nerve cells. After binding to site 1 of the sodium channels [19], sodium ion transport is blocked, causing inhibition of axonal depolarization. In mammals, this leads to muscle paralysis and death by respiratory arrest. The toxic potency of PSP variants in mice depends on their affinity for site 1 of the sodium channel [20]. Saxitoxin is the most potent PSP (the dose required to kill 50% of treated mice [LD50] is 10 μg/kg intraperitoneally), whereas C1 is more than 160-fold less toxic [17,21].

An ideal assay for use by managers of drinking-water supplies should quantify the potential risk to public health (i.e., the toxicity present). This is particularly true when many possible toxin analogues exist. The common perception is that chromatographic methods are more accurate and reliable than biological methods. Chromatographic methods detect the individual toxins, but the risk is assessed by converting that result, formally or informally, into an estimation of toxicity. Biological assays are ideal for assimilating toxicity from multiple toxin analogues into a single average result for a particular sample, thus eliminating the need for both complicated sample preparation and derivatization, and for a full range of toxin standards.

Several biological techniques have been developed for the detection and quantification of PSPs: Immunoassays [22,23], including the Jellett Rapid Test for PSP™ (Jellett Rapid Testing, Halifax, NS, Canada); radioreceptor assays, one with mammalian sodium channels [24] and another with saxiphilin [25]; and a toxicity assay based on the mouse neuroblastoma cell line, Neuro-2A [26]. The Jellett Rapid Test for PSP looks promising and has been used to screen for PSPs in Finnish cyanobacterial blooms [14]. The Neuro-2A cell–based assay also is attractive, because it shows good cross-reactivity with the different PSPs, uses a colorimetric end point, is inexpensive compared to immunoassays, and does not require the use of radioactive material. Also, it can be adapted to detect algal toxins that activate voltage-gated sodium channels, such as brevetoxins and ciguatoxins [27–29].

The Neuro-2A cell–based assay has been validated by a number of groups for use with shellfish extracts [20,27,28], but to our knowledge, only a single publication has described its use with cyanobacterial extracts [30]. This difference is important, because marine dinoflagellates produce the more potent PSP variants STX, neosaxitoxin (neoSTX), and the GTXs, whereas cyanobacteria produce a different suite of PSPs. Australian *Anabaena circinalis* produces predominantly the low-potency C-toxins, with much lower amounts of the more potent variants [2,31], and American *L. wollei* produces *L. wollei* toxins 1 to 6. Brazilian *C. raciborskii* produces four known PSP analogues plus unidentified compounds that behave chemically and chromatographically like PSPs. Extracts of these strains produce a toxicosis in the mouse that is typical of PSPs but with a potency considerably greater than can be explained by the content of known PSPs. It is hypothesised that these findings are evidence of undescribed PSP variants [6,7].

It is open to question whether the Neuro-2A cell–based assay will respond to an extract dominated by C-toxins in a manner quantitatively similar to one dominated by, for example, STX. In the present study, a range of Australian and Brazilian field and cultured cyanobacterial isolates were analyzed by the standard HPLC method using postcolumn derivatization [17,21], by a newly developed single-run LC-tandem MS (MS/MS) method [18], by the Jellett Rapid Test for PSP [22,32], and by the Neuro-2A cell–based bioassay. Unfortunately, samples of *L. wollei* were not available at the time of the present study. To estimate interlaboratory reproducibility of the cell-based assay, the samples were analyzed at both the Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) in Paris (France) and the Australian Water Quality Centre (AWQC) in Adelaide (Australia).

MATERIALS AND METHODS

Cyanobacterial samples used in the present study

A range of cyanobacterial samples (Table 1) were selected from those previously collected in a survey of Australian blooms by Baker and Humpage [11]. These were further studied by Velzeboer et al. [31]. They included both neurotoxic and nonneurotoxic strains, with the latter including some hepatotoxic material, because it was of interest to see whether the

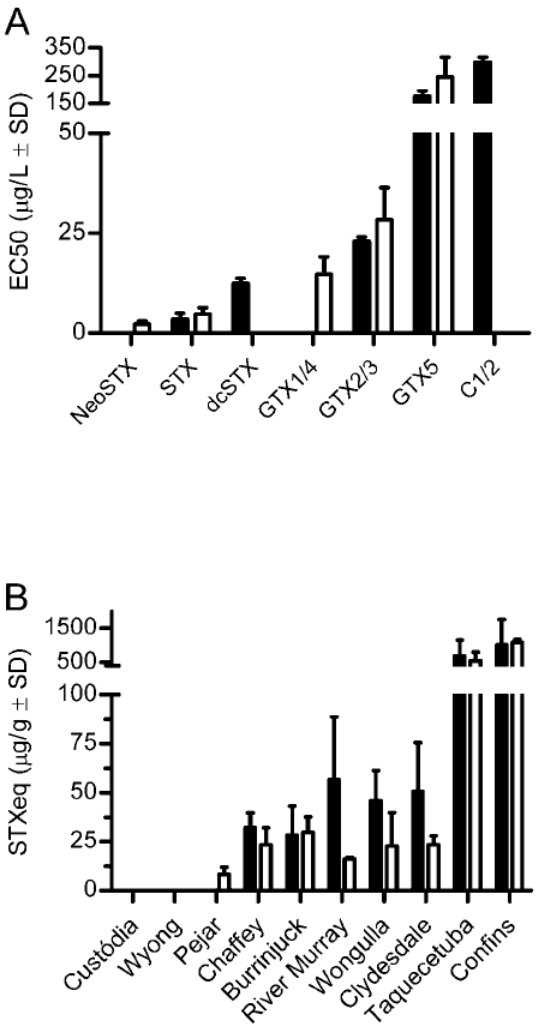


Fig. 1. Interlaboratory comparison of the Neuro-2A cell–based assay between the Australian Water Quality Centre (AWQC; Salisbury South Australia) and the Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN; Paris, France). (**A**). Comparison of the doses required to kill 50% of cells [EC50s; µg/L, mean ± standard deviation [SD]) as determined for paralytic shellfish poison (PSP) standards by each laboratory. Saxitoxin (STX), gonyautoxin (GTX) 2/3, and GTX5 were analyzed by both laboratories, whereas decarbamoyl STX (dcSTX) and C-toxin 1/2 (C1/2) were only analyzed at the AWQC and neosaxitoxin (neoSTX) and GTX1/4 only at the MNHN. (**B**). Comparison of toxicities (STX equivalent [STXeq], µg/g; mean ± SD) of extracts of cyanobacterial samples. Pejar, Custódia and Wyong are non-PSP-containing samples. The EC50s of standards appeared to be slightly higher at the MNHN than at the AWQC (Wilcoxon paired-sum test: $p < 0.05$, $n = 3$), but no significant difference was found between the results for the extracts (Wilcoxon paired-sum test: $p = 0.3125$, $n = 10$). The amount of the River Darling sample was not adequate for inclusion in the interlaboratory comparison. ■ = AWQC; □ = MNHN.

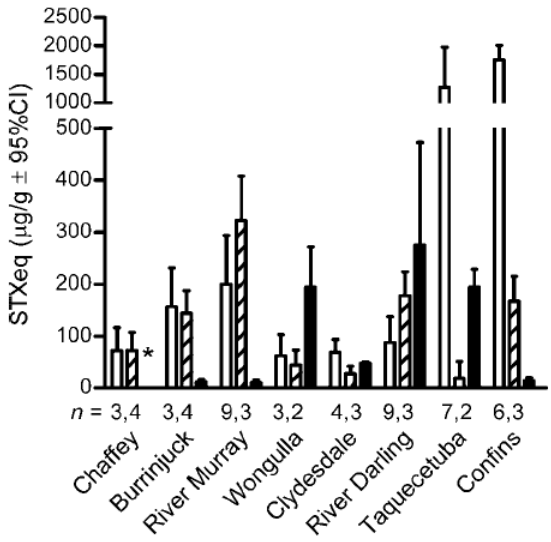


Fig. 2. Comparison of various methods for detection of paralytic shellfish poisons (Saxitoxin equivalent [STXeq]; µg/g; mean ± 95% confidence interval [CI]). Extracts were assayed using the Neuro-2A cell–based assay between three and nine times. High-performance liquid chromatography (HPLC) consists of the average of a single liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination plus one to three determinations by HPLC with postcolumn derivatization and fluorescence detection. The actual values of *n* are shown below the *x*-axis. Jellett test strips were used to assay a dilution series of each extract on a single occasion only, with the data shown being the toxin concentration producing a test band intensity of 50% of the control band intensity (mean ± 95% CI) as estimated from nonlinear regression of the concentration-response curves. A *n* value is not shown for this method. Because of these differences in derivation of the data, the 95% CI indicates the relative variability of each method but cannot be used to make statistical comparisons between them. Because of a lack of material, the Chaffey sample was not analyzed using the Jellett test strips. (□) = Neuro-2A; (▨) = HPLC; (■) = Jellett.

neuroblastoma cells would respond to microcystins. Three samples of *C. raciborskii* Seenayya Subba Raju also were obtained from Sandra Azevedo (University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil), two of which were known to contain a range of PSPs different from that in the Australian samples, including some PSP-like compounds that are as yet unidentified [6]. One sample of *Phormidium favosum* (Bory) Gomont producing the neurotoxin anatoxin-a [33] also was included to see if the neuroblastoma cells would respond specifically to PSPs.

Extraction protocols

The standard extraction procedure for shellfish uses 5% acetic acid [29]. This was cytotoxic to the neuroblastoma cells, however, so a number of alternative methods were tested. The extraction method finally used was probe sonication (50 W for 2 min; Branson Sonic Power Company, Danbury, CT, USA) in acidified ultrapure water (HCl added to attain pH 2.4), followed by centrifugation at 1,000 *g* for 10 min. The concentration of HCl used was one-tenth of that required to hydrolyze the carbamoyl-*N*-sulfates of the C-toxins [34]. This method extracted the same amount of veratridine-dependent toxicity as acetic acid (data not shown) but could be used directly in the assay without producing nonspecific cytotoxicity.

Extracts generally were made as 10-mg freeze-dried material in 3 ml of acidified water except for the extracts that were compared by the AWQC and the MNHN, for which the quantities used were 30 mg in 9 ml. The difference in Neuro-2A toxicity between these extracts (Fig. 1) and those used later at the AWQC (to produce the data as shown in Fig. 2) may be the result of reduced sonication efficiency in the larger

volume. This was not explored further, because optimization of extraction efficiency was not the primary aim of the present study.

Pure toxins used in the neuroblastoma assay

Saxitoxin, neoSTX, dcSTX, an epimeric mix of GTX2/3, an epimeric mix of GTX1/4, and GTX5 certified reference materials were obtained from the Institute for Marine Biosciences (Halifax, NS, Canada). C-toxins were purified from a natural Australian bloom of *Anabaena circinalis* using the following method: 0.5 L of the bloom material in 0.05 M acetic acid was subjected to three consecutive freeze-thaw cycles to lyse the cells. The final thawed suspension was centrifuged (10,000 *g* for 20 min), and C1/2 toxins were isolated from the supernatant and purified as described previously [35].

Neuro-2A cell–based bioassay

The Neuro-2A mouse neuroblastoma cell line was obtained from the European Collection of Cell Cultures (catalog no. 89121404; Porton Down, UK). Twenty-five thousand cells were added to each well of a 96-well microtiter plate (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) and incubated for 24 h. Then, veratridine (0.05 mM) and ouabain (0.5 mM), along with the sample (20 µl in a 200-µl total volume), were added to the culture medium (RPMI-1640 with 300 mg/L of L-glutamine and without sodium bicarbonate but supplemented with 10% newborn calf serum, 110 mg/L of sodium pyruvate, 2 g/L of sodium bicarbonate, 62.5 mg/L of penicillin G, and 100 mg/L of streptomycin sulfate, adjusted to pH 7.4 ± 0.05). The RPMI-1640 and all chemicals were from Sigma (Sydney, NSW, Australia). Newborn calf serum was from Gibco (Melbourne, Victoria, Australia). Veratridine causes sodium channels in the cell membrane to open, allowing a potentially lethal influx of sodium ions into the cell. Ouabain inhibits the action of the sodium/potassium antiporter that pumps sodium ions back out of the cell and, therefore, maximizes the effect of veratridine. The PSPs, being sodium channel blockers, counter the effect of veratridine on sodium ion influx. After a 24-h exposure, the increased survival of cells because of this PSP effect is measured using the 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan (MTT) assay (Sigma) for mitochondrial reductase activity as a surrogate for cell number [36]. The absorbance was read at 550 nm (reference, 630 nm) on a Wallac Victor 3 multilabel plate reader (PerkinElmer, Melbourne, Victoria, Australia).

Duplicate STX standard curves were run on each 96-well plate. The concentration range was 0.05 to 200 ng STX/ml (final concentration in the well), covered by 11 separate concentrations. The MTT results from the standards, expressed as the percentage of negative controls (%MTT), were fit to a sigmoid curve with variable slope. Extracts of unknowns were analyzed as four replicates each of four dilutions (undiluted, one-half, one-quarter, and one-eighth). The %MTT of the unknowns was compared with the standard curve "acceptability ranges," which were calculated from the determined values for the upper and lower plateaus of the concentration–response curve to provide ranges of 10 to 90% and 20 to 80% of the linear portion. These ranges were used to screen %MTT results of dilutions of unknowns so that only values falling within these ranges were used to calculate the STX-equivalent (STXeq) toxicity in each well from the plate standard curve. An average STXeq content (ng/ml) was calculated from the acceptable wells (taking into account dilution). Finally, the STXeq (ng/ml) was converted to STXeq content of the original sample (µg/g). To estimate sources of variance, standard deviations and coefficients of variation were calculated from accepted replicates (ng/ml) from all four dilutions of a single analysis of a sample as well as for accepted replicates within each dilution.

The final results from repeated neuroblastoma analyses of 11 cyanobacterial samples (total of 88 analyses) were compared to determine whether a significant difference in results existed using each acceptability range (10–90% vs 20–80% of the linear portion of the STX concentration–response curve). The medians were slightly but statistically significantly different (Wilcoxon matched-pairs test: $p = 0.02$, paired, two-tailed), with the 10 to 90% acceptability range producing, overall, a higher estimate of STXeq (µg/g) than the 20 to 80% range (10–90%: median, 79 µg/g; mean, 608 µg/g; 20–80%: median. 72 µg/g; mean. 549 µg/g). More importantly, in three of eight analyses of non-PSP-containing samples, the 10 to 90% range allowed acceptance of nonzero results (false positive), whereas these were rejected by the 20 to 80% range. Only 2 of 80 analyses of PSP-containing samples that were accepted using the 10 to 90% range were rejected using the 20 to 80% range to give a "no result."

Taking all of the above into account, the 20 to 80% range of the STX standard curve was used at the AWQC for calculation of STXeq from unknowns. The results of analyses based on these parameters are shown in Figure 2.

Other assay formats: HPLC, LC-MS/MS, and Jellett Rapid Test for PSP

Acetic acid (0.05 M) extracts of the freeze-dried samples also were analyzed by HPLC with postcolumn derivatization and fluorescence detection [17], and acetonitrile:water:formic acid (80:19.1:0.1, v/v/v) extracts of the rehydrated freeze-dried samples were analyzed by LC-MS/MS [18]. All chemicals used for chromatographic analyses were of analytical grade. The extracts used for the neuroblastoma assay also were tested using Jellett Rapid Test for PSP [22,32].

HPLC and LC-MS/MS. Samples were analyzed by HPLC with postcolumn derivatization and fluorescence detection [17] at the AWQC on up to three occasions using methods and standards available at each time (Table 2). The first such analysis was performed by Velzeboer et al. [31] in 2000. Subsequent analyses were done in 2002 and 2003 by three different operators, referred to as HPLC operator 1, HPLC operator 2, and HPLC operator 3. The samples also were analyzed using LC-MS/MS by G. Eaglesham at Queensland Health Scientific Services [18]. The limit of reporting was estimated to be 0.2 µg/g for most analytes except C-toxins (2.0 µg/g).

Different extracts of the samples were used on each occasion, and each analyst had a slightly different set of standards available (see Table 2). Therefore, this set of analyses mimics an interlaboratory comparison of chromatographic methods (including extraction).

Jellett Rapid Test for PSP. These test strips are lateral-flow immunochromatographic devices [32] that use antibodies to detect a range of PSPs. Detection of PSPs is based on competitive binding of PSPs in the sample versus STX immobilized at the test band. In the test strips used during the present study, a positive result is given when the test band intensity is reduced to less than half that of a control band (test band intensity of >75% of control is considered to be nontoxic). The anti-PSP antibodies are used in the test strips at concentrations that

Table 2. Toxin standards used in each chromatographic analysis[a]

Method[b]	NEO	STX	dcNEO	dcSTX	GTX1	GTX4	GTX2	GTX3	dcGTX2	dcGTX3	GTX5	C2	C1
LC-MS/MS	+	+	+[c]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HPLC1	+	+			+	+	+	+	+[d]	+[d]	+[d]	+	+
HPLC2	+	+			+	+	+	+				+	+
HPLC3	+	+			+	+	+	+	+	+		+	+

[a] STX = saxitoxin; dc = decarbomoyl; GTX = gonyautoxin; C = C-toxin; LC-MS/MS = liquid chromatography–tandem mass spectrometry; HPLC = high-performance liquid chromatography.
[b] Numbers following HPLC refer to the operator involved.
[c] No decarbamoyl neosaxitoxin (dcNEO) standard; hence, the concentration was estimated from neosaxitoxin (NEO) standard.
[d] Toxin noted as present or absent but not quantified or included in the STXeq estimate because of lack of quantitative standards.

produce a positive reading when 80 μg of STXeq are present in a standard extract from 100 g of shellfish meat (see Laycock et al. [32] and references therein). The toxin concentration in such an extract is equivalent to 1.075 μM or 321 μg/L of STX [32]. In a dilution series of a toxic extract, dilutions containing higher concentrations than this will produce a relative test band intensity of less than 50% of control, and those containing less than this concentration will produce a band of greater than 50% relative intensity. The EC50 is the concentration at which the concentration–response curve crosses 50% relative band intensity, and by definition, this is 1.075 μM for these test strips (approximated to 1 μM hereafter). Note that in the most current version as of this writing (late 2006), a positive result is obtained if the test band is lighter than the control band, with a negative result obtained if the test band is darker than the control band. This makes assessment of the result easier.

To determine an approximate toxin concentration in each of the extracts that produced a 50% relative band intensity, the cyanobacterial extracts used in the neuroblastoma assay were diluted in a one-third series in acidified high-purity water (pH 2.4) until no more toxicity was detected by the test strips. The diluted extract was added to the assay buffer and tested according to the manufacturer's instructions. This amount of acidified water in the assay buffer did not affect the final pH.

Statistics

GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for all curve-fitting, statistical tests (Wilcoxon matched-pair tests, one-way analysis of variance, or linear and nonlinear regression, as noted in the relevant sections), and graphing. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

RESULTS

Neuro-2a cell–based assay interlaboratory comparison

Standards. Pure PSPs of widely differing toxicities (STX, GTX2/3, and GTX5) were assayed in both laboratories, with a number of others (neoSTX, dcSTX, GTX1/4, and C1/2) being tested in one or the other of the laboratories based on availability. The results are shown in Figure 1A. Interestingly, the EC50s of pure toxins were slightly higher at the MNHN than at the AWQC (Wilcoxon paired-sum test, $p < 0.05$). Nevertheless, toxins grouped in the expected toxicity levels: NeoSTX and STX exhibit the highest toxicity level; dcSTX, GTX1/4, and GTX2/3 an intermediate toxicity level; and GTX5 and C1/2 the lowest toxicity level. Similar observations were reported by Jellett et al. [20].

Cyanobacterial extracts. Ten extracts were made at the AWQC and assayed in both laboratories (AWQC and MNHN). This provides a useful indication for the reproducibility of the assay in different laboratories. Toxicities detected at the MNHN appear to be generally somewhat lower than those from the AWQC (Fig. 1B), but no significant difference was found between the results from the two laboratories as determined by Wilcoxon paired-sum test ($p = 0.3125$). The extracts fell into three groups: First, Custódia, Wyong Farm, and Pejar Dam were nontoxic extracts. Second, Chaffey Dam, Burrinjuck Dam, River Murray, Wongulla Lagoon, and Clydesdale Lake extracts exhibited a intermediate toxicity, ranging from 20 to 100 μg STXeq/g lyophilized material. Third, the Brazilian extracts Taquecetuba and Confins gave the highest toxicity (>500 μg STXeq/g). The River Darling sample was not used because of lack of material.

Results from other assay formats

LC-MS/MS and HPLC. Acetonitrile:water:formic acid (80:19.1:0.1, v/v/v) extracts of the rehydrated freeze-dried samples were analyzed using LC-MS/MS [18]. The LC-MS/MS analysis was the most reliable chromatographic method, both because it was based on the largest range of standards and because toxin identification was based on characteristic mass transitions rather than simply on retention time. The content of individual toxins in each freeze-dried sample, as determined by this method, is shown in Table 3.

Acetic acid (0.05 M) extracts of the freeze-dried samples also were analyzed by HPLC with postcolumn derivatization and fluorescence detection [17] at the AWQC on up to three occasions using methods and standards available at each time. Results from the HPLC determinations of toxin contents were converted to the STXeq contents (μg STXeq/g dry sample) based on published mouse toxicity equivalents [17]. The averaged chromatography results (LC-MS/MS plus one to three HPLC results) are shown in Figure 2 along with the STXeq determinations from the neuroblastoma assay and Jellett test strips.

Jellett Rapid Test for PSP. In 5 of the 48 tests, a more dilute sample gave either the same or a more positive response than the previous, more toxic dilution. These aberrant results indicate either operator error or variability in the test strip response. The toxin content of a dilution producing a 50% band intensity (i.e., EC50) was determined from nonlinear regression of relative band intensity versus the toxin content calculated from the LC-MS/MS analysis of each sample. This EC50 toxin content was expected to approximate the limit of detection of the test strips (i.e., 1 μM STX). Although the average of the results for all toxic samples was near this figure, the results for different samples varied by as much as 28-fold.

DISCUSSION

The main purpose of the present study was to test the usefulness and reliability of the Neuro-2A cell–based toxicity as-

Table 3. Toxin contents of cyanobacterial samples as determined by liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis (mole % of total except the last column, which shows total paralytic shellfish poisons as μg/g freeze-dried sample)[a]

Sample	NEO	STX	dcNEO	dcSTX	GTX1	GTX4	GTX2	GTX3	dcGTX2	dcGTX3	GTX5	C2	C1	Total (μg/g)
Custódia	—[b]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.0
Wyong Farm Dam	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.0
Pejar Dam	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.0
Chaffey Dam	—	2.1	—	0.53	—	—	1.7	0.59	2.7	0.04	2.2	7.3	83	1,240
Burrinjuck Dam	—	0.35	—	0.26	—	—	2.5	0.85	4.3	0.08	0.74	7.0	84	1,977
River Murray, Lock 2	—	0.09	—	—	0.04	0.02	1.3	0.51	5.0	0.07	0.19	5.7	87	3,124
Wongulla Lagoon	—	—	—	—	—	—	3.2	1.1	12	0.18	0.13	6.3	77	1,763
Clydesdale Lake	—	3.5	—	9.6	0.25	0.14	21	8.3	7.3	—	40	3.6	6.1	106.7
River Darling	—	—	—	—	0.06	0.03	2.6	1.1	5.3	0.08	0.11	6.4	84	1,908
Taquecetuba	25	5.7	63	6.7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	60.0
Confins	26	7.1	61	6.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	58.0

[a] NEO = neosaxitoxin; STX = saxitoxin; dc = decarbomoyl; GTX = gonyautoxin; C = C-toxin.
[b] — = not detected (limit of reporting excluding C-toxins, 0.2 μg/g; limit of reporting for C-toxins, 2.0 μg/g).

say for detection and quantification of PSPs in natural bloom samples of freshwater cyanobacteria. Both pure toxins and natural bloom samples were analyzed, and the results for the latter were compared with chromatographic determinations.

The results for pure toxins generally were as expected from their known relative toxicities in the mouse bioassay. The only exceptions were dcSTX and GTX2/3, the toxicities of which were somewhat less relative to that of STX than was reported by Jellett et al. [20] and expected from the mouse bioassay [17]. Nevertheless, the toxins fell into their expected toxicity groups: STX and neoSTX were most toxic; dcSTX, GTX1/4, and GTX2/3 were intermediate; and GTX5 and the C-toxins were least toxic. Interestingly, the EC50s of pure toxins were higher at the MNHN than at the AWQC (Wilcoxon paired-sum test, $p < 0.05$). Because this was consistent for all three toxins tested in both laboratories (STX, GTX2/3, and GTX5), it may be that rather than this being caused by random experimental error, the sensitivity of the cells was different between the two laboratories. After 70 subcultures, neuroblastoma cells are not as sensitive as cells that have been through fewer subculture cycles (unpublished data), so it may be that on average, the cells used at the MNHN were slightly older than those used at the AWQC. Alternatively, culture conditions may have varied slightly. The results for the bloom sample extracts were not significantly different once expressed in terms of STXeq. This general concordance of results is in contrast to a larger interlaboratory comparison of the neuroblastoma assay, along with other methods, for the determination of brevetoxins that was reported at the Harmful Algae Conference in 2002 [37]. In that study, "extreme data variance rendered it unsuitable for statistical analysis," but possible reasons for this variance were not discussed. Preliminary work at the MNHN has found that recoveries of brevetoxin from fish flesh can be very low, suggesting that percentage error in quantification could be high in this scenario (unpublished data).

Toxin contents of the bloom samples as determined by LC-MS/MS are shown in Table 3. Three groups can be distinguished based on the PSP contents: In the first group (Custódia, Wyong Farm, and Pejar Dam extracts), no toxin analogues were detected. In the second group (Chaffey Dam, Burrinjuck Dam, River Murray, Wongulla Lagoon, Clydesdale Lake, and River Darling extracts), several intermediate- to low-toxicity analogues were detected (GTX2, GTX3, dcGTX2, C1, and C2). In the last group (the Brazilian samples Taquecetuba and Confins), only the most toxic analogues were detected (neoSTX, STX, dc-neoSTX, and dcSTX), although these still could not account for the observed cytotoxicity. As shown by Lagos et al. [6], these samples probably also contained other unidentified PSPs that, of course, were not detected in the above analyses. In the second group, GTX1 and GTX4 were found in some samples as extremely small peaks, with a signal to noise ratio of approximately 2:1. They both, however, gave a consistent signal on repeat analyses. Similar small peaks also have been noted from time to time in HPLC analyses using postcolumn derivatization and fluorescence detection (data not shown). All Australian samples except Clydesdale Lake were quantitatively dominated by C1 and, to a lesser degree, C2. Given the age of the samples, some of the decarbamoyl analogues and GTX5 detected likely were degradation products of the C-toxins. Clydesdale Lake was the only sample from western Australia; all the other Australian samples were collected in the Murray-Darling Basin in eastern Australia. This bloom sample originally was characterized as nontoxic by Velzeboer et al. [31] based on both mouse bioassay and HPLC results, although an *Anabaena circinalis* strain isolated from it was later found to be neurotoxic [31].

Surprisingly, the STXeq values calculated from the chromatographic methods (LC-MS/MS and the three HPLC determinations by HPLC operator 1, HPLC operator 2, and HPLC operator 3) varied by up to threefold (data not shown). The HPLC operators did not use as broad a suite of standards as for the LC-MS/MS, perhaps reflecting reduced expectations of which analogues they were likely to detect balanced against the cost of obtaining the standards for all analogues. Nevertheless, determinations of even common toxin analogues varied by two- to threefold (data not shown). The third HPLC analysis consistently produced higher estimates than the other chromatographic determinations with the exception of a false negative reported for Taquecetuba sample, in part because standards for dcSTX and dc-neoSTX were not used (Table 3). These analogues were relatively abundant in Taquecetuba and contributed significantly to the calculation of STXeq for this sample. A false-negative determination for Clydesdale by HPLC operator 1 probably resulted because the profile of analogues was atypical of the Australian samples so far tested and because the levels of toxins were near the limit of detection. It should be noted that these analyses were performed on an ad hoc basis in competent research laboratories. It might be expected that more consistency would be seen among reg-

ulatory laboratories that routinely perform these assays. Nevertheless, the comparison remains valid with the Neuro-2A cell–based assay set up in similar circumstances. Importantly, the neuroblastoma assay did not produce any false negatives.

In three of the six toxic Australian samples (Burrinjuck Dam, Chaffey Dam, and River Murray Lock 2), estimates from the chromatographic methods fell within the range of toxicity as quantified by the neuroblastoma assay. In two others (River Darling and Wongulla Lagoon), the toxin content apparently overestimated toxicity by between two- and sixfold, whereas for the Clydesdale Lake sample, toxin content was variable but always lower than expected (overall, perhaps 50% lower). It is possible that this sample may contain unidentified toxins of low potency, because as noted, this western Australian sample contains an unusual complement of toxins.

All nontoxin-containing samples also were nontoxic by the neuroblastoma assay; hence, this assay did not produce any false positives. Furthermore, the Neuro-2A cells did not respond to the microcystins contained in the Wyong Farm Dam and Pejar Dam samples or to the anatoxin-a contained in the La Loue sample. Hence, these common cyanobacterial toxins, which may co-occur with the PSPs, do not interfere with the assay.

Brazilian *C. raciborskii* strains contain compounds that behave chemically and chromatographically like PSPs [6,7]. These strains also caused a toxicosis in the mouse that was indistinguishable from that caused by PSPs but was considerably more potent than could be accounted for by the HPLC-determined content of known PSPs [6,7]. The two Brazilian samples used were approximately 35-fold more toxic in the neuroblastoma assay than would be expected from the chromatographic results. This clearly shows that the neuroblastoma assay was the better indicator for the mammalian toxicity of these samples and illustrates the value of the Neuro-2A cell–based assay in detecting unexpected effects.

The Jellett Rapid Test for PSP uses lateral-flow immunochromatographic devices [32], which in turn use antibodies, to detect a range of PSPs. The makers claim good detection across most of the PSP analogues that have hydrogen at the N1 position but lower sensitivity to the analogues that have a hydroxyl group at this position. This was not expected to be a problem for toxicity determinations of Australian *Anabaena circinalis*, which produces predominantly N1-hydrogen analogues [38]. The results obtained with the PSP test strips used in the present study were not quantitative, because the responses for PSP-containing samples varied from the expected value by ±10-fold. The nonneurotoxic *Microcystis aeruginosa*–containing samples (Wyong Farm Dam and Pejar Dam), however, had no effect on the test strips. The only sample to which the test strips changed from positive to negative just as the toxin content was diluted to less than 1 μM was Clydesdale, which was the only Australian sample not composed primarily of C-toxins (data not shown). Rapala et al. [14] also used the Jellett Rapid Test for PSP, with good results, to screen their PSP-producing *Anabaena lemmermannii* samples. It therefore is interesting to note that their *A. lemmermannii* produced only STX. Since the work at the AWQC was done, however, Jellett Rapid Testing has reconfigured the test strips as described in *Materials and Methods.* Preliminary results from a batch purchased in late 2006 appear to be more reproducible than those from the batch tested earlier, and validation of their use with *Anabaena circinalis* samples is continuing.

In conclusion, the Neuro-2A cell–based assay produced estimates of toxin content in the cyanobacterial extracts that were within a factor of approximately two of the expected value (as determined by LC-MS/MS). Reproducibility was not high, but it was adequate for a screening assay. No false positives or false negatives were detected. The presence of the cyanobacterial toxins microcystin and anatoxin-a, which hypothetically may have caused non-PSP-specific cytotoxicity, did not affect the assay. Results were comparable when implemented independently in two separate laboratories. Neither the chromatographic techniques nor the Jellett Rapid Test for PSP could detect the putative unidentified PSPs contained in two Brazilian *C. raciborskii* samples. The neuroblastoma assay detected approximately 35-fold more toxicity in these samples than could be accounted for by the known toxins. Because this replicates the higher-than-expected mouse toxicity of these strains [7], this indicates the value of a toxicity screening assay when any doubt exists about the range of toxin analogues likely to be present. This is particularly important with cyanobacterial samples, because new analogues of various toxins continue to be found. The neuroblastoma assay is suitable for this screening role. It is capable of providing results within about a day and a half, which is similar to the mouse bioassay in a commercial setting, but it has the advantages over the mouse bioassay of providing higher throughput, being cheaper per assay, and having greater sensitivity [39].

Acknowledgement—This work was supported by the Australian Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment, the South Australian Water Corporation, the American Water and Wastewater Association Research Fund, the French–Australian Science and Technology Program, and the Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris, France). This work also was supported by a grant of the French Minister of Research and Agriculture (Program AQS S40) and a grant of the French Minister of Ecology (Program Environment and Health EN00C06). The authors would like to thank Sandrine Leiba-Magnin (Muséum National d'Histoire Naturelle) for technical assistance.

REFERENCES

1. Li R, Carmichael WW, Liu Y, Watanabe MM. 2000. Taxonomic re-evaluation of *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5 based on morphology and 16S rRNA sequences. *Hydrobiologia* 438:99–105.
2. Humpage AR, Rositano J, Bretag AH, Brown R, Baker PD, Nicholson BC, Steffensen DA. 1994. Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. *Aust J Mar Freshw Res* 45: 761–771.
3. McBarron EJ, Walker RI, Gardner I, Walker KH. 1975. Toxicity to livestock of the blue-green alga *Anabaena circinalis*. *Aust Vet J* 51:587–588.
4. Negri AP, Jones GJ, Hindmarsh M. 1995. Sheep mortality associated with paralytic shellfish poisons from the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Toxicon* 33:1321–1329.
5. Jones GJ, Negri AP. 1997. Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) in freshwaters. *Water Res* 31:525–533.
6. Lagos N, Onodera H, Zagatto PA, Andrinolo D, Azevedo SM, Oshima Y. 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37:1359–1373.
7. Molica R, Onodera H, Garcia C, Rivas M, Andrinolo D, Nascimento S, Meguro H, Oshima Y, Azevedo S, Lagos N. 2002. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia* 41:606–611.
8. Pereira P, Li RH, Carmichael WW, Dias E, Franca S. 2004. Taxonomy and production of paralytic shellfish toxins by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* LMECYA40. *Eur J Phycol* 39:361–368.
9. Carmichael WW, Evans WR, Yin QQ, Bell P, Moczydlowski E. 1997. Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater

cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb. nov. *Appl Environ Microbiol* 63:3104–3110.
10. Pomati F, Sacchi S, Rossetti C, Giovannardi S, Onodera H, Oshima Y, Neilan BA. 2000. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp. FP1: Molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *J Phycol* 36:553–562.
11. Baker PD, Humpage AR. 1994. Toxicity associated with commonly occurring cyanobacteria in surface waters of the Murray–Darling basin, Australia. *Aust J Mar Freshw Res* 45:773–786.
12. Bowling LC. 1994. Occurrence and possible causes of a severe cyanobacterial bloom in Lake Cargellico, New South Wales. *Aust J Mar Freshw Res* 45:737–745.
13. Kaas H, Henriksen P. 2000. Saxitoxins (PSP toxins) in Danish lakes. *Water Res* 34:2089–2097.
14. Rapala J, Robertson A, Negri AP, Berg KA, Tuomi P, Lyra C, Erkomaa K, Lahti K, Hoppu K, Lepisto L. 2005. First report of saxitoxin in Finnish lakes and possible associated effects on human health. *Environ Toxicol* 20:331–340.
15. Onodera H, Satake M, Oshima Y, Yasumoto T, Carmichael WW. 1997. New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*. *Nat Toxins* 5:146–151.
16. Negri A, Stirling D, Quilliam M, Blackburn S, Bolch C, Burton I, Eaglesham G, Thomas K, Walter J, Willis R. 2003. Three novel hydroxybenzoate saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Chem Res Toxicol* 16:1029–1033.
17. Oshima Y. 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J Assoc Off Anal Chem* 78:528–532.
18. Dell'Aversano C, Eaglesham GK, Quilliam MA. 2004. Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1028:155–164.
19. Catterall WA. 1992. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol Rev* 72:S15–S48.
20. Jellett J, Stewart JE, Laycock MV. 1995. Toxicological evaluation of saxitoxin, neosaxitoxin, gonyautoxin II, gonyautoxin II plus III, and decarbomoylsaxitoxin with the mouse neuroblastoma cell bioassay. *Toxicol In Vitro* 9:57–65.
21. Oshima Y, Sugino K, Yasumoto T. 1989. Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins. In Natori S, Hashimoto K, Ueno Y, eds, *Mycotoxins and Phycotoxins '88*. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, pp 319–328.
22. Jellett JF, Roberts RL, Laycock MV, Quilliam MA, Barrett RE. 2002. Detection of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in shellfish tissue using MIST Alert (TM), a new rapid test, in parallel with the regulatory AOAC (R) mouse bioassay. *Toxicon* 40:1407–1425.
23. Usleber E, Schneider E, Terplan G. 1991. Direct enzyme immunoassay in microtitration plate and test strip format for the detection of saxitoxin in shellfish. *Lett Appl Microbiol* 13:275–277.
24. David LS, Nicholson RA. 2004. Quantitation of paralytic shellfish toxins using mouse brain synaptoneurosomes. *Chemosphere* 55:1315–1321.
25. Llewellyn LE, Doyle J, Negri AP. 1998. A high-throughput, microtiter plate assay for paralytic shellfish poisons using the saxitoxin-specific receptor, saxiphilin. *Anal Biochem* 261:51–56.
26. Kogure K, Tamplin ML, Simidu U, Colwell RR. 1989. Tissue culture assay method for PSP and related toxins. In Okaichi T, Anderson DM, Nemoto T, eds, *Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology*. Elsevier, New York, NY, USA. pp 383–386.
27. Dechraoui MY, Naar J, Pauillac S, Legrand AM. 1999. Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels. *Toxicon* 37:125–143.
28. Manger RL, Leja LS, Lee SY, Hungerford JM, Hokama Y, Dickey RW, Granade HR, Lewis R, Yasumoto T, Wekell MM. 1995. Detection of sodium channel toxins—Directed cytotoxicity assays of purified ciguatoxins, brevetoxins, saxitoxins, and seafood extracts. *J Assoc Off Anal Chem* 78:521–527.
29. Manger RL, Leja LS, Lee SY, Hungerford JM, Wekell MM. 1993. Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: Semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins, and ciguatoxins. *Anal Biochem* 214:190–194.
30. Testé V, Briand J-F, Nicholson BC, Puiseux-Dao S. 2002. Comparison of changes in toxicity during growth of *Anabaena circinalis* (cyanobacteria) determined by mouse neuroblastoma bioassay and HPLC. *J Appl Phycol* 14:399–407.
31. Velzeboer RMA, Baker PD, Rositano J, Heresztyn T, Codd GA, Ragget SL. 2000. Geographical patterns of occurrence and composition of saxitoxins in the cyanobacterial genus *Anabaena* (Nostocales, Cyanophyta) in Australia. *Phycologia* 39:395–407.
32. Laycock MV, Jellett JF, Belland ER, Bishop PC, Thériault BL, Russell-Tattrie AL, Quilliam MA, Cembella AD, Richards RC. 2000. MIST Alert™: A rapid assay for paralytic shellfish poisoning toxins. *Proceedings*, IX International Conference on Harmful Algal Blooms, Hobart, Tasmania, Australia, February 7–11, pp 254–256.
33. 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.
34. Shimuzu Y. 2000. Chemistry and mechanism of action. In Botana LM, ed, *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*. Marcel Dekker, New York, NY, USA, pp 151–172.
35. Laycock MV, Thibault P, Ayer SW, Walter JA. 1994. Isolation and purification procedures for the preparation of paralytic shellfish poisoning toxin standards. *Nat Toxins* 2:175–183.
36. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63.
37. Dickey RW, Plakas SM, Jester ELE, El Said KR, Johannessen JN, Flewelling LJ, Scott P, Hammond DG, Van Dolah FM, Leighfield TA, Bottein Dechraoui MY, Ramsdell JS, Pierce RH, Henry MS, Poli MA, Walker C, Kurtz J, Naar J, Baden D, Musser SM, White KD, Truman P, Miller A, Hawryluk TP, Wekell MM, Stirling D, Quilliam M, Lee JK. 2004. Multilaboratory study of five methods for the determination of brevetoxins in shellfish tissue extracts. In Steidinger KA, Landsberg JH, Tomas CR, Vargo GA, eds, *Harmful Algae 2002*. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, St. Petersburg, FL, USA, pp 300–302.
38. Negri AP, Jones GJ. 1995. Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis* by the freshwater mussel *Alathyria condola*. *Toxicon* 33:667–678.
39. Truman P, Lake RJ. 1996. Comparison of mouse bioassay and sodium channel cytotoxicity assay for detecting paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish extracts. *J Assoc Off Anal Chem* 79:1130–1133.

Article 2: First report of saxitoxins produced by the cyanobacterium Aphanizomenon gracile in a French recreational water body.

soumis à Harmful Algae

Ledreux A.[a], Thomazeau S.[a], Catherine A.[a], Duval C.[a], Yéprémian C.[a], Marie, A [b], Bernard C.[a,*]

[a] FRE 3206 CNRS / MNHN Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes, USM 505 Cyanobactéries, Cyanotoxines et Environnement, Muséum National d'Histoire Naturelle, 57 rue Cuvier, CP 39, 75231 Paris cedex 05, France.

[b] Plateforme de Spectrométrie de masse, FRE 3206 CNRS / MNHN Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes, Muséum National d'Histoire Naturelle, France, 57 rue Cuvier, CP 54, 75231 Paris cedex 05, France.

* Corresponding author. Mailing address: FRE 3206 CNRS / MNHN MCAM, Equipe Cyanobactéries, Cyanotoxines et Environnement, Muséum National d'Histoire Naturelle, 57 rue Cuvier, Case 39, 75231 Paris cedex 05, France.

Phone: +33 1 40 79 31 83. Fax: +33 1 40 79 35 94. E-mail: cbernard@mnhn.fr.

Abstract

In the last few years, a scientific consensus has emerged regarding the increasing frequency and severity of cyanobacterial blooms in freshwater environments. Consequently, recreational and drinking water bodies are now monitored by the relevant authorities to prevent animal and human poisoning related to cyanobacteria and their toxins. A survey of a water body used for recreational activities (at Champs-sur-Marne, in the Paris area of France) was conducted from 2005 to 2008. The chlorophyll *a* concentrations, and the occurrence of toxic cyanobacteria and of the cyanotoxins microcystins, anatoxin-a and saxitoxins were recorded. The potentially toxic genera *Aphanizomenon, Planktothrix* and *Microcystis* were observed throughout the monitoring period. The cyanobacteria *Microcystis* was the dominant genus during the first part of the period (2005 to 2007), whereas *Aphanizomenon* became the dominant genus towards the end of the survey (2007-2008). As a consequence, microcystins were initially detected at high concentrations (max. = 89 µg eq. MC-LR L^{-1} in raw water), and were later superceded by saxitoxins (STXs) in 2008. To attribute STXs production to the appropriate cyanobacterial taxa, eighteen cultures obtained after an isolation procedure were screened by PCR for the presence of the *sxt*A gene, then analyzed for their STX concentrations using the Neuro-2a cell-based assay and LC-MS/MS. This confirmed that the STX and NEO variants were present in the natural samples at concentrations higher than 3 µg eq.STX L^{-1} in raw water, and identified *Aphanizomenon gracile* as the producer of STXs. The health risks associated with the presence of STXs alone or with its co-occurrence with other known cyanotoxins in recreational water bodies are discussed.

Keywords: *Aphanizomenon*, cyanobacteria, freshwater, saxitoxins.

Introduction

In freshwater ecosystems, potentially toxic cyanobacteria are a source of increasing concern since they are a health risk for animals as well as for human beings (Hitzfed et al., 2000). A scientific consensus has emerged regarding the changes in global climate, and the increased frequency and severity of cyanobacterial blooms (Paerl and Huisman, 2008). As a consequence, surveys of cyanobacteria and their potential toxicity has led to the identification of a large number of areas that are contaminated with known cyanotoxins. To date, 67 species have been reported as being producers of cyanotoxins, that have been classified broadly into hepatotoxins, neurotoxins, and dermatotoxins (Sivonen and Jones, 1999; Fristachi and Sinclair, 2008; Thomazeau, pers. comm.). Recreational and drinking water bodies are monitored by the relevant authorities to prevent animal and human intoxications related to cyanobacteria and their toxins. In France, safety guidelines for monitoring water resources fall under the purview of different recommendations (Administrative Orders DGS/SD7A 2003/270, 2004/364, 2005/304) that are implemented by Government safety institutions. These monitoring programs include evaluating the total phytoplankton biomass estimated from the chlorophyll *a* concentrations, identifying the cyanobacterial genera or species present, and measuring the concentrations of microcystins (MCs) present. The growing concern of the scientific community and the health agencies has led to increased efforts to study the occurence of cyanobacteria and identify additional cyanotoxin and cyanotoxin producers.

In France, hepatotoxic microcystins associated with *Planktothrix* or *Microcystis* blooms are commonly reported (e.g. Catherine et al., 2008a; Briand et al., 2009). There have also been a few reports of incidents involving neurotoxins. For example, anatoxin-a and homoanatoxin-a have been detected in French rivers (Gugger et al., 2005; Cadel-Six et al., 2007), and benthic cyanobacteria were identified as the producers of these neurotoxins. Canine neurotoxicosis has also been directly linked to the presence of these microorganisms.

The saxitoxins (STXs) are a group of neurotoxins consisting of at least 30 carbamate alkaloid compounds (Aráoz et al., 2009). This large family of toxin is referred to as the Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in the marine environment. They can be divided into 3 groups according to their degree of sulfatation which is, in turn, related to their specific toxic effects in the mouse (Llewellyn, 2006). The most toxic are the non-sulfated saxitoxins. The singly-sulfated gonyautoxins exhibit mild toxicity and the doubly sulphated C-toxins are the least toxic analogs.

Numerous cases of human poisoning due to STXs have been reported in marine areas, where these toxins are bioaccumulated by filter-feeding molluscs, such as mussels and oysters. In freshwater environments, no cases of poisoning as a result of consuming these organisms have been reported so far, but there is some evidence that STXs can bioaccumulate in the freshwater mussel *Alathyria condola* (Negri and Jones, 1995), in snails (*Pomacea patula catemacensis*) (Berry and Lind, 2009) and in the freshwater fish Tilapia (*Oreochromis niloticus*) consumed by humans (Galvão et al., 2009). Nevertheless, exposure to STXs in freshwater recreational areas should also be considered carefully, since adverse health effects on children (e.g. fever, eye irritation, abdominal pain, skin rash) have been reported in Finnish lakes (Rapala et al., 2005).

The methods used to detect and quantify STXs are based on their chemical structure, and include (i) immunoassays (Jellett et al., 2002) and (ii) chromatographic methods using available chemical certified standards (n = 9 among more than 30 variants already reported). Until recently, the chemical variability of STXs meant that the standard high-performance liquid chromatography method required three separate runs (Oshima, 1995) to analyze each sample. Dell'Aversano et al. (2005) overcame this technical problem by developing a single-run liquid chromatography-mass spectrometry method that can be used to determine individual analogs of STXs.

Alternative methods based on the mechanisms of toxicity of the STXs have also been proposed. STXs act on sodium voltage-gated channels of nerve cells. After binding to the site 1 of the sodium channels (Cestèle and Catterall, 2000), sodium transport is blocked, resulting in the inhibition of axonal depolarization, and thus leading to muscle paralysis. These toxicological effects have led to the widespread use of mouse bioassays to monitor STXs in shellfish. However, for ethical reasons and due to its poor reproducibility, this approach should be replaced by alternative methods. The Neuro-2a cell line contains high levels of sodium voltage-gated channels (Kogure et al., 1988), and has been employed for several years to detect STXs. The Neuro-2a cell-based bioassay has been shown to be an effective method for detecting and quantifying cyanobacterial STXs (Humpage et al., 2007).

Finally, another method for monitoring STXs is to detect STX-producing algal blooms using molecular methods. The saxitoxin biosynthesis pathway has recently been published (Kellmann et al., 2008). The use of molecular probes targeting STX-producing cyanobacteria may provide useful early warning systems for toxic blooms.

In this study, we present the first evidence of an STX-contaminated freshwater body in France. This new finding emerged from a regional survey of cyanobacteria and cyanotoxins in Ile-de-France area. Fifty water bodies were sampled and screened for the presence of toxic cyanobacteria and microcystins (MCs), anatoxins (ANTX) and saxitoxins (STXs) (Catherine et al., 2008b). Among the fifty water bodies sampled in the Ile-de-France area, special attention was focussed on the water body of the Champs-sur-Marne recreational area because cyanobacteria were known to have occurred there since 2005, and this had aroused the interest of the regional authorities in assessing the risk linked to cyanotoxins. This paper focuses on the detection of STXs in environmental samples collected from this water body, and on the identification of the causative cyanobacterial species. We also discuss the implications for the health risk assessment of STXs in recreational water bodies.

Material and methods

1. Sampling site

The recreational area of Champs-sur-Marne (48°51'50" N, 2°35'53" E) is in the outer suburb of Paris (France). This reservoir is a small (10.3 ha) and shallow (mean depth equal to 2.4 meter) water body, which is isolated from the river system (Figure 1), and originated as a disused sand pit. It is now a recreational area used for bathing, kayaking, sailing and windsurfing.

Because it is used for recreational activities, and because there had been repeated observations of cyanobacterial masses, the area was monitored from June 2005 to December 2008 at Site 1 (n = 97 samples). This site corresponds to a bathing area, which is separated from the rest of the water body by a mesh barrier. Samples were collected from Site 2 from April 2006 to December 2008 (n = 38 samples), because significant levels of cyanobacteria had been observed at Site 1 in 2005 and because this site is used for bathing activities.

2. Sample collection and preparation

Two liters of raw water collected from the sub-surface level at each station were placed in plastic bottles, kept refrigerated, and protected from light until being filtered through glass fiber filters (Whatman 47 mm GF-C filters) at the laboratory. Filters were stored frozen at -24°C.

On 8 September 2008, surface scum was also collected, placed in plastic bottles, kept refrigerated and protected from light during transportation.

The frequency of sampling was determined by the need to ensure the complete safety of the users of this leisure facility. Consequently, sampling was performed weekly in summer, fortnightly in spring and autumn and, monthly in winter.

3. Study of the phytoplankton community

The chlorophyll *a* (Chl *a*) concentration was measured after methanol/water extraction (90/10, v/v) of frozen filters (Talling & Driver, 1963), and analyzed using a Cary 50 Scan spectrophotometer (Varian Inc., Palo Alto, USA).

The cyanobacterial genera or species (>20 µm) were determined using samples fixed in buffered formaldehyde (5% v/v) as described previously (Yéprémian et al., 2007). The identification of the phytoplankton was based on current literature (Komárek and Anagnostidis, 1989; 1998; 2005). For each sample, the number of taxa present was assessed, and relative taxon abundances were determined by counting 400 individuals using a Malassez counting chamber. Cyanobacteria were considered as the dominant subpopulation if they accounted for more 30% of the total phytoplankton.

4. Isolation and obtaining of single-species cyanobacterial cultures

The water samples or scum were inoculated on a Z8 minus nitrogen (Z8-X) (Kotai, 1972) solid medium (7 g L^{-1} of agar). Isolations were carried out by repeated transfers of single filaments onto solid media (at least 5 steps) under an inverted microscope (Olympus CK2, Japan). As the isolation procedure did not exceed 5 steps, we considered that the cultures obtained were monospecific and not clonal.

Cultivable colonies were later cultured in 25 cm^2 culture flasks (Nunc, France) containing 10 mL of Z8-X medium. Single-species cultures were maintained at 25 °C, using daylight fluorescent tubes providing an irradiance level of 16 µmol photons m^{-2} s^{-1}, with a photoperiod of 16L: 8D. Photographs and measurements were taken using a microscope coupled to a Digital Sight DS-L1 image acquisition system (Nikon Inc., Japan).

5. PCR

Amplifications of the partial *sxt*A gene were performed with primer pair *sxt*AF (5'-AGG-TCT-TGA-CTT-GCA-TCC-AA-3') and *sxt*AR (5'-AAC-CGG-CGA-CAT-AGA-TGA-TA-3'), which were designed for this study with support from *sxt*A sequences available in Genbank (Kellmann et al., 2008). PCR amplification was performed in 20 µL containing 5 µL of culture, 250 µM of dNTPs, 25 µM of each primer, 2.5 µL of 10X PCR Buffer with 2.5 µL

of $MgCl_2$ (25 mM) and 1 U of GoldStar DNA polymerase (Eurogentec, San Diego, USA). The PCR reactions were performed with a Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA), and consisted, after a preliminary 5-min denaturing step at 94°C, of 35 cycles at 94°C for 1 min, at 58°C for 1 min, and at 72°C for 2 min. An extension period was performed for 5 min at 72°C, followed by a final 10-min period at 10°C. The amplicons were checked on 1.5% agarose gels.

6. Screening for cyanotoxins

During the monitoring program which started in 2005, a number of samples were analyzed for their cyanotoxin content. Samples were selected for this analysis in accordance with the WHO guidelines (WHO, 2003), i.e; (i) when Chl *a* concentrations exceeded 10 µg L^{-1}, (ii) when cyanobacteria were dominant (>30%) in the phytoplankton and (iii) when cyanobacteria genera known to be potentially toxic were observed in the samples. For example, when *Microcystis* spp. were dominant in the phytoplankton, the MCs content was determined.

6.1 Screening for MCs

MCs contents were estimated after methanolic extraction of frozen filters using the protein phosphatase 2A inhibition assay (PP2A), as described previously (Briand et al., 2002). The MCs concentrations were calculated from a standard MC-LR calibration curve (Alexis Biochemicals, Switzerland). Under these conditions, the detection limit was 0.01 µg equivalent MC-LR per liter of raw water. A maximum of 21 samples were analyzed for their MCs content each year during the monitoring program.

6.2. Screening for ANTX

Screening for ANTX was performed by mass spectrometry according to Gugger et al. (2005).

6.3. Screening for STXs

6.3.1. Neuro-2a cell-based assay

The saxitoxin content of frozen filters was extracted in 6 mL of ultra pure water acidified with acetic acid to pH 2.4, sonicated for 3 min with an ultrasonic probe in pulse mode (Sonics Vibra Cell 130W, Granuloshop, France), and filtered on 0.45-µm filters (Analypore Labosi). The filtrates were analyzed by a Neuro-2a cell-based assay versus a STX standard (Institute of Marine Biosciences, Halifax, Canada). The STXs were detected as described previously (Humpage et al., 2007).

6.3.2. LC-MS/MS analyses

LC-MS/MS analyses were performed by a modification of the method published by Dell'Aversano et al. (2005). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) was employed to separate the polar neurotoxin molecules, and was carried out using a 3.5 µm Sequant ZIC HILIC column (150 mm x 1 mm i.d.). The HPLC system was from Dionex, USA (Ultimate 3000). The mobile phases consisted of (A) aqueous ammonium acetate 10 mM adjusted to pH 5 with acetic acid and (B) ACN acidified with 0.05% HCOOH. Separation was carried out under isocratic condition (40% A/60% B) at a flow rate of 50 µl. min^{-1}. The separated molecules were analyzed on-line using a quadripole–time of flight (Q-TOF) mass spectrometer (Pulsar i, Applied Biosystems) equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The information dependent acquisition (IDA) mode allowed both MS and MS/MS spectra to be acquired. All experiments were performed in positive-ion mode. Data were acquired and processed using Analyst Qs software (version 1.1). Typical acquisition parameters were as follows: capillary voltage = 4500 V, declustering potential = 20 V, scan range ranged from m/z = 50 to m/z =1000, exclusion time = 60 seconds. The collision energy required for fragmentation (MS/MS experiments) was automatically calculated by the software.

A set of nine standards purchased from the Institute of Marine Biosciences (Halifax, Canada) was used and consisted of STX, NEO, GTX1/4, GTX2/3, GTX5, C1/C2, dcSTX, dcNEO and dcGTX2/3. The STXs variants in the cyanobacterial extracts were identified from the chromatographic retention time, molecular mass and MS/MS ion fragments.

Results

1. Chlorophyll *a* concentrations

During the survey period, the area sampled was characterized as hypereutrophic on the basis of the chlorophyll *a* concentrations (Ryding and Rast, 1994) (Table 1 and Figure 2). For Site 1, the mean Chl *a* concentration ranged from a minimum value of 29 µg L^{-1} in 2007 to a maximum of 200 µg L^{-1} in 2005. The highest Chl *a* levels (1,590 µg L^{-1} (Table 1)) measured in September 2005 at Site 1 (Figure 2) corresponded to surface scum. For Site 2, the mean Chl *a* value reached its lowest level during the year 2007 (21 µg L^{-1}), and peaked in 2008 (67 µg L^{-1}).

2. Cyanobacterial species richness

During the monitoring, the number of cyanobacterial taxa doubled at both sampling sites (e.g. for Site 1: 13 taxa in 2005 versus 28 taxa in 2008) (Table 1). Several potentially toxic cyanobacterial genera such as *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis,* and *Planktothrix* were observed with variable intensity and frequency of occurrence during the monitoring period (data not shown). Among these potentially toxic genera, the most abundant during the survey were *Aphanizomenon* and *Microcystis* .

Occurrences of *Aphanizomenon* spp. were of particular interest, since species belonging to this genus have been identified as potential producers of a range of toxins, including STXs. The relative frequency (number of occurrences/number of samples analyzed) of *Aphanizomenon* spp. increased during the monitoring period (from 41% in 2005 to 67% in 2008 for Site 1, and from 20% in 2006 to 60% in 2008 for Site 2 (Table 1)), indicating that *Aphanizomenon* spp. had progressively settled in the water body between 2005 and 2008. Throughout the survey, *Aphanizomenon* spp. was usually observed in summer, but its presence was not correlated with the dominance of cyanobacteria in the phytoplankton community (Figure 2).

The relative frequency of the occurrence of the potential MCs producers *Microcystis* spp. increased (from 59% in 2005 to 75% in 2008) at Site 1, whereas it remained unchanged at Site 2 (from 50% in 2006 to 47% in 2008). The highest relative frequency was recorded in 2007 for both sites (88% and 77%, respectively); these values indicate that *Microcystis* spp. was observed in most of the samples collected in 2007.

3. Detection of cyanotoxins during the monitoring period

The highest concentrations of MCs at Site 1 (89 µg eq. MC-LR L^{-1} and 57 µg eq. MC-LR L^{-1}) were observed in September 2005 and August 2006, respectively. These concentrations corresponded to the presence of *Microcystis aeruginosa* and *M. wesenbergii*. associated with

high levels of Chl *a* (931 µg L^{-1} and 147 µg L^{-1}, respectively). At Site 2, MCs levels were close to or below the limit of detection.

Screening for ANTX by mass spectrometry was performed on selected samples when Chl *a* concentrations were above 30 µg L^{-1}, and when *Anabaena flos-aquae* was observed in the phytoplankton. No ANTX was detected at any time during the period of monitoring.

4. Detection of STXs in natural samples

STXs were detected in September 2008 at concentrations of 4.8 ± 0.5 µg eq.STX L^{-1} and 6.7 ± 3.5 µg eq.STX L^{-1} for Sites 1 and 2, respectively (Table 2). STXs were detected by the Neuro-2a cell-based assay, and confirmed by LC-MS/MS analysis. These high STXs concentrations were correlated to high Chl *a* concentrations (153 µg L^{-1} and 208 µg L^{-1}, for Sites 1 and 2, respectively), and to the dominance of *Aphanizomenon flos-aquae* and *Aph. gracile* (Table 2).

5. Detection of STXs in cyanobacterial cultures

From the STXs natural samples and after isolation procedure, 18 single-species cultures of *Anabaena planctonica* Brunnthaler (1903), *Aphanizomenon gracile* Lemmermann (1910) and *Aphanizomenon aphanizomenoides* (Forti) Hortobágyi & Komárek (1979) were obtained (Table 3 and Figure 3). Cyanobacterial species were identified on the basis of morphological criteria, as described in the Materials and methods section.

The cultures were checked for the STX genes cluster by PCR, and a 600-bp product corresponding to the *sxt*A gene was clearly amplified in 3 cultures of *Aph. gracile* (AphG4, AphG15 and AphG16), and to a lesser extent in the two cultures of *Aph. aphanizomenoides* (AphA1 and AphA17) (data not shown).

Production of STXs was found in the three *Aph. gracile* cultures by the Neuro-2a cell-based assay, and this was confirmed by LC-MS/MS analyses (Table 3). The STXs content ranged from 0.4 ± 0.2 pg eq.STX per cell to 1.2 ± 0.3 pg eq.STX per cell. LC-MS/MS analyses identified STX and NEO among the 9 variants screened. In MS experiments, STX was detected both as the protonated ion (m/z 300) and as a fragment ion (m/z 282) corresponding to the dehydrated ion at a retention time in the range of 25.2-25.5 min compared to the 25.6 min of the STX standard. In MS/MS mode, fragment ions of STX were observed (m/z 282; 221; 204; 186; 179 and 138). NEO was detected as the parent ion (m/z 316) with a retention time in the range 24.5 -24.9 min, versus 24.8 min for the NEO standard. Fragment ions with m/z 298; 237; 220; 177 and 138 were detected for NEO in MS/MS mode.

In AphA1 and AphA17 cultures, in spite of a visible response in PCR, STXs were not detected by either the Neuro-2a cell-based assay or the LC-MS/MS analyses (Table 3). This meant that the STXs production in the environmental samples could be attributed to *Aph. gracile* rather than to *Anabaena planctonica* or *Aph. aphanizomenoides*.

Discussion

The phytoplanktonic community in the Champs-sur-Marne recreational water body was clearly dominated by cyanobacteria in summer, and displayed increasing numbers of species from 2005 to 2008. Despite the methodological constraints inherent in monitoring cyanobacteria (i.e. the greater frequency of sampling in summer because of the recreational use), a trend can be observed in the dominant cyanobacterial genera during the survey. When monitoring began, *Microcystis* was the dominant genus, whereas since 2007 the Nostocales have increased to become the dominant population. This change in the cyanobacterial community has had a clear impact on the cyanotoxins present (MCs in 2005 *vs.* STXs in 2008). Because of the lack of data pertaining to the environmental variables during this period, it is impossible to identify the causes of this shift. Teubner et al. (1999) demonstrated that the critical TN:TP ratio has an influence on the development of *Aphanizomenon flos-aquae* and other cyanobacterial species. However, the importance of this ratio must be considered in relation to other environmental variables. Time series analyses of environmental parameters and their correlation with cyanobacterial biomass is required if we are to identify the main factors controlling *Aphanizomenon* and *Microcystis* dynamics.

During the last few decades, the increase in the frequency of cyanobacterial blooms in freshwater bodies has led water management authorities to pay more attention to the risks associated with toxic cyanobacteria. The diagnosis of toxic occurrences still focuses mainly on microcystins, although reports of neurotoxins are becoming more frequent (e.g. Liu et al., 2006; Carrasco et al., 2007; Wood et al., 2007).

As far as we are aware, this is the first published report of the presence of STXs in French freshwater. The causative organism has been identified as *Aphanizomenon gracile,* and single-species cultures producing STXs have been successfully obtained.

On the basis of the strains cultured, nine cyanobacterial species have so far been identified as producing STXs in freshwater. *Aphanizomenon flos-aquae* was first reported to be an STXs producer in the late 1960s, first in Canada (Jackim and Gentile, 1968), and then in New Hampshire in the United States (Mahmood and Carmichael, 1986). Australian blooms dominated by *Anabaena circinalis* producing STXs have caused extensive stock deaths in

Australia (Humpage et al., 1994; Negri et al., 1995). STXs from *Lyngbya wollei* have since been reported in Alabama (Carmichael et al., 1997), those from *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Raphidiopsis brookii* in Brazil (Lagos et al., 1999; Molica et al., 2002; Yunes et al., 2009), from *Aphanizomenon flos-aquae*, *Aph. issatschenkoi* (*Cuspidothrix issatschenkoi*) and *Aph. gracile* in Portugal (Pereira et al., 2000; Ferreira et al., 2001; Pereira et al., 2004), from *Anabaena lemmermannii* in Denmark and Finland (Kaas and Henriksen, 2000; Rapala et al., 2005) and from *Limnothrix redekei* in Italy (Pomati et al., 2000; Gkelis et al., 2005).

In previous studies conducted in Portugal and Brazil, the presence of STXs had already been attributed to *Aphanizomenon gracile* (Pereira et al., 2004; Costa et al., 2006). Moreover, there is some evidence that this species may also produce toxins such as cylindrospermopsin (Rücker et al., 2007), and a not yet identified hepatoxin (Dos S. Vieira et al., 2005).

In Champs-sur-Marne, *Aph. gracile* was part of a complex phytoplanktonic community in which other potentially toxic species, such as *Anabaena flos-aquae, Aphanizomenon flos-aquae, Microcystis aeruginosa, M. wesenbergii*, and *Planktothrix agardhii*, were also encountered. Nevertheless, there was no evidence of the co-occurrence of different types of cyanotoxins at any time during the surveillance of the Champs-sur-Marne water body, and there was no clear evidence of a time-dependent succession in the potentially toxic *Microcystis* and *Aphanizomenon* populations (Figure 2).

In natural water samples analyzed for their STXs content, *Aphanizomenon gracile* species accounted for only 6.5% and 7.5% of the phytoplanktonic biomass at Sites 1 and 2, respectively (Table 2). As *Aph. flos-aquae* was the dominant species, and has previously been reported to be an STXs producer (e.g. Mahmood and Carmichael, 1986; Ferreira et al. 2001), we cannot exclude the possibility that *Aph. flos-aquae* did not in fact contribute to the production of STXs in the water body.

In the natural samples analyzed, the concentrations of STXs were 4.8 ± 0.5 µg eq.STX L^{-1} and 6.7 ± 3.5 eq.STX L^{-1} for Sites 1 and 2, respectively. These values were above the limit indicated in the guideline (3 µg eq.STX L^{-1}) for STXs in drinking waters proposed by Australia and Brazil. However, they are lower than the values reported by Rapala et al. (2005) (ranging from 33 to 1000 µg eq.STX L^{-1}), which have been linked to possible associated effects on human health. It is difficult to compare our findings with other reports of occurrences of STXs in water bodies, since toxicity values are often expressed as the STX equivalent per g of lyophilized material, and are not always linked to Chl *a* concentrations.

In the 3 single-species cultures of *Aphanizomenon gracile* and in the natural samples, only the two variants STX and NEO were detected by LC-MS/MS. In the past, the toxin profiles of other strains of *Aphanizomenon* have been studied (see Aráoz *et al*. (2009) for review). It is interesting to note that the *Aphanizomenon gracile* strain LMECYA40 isolated by Pereira et al. (2004) in Portugal also produced only STX and NEO. One strain of *Aphanizomenon flos-aquae* (NH5) isolated by Mahmood and Carmichael (1986) in New Hampshire was reported to produce STX and NEO, whereas Ferreira et al. (2001) detected a more complex toxin profile (GTX1, GTX3, GTX4 and C1) in cultures of *Aph. flos-aquae* isolated from northern Portugal.

Other STXs variants may be found in natural samples, depending on the heterogenicity of the cyanobacterial subpopulations within the blooms, as reported in freshwater (e.g. Kurmayer et al., 2004; Yéprémian et al., 2007) and marine environments for the STXs producers *Alexandrium* and *Gymnodinium* (e.g. Cho et al., 2008; Touzet et al., 2008). The physiological status of the toxin producers could also influence their toxin profiles.

Several tools can be used to monitor STXs in water bodies: (i) rapid microscopic observation and morphological comparison with known cyanobacterial STXs producers, (ii) molecular tools to screen for the presence of genes implicated in the synthesis of STXs, (iii) methods such as the Neuro-2a cell based assay or easy-to-use ELISAs, which assimilate the toxicity from multiple toxin analogs into a single average result and (iv) analytical methods for identifying known STXs variants. However, we have to keep in mind that depending on the manufacturer of the ELISA used, there is poor cross reactivity for some of the STXs variants, which could lead to an underestimation of the STX levels or to false-negatives. Analytical methods, such as LC-MS/MS, may not be reliable when natural samples contain unknown STXs variants (Humpage et al., 2007).

In this study, *Aph. gracile* and *Aph. flos-aquae* were the dominant species when STX production was observed. These two species frequently occur in freshwater environments of the Northern hemisphere, probably as a consequence of their ability to survive unfavorable growth conditions by forming akinetes. They are known to produce STXs, CYN or MCs (e.g. Willame et al., 2005; Preussel et al., 2006), and we can hypothesize that several types of toxins may occur simultaneously (Fastner et al., 2009). Such co-occurrence demands careful consideration, as we know nothing about the impact of mixtures of cyanotoxins on human and animal health. To date, the health risk associated to cyanobacteria and cyanotoxins is mainly related to the presence of MCs in the particular fraction. Nevertheless, it has been shown that a significant proportion of other toxins, such as CYN and STXs, can be found in the dissolved

fraction of raw waters (Fastner et al., 2009), and that these toxins may persist in the environment (Jones and Negri, 1997). This possible co-occurrence of several cyanobacterial toxins, and the persistence of dissolved toxins in water bodies highlights the need to re-evaluate the guidelines for recreational waters so as to evaluate the risk linked to cyanobacteria and to their toxins more accurately.

Acknowledgements

Sampling was done in cooperation by the technical team of the Champs-sur-Marne area and the MNHN during a research program involving the study of biodiversity in the Seine-Saint-Denis Department. Fellowships were awarded to A. Ledreux by AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) and to A. Catherine by the MNHN (Legs Prévost, Conseil Général de Seine Saint-Denis). The authors are grateful to S. Hamlaoui for assistance with cell cultures, to L. Dubost for MS analyses and to Dr. Katia Comte for helpful discussion. This work was funded by the program ANR SEST 07 CYANOTOX.

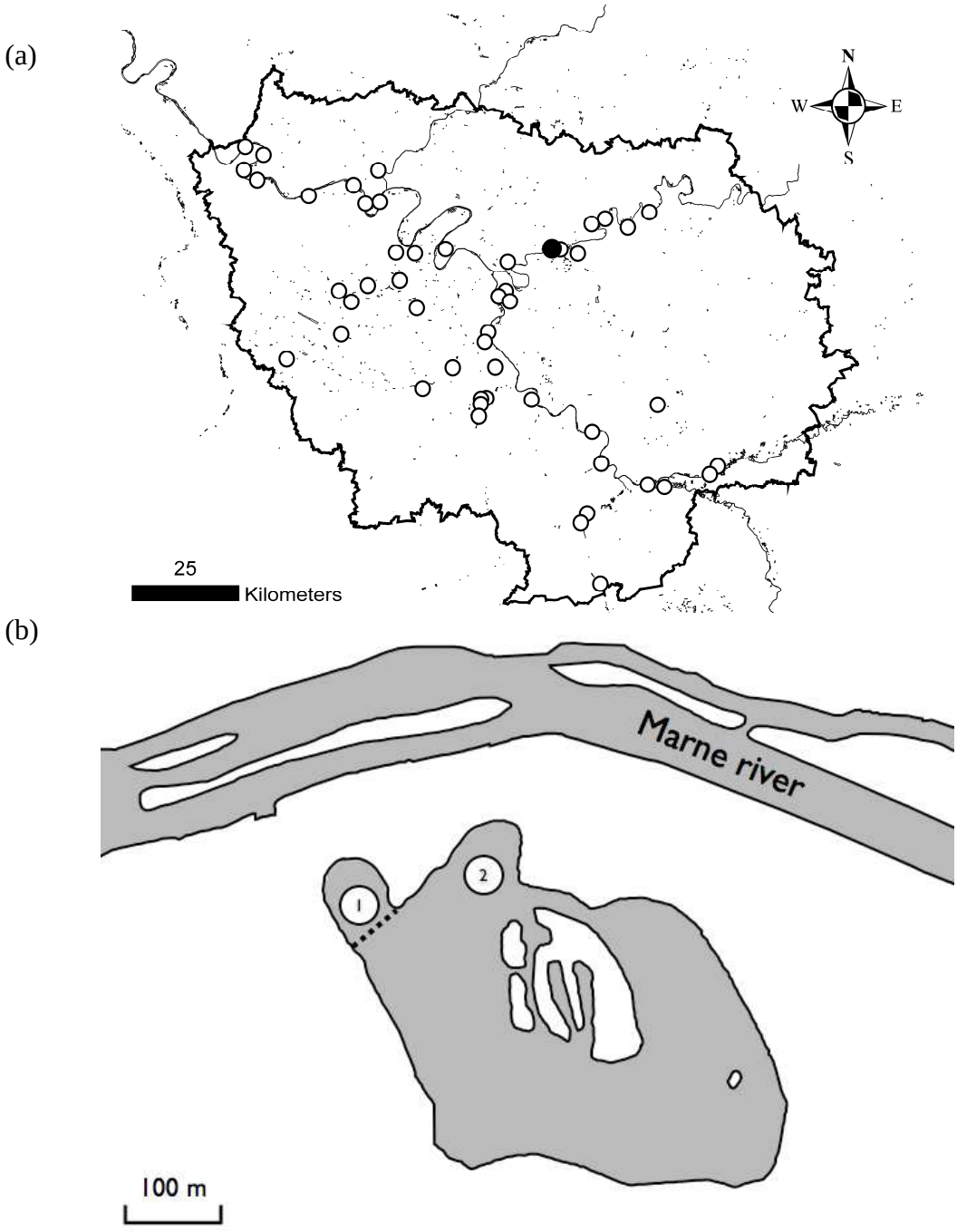


Figure 1: (a) Geographic location of the Champs-sur-Marne water body within the Ile-de-France region (open circles: water bodies included in the Cyanotox program; black circle: Champs-sur-Marne water body). (b) Location of sampling sites 1 and 2 (the dashed line shows the mesh separating the bathing area from the rest of the water body).

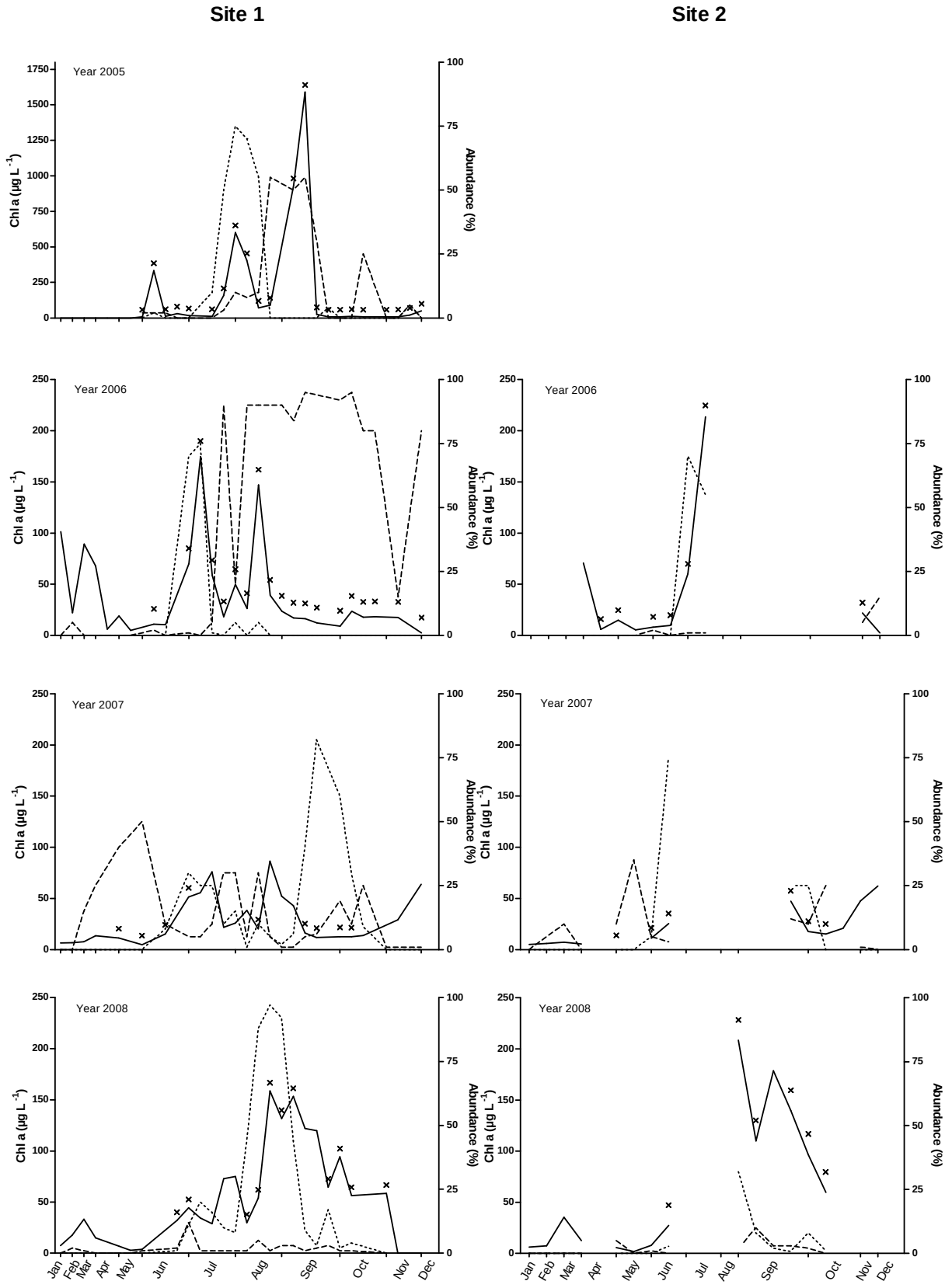


Figure 2: Dynamics from June 2005 to November 2008 of chlorophyll a (——) (left y-axis), dominance of cyanobacteria (**x**), relative abundance of *Microcystis* spp. (- - -) and relative abundance of *Aphanizomenon* spp. (·····) at Champs-sur-Marne (Site 1 and Site 2) (right y-axis).

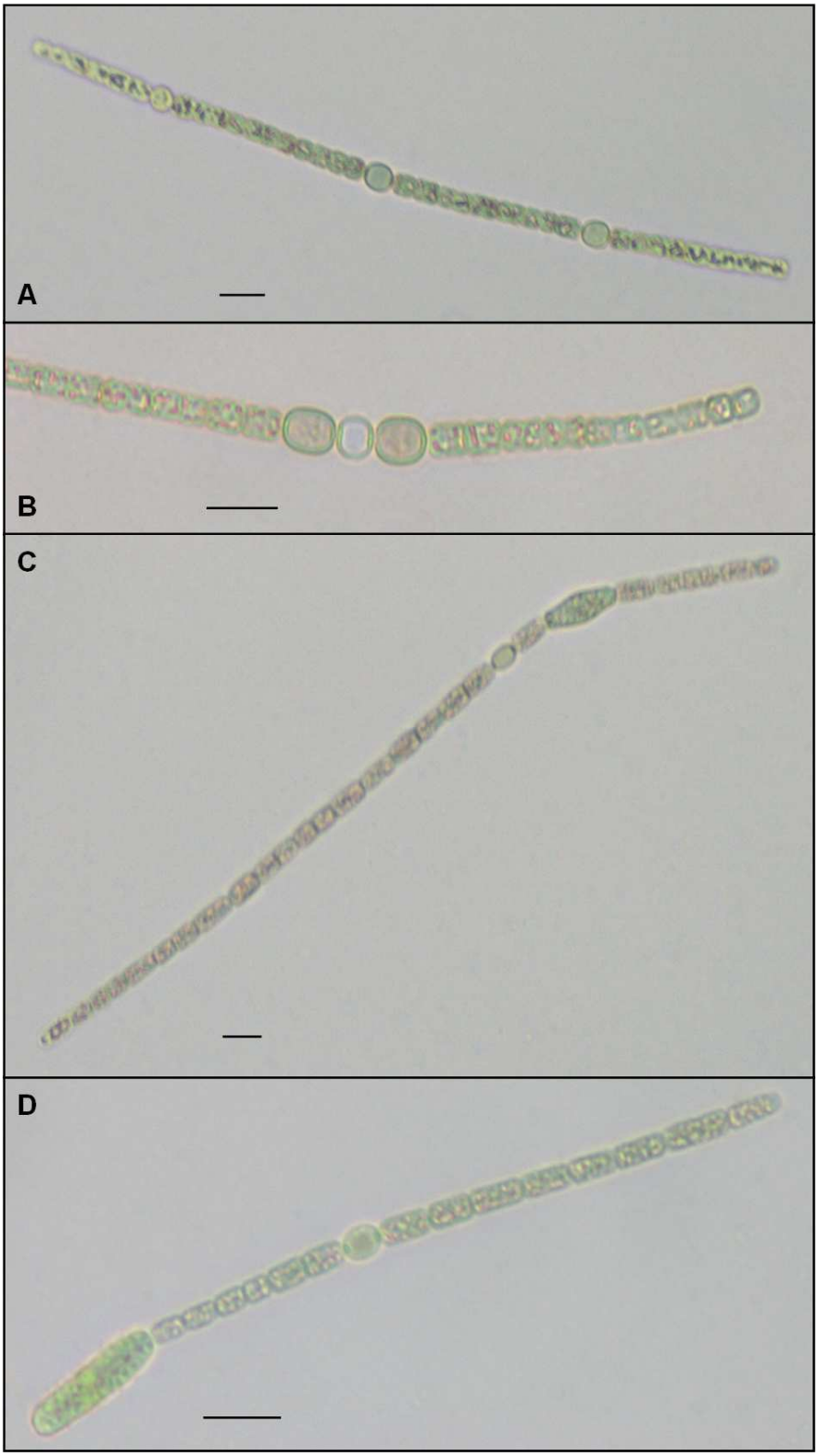


Figure 3: Micrographs of single-species cultures investigated in this study. **A:** *Aphanizomenon aphanizomenoides* (Forti) Hortobágyi & Komárek (1979) (AphA1), an effilated trichome with heterocytes. **B.** *Aphanizomenon aphanizomenoides* (AphA1), a trichome with akinetes and heterocyte. **C.** *Aphanizomenon gracile* Lemmermann (1910) (AphG4), a trichome with akinete and heterocyte. **D.** *Aphanizomenon gracile* (AphG15), a trichome with akinete and heterocyte. Scale bars indicate 10 µm.

Table 1: Chlorophyll *a* concentrations, number of cyanobacterial taxa, occurrence and relative frequency of *Aphanizomenon* spp. and *Microcystis* spp., and maximum levels of MCs and STXs for Site 1 (a) and Site 2 (b) for each year during the monitoring of the Champs-sur Marne water body.

		Chl *a* (µg L^{-1})			**Cyanobacteria**	***Aphanizomenon* spp.**		***Microcystis* spp.**		**MCs (µg eq.MC-LR L^{-1})**	**STXs (µg eq.STX L^{-1})**
Year	**Number of samples**	**Mean**	**Max**	**CV%**	**Total number of taxa**	**Occurrence**	**Relative frequency (%)**	**Occurrence**	**Relative frequency (%)**	**Max**	**Max**
(a) 2005	22	200	1590	195	13	9	41	13	59	89	<LOD
2006	27	40	175	110	18	5	19	18	67	57	<LOD
2007	24	29	86	82	25	16	67	21	88	<LOD	<LOD
2008	24	59	159	81	28	16	67	18	75	<LOD	5
(b) 2005	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<LOD
2006	10	41	214	158	11	2	20	5	50	<LOD	<LOD
2007	13	21	62	91	16	4	31	10	77	0.1	<LOD
2008	15	67	208	103	21	9	60	7	47	<LOD	7

LOD: limit of detection

Table 2: Chlorophyll *a* concentrations, cyanobacterial species observed and their relative abundance and toxicity in the raw water samples harvested on 8 September 2008 at Sites 1 and 2 of the Champs-sur-Marne water body.

	Chl *a* (µg L^{-1})	**Cyanobacterial species**	**Relative abundance (%)**	**MCs content**	**ANTX content**	**STXs content µg eq.STX L^{-1}**
Site 1	153 ± 1	*Aphanizomenon flos-aquae*	36	<LOD	<LOD	4.8 ± 0.5
		Aphanizomenon gracile	6.5			
		Aphanizomenon aphanizomenoides	1			
		Microcystis aeruginosa	<1			
		Microcystis wesenbergii	2			
Site 2	208 ± 4	*Aphanizomenon flos-aquae*	71.5	<LOD	<LOD	6.7 ± 3.5
		Aphanizomenon gracile	7.5			
		Aphanizomenon aphanizomenoides	<1			
		Microcystis wesenbergii	1.5			

LOD: limit of detection

Table 3: Presence of the *sxt*A gene and detection of STXs in 5 monospecific cultures isolated from Champs-sur-Marne recreational area.

Cyanobacterial species	**Single-species cultures**	**Presence of the sxtA gene**	**Presence of STXs**		
			Neuro-2a cell-based assay		LC-MS/MS
			pg eq.STX cell^{-1}	ng eq.STX L^{-1}	Qualitative detection of STXs
Anabaena flos-aquae	AWQC ANA311E[a]	++	nd		nd
Anabaena planctonica	Anapl-A	-	nd		nd
	Anapl-B	-	nd		nd
Aphanizomenon aphanizomenoides	AphA1	+	<LOD	<LOD	-
	AphA2	-	nd		nd
	AphA3	-	nd		nd
	AphA6	-	nd		nd
	AphA9	-	nd		nd
	AphA10	-	nd		nd
	AphA11	-	nd		nd
	AphA13	-	nd		nd
	AphA17	+	<LOD	<LOD	-
Aphanizomenon gracile	AphG4	++	0.6 ± 0.3	0.4 ± 0.2	+
	AphG5	-	nd		nd
	AphG6	-	nd		nd
	AphG7	-	nd		nd
	AphG14	-	nd		nd
	AphG15	++	0.2 ± 0.03	0.2 ± 0.03	+
	AphG16	++	1.2 ± 0.3	0.8 ± 0.2	+

[a] This culture was clonal and represented our positive control for the presence of the *sxt*A gene.

The *sxt*A gene was absent (-), poorly visible (+) or (++) visible in the agarose gels.

nd : not done

LOD: limit of detection.

References

Aráoz, R., Molgó, J., Tandeau de Marsac, N., 2009. Neurotoxic cyanobacterial toxins. Toxicon, doi :10.1016/j.toxicon. 2009.07.036.

Berry, J.P., Lind, O., 2009. First evidence of "paralytic shellfish toxins" and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in "tegogolo" snails (*Pomacea patula catemacensis*). Toxicon, doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.035.

Briand, J.F., Robillot, C., Quiblier, C., Bernard, C., 2002. A perennial bloom of *Planktothrix agardhii* (cyanobacteria) in a shallow eutrophic French lake: limnological and microcystin production studies. Arch. Hydrobiol. 153, 605–622.

Briand, E., Escoffier, N., Straub, C., Sabart, M., Quiblier, C., Humbert, J.-F., 2009. Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a bloom-forming *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) population. ISME J. 3, 419-429.

Cadel-Six, S., Peyraud-Thomas, C., Brient, L., Tandeau de Marsac, N., Rippka, R., Méjean, A., 2007. Different genotypes of anatoxin-producing cyanobacteria coexist in the Tarn River, France. Appl Environ Microbiol. 73, 7605-7614.

Carmichael, W.W., Eans, W.R., Yin, Q.Q., Bell, P., Moczydlowsky, E., 1997. Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb.nov. Appl Environ Microbiol. 63, 3104-3110.

Carrasco, D., Moreno, E., Paniagua, T., de Hoyos, C., Wormer, L., Sanchis, D., Cirés, S., Martıin-del-Pozo, D., Codd, G.A., Quesada, A., 2007. Anatoxin-a occurrence and potential cyanobacterial anatoxin-a producers in Spanish reservoirs. J. Phycol. 43, 1120–1125.

Catherine, A., Quiblier, C., Yéprémian, C., Got, P., Groleau, A., Vinçon-Leite, B., Bernard, C., Troussellier, M., 2008a. Collapse of a *Planktothrix agardhii* perennial bloom and microcystin dynamics in response to reduced phosphate concentrations in a temperate lake. FEMS Microbiol Ecol 65, 61–73.

Catherine, A., Troussellier, M., Bernard, C., 2008b. Design and application of a stratified sampling strategy to study the regional distribution of cyanobacteria (Ile-de-France, France). Water Res. 42, 4989-5001.

Cestèle, S., Catterall, W.A., 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. Biochimie 82, 883-892.

Cho, Y., Hiramatsu, K., Ogawa, M., Omura, T., Ishimaru, T., Oshima, Y., 2008. Non-toxic and toxic subclones obtained from a toxic clonal culture of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae): Toxicity and molecular biological feature. Harmful Algae 7, 740-751.

Costa, I.A.S., Azevedo, S.M.F.O., Senna, P.A.C., Bernardo, R.R., Costa, S.M., Chellappa, N.T., 2006. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. Brazilian Journal of Biology 66, 211-219.

Dell'Aversano, C., Hess, P., Quilliam, M.A., 2005. Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. J. Chromatogr. A 1081, 190-201.

Dos S. Vieira, J.M., Azevedo, M.T., Oliveira Azevedo, S.M.F., Honda, R.Y., Correa B., 2005. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. Toxicon 45, 901-9.

Fastner, J., Rücker, J., Wiedner, C., Nixdorf, B., Chorus, I., 2009. Long-term trends and seasonal patterns of cyanobacterial hepato- and neurotoxins in German water bodies. In: International Symposium on Toxicity Assessment, Metz, France, p.57.

Ferreira, F.M.B., Franco, J.M., Fidalgo, M.L., Fernandez-Vila, P., 2001. PSP toxins from *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacteria) collected in the Crestuma-Lever reservoir (Douro river, Northern Portugal). Toxicon 39, 757-761.

Fristachi, A., Sinclair, J.L., 2008. Occurrence of cyanobacterial harmful algal blooms: workgroup report. Advances in Experimental Medicine and Biology 619, 45-103.

Galváo, J.A., Oetterer, M., Bittencourt-Oliveira, M.C., Gouvêa-Barros, S., Hiller, S., Erler, K., Luckas, B., Pinto, E., Kujbida, P., 2009. Saxitoxins accumulation by freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*) for human consumption. Toxicon 54, 891-894.

Gkelis, S, Rajaniemi, P, Vardaka, E, Moustaka-Gouni, M, Lanaras, T, Sivonen, K., 2005. *Limnothrix redekei* (Van Goor) Meffert (Cyanobacteria) strains from Lake Kastoria, Greece form a separate phylogenetic group. Microbial Ecology 49(1), 176-182.

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.

Hitzfeld, B.C., Höger, S.J., Dietrich, D.R., 2000. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. Environ Health Perspect 108 (S1), 113-122.

Humpage, A.R., Rositano, J., Bretag, A.H., Brown, R., Baker, P.D., Nicholson, B.C., Steffensen, D.A., 1994. Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. Aust. J. Mar. Freshwater Res 45, 761-771.

Humpage, A.R., Ledreux, A., Fanok, S., Bernard, C., Briand, J.-F., Eaglesham, G., Papageorgiou, J., Nicholson, B., Steffensen, D., 2007. Application of the neuroblastoma assay

for paralytic shellfish poisons to neurotoxic freshwater cyanobacteria: interlaboratory calibration and comparison with other methods of analysis. Environ. Toxicol. Chem. 26, 1512-1519.

Jackim, E. Gentile, J. 1968. Toxins of a blue-green alga: similarity to saxitoxin. Science 162, 915-916.

Jellett, J.F., Roberts, R.L., Laycock, M.V., Quilliam, M.A., Barrett, R.E., 2002. Detection of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in shellfish tissue using MIST Alert, a new rapid test in parallel with the regulatory AOAC mouse bioassay. Toxicon 40, 1407-1425.

Jones, G.J., Negri, A.P., 1997. Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) in freshwaters. Water Res. 31, 525-533.

Kaas, H., Henriksen P., 2000. Saxitoxins (PSP toxins) in Danish lakes. Water Res. 34, 2089-2097.

Kellmann, R, Mihali, TK, Jeon, YJ, Pickford, R, Pomati, F, Neilan, BA. 2008. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. Appl Environ Microbiol. 74(13), 4044-4053.

Kogure, K., Tamplin, M.L., Simidu, U., Colwell, R.R., 1988. A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. Toxicon 26**,** 191-197.

Komárek, J., Anagnostidis, K., 1989. Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 4-Nostocales. Arch. Hydrobiol. Suppl. 82-83, 247-345.

Komárek, J., Anagnostidis, K., 1998. Cyanoprokaryota, 1.Teil: Chroococcales. In: Ettl, H., Gärtner, G., Heynigh, H., Mollenhauer, D. (Eds). Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1, Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, 548 pp.

Komárek, J., Anagnostidis, K., 2005. Cyanoprokaryota. 2. Teil: Oscillatoriales. In: Büdel, B., Krienitz, L., Gärtner, G., Schagerl, M. (Eds). Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2, Elsevier GmbH, München, 759 pp.

Kotai, J., 1972. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. Publication B-11/69. Norwegian Institute for Water Research, Oslo, pp. 1-5.

Kurmayer, R., Christiansen, G., Fastner, J., Börner, T., 2004. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. Environ. Microbiol. 6, 831-841.

Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P.A., Andrinolo, D., Azevedo, S.M., Oshima, Y., 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. Toxicon 37, 1359-1373.

Liu, Y., Chen, W., Li, D., Shen, Y., Liu, Y., Song, L., 2006. Analysis of paralytic shellfish toxins in *Aphanizomenon* DC-1 from Lake Dianchi, China. Environ. Toxicol. 21, 289-295.

Llewellyn, L.E., 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. Nat. Prod. Rep. 23, 200-222.

Mahmood, N.A., Carmichael, W.W., 1986. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. Toxicon 24, 175-186.

Molica, R., Onodera H., Garcia G., Rivas M., Andrinolo D., Nascimento S., Meguro H., Oshima Y., Azevedo S., Lagos, N., 2002. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. Phycologia 41, 606-611.

Negri, A.P., Jones, G.J., 1995. Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis* by the freshwater mussel *Alathyria condola*. Toxicon 33, 667-678.

Negri, A.P., Jones, G.J., Hindmarsh, M., 1995. Sheep mortality associated with paralytic shellfish poisons from the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. Toxicon 33, 1321-1329.

Oshima, Y., 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. J AOAC Int. 78, 528-532.

Paerl, H.W., Huisman, J., 2008. Blooms like it hot. Science 320, 57-58.

Pereira, P., Onodera, H., Andrinolo, D., Franca, S., Araujo, F., Lagos, N., Oshima, Y., 2000. Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. Toxicon 38, 1689-1702.

Pereira, P., Li, R.H., Carmichael, W.W., Dias, E., Franca, S., 2004. Taxonomy and production of paralytic shellfish toxins by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* LMECYA40. Eur. J. Phycol. 39, 361-368.

Pomati, F., Sacchi, S., Rossetti, C., Giovannardi, S., Onodera, H., Oshima, Y., Neilan, B.A., 2000. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp. FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. J. Phycol. 36, 553-562.

Preussel, K, Stuken, A, Wiedner, C, Chorus, I, Fastner, J., 2006. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. Toxicon 47, 156-162.

Rapala, J., Robertson, A., Negri, A.P., Berg, K.A., Tuomi, P., Lyra, C., Erkomaa, K., Lahti, K., Hoppu, K., Lepisto, L., 2005. First report of saxitoxin in Finnish lakes and possible associated effects on human health. Environ. Toxicol. 20, 331-340.

Ryding, S.-O., Rast, W., 1994. Le contrôle de l'eutrophisation des lacs et réservoirs.

UNESCO, Editions MASSON, Paris, France, 294 pp.

Rücker, J., Stüken, A., Nixdorf, B., Fastner, J., Chorus, I., Wiedner, C., 2007. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 Aphanizomenon-dominated temperate lakes. Toxicon 50, 800-809.

Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.) Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health. Significance, monitoring and management. Spon/Chapman & Hall, London, pp. 41-112.

Talling, J.F., Driver, D., 1963. Some problems in the estimation of chlorophyll a in phytoplankton. In: Doty, M. (Ed.), Proceedings on primary production measurement, marine and freshwater. US Atomic Energy Engineering Commission, Hawaii, pp. 146-152.

Teubner, K, Feyerabend, R., Henning, M., Nicklisch, A., Woitke, P., Kohl, J.-G., 1999. Alternative blooming of *Aphanizomenon flos-aquae* and *Planktothrix agardhii* induced by the timing of critical nitrogen: phosphorus ratio in hypertrophic riverine lakes. Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol. 54, 325-344.

Touzet, N. Franco, J.M., Raine, R., 2008. Morphogenetic diversity and biotoxin composition of *Alexandrium* (Dinophyceae) in Irish coastal waters. Harmful Algae 7, 782-797.

WHO, 2003. Algae and cyanobacteria in fresh water. In: Guidelines for safe recreational water environments. Geneva,World Health Organization. p. 136-158.

Willame, R, Jurczak, T, Iffly, JF, Kull, T, Meriluoto, J, Hoffmann, L., 2005. Distribution of hepatotoxic cyanobacterial blooms in Belgium and Luxembourg. Hydrobiologia 551, 99-117.

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.

Yéprémian, C., Gugger, M.F., Briand, E., Catherine, A., Berger, C., Quiblier, C., Bernard, C., 2007. Microcystin ecotypes in a perennial *Planktothrix agardhii* bloom. Water Res. 41, 4446-4456.

Yunes, J.S., De La Rocha, S., Giroldo, D., Bonoto da Silveira, S., Comin, R., da Silva Bicho, S., Melcher, S.S., Sant'anna, C.L., Vieira, A.A., 2009. Release of carbohydrated and proteins by a subtropical strain of *Raphidiopsis brookii* (Cyanobacteria) able to produce saxitoxin at three nitrate concentrations. J. Phycol. 45, 585-591.

Discussion

Le test sur la lignée de neuroblastomes Neuro-2a initialement développé par Kogure et al. (1988) peut constituer une méthode complémentaire au bioessai sur souris pour la détection et la quantification des STXs (Rossini, 2005 ; Hess et al., 2006 ; Botana et al., 2009).

Compte tenu du fait que ce test fonctionne pour la recherche des STXs dans les coquillages, il y a de grandes chances qu'il devienne un outil performant pour la détection des STXs pour un milieu moins complexe comme les eaux douces de surface.

Dans ce contexte, l'article 1 a pour principal objectif de montrer que ce test sur lignée cellulaire peut être employé pour la détection spécifique et la quantification des STXs produites en eau douce par des efflorescences à cyanobactéries. Des analogues certifiés de STXs ainsi que des extraits d'efflorescences à cyanobactéries ou de souches en culture ont été testés et les résultats obtenus comparés avec d'autres méthodes d'analyse. Les limites de détection obtenues dans nos conditions expérimentales sont reportées dans le tableau ci-dessous.

Limites de détection des saxitoxines par le test Neuro-2a	
STX pure	8 nM
Extrait d'efflorescence à cyanobactérie	5 µg éq.STX par g de lyophilisat

Au travers de cette démarche, nous avons voulu montrer que, quelque soit l'origine des STXs, le test sur lignée cellulaire Neuro-2a peut permettre la détection et la quantification des STXs.

Sensibilité, spécificité et variabilité pour les standards

Dans nos conditions expérimentales, l'étude a montré que la lignée Neuro-2a est sensible à tous les analogues testés (STX, NéoSTX, GTX1/4, GTX2/3, GTX5 et C1/C2). Des CE_{50} ont en effet pu être déterminées pour chaque analogue ou couple d'analogues. Un test de Mann-Whitney pour la comparaison des moyennes a permis de montrer que les différences observées entre les CE_{50} sont significatives, ce qui signifie que les cellules Neuro-2a répondent de façon qualitative en fonction de l'affinité des analogues pour le site 1 de la sous unité α du canal sodium voltage-dépendant. Au-delà des résultats présentés dans l'article 1, il nous a donc semblé pertinent de comparer les toxicités relatives obtenues pour chaque standard étudié entre le bioessai sur souris (échelle d'un organisme) et le test sur neuroblastomes Neuro-2a (échelle cellulaire). La figure 20 présente la relation linéaire entre

les CE_{50} déterminées sur le test Neuro-2a et les toxicités sur souris pour les différents analogues de STXs.

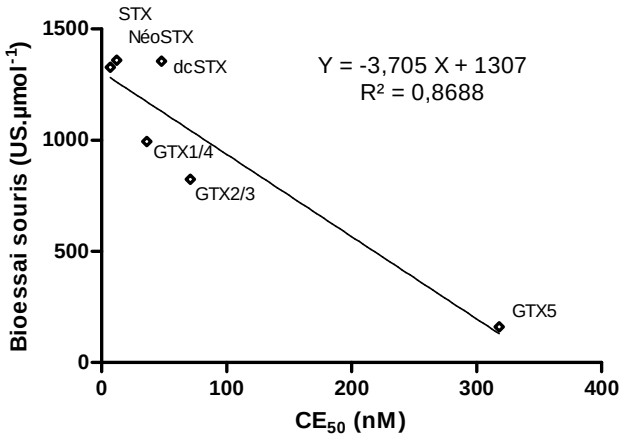


Figure 20 : Relation entre les CE50 moyennes déterminées par le test sur Neuro-2a et les toxicités spécifiques pour chaque analogue (ou couple d'analogues). Le couple C1/C2 n'a pas été pris en compte car il n'y a pas de valeur de toxicité sur souris disponible.

Cette figure met en évidence une bonne corrélation ($R^2 = 0,86$, $p<0,01$) entre le bioessai sur souris et le test sur Neuro-2a. Dans ces conditions, on peut comparer des résultats obtenus par le bioessai sur souris et par le test Neuro-2a et quantifiés en équivalent STX. Une telle corrélation a été obtenue entre le bioessai sur souris et le test sur Neuro-2a pour la détection des STXs dans des extraits de coquillages ($R^2 = 0,903$, $p<0,001$) (Truman et Lake, 1996).

Vale et al. (2008) ont évalué la toxicité de différents standards certifiés de STXs sur des cultures primaires de neurones en grain du cervelet de rat (CGC) avec une méthode mesurant les variations de potentiel membranaire induites par les saxitoxines grâce à un marqueur fluorescent (DiBAC4(3)).

Le tableau XII présente une comparaison des résultats obtenus dans notre étude et celle de Vale et al.

Tableau XII : Comparaison des CE_{50} obtenues pour différents analogues de STXs sur la lignée Neuro-2a et une culture primaire de neurones (CGC).

Analogue	Neuro-2a : CE_{50} (nM)	CGC : CE_{50} (nM)
NéoSTX	7	6,2
STX	12	5,1
GTX1/4	36	9,5
GTX2/3	71	13,6
C1/C2	318	non déterminé
GTX5	551	52
dcSTX	non déterminé	6,3
dcNéoSTX	non déterminé	10,5
dcGTX2/3	non déterminé	22,8

Les résultats obtenus sur les cultures primaires de neurones semblent indiquer que celles-ci sont plus sensibles aux STXs. Un résultat similaire a été rapporté par LePage et al. (2005) pour la P-CTX1. Selon ces auteurs, les CGC exprimeraient 20 fois plus de canaux sodiques voltage-dépendant que les cellules Neuro-2a, ce qui les rendrait plus sensibles aux toxines agissant sur ces canaux. Par ailleurs, la fourchette de CE_{50} obtenue pour les CGC est plus étroite (de 5,1 à 52 nM) que pour les Neuro2a (de 7 à 551 nM), ce qui présente un inconvénient pour l'étude d'extraits de toxicité inconnue. En effet, les analogues les plus toxiques ayant tous sensiblement le même pouvoir sur le potentiel de membrane mesuré, il peut en résulter une surestimation de la toxicité des extraits. En outre, l'utilisation de cultures primaires de neurones pose le problème de leur isolement à partir d'animaux vivants peu compatible avec une utilisation du test dans un contexte de criblage de la toxicité d'échantillons.

Dans notre étude, la variabilité intra-laboratoire observée pour les valeurs de CE_{50} est inférieure à 30% pour un nombre de réplicats allant de n=5 (GTX5) à n=30 (STX). Cette variabilité est comparable à celle observée sur la lignée Neuro-2a (Jellett et al., 1995) et sur le bioessai sur souris (Holtrop et al., 2006). La variabilité du test Neuro-2a peut être imputée à différents paramètres de nature biologique (nombre de cellules ensemencées dans les puits et changement de l'état physiologique des cellules en fonction du nombre de repiquages) ou chimique (concentrations en ouabaïne et vératridine et instabilité chimique des standards de STXs).

L'étude inter-laboratoires MNHN/AWQC a porté sur 3 standards (STX, NéoSTX et GTX2/3). Les CE_{50} obtenues au MNHN sont légèrement supérieures à celles de l'AWQC, néanmoins les effets toxiques de chaque standard sont comparables entre les deux laboratoires.

En confrontant toutes les données disponibles (CE_{50} déterminées sur Neuro-2a, sur cultures primaires de CGC ainsi que toxicités spécifiques sur la souris), trois groupes de toxicité peuvent être distingués, mettant ainsi en évidence que le potentiel toxique des STXs est transposable de l'échelle cellulaire à celle de l'organisme.

NéoSTX, STX, dcSTX	Forte toxicité
GTX1/4, GTX2/3, dcNéoSTX	Toxicité intermédiaire
C1/C2, GTX5	Faible toxicité

Extraits d'efflorescences à cyanobactéries et détection de nouveaux analogues de STXs

La comparaison inter-laboratoires (MNHN/AQWC) n'a pas montré de différence significative pour les 10 extraits d'efflorescences à cyanobactéries testés en commun (Article 1, Fig. 1B). Ceux-ci peuvent être classés en trois groupes : (i) les non toxiques (Custodia, Wyong et Pejar), (ii) les extraits ayant une toxicité moyenne (Chaffey, Burrinjuck, River Murray, Wongulla et Clydesdale) et (iii) les extraits très toxiques (Taquecetuba et Confins).

Des différences significatives ont été mises en évidence pour certains extraits entre 1) : les résultats LC-MS/MS et HPLC-FD et 2) : le test cellulaire et les méthodes analytiques (Figure 21).

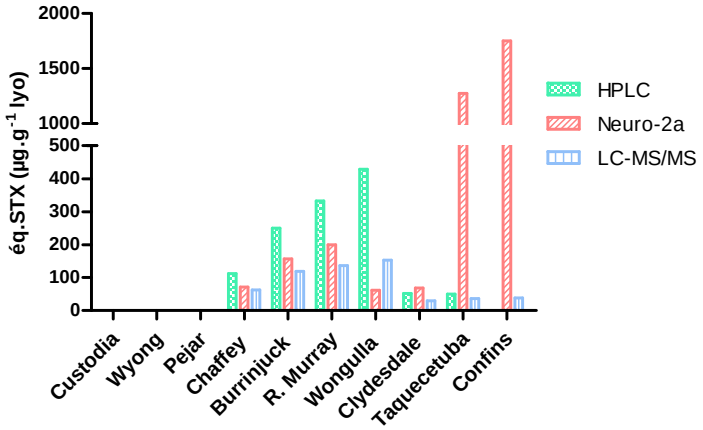


Figure 21 : Récapitulatif des résultats moyens obtenus par le test Neuro-2a, par HPLC-FD et par LC-MS/MS pour les 10 extraits d'efflorescences à cyanobactéries (selon l'article 1)

Concernant les différences entre LC-MS/MS et HPLC-FD, celles-ci s'expliquent par le fait que les différents opérateurs ne disposaient pas tous du même jeu de standards, avec des conséquences sur la détermination de la concentration de chacun des analogues. Cela a des conséquences sur le calcul de la toxicité des extraits en équivalent STX. La toxicité en éq.STX étant calculée en additionnant les quantités d'analogues détectées affectées d'un coefficient de toxicité spécifique (*cf.* Figure 4, Chapitre 1), le résultat est donc biaisé.

Concernant les différences observées entre test Neuro-2a et méthodes analytiques, ces observations sont particulièrement contrastées pour les extraits Taquecetuba et Confins (*cf.* Figure 21). Cette étude met clairement en évidence l'intérêt d'un test fonctionnel tel que le test sur Neuro-2a. En effet, ces deux extraits correspondent à des efflorescences à cyanobactéries de plans d'eau brésiliens dominées par l'espèce *Cylindrospermopsis raciborskii*, provoquant chez la souris des symptômes de neurotoxicose identiques à ceux causés par les STXs (Lagos et al., 1999 ; Molica et al., 2002). La toxine responsable est un analogue de STX qui se comporte chromatographiquement de la même façon que les STXs et

qui représente près des deux tiers des STXs de l'extrait (Molica et al., 2002). Au cours de notre étude, cet analogue n'a pas été recherché par les analyses HPLC-FD et LC-MS/MS par absence de standard, conduisant ainsi à un résultat non concordant pour l'extrait Confins entre l'HPLC-FD et le test cellulaire.

L'article 1 a donc contribué à montrer que, dans nos conditions expérimentales, le test sur lignée cellulaire Neuro-2a est (i) sensible aux différents analogues de STXs testés avec une variabilité des réponses inférieure à 30%, (ii) qu'il répond qualitativement pour les standards de la même façon que le bioessai sur souris, et que (iii) la variabilité et la reproductibilité sont globalement satisfaisantes pour un test biologique. Notre étude a démontré l'intérêt de ce test fonctionnel dans un contexte où des analogues de STXs non identifiés sont présents dans les extraits d'efflorescences.
Le test sur Neuro-2a constitue donc un outil d'étude complémentaire aux techniques analytiques permettant de mettre en évidence des toxines bloquant le site 1 de la sous-unité α des canaux sodium voltage-dépendants.

Afin de conforter l'utilisation d'un tel test comme outil de criblage d'échantillons de toxicité inconnue, nous l'avons utilisé pour évaluer la présence des STXs dans le cadre du suivi d'un plan d'eau douce à usage récréatif. Ce suivi comprend, selon les recommandations de l'OMS, l'évaluation de la biomasse phytoplanctonique (concentrations en chlorophylle *a*) ainsi que la détermination en microscopie optique des genres et /ou espèces de cyanobactéries.
Dans un contexte de suivi de plan d'eau, il est important pour les gestionnaires de pouvoir s'appuyer sur des méthodes qui permettent de détecter directement un potentiel toxique. Les tests fonctionnels basés sur le mode d'action des toxines tels que le test d'inhibition des PPases par les MCYST ou le test Neuro-2a pour les STXs sont particulièrement intéressants car ils fournissent des résultats dans un temps relativement court (2 jours pour le test sur cellules Neuro-2a).
Par cette démarche, nous avons montré que les MCYST associées au genre *Microcystis* atteignent des niveaux élevés (jusqu'à 89 µg éq.MCYST-LR.L^{-1}, en 2005) tandis que les concentrations en STXs sont de l'ordre de 5 µg éq.STX.L^{-1} (septembre 2008). Des isolements entrepris afin de déterminer l'espèce productrice de STXs nous ont permis d'identifier que l'espèce *Aphanizomenon gracile* est l'agent responsable de la production de STXs. Les analogues STX et NéoSTX ont été mis en évidence par LC-MS/MS. L'originalité de la

démarche a permis de soumettre pour publication cette première description de STXs sur un plan d'eau douce en France.

L'utilisation du test sur lignée Neuro-2a a permis de mettre en évidence un risque potentiel pour les utilisateurs du plan d'eau lié à la présence de STXs. Selon le rapport de l'Afssa (2006), moins d'une dizaine de pays ont mis en place des recommandations pour la surveillance sanitaire de la contamination des eaux de zones de baignade et d'activités aquatiques et sa gestion en cas de prolifération de cyanobactéries ou de contamination par des cyanotoxines. Concernant les neurotoxines, seul le Canada a défini un seuil d'alerte de 40 $\mu g.L^{-1}$ d'anatoxine-a d'après une évaluation de la concentration limite d'exposition qui permet de garantir l'absence d'effets nocifs chez les enfants (Afssa, 2006). Aucun seuil n'a été défini pour les STXs présentes dans les plans d'eau à usage récréatif.

Par ailleurs, la possible co-occurrence des différentes familles de cyanotoxines (e.g. Osswald et al., 2007 ; Fastner et al., 2009 ; Messineo et al., 2009) pose le problème de la synergie de leurs effets en cas d'exposition aiguë mais également d'exposition chronique. A ce jour, aucune étude ne s'est intéressée à cette question. Pourtant, la connaissance acquise des concentrations en cyanotoxines d'un grand nombre de plans d'eau permettrait d'en déduire de valeurs médianes qui pourraient être utilisées pour évaluer l'effet synergique potentiel de différents groupes de cyanotoxines. Les lignées cellulaires pourraient représenter le premier échelon d'étude avant de s'intéresser aux effets synergiques des cyanotoxines sur des organismes aquatiques potentiellement impactés par ces dernières.

Quoiqu'il en soit, le test sur la lignée cellulaire Neuro-2a nous a permis de mettre en évidence un risque potentiel lié à la présence de STXs pour les usagers du plan d'eau. Ce test a donc montré son intérêt en tant qu'outil permettant d'apprécier le risque lié aux STXs en eau douce, comme cela avait été montré pour les bivalves marins (Jellett et al., 1992 ; Truman et Lake, 1996).

Dans ce contexte, étendre l'utilisation de la lignée Neuro-2a pour la détection spécifique d'autres neurotoxines présente un intérêt évident : une seule lignée cellulaire permettrait de distinguer, en fonction des conditions expérimentales, différents types de neurotoxicité correspondant à différents modes d'action. C'est pour cette raison que, comme mentionné en introduction de cette thèse, nous nous sommes penchés sur l'étude de la réponse du modèle Neuro-2a après exposition à la palytoxine. De plus, dans le cadre général d'apport de connaissances en vue de la constitution d'une batterie de tests *in vitro*, il est également important d'apporter des éléments de compréhension et de décrire les réponses du modèle

cellulaire face à une famille de neurotoxines émergentes pour laquelle existent certaines inconnues.

Chapitre 3
Caractérisation du modèle expérimental Neuro-2a en réponse à l'exposition aux palytoxines

Les analogues de PlTX synthétisés par les dinoflagellés du genre *Ostreopsis* représentent une menace pour la santé humaine. Ces toxines très puissantes peuvent en effet être bioaccumulées dans les poissons et coquillages consommés par l'homme. Si leur toxicité orale est deux fois moins élevée que celle des STXs, il n'en reste pas moins que cette famille de toxines pose problème, notamment parce que d'autres analogues de PlTX risquent d'être identifiés. Les méthodes de détection des PlTXs ont fait l'objet d'un grand nombre de publications vers la fin des années 1980 et début des années 1990 (Encart 4).

Encart 4 – Méthodes de détection des palytoxines

Méthodes basées sur le mode d'action

Le **test hémolytique** développé par Habermann et al. (1981) permet de détecter la PlTX et ses analogues, mais son utilisation est assez empirique, chaque équipe l'utilisant avec ses propres conditions. De plus, il est sujet aux interférences liées aux matrices complexes. Riobo et al. (2008), dans une tentative d'uniformatisation, ont déterminé les conditions théoriques optimales (notamment température et concentration en ouabaïne) pour le test hémolytique (sur érythrocytes de mouton) mais celui-ci n'a pas été testé avec des échantillons naturels.

Méthodes basées sur la reconnaissance structurale

- Des **anticorps anti-PlTX** ont été développés et des tests basés sur leur utilisation pour la détection spécifique de la PlTX ont été proposés (Levine et al., 1987 ; 1988 ; Bignami et al., 1992). Ces tests ne sont plus utilisés, notamment en raison de l'indisponibilité commerciale des anticorps.
- Riobo et al. (2006) ont proposé une méthode **HPLC-FD** avec une dérivation pré-colonne. Les auteurs rapportent une limite de quantification de 2 ng pour la PlTX dans des extraits d'origine algale. Cette méthode n'a pas été utilisée pour la détection des PlTXs dans des coquillages.
- La **LC-MS/MS** est également utilisée pour détecter la PlTX et ses analogues (e.g. Ciminiello et al., 2008). La présence de l'ion fragment de m/z = 327 est un indicateur de la présence de PlTX dans un échantillon (Lenoir et al., 2004). Ce fragment correspond à une coupure de la molécule entre le carbone 8 et le carbone 9 (*cf.* Figure 10) et à la perte d'une molécule d'eau.

Les PlTXs ne sont actuellement pas encore réglementées au niveau européen, mais depuis leur apparition dans le bassin méditerranéen, elles font l'objet d'une attention particulière et ont été évalués par l'Efsa en raison de leur potentiel neurotoxique (EFSA, 2009b). La valeur que l'Efsa propose suite à son processus d'évaluation des risques est de 30 µg éq. PlTX+Ovatoxine-a par kg chair de coquillage. Cette valeur est près de 8 fois plus faible que le seuil provisoire de 250 µg éq. PlTX par kg de chair qui avait été proposé en 2005 (WG Toxicology, 2005), en attendant que les données toxicologiques et épidémiologiques soient suffisantes pour permettre une évaluation plus précise du danger représenté par les PlTXs.

Dans ce contexte, le but de notre travail est de caractériser les réponses du modèle cellulaire choisi pour pouvoir, *in fine*, proposer une méthode basée sur l'action des PlTXs sur la pompe Na^+,K^+-ATPase qui pourrait être intégrée à une batterie de tests *in vitro*.

Notre démarche expérimentale a donc consisté en plusieurs étapes :

- évaluer la sensibilité de la lignée Neuro-2a en réponse à un traitement avec la PlTX standard et en déduire le temps de traitement optimal,

- sur la base du mode d'action de la PlTX sur la pompe Na^+,K^+-ATPase et de l'effet antagoniste connu de l'ouabaïne, déterminer les conditions optimales permettant de détecter spécifiquement la PlTX,
- évaluer la capacité du test à détecter spécifiquement et quantifier en équivalent PlTX des analogues de la PlTX produits notamment par une efflorescence d'*Ostreopsis* dont on sait qu'elle contient de l'ovatoxine-a,
- évaluer, dans nos conditions expérimentales, après une extraction méthanolique peu spécifique, l'effet matrice de chair totale de moules supplémentées avant ou après extraction en PlTX de façon à approcher la valeur seuil proposée en 2005 de 250 µg éq.PlTX par kg de chair.

Article 3 : Suitability of the Neuro-2a cell line for the detection of palytoxin and analogues (neurotoxic phycotoxins)

Publié dans Toxicon

Toxicon 53 (2009) 300–308

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Suitability of the Neuro-2a cell line for the detection of palytoxin and analogues (neurotoxic phycotoxins)

Aurélie Ledreux [a,b], Sophie Krys [b], Cécile Bernard [a,*]

[a] Unité Ecosystèmes et interactions toxiques, USM 0505/EA 4105 MNHN, Muséum National d'Histoire Naturelle, Case 39, 12 rue Buffon, F-75231 Paris Cedex 5, France
[b] Unité Toxines, Polluants Organiques et Pesticides, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 June 2008
Received in revised form 3 December 2008
Accepted 4 December 2008
Available online 11 December 2008

Keywords:
Palytoxin
Neuro-2a cells
Neurotoxins
Ostreopsis
Shellfish
Functional assays

ABSTRACT

Palytoxin and related compounds are neurotoxic phycotoxins produced by benthic microalgae belonging to the genus *Ostreopsis*. For several years this family of phycotoxins has been posing a threat to human health since they can bioaccumulate in shellfish. With the aim of replacing current biological assays, such as the mouse or hemolytic assays, we investigated using the Neuro-2a neuroblastoma cell line to detect palytoxin and related compounds. Cell death induced by the effects of PITX and analogues on Na^+, K^+-ATPase were measured using the 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan (MTT) assay for mitochondrial reductase activity as a surrogate for cell number. The specificity of the Neuro-2a cell-based assay for palytoxin detection was confirmed by using ouabain, which also acts on Na^+, K^+-ATPase. Pre-treatment of the Neuro-2a cells with ouabain minimizes the effects of palytoxin. The specificity of the Neuro-2a assay was confirmed by the finding that cell death was not detected when Neuro-2a cells were exposed to other phycotoxins with unrelated cellular targets. When the Neuro-2a assay was used to detect palytoxin in mussel extracts spiked with levels of palytoxin around the proposed regulatory value of 250 μg palytoxin/kg shellfish, a good correlation was observed between the levels found and the expected values.
We conclude by proposing an experimental design for functional assays using the Neuro-2a cell line for the specific detection of four neurotoxic phycotoxin families: saxitoxins, brevetoxins, ciguatoxins and palytoxins.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Palytoxin (PITX) is one of the most potent marine toxins produced by zoanthids (soft corals) of the genus *Palythoa* (Moore and Scheuer, 1971). The structure of this large and complex polyhydroxylated molecule has been elucidated by Uemura et al. (1981), and Moore and Bartolini (1981).

The origin of palytoxin in the zoanthids has long been a matter of speculation, and several possible origins have been suggested (e.g. microorganisms associated with zoanthids; Halstead, 2002), including dinoflagellates belonging to the genus *Ostreopsis* (Usami et al., 1995; Taniyama et al., 2003). This hypothesis is supported by the implication of *Ostreopsis siamensis* in a case of clupeotoxism in Madagascar (Onuma et al., 1999). To date, four species of *Ostreopsis*: *Ostreopsis lenticularis* (Mercado et al., 1994), *Ostreopsis siamensis* (Usami et al., 1995), *Ostreopsis mascarenensis* (Lenoir et al., 2004) and *Ostreopsis ovata* (Ciminiello et al., 2008) are known to be capable of producing palytoxin and related (PITX-like) compounds. The chemical structure of some of the analogues of PITX has been elucidated (Usami et al., 1995; Ciminiello et al., 2008).

* Corresponding author. Tel.: +33 1 40 79 31 83; fax: +33 1 40 79 35 94.
E-mail address: cbernard@mnhn.fr (C. Bernard).

0041-0101/$ – see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.toxicon.2008.12.005

For several years, PlTX-like compounds have occurred in the Mediterranean Sea, and have been linked to respiratory irritation in people exposed to seawater spray, especially in Italy and Spain (Durando et al., 2007). Recent studies have demonstrated that the species *O. ovata* observed in Italy produces ovatoxin-a, an analogue of PlTX (Ciminiello et al., 2008), and that PlTX-like toxins can bioaccumulate in shellfish (Aligizaki et al., 2008). This possible bioaccumulation poses a threat to human health, and has economic consequences for shellfish producers.

Palytoxin and its analogues can be detected by recently developed chromatographic methods (Ciminiello et al., 2006; Riobo et al., 2006). These methods are very efficient, but are not suitable for assessing the biological activity of extracts that may contain several related active compounds, as in the case of *Ostreopsis* toxins (Ciminiello et al., 2008). Like other neurotoxins, PlTX can be detected by a mouse bioassay, which was developed over 30 years ago (Teh and Gardiner, 1974), and has remained unchanged ever since. Both for ethical reasons, and because of the lack of specificity and sensitivity of the mouse bioassays, alternative methods are now being sought for use in monitoring PlTX and its analogues in shellfish.

Functional assays offer an alternative to chemical measurements and the non-specific mouse bioassay. In the case of neurotoxic phycotoxins, these tests exploit the binding of the toxin to its receptor (for review, see Rossini, 2005). The intensity of the response is related to the concentration of the toxin and its analogues interacting with their specific receptors.

Habermann and Chhatwal (1982) showed that in mammalian erythrocytes, PlTX causes a rapid depletion of K^+ in the cells followed by hemolysis. This hemolysis is specifically inhibited by ouabain (Habermann and Chhatwal, 1982), a glycoside that binds to the sodium pump (Lingrel et al., 1998). The effect of PlTX is attributed to its ability to bind to the outer part of Na^+, K^+-ATPase, leading to its conversion into a cationic channel (Habermann, 1989; Artigas and Gadsby, 2003).

A hemolysis assay including ouabain was originally developed to estimate the PlTX content of algal or shellfish extracts (Taniyama et al., 2001, 2003; Rhodes et al., 2002; Riobo et al., 2002, 2006; Lenoir et al., 2004; Aligizaki et al., 2008). However, the lack of reliable results of this hemolytic assay, and the fact that it cannot be used to identify the toxin involved has led to the development of alternative assays.

In the case of PlTX and its analogues, we need functional assays that are both sensitive and specific, especially in view of the fact that most PlTX-like compounds remain to be identified and toxicologically characterized. Recently, Bellocci et al. (2008) have described a method intended to replace erythrocytes with the established MCF-7 cell line. They propose a cytolytic assay based on the release of cytosolic lactate dehydrogenase in response to PlTX. This response indicates the presence of a severe membrane defect that presages cell lysis. Espiña et al. (2008) have demonstrated that the neuroblastoma cell line BE(2)-M17 is a suitable model for the specific detection of PlTX.

We set out to demonstrate that Neuro-2a neuroblastoma cells could be used to detect several different phycotoxins families. Indeed, this neuroblastoma cell-based bioassay is already being used to detect and distinguish several other neurotoxic phycotoxin families: saxitoxins (Jellett et al., 1992, 1995; Manger et al., 1993, 1995; Humpage et al., 2007), brevetoxins (Truman et al., 2002), and ciguatoxins (Dechraoui et al., 1999). We then investigated the sensitivity, specificity, and reliability of the Neuro-2a bioassay for the detection of palytoxin and its analogues. The method proposed provides an accurate estimate of the PlTX content of biological materials, such as algae and shellfish. Finally we proposed an experimental strategy for detecting a range of seafood toxins using the Neuro-2a cell-based bioassay.

2. Material and methods

2.1. Neuro-2a culture

The Neuro-2a mouse neuroblastoma cell line, obtained from the ATCC (CCL-131), was routinely grown in 75 cm^2 Nunc plastic flasks (Nunc, Denmark) with L-glutamine-free RPMI 1640 medium (Biowest, France) supplemented with 10% newborn calf serum (Biowest, France), 90 mg L^{-1} sodium pyruvate (Sigma–Aldrich, France), 600 mg L^{-1} L-glutamine (Sigma–Aldrich, France), 1000 U L^{-1} penicillin G (Biowest, France) and 1 mg L^{-1} streptomycin sulfate (Biowest, France) at 37 °C in an atmosphere enriched with 5% CO_2.

2.2. Toxins

Palytoxin purified from *Palythoa tuberculosa* was obtained from Wako Chemicals (Germany), and dissolved in 50% ethanol. A certified reference calibration solution of saxitoxin (STX) was obtained from the Institute for Marine Biosciences (Halifax, NS, Canada). Brevetoxin PbTx-3 was obtained from Calbiochem (USA), and prepared in absolute methanol. Microcystin-LR was obtained from Alexis Biochemicals (Switzerland), and diluted in absolute methanol. Aliquots of toxins were stored at −20 °C. Ouabain was purchased from Sigma–Aldrich (France). The stock solution was prepared in pH 7 milliQ water. The working dilutions of toxins and ouabain were prepared in RPMI medium supplemented with 600 mg L^{-1} L-glutamine, 90 mg L^{-1} sodium pyruvate, 1000 U L^{-1} penicillin G and 1 mg L^{-1} streptomycin sulfate (MWS: medium without serum).

2.3. Algal extracts

2.3.1. Epiphytic dinoflagellates

Three macroalgal samples (*Rhodophyta* and *Phaeophyta*) collected from Morgiret (Ile du Frioul, France) and Bain des Dames (Marseille, France) (on August 21st 2007, August 28th and September 5th, kindly provided by Françoise Marco-Miralles and Caroline Lecalard, Ifremer) (Table 1) were vigorously shaken in filtered seawater in order to collect the associated epiphytic dinoflagellates. The seawater was then filtered through plankton netting (20 µm mesh) or centrifuged (3220 g, 20 min, 10 °C). The procedure was repeated twice to obtain a plankton pellet. The pellets were sonicated with an ultrasonic probe in 5 mL methanol/water (3:7, v/v) for 3 min in pulse mode (Sonics

Table 1
Algal samples used in the present study.

Sample code	Source	Sampling date (dd/mm/yy)	Epiphytic *Ostreopsis*[a]	eq.PlTX $cell^{-1}$	Planktonic *Ostreopsis*[b]	eq.PlTX $cell^{-1}$
1	Bain des Dames, France	22/08/07	1130	nd	1500	nd
2	Morgiret, France	29/08/07	12,800	nd	5300	nd
3	Bain des Dames, France	06/09/07	140	nd	200	nd
4	Mar Ligure, Italy	Summer 2006	–	–	11.6×10^6	1.1 ± 0.4

[a] Number of *Ostreopsis* cells per gram of fresh weight of macrophyte.
[b] Number of *Ostreopsis* cells per liter.

Vibra Cell 130 W, Granuloshop, France), while being kept cold in an ice bath. The mixtures were then centrifuged at 3220 g for 20 min, and the supernatants filtered on 0.22-µm filters (Dutscher, France). Aliquots were prepared and stored at −20 °C before analysis.

2.3.2. Planktonic dinoflagellates

A 300 mL seawater sample (kindly provided by Dr. Anna Milandri, Italy) had been collected in summer 2006 (Mar Liguria, Italy) during a massive *O. ovata* bloom (Table 1). 150 mL of the sample were centrifuged at 3220 g for 20 min at 10 °C, and 150 mL filtered through 2.0 µm, 47-mm diameter, Nuclepore filters (Whatman, France). Plankton pellets or filters were treated as described above.

2.4. Spiked mussel extracts

Specimens of mussels (*Mytilus chilensis*) were purchased in a local supermarket. They were shucked and all the flesh was pooled. Aliquots of 5 g of mussel homogenate were extracted by mixing with an Ultra-Turrax for 3 min with 30 mL methanol/water (1:1, v/v). The mixture was then centrifuged for 20 min at 3220 g and at 4 °C. The supernatant was filtered through Whatman filters no 114 (Whatman, France), and the filtrate collected in a 50 mL flask. The volume was adjusted to 50 mL with milliQ water. The extract was filtered on 0.22 µm filters (Dutscher, France), and 10 mL aliquots were prepared before adding the toxin.

Extracts were spiked before and after the extraction procedure described above with amounts of the PlTX standard around a proposed regulatory value of 250 µg eq.PlTX/kg shellfish (WG Toxicology, 2005). Extracts were prepared and spiked to yield final concentrations of 50, 125, 250, 500 µg PlTX/kg shellfish. Each spiking level was prepared in triplicate.

2.5. Neuro-2a cell-based bioassay

To set up the experiments, 50,000 Neuro-2a cells were seeded into each well of a 96-well microtiter plate (Nunc, Denmark), and incubated for 24 h at 37 °C. After incubation, the medium was then removed and replaced with 100 µL of MWS.

On each microplate, four wells were processed as untreated controls (200 µL MWS), and four wells as ouabain controls (final concentration 500 µM in MWS). The physiological status of cells throughout the study period ($n = 46$ microplates) was verified by measuring their optic density at the end of the assay.

Standard curves of PlTX were run in duplicate, in the presence or absence of ouabain. If not stated otherwise, cells were incubated for 19 h at 37 °C. At the end of this incubation period, the medium was tapped off onto a paper-towel, and 60 µL of medium containing 0.83 mg mL^{-1} of 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan (MTT) (Sigma–Aldrich, France) were added to each well. The MTT assay was used to measure the mitochondrial reductase activity as a surrogate for cell number (Mosmann, 1983). The plates were incubated for 45 min at 37 °C. Finally, the MTT was discarded and 100 µL dimethyl sulfoxide added to each well to dissolve the formazan. The absorbance was read at 540 nm on a plate reader (Dynex MRXII, France). The measured absorbance (% MTT) was converted to a percentage indicating a cell survival number normalized between the OD_{min} and OD_{max} obtained for each standard curve. The results were expressed as the percentage mortality. Data were fitted to a sigmoid curve with variable slope.

2.5.1. Effect of PlTX: $_{Direct}$PlTX

The PlTX standard (10 µL) was added to one well and serially diluted along the microplate in duplicate. The final volume in the wells was adjusted to 200 µL with MWS. The final PlTX concentrations ranged from 0.9 pM to 466 pM. Four incubation periods were tested: 4 h, 17 h, 19 h, and 21 h. At least three replicates were done for each incubation period.

2.5.2. Specific effect of PlTX: $_{Pre\text{-}ouabain}$PlTX

The Neuro-2a cells were pre-incubated with ouabain for 1 h, 2 h or 3 h. Three ouabain concentrations were tested: 250 µM, 500 µM and 1000 µM. At the end of the pre-incubation time, 100 µL PlTX dilutions were added to each well to obtain the final PlTX concentrations described above. At least three replicates were processed for each combination of ouabain concentration and time of pre-treatment.

2.5.3. Combined effect of PlTX and ouabain: $_{Direct}$PlTX + O

PlTX standard (10 µL) was added to one well and serially diluted along the microplate, in duplicate. 100 µL MWS containing ouabain (final concentration 500 µM) were then added to each well in order to measure the combined effect of PlTX and ouabain. Ten experiments were performed.

2.5.4. Other toxins tested

The concentrations of STX, PbTx-3 and Mcyst-LR tested ranged from 3.3 to 1672 nM, 5.4 to 2787 nM and 0.1 to 3 µM, respectively. Standard toxin (10 µL) was added to one well, and serially diluted along the microplate, in duplicate. 100 µL MWS containing ouabain (final concentration 500 µM) or not were added to each well in order to give a final volume of 200 µL per well. Neuro-2a cells were also pre-incubated with 500 µM ouabain for 2 h, and then toxin dilutions were added to each well to obtain the final

concentrations listed above. Experiments were done in triplicates for each experimental condition.

2.5.5. Algal extracts or spiked mussel extracts

20 µL of extract were added to one well, and serially diluted along the microplate, in duplicate. The final volume was adjusted to 200 µL with MSW. The specificity of the assay was ensured by pre-treating the Neuro-2a cells with ouabain, as described for the PlTX standard. The %MTT found for the extracts was compared with the PlTX standard curves to calculate the PlTX-equivalent (eq.PlTX). Only the dilutions in the linear portion of the standard curves were taken into account. Each extract (spiked mussel extracts and algal extracts) was tested in triplicates.

2.6. Statistical analysis

GraphPad Prism version 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for all curve-fitting, statistical tests, and graph plotting.

3. Results

The objectives of the first part of the study were to determine the optimal incubation time and ouabain concentration required to perform the Neuro-2a cell-based assay. The ouabain concentration required to achieve the conditions giving the greatest specificity of the palytoxin response was determined. These optimized conditions were then used to determine the PlTX content of algal extracts and spiked mussel extracts.

3.1. Variability of controls

The variability of the OD measured in wells containing untreated cells, and in wells containing cells that had been exposed to ouabain was measured after determining the cell survival using the MTT assay. The mean OD values presented here correspond to the data obtained throughout the working period and include 46 microplates. The mean OD_{540nm} was 2.57 for the untreated cells, and 2.15 for the cells incubated with 500 µM ouabain ($n = 46$ microplates). These mean values are significantly different (Wilcoxon paired-sum test, $p < 0.05$). The variability (CV %) values calculated for the wells containing untreated cells, and for the wells containing cells that had been treated with 500 µM ouabain were 10.0% and 12.4%, respectively.

3.2. Detection of the effect of palytoxin on Neuro-2a cells

Four incubation periods were tested (4 h, 17 h, 19 h, and 21 h) in order to find out which had the sigmoid model which best fitted the data. Fig. 1 shows the mean dose–response curves for exposures of 4 h and 19 h to PlTX. Statistical analysis of the dose–response curve parameters did not show any significant differences between incubation periods of 17 h, 19 h and 21 h. The closest fit with the non-linear regression model was achieved for 19 h, with a narrow 95% confidence interval (data not shown). Consequently, all subsequent Neuro-2a experiments were carried out with an incubation time of 19 h. This made it possible to determine an EC_{50} value of 42.9 ± 3.8 pM ($n = 10$) (final concentration in the microplate) (Fig. 1). The detection limit was found to be 20 pM.

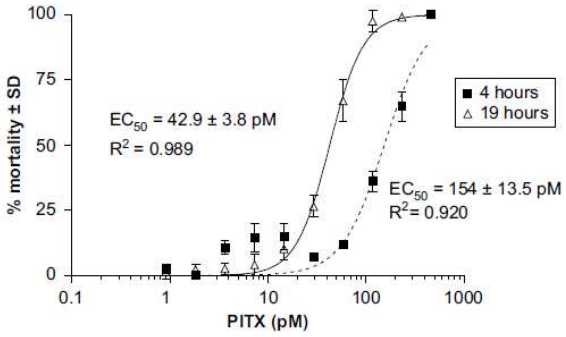


Fig. 1. Time dependence of the cell death effect of palytoxin in the Neuro-2a cells. The incubation times tested were 4 h (filled squares, $n = 3$) and 19 h (empty triangles, $n = 10$).

3.3. Specific conditions for palytoxin detection using Neuro-2a cells

The EC_{50} value for ouabain versus Neuro-2a cells was found to be 1200 µM (data not shown). We first tested the competitive effect of pre-incubating Neuro-2a cells with ouabain before adding the PlTX. Three ouabain concentrations (250 µM, 500 µM and 1000 µM) combined with three pre-incubation periods (1 h, 2 h and 3 h) were tested to determine the most effective combination of ouabain concentration and incubation time before adding PlTX, for producing a significant difference in EC_{50} between cells that had or had not been pre-incubated with ouabain (data not shown). The combination of 500 µM ouabain plus pre-incubating for 2 h produced the most significant difference between the direct cytolytic effect of PlTX ($_{Direct}$PlTX: $EC_{50} = 42.9 \pm 3.8$ pM), and the specific effect of PlTX when ouabain was used as a competitor ($_{Pre\text{-}ouabain}$PlTX: $EC_{50} = 290.7 \pm 50.2$ pM, $n = 10$) (Table 2). Subsequent experiments were performed with the ouabain concentration of 500 µM.

The synergistic effects of PlTX and ouabain were then tested on the Neuro-2a cells. A marked toxic effect was observed ($EC_{50} = 6.3 \pm 4.7$ pM, $n = 10$) when PlTX and ouabain ($_{Direct}$PlTX + Ouabain) were both added simultaneously to the Neuro-2a cells (Table 2). As considerable cell death was induced, the adjustment of data to the non-linear regression model was not acceptable for the

Table 2
EC_{50} values for the dose–response curves obtained for the direct effect of PlTX ($_{Direct}$PlTX), after pre-incubating the Neuro-2a cells with 500 µM ouabain before adding the PlTX ($_{Pre\text{-}ouabain}$PlTX), and the direct effect of PlTX and Ouabain 500 µM administered simultaneously ($_{Direct}$PlTX + Ouabain).

	$_{Direct}$PlTX	$_{Pre\text{-}ouabain}$PlTX	$_{Direct}$PlTX + Ouabain
Number of replicates	10	10	10
EC_{50} (pM)	42.9	290.7	6.3
Standard deviation	3.8	50.2	4.7
R^2	0.989	0.931	0.518

$_{Direct}$PITX + Ouabain conditions ($R^2 = 0.518$, $p < 0.01$, $n = 10$), whereas it was acceptable for PITX alone ($R^2 = 0.989$, $p < 0.01$, $n = 10$) (Fig. 2).

We also compared the cell death induced by PITX alone, and the specific response when ouabain was used as a competitor to the cell death induced by saxitoxin, brevetoxin and microcystin-LR. Under our experimental conditions, saxitoxin, brevetoxin and microcystin-LR did not induce any direct cell death in Neuro-2a cells at concentrations ranging from 3.3 nM to 1672 nM, 5.4 nM to 2787 nM and 0.1 to 3 μM, respectively. Furthermore, when ouabain was used either as a pre-treatment or combined with the toxin, the observed mortality of the Neuro-2a cells was related solely to that induced by ouabain itself (data not shown).

3.4. Detection of PITX-like compounds in Ostreopsis *extracts*

We then tried using Neuro-2a cells to detect PITX-like compounds in four algal extracts containing *Ostreopsis*. Samples 1, 2 and 3 did not demonstrate any cytotoxic effect on the Neuro-2a cells, whereas a toxic effect was detected for Sample 4, the toxin content of which was found to be 1.1 ± 0.4 pg eq.PITX/cell ($n = 4$). In addition, pre-incubating the Neuro-2a cells with ouabain before adding the algal extract (Fig. 3) inhibited the toxic response, confirming the presence of PITX analogues in this sample.

3.5. Detection of PITX in spiked mussel extracts

Preliminary experiments were carried out to find out whether the non-toxic mussel extracts could induce cell death in the Neuro-2a cells. Adding 20 μL of non-toxic mussel extract (corresponding to 1 mg of shellfish) did not induce any significant increase in the mortality of the Neuro-2a cells (data not shown).

The matrix effect of spiked mussel extracts containing 25 ng PITX/mL was assessed. Fig. 4 shows that there is a slight, but significant, difference between the mean dose–response curves obtained for the PITX standard

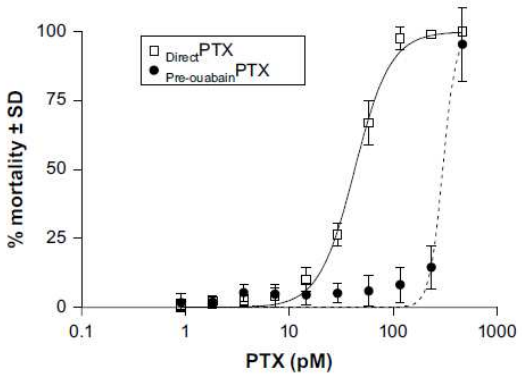


Fig. 2. Effect on the mortality of the Neuro-2a cells of PITX alone ($_{Direct}$PITX, empty squares), and pre-incubation with 500 μM ouabain for 2 h before adding PITX ($_{Pre\text{-}ouabain}$PITX, filled circles). Data represent the means ± SD of ten separate experiments.

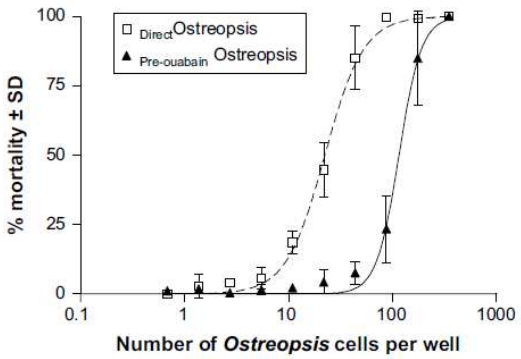


Fig. 3. Effect on the mortality of the Neuro-2a cells of the *Ostreopsis* extract (sample 4) (empty squares) and pre-treatment with 500 μM ouabain for 2 h before adding the *Ostreopsis* extract (filled triangles) and incubating for 19 h. Data represent the means ± SD of four separate experiments.

($EC_{50} = 42.9 \pm 3.8$ pM, $n = 10$) and those obtained for the spiked mussel extract ($EC_{50} = 62.1 \pm 15.2$ pM, $n = 9$).

The accuracy of the responses of the Neuro-2a cell-based assay was then checked using four groups of mussel extracts spiked before or after the extraction procedure with 5, 12.5, 25 and 50 ng of PITX/mL, corresponding to 50, 125, 250 and 500 μg PITX/kg shellfish meat respectively. The results are shown in Fig. 5. A significant correlation was observed between the PITX content determined by the Neuro-2a assay, and the known toxin content (before extraction: $y = 0.320x + 32.92$, $R^2 = 0.975$, $n = 3$; after extraction: $y = 0.601x + 56.06$, $R^2 = 0.917$, $p < 0.01$, $n = 9$).

4. Discussion

Over the past 20 years, cell-based assays have been developed to replace the toxicity tests using mice to detect a number of phycotoxins. A range of cell types have been tested, such as KB cells (Amzil et al., 1992; Tubaro et al., 1996), fibroblasts (Fessard et al., 1994), BGM cells (Croci et al., 1997), HepG2 and Caco2 cells (Oteri et al., 1998), and especially neuroblastoma cells (Kogure et al., 1988; Gallacher and Birkbeck, 1992; Jellett et al., 1992, 1995; Manger et al., 1993, 1995; Truman et al., 2002; Humpage et al.,

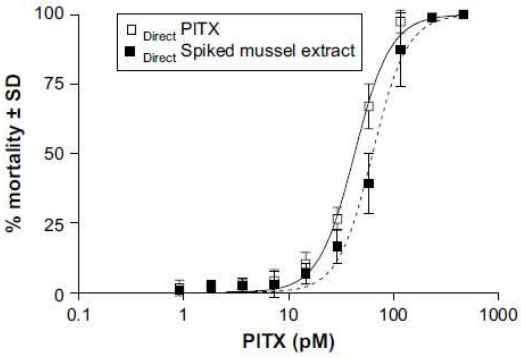


Fig. 4. Effect on the mortality of Neuro-2a cells of PITX standard ($n = 10$) or mussel extract spiked with 9.3 nM PITX ($n = 9$).

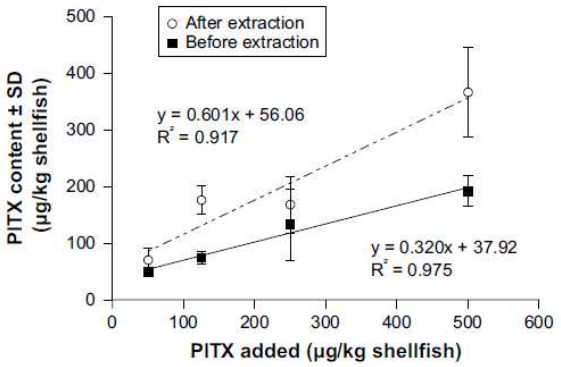


Fig. 5. Detection of PlTX in spiked extracts prepared from whole mussel flesh. Extracts were spiked with four different PlTX concentrations, indicated on the X-axis, before their PlTX content was determined by the Neuro-2a cell-based assay. Data represent means ± SD obtained in three (before extraction) or nine (after extraction) separate experiments.

2007; Espiña et al., 2008). In early attempts to detect phycotoxins, the analysis was mainly based on the morphological changes that are induced in an unspecific manner by all phycotoxins. In more sophisticated methods, detection was based on cell staining, mostly using neutral red uptake or MTT reduction (e.g. Manger et al., 1993, 1995; Tubaro et al., 1996; Oteri et al., 1998). These markers were used to determine the percentage of viable cells by colorimetric analyses.

In these early cell-based assays, the cytotoxicity criterion was not specific, and so they could not be used to identify the family of toxins involved. Subsequently, functional assays based on the specific actions of toxins on cellular targets have been developed, such as the neuroblastoma Neuro-2a cell-based assay for the detection of three families of neurotoxins, namely the saxitoxins (Kogure et al., 1988; Gallacher and Birkbeck, 1992; Jellett et al., 1992; Manger et al., 1993, 1995; Humpage et al., 2007), brevetoxins and ciguatoxins (Manger et al., 1993, 1995; Dechraoui et al., 1999; Truman et al., 2002). The specificity of this assay is conferred by a combination of veratridine, which triggers the opening of the sodium channels and allows a potentially lethal influx of sodium ions to enter the cell, and ouabain, which inhibits the action of Na^+, K^+-ATPase, and maximizes the effect of veratridine. The death of Neuro-2a cells induced by veratridine/ouabain specifically detects sodium channel blockers, such as saxitoxins and sodium channel openers, such as brevetoxins and ciguatoxins.

If a single cell line can be used in this way to detect the overall toxicity of several different classes of toxins, this would provide an economic mean of contributing to consumer protection.

Our work demonstrate that it would be possible to use the Neuro-2a cell line to detect PlTX and related compounds that act on Na^+, K^+-ATPase in materials such as algae or shellfish. The response induced by the direct effect of PlTX on Na^+, K^+-ATPase can easily be measured using the MTT assay. The specificity of the method is ensured by adding ouabain at the appropriate time.

In our proposal, the effect of PlTX on Neuro-2a cells is estimated by using the MTT assay for mitochondrial reductase activity as a surrogate for cell number (Mosmann, 1983). Bellocci et al. (2008) analyzed the release of lactate dehydrogenase (LDH) into the culture medium to estimate the cytolysis induced by PlTX in MCF-7 cells. In fact, the MTT assay seems to be more convenient since this procedure is simpler to perform than measuring LDH in culture medium as it does not involve transferring supernatants from one microplate to another one. In a recent paper, Espiña et al. (2008) proposed a dynamic method for the specific detection of PlTX by using Alamar Blue in BE(2)-M17 human neuroblastoma cells. This non-toxic fluorescent dye allows the detection of low concentrations of PlTX as the authors may keep the incubation of PlTX with the cells up to 72 h.

In order to verify the reliability of the Neuro-2a assay as a detection tool, the variability of the OD measured in wells containing untreated cells and in wells containing cells treated with 500 µM ouabain has been determined and found to be 10.0% and 12.4%, respectively ($n = 46$). These values indicate that the Neuro-2a cell-based assay has low variability, and also demonstrates that ouabain does not induce any significant increase in the variability of the responses.

Our study of the impairment of the Na^+, K^+ antiporter due to the effect of PlTX on Neuro-2a cells shows that the cytolytic effect reported to occur in suspension of erythrocytes (Habermann and Chhatwal, 1982) and in MCF-7 cells (Bellocci et al., 2008), can also be induced in Neuro-2a cells. Under our experimental conditions (19-h exposure time), we found an EC_{50} value versus Neuro-2 cells of 42.9 pM, whereas Bellocci et al. (2008) found an EC_{50} value versus MCF-7 cells of 5.3 pM (expressed in the well) after exposure for 1 h, which indicates that PlTX has greater toxicity towards MCF-7 cells, producing more effect despite the shorter exposure time. These two cell lines seem to have different sensitivities to PlTX, but differences in the experimental procedure, the incubation time and in the methods used to evaluate cell mortality make it difficult to compare the data. Espiña et al. (2008) also reported differences in sensitivity to PlTX between a rat hepatic cell line (Clone 9) and a human neuroblastoma cell line (BE(2)-M17), this last one being the more suitable for the specific detection of PlTX.

We found that pre-incubating Neuro-2a cells with ouabain (500 µM) for 2 h protected them against the cytotoxic effect of PlTX, and increased cell viability. These findings are consistent with those obtained by Habermann and Chhatwal (1982) in erythrocytes, Bellocci et al. (2008) in MCF-7 cells and Espiña et al. (2008) in neuroblastoma cell line (BE(2)-M17). We also showed that the concomitant treatment of Neuro-2a with 500 µM ouabain and PlTX induced a major increase in cell death, demonstrating that these two toxins have a synergistic effect on Na^+, K^+-ATPase.

We next checked whether other algal toxins acting at different cellular targets could also induce Neuro-2a cell death under our experimental conditions. We found that STX, PbTx-3 and Mcyst-LR did not induce any Neuro-2a mortality. The results obtained under the three

experimental conditions described in the Results section ($_{Direct}$PlTX, $_{Pre\text{-}ouabain}$PlTX and $_{Direct}$PlTX + Ouabain), show that the Neuro-2a cell-based assay is suitable for the specific detection of PlTX.

We found that the PlTX analogues produced by naturally occurring *O. ovata* in Italy (Ciminiello et al., 2008) are cytotoxic to the Neuro-2a cells, and that this effect can be prevented by pre-treating the cells with 500 µM ouabain, confirming that the extract tested contains PlTX analogues acting on Na^+, K^+-ATPase. This demonstrates that the Neuro-2a cell-based assay is suitable for detecting and measuring PlTX analogues in algal extracts. In view of the procedure used to extract the toxin from algal samples in this study, if we assume a mean toxicity value of 0.5 pg PlTX/cell (Rhodes et al., 2002), the Neuro-2a assay could be used to detect PlTX and analogues once algal populations reach a density of 2×10^5 cells/L.

During the first meeting of a working group on toxicology organized by the Community Reference Laboratory for marine biotoxins in Cesenatico (Italy) (WG Toxicology, 2005), a regulatory limit of 250 µg palytoxins/kg shellfish was proposed, based on the mouse bioassays data available. We used this value to evaluate the reliability of the proposed Neuro-2a cell-based assay for monitoring palytoxin and analogues in shellfish. The results obtained confirm that PlTX activity can be detected over a range of concentrations that includes the proposed regulatory limit. Within 24 h of treatment with toxic extracts, the Neuro-2a assay is sensitive enough to detect 5 ng PlTX/mL of extract, which corresponds to 50 µg PlTX/kg shellfish in view of the extract preparation procedure. This concentration is 5 times lower than the proposed regulatory threshold of 250 µg/kg shellfish. Our limit of detection is 20 times lower than the determined value of 1 µg PlTX/g (Fig. 6, Bellocci et al., 2008). The method proposed by Espiña et al. (2008) also reached a limit of detection of 5 ng PlTX/mL of extract but within 48 h of treatment, which make it less useful for the routine analysis of toxic extracts.

Further work is required to improve the procedure extraction of PlTX from shellfish matrices, to test the reproducibility and sensitivity of the Neuro-2a cell-based assay to shellfish extracts spiked before the extraction procedure and to find out whether the Neuro-2a assay can be used to detect PlTX analogues in naturally contaminated shellfish. Like other groups of phycotoxins, such as saxitoxins or brevetoxins, which are metabolized by shellfish to form more or less toxic analogues (Artigas et al., 2007; Plakas et al., 2002, 2004), it is possible that PlTX and its analogues could be metabolized by molluscs. This possibility encourages the search for functional assays that are able to detect PlTX analogues acting on Na^+, K^+-ATPase.

In conclusion, we propose an experimental design (Fig. 6) for the detection of neurotoxic phycotoxins. It involves the use of a single cell line (the neuroblastoma Neuro-2a cell-line) for the specific detection of four phycotoxin families that must be monitored in view of their potential threat to human health: PlTXs, STXs, PbTxs, and CTXs. The experimental procedure is based, on the one hand, on using two competitors (ouabain and veratridine) that the literature shows specifically detect neurotoxins that act on voltage-gated sodium channels: STXs, PbTxs and CTXs and, on the other hand, on the direct cytotoxic effect of PlTX and analogues and on the protective effect of ouabain. Moreover, the use of the microplate format means that multiple samples can be analyzed in a single run, which makes it economical in terms of the pure toxins and extracts used, as well as saving time.

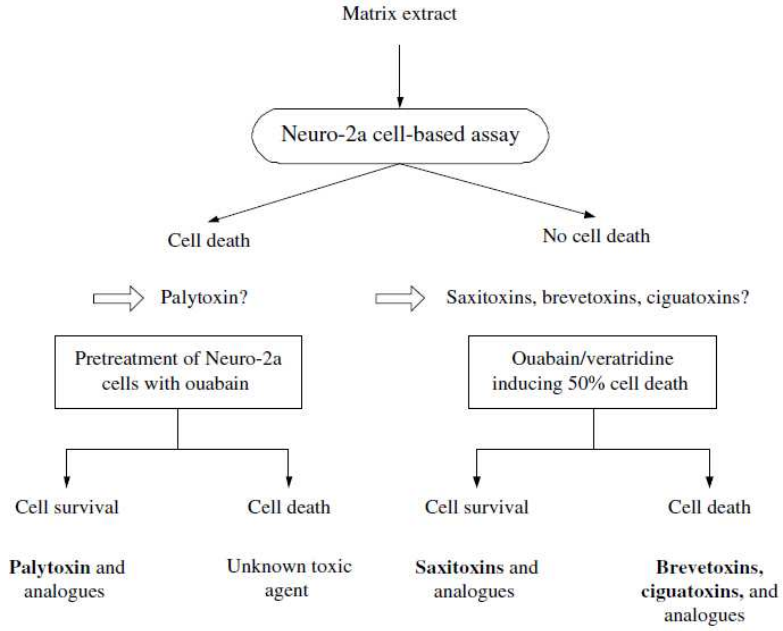


Fig. 6. Experimental design in which the Neuro-2a cell-line is used for the specific detection of four families of neurotoxins on the basis on their cellular targets.

The fact that seafood products can be contaminated by several different classes of toxin, the increased complexity of toxin panels, and the recent problem of emerging toxicities should encourage the development of functional assays able to identify different classes of phycotoxin, depending on their molecular target.

Acknowledgements

This work was made possible by an AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) fellowship awarded to A. Ledreux and was funded by the "Arcachon" national research program. We would like to thank Cassian Bon and Simone Puiseux-Dao for helpful discussions. This work was dedicated to the memory of Cassian Bon.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

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.

Amzil, Z., Pouchus, Y.-F., Le Boterff, J., Roussakis, C., Verbist, J.-F., Marcaillou-LeBaut, C., Masselin, P., 1992. Short-time cytotoxicity of mussel extracts: a new bioassay for okadaic acid detection. Toxicon 30, 1419–1425.

Artigas, M.L., Vieira Vale, P.J., Gomes, S.S., Botelho, M.J., Rodrigues, S.M., Amorim, A., 2007. Profiles of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish from Portugal explained by carbamoylase activity. J. Chromatogr. A 1160, 99–105.

Artigas, P., Gadsby, D.C., 2003. Na^+/K^+-pump ligands modulate gating of palytoxin-induced ion channels. PNAS 100, 501–505.

Bellocci, M., Ronzitti, G., Milandri, A., Melchiorre, N., Grillo, C., Poletti, R., Yasumoto, T., Rossini, G.P., 2008. A cytolytic assay for the measurement of palytoxin based on a cultured monolayer cell line. Anal. Biochem. 374, 48–55.

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. Anal. Chem. 78, 6153–6159.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2008. Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 19, 111–120.

Croci, L., Cozzi, L., Stacchini, A., De Medici, D., Toti, L., 1997. A rapid tissue culture assay for the detection of okadaic acid and related compounds in mussels. Toxicon 35, 223–230.

Dechraoui, M.-Y., Naar, J., Pauillac, S., Legrand, A.-M., 1999. Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels. Toxicon 37, 125–143.

Durando, P., Ansaldi, F., Oreste, P., Moscatelli, P., Marensi, L., Grillo, C., Gasparini, R., Icardi, G., 2007. *Ostreopsis ovata* and human health: epidemiological and clinical features of respiratory syndrome outbreaks from a two-year syndromic surveillance, 2005–2006 in north-west Italy. Euro Surveill. 12, 191–193.

Espiña, B., Cagide, E., Louzao, M.C., Martinez-Fernandez, M., Vieytes, M.R., Katikou, P., Villar, A., Jaen, D., Maman, L., Botana, L.M., 2008. Palytoxins specific and dynamic detection by in vitro microplate assay with human neuroblastoma cells. Biosci. Rep., doi:10.1042/BSR 20080080.

Fessard, V., Diogène, G., Dubreuil, A., Quod, J.-P., Durand-Clément, M., Legay, C., Puiseux-Dao, S., 1994. Selection of cytotoxic responses to maitotoxin and okadaic acid and evaluation of toxicity of dinoflagellate extracts. Nat. Toxins 2, 322–328.

Gallacher, S., Birkbeck, T.H., 1992. A tissue culture assay for direct detection of sodium channel blocking toxins in bacterial culture supernates. FEMS Microbiol. Lett. 92, 101–108.

Habermann, E., Chhatwal, G.S., 1982. Ouabain inhibits the increase due to palytoxin of cation permeability of erythrocytes. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 319, 101–107.

Habermann, E., 1989. Palytoxin acts through Na^+, K^+-ATPase. Toxicon 27, 1171–1187.

Halstead, B.W., 2002. The microbial biogenesis of aquatic biotoxins. Toxicol. Mech. Methods 12, 135–153.

Humpage, A.R., Ledreux, A., Fanok, S., Bernard, C., Briand, J.-F., Eaglesham, G., Papageorgiou, J., Nicholson, B., Steffensen, D., 2007. Application of the neuroblastoma assay for paralytic shellfish poisons to neurotoxic freshwater cyanobacteria: interlaboratory calibration and comparison with other methods of analysis. Environ. Toxicol. Chem. 26, 1512–1519.

Jellett, J.F., 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.

Jellett, J.F., Stewart, J.E., Laycock, M.V., 1995. Toxicological evaluation of saxitoxin, neosaxitoxin, gonyautoxin II, gonyautoxin II plus III and decarbamoylsaxitoxin with the mouse neuroblastoma cell bioassay. Toxicol. In Vitro 9, 57–65.

Kogure, K., Tamplin, M.L., Simidu, U., Colwell, R.R., 1988. A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. Toxicon 26, 191–197.

Lenoir, S., Ten-Hage, L., Turquet, J., Quod, J.-P., Bernard, C., Hennion, M.-C., 2004. First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dynophyceae) benthic bloom in southwestern Indian ocean. J. Phycol. 40, 1042–1051.

Lingrel, J.B., Croyle, M.L., Woo, A.L., Argüello, J.M., 1998. Ligand binding sites of Na, K-ATPase. Acta Physiol. Scand. Suppl. 643, 69–77.

Manger, R.L., Leja, L.S., Lee, S.Y., Hungerford, J.M., Wekell, M.M., 1993. Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage sensitive sodium channels: semi-automated assay for saxitoxins, brevetoxins and ciguatoxins. Anal. Biochem. 214, 190–194.

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

Mercado, J.A., Viera, M., Escalona de Motta, G., Tosteson, T.R., Gonzalez, I., Silva, W., 1994. An extraction procedure modification changes the toxicity, chromatographic profile and pharmacologic action of *Ostreopsis lenticularis* extracts. Toxicon 32, 256.

Moore, R.E., Scheuer, P.J., 1971. Palytoxin: a new marine toxin from a Coelenterate. Science 172, 495–498.

Moore, R.E., Bartolini, G., 1981. Structure of palytoxin. J. Am. Chem. Soc. 103, 2491–2494.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55–63.

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 clupeotoxism. Toxicon 37, 55–65.

Oteri, G., Stammati, A., Zampaglioni, F., Zucco, F., 1998. Evaluation of the use of two human cell lines for okadaic acid and DTX-1 determination by cytotoxicity assays and damage characterization. Nat. Toxins 6, 197–209.

Plakas, S.M., El Said, K.R., Jester, E.L.E., Granade, H.R., Musser, S.M., Dickey, R.W., 2002. Confirmation of brevetoxin metabolism in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by controlled exposures to pure toxins and to *Karenia brevis* cultures. Toxicon 40, 721–729.

Plakas, S.M., Wang, Z., El Said, K.R., Jester, E.L.E., Granade, H.R., Flewelling, L., Scott, P., Dickey, R.W., 2004. Brevetoxin metabolism and elimination in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) after controlled exposure to *Karenia brevis*. Toxicon 44, 677–685.

Rhodes, L., Towers, N., Briggs, L., Munday, R., Adamson, J., 2002. Uptake of palytoxin-like compounds by shellfish fed with *Ostreopsis siamensis* (Dinophyceae). N. Z. J. Mar. Freshwater Res. 36, 631–636.

Riobo, P., Paz, B., Fernandez, M.L., Fraga, S., Franco, J.M., 2002. Lipophylic toxins of different strains of Ostreopsidaceae and Gonyaulaceae. In: Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., ., Tomas, C.R., Vargo, G.A. (Eds.), Harmful Algae Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Florida, pp. 119–121.

Riobo, P., Paz, B., Franco, J.M., 2006. Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. Anal. Chim. Acta 566, 217–223.

Rossini, G.P., 2005. Functional assays in marine biotoxin detection. Toxicology 207, 451–462.

Taniyama, S., Mahmud, Y., Tanu, M.B., Takatani, T., ArakawaO.Noguchi, T., 2001. Delayed haemolytic activity by the freshwater puffer Tetraodon sp. toxin. Toxicon 39, 725–727.

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.

Teh, Y.F., Gardiner, J.E., 1974. Partial purification of *Lophozozymus pictor* toxin. Toxicon 12, 603–610.

Truman, P., Stirling, D.J., Northcote, P., Lake, R.J., Seamer, C., Hannah, D.J., 2002. Determination of brevetoxins in shellfish by the neuroblastoma assay. J. AOAC Int. 85, 1057–1063.

Tubaro, A., Florio, C., Luxich, E., Vertua, R., Della Loggia, R., Yasumoto, T., 1996. Suitability of the MTT-based cytotoxicity assay to detect okadaic acid contamination of mussels. Toxicon 34, 965–974.

Uemura, D., Ueda, K., Hirata, Y., 1981. Further studies on palytoxin. II. Structure of palytoxin. Tetrahedron Lett. 22, 2781–2784.

Usami, M., Satake, M., Ishida, S., Inoue, A., Kan, Y., Yasumoto, T., 1995. Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. J. Am. Chem. Soc. 117, 5389–5390.

WG Toxicology, 2005. Report of the First Meeting of the Working Group on Toxicology, Cesenatico, Italy, 24–25 October 2005.

Discussion

Les analogues de PlTX synthétisés par les dinoflagellés du genre *Ostreopsis* sont susceptibles d'être bioaccumulés dans les poissons et les coquillages, constituant ainsi un risque sanitaire si ces denrées sont consommées par l'homme. Si les données concernant les doses toxiques pour l'homme restent très fragmentaires, un seuil provisoire de 250 µg éq.PlTX.kg^{-1} a été proposé en 2005 et nous disposons depuis peu de la proposition par l'Efsa d'un seuil de 30 µg éq.PlTX+Ovatoxine-a élaboré suite à leur processus d'évaluation des risques (EFSA, 2009b).

Le test hémolytique jusqu'alors utilisé pour détecter la PlTX n'a pas été caractérisé de façon précise et divers variantes méthodologiques sont actuellement utilisées, rendant difficiles la comparaison des résultats (e.g. Taniyama et al., 2001 ; 2003 ; Rhodes et al., 2002 ; Aligizaki et al., 2008). Par ailleurs, l'utilisation de sang frais peut poser le problème de l'approvisionnement.

Dans cet article, nous proposons l'utilisation de la lignée cellulaire Neuro-2a qui répond de façon spécifique à la PlTX et aux analogues agissant sur la pompe Na, K-ATPase dans des extraits d'efflorescences algales et de coquillages. Le test au MTT permet de mesurer l'effet des toxines sur la survie des cellules. La spécificité de la méthode est conférée par l'utilisation, dans des conditions appropriées, de l'ouabaïne. Dans nos conditions expérimentales, une CE_{50} de 43 pM a été déterminée pour un temps de traitement de 19 heures. Des CE_{50} de 100 pM et 160 pM ont été rapportées respectivement par Canete et Diogène (2008) sur les lignées Neuro-2a et NG118-15 pour un traitement de 24 heures.

Une alternative proposée par Bellocci et al. (2008) repose sur l'emploi de la lignée cancéreuse de cellules mammaires MCF-7 et la libération de la LDH dans le milieu de culture comme marqueur de cytotoxicité. Dans leur proposition, les cellules sont incubées pendant des temps très courts : 15 minutes en présence d'ouabaïne puis 1 heure avec la PlTX ou les extraits de coquillages à tester. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle repose sur la libération de la LDH dans le milieu de culture, ce qui implique des manipulations supplémentaires pour transférer le surnageant d'une plaque à une autre, pouvant conduire à augmenter la variabilité des réponses.

La lignée cellulaire de neuroblastomes humains BE(2)-M17 est plus sensible que la lignée Clone 9 (cellules hépatiques de rat) pour détecter de façon spécifique la PlTX et ses analogues avec l'Alamar Blue comme marqueur de viabilité (Espina et al., 2009). En effet, cette dernière semble moins sensible à l'ouabaïne probablement en raison du type d'isoformes constituant

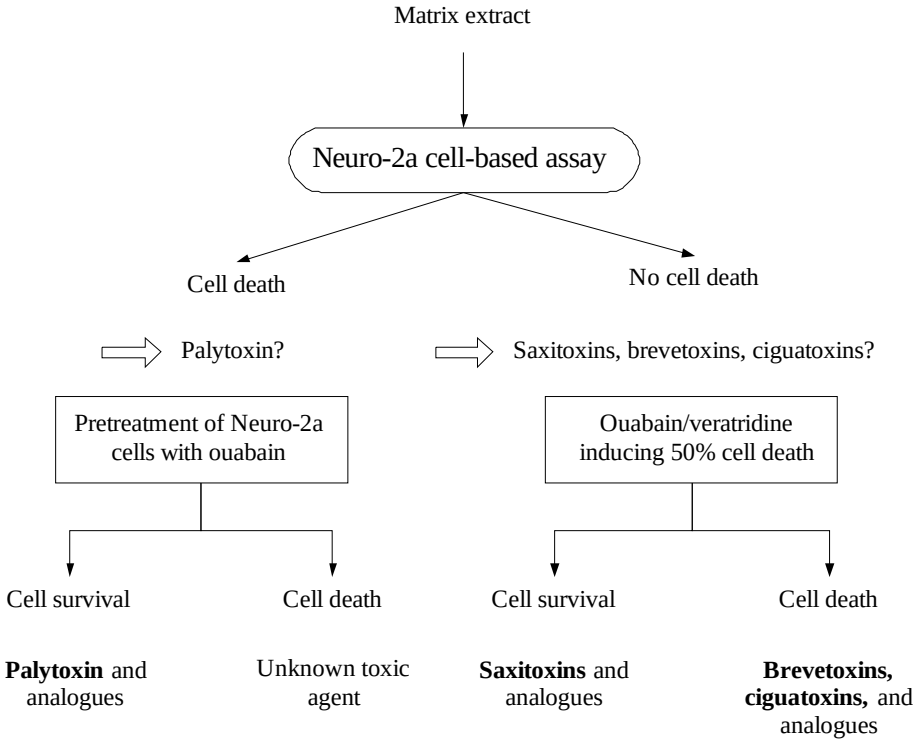
les sous-unités de la pompe Na, K-ATPase. Cette méthode présente l'avantage de fournir une mesure dynamique de la viabilité cellulaire en utilisant l'Alamar Blue qui n'est pas cytotoxique pour les cellules, permettant ainsi de faire des lectures à différents temps d'incubation. Par contre, pour détecter un effet cytotoxique des extraits de coquillages, un temps de 48 heures d'exposition est nécessaire ce qui rend cette méthode inappropriée pour répondre en situation d'alerte.

Nos travaux sur la lignée Neuro-2a ont montré que, dans nos conditions expérimentales et après une extraction peu spécifique au méthanol, le test permet de détecter des quantités de PlTX de l'ordre de 50 µg PlTX par kg de chair de coquillage, soit près de 5 fois moins que le seuil provisoire de 250 $\mu g.kg^{-1}$. Le tableau ci-dessous récapitule les limites de détection obtenues dans nos condtions expérimentales.

Limites de détection de la palytoxine par le test Neuro-2a	
PlTX pure	20 pM
Extrait de chair totale de moule dopé avec PlTX	50 µg PlTX par kg de chair

Des travaux supplémentaires seraient nécessaires pour améliorer la technique d'extraction des PlTXs à partir des efflorescences algales ou des coquillages. Une extraction plus spécifique permettrait d'augmenter la sensibilité du test cellulaire et contribuerait à une meilleure appréciation du risque lié aux PlTXs. Cet aspect sera discuté plus longuement dans la discussion générale de ce manuscrit.

La lignée Neuro-2a permet donc, en fonction des conditions expérimentales, de détecter spécifiquement 4 familles de neurotoxines dont les cibles cellulaires sont connues : les saxitoxines, les brévétoxines et les ciguatoxines qui agissent sur le canal sodium voltage-dépendant et les palytoxines qui agissent sur la pompe Na, K-ATPase (Figure 6 de l'article 3 reporté ci-dessous).



A ce stade de nos travaux, nous avons caractérisé les réponses du modèle cellulaire Neuro-2a suite à l'exposition à deux familles de neurotoxines agissant selon deux modes d'actions différents. Cela nous permet d'envisager l'utilisation de ce modèle dans des contextes de toxicités sur l'animal non connues. Ainsi, il sera possible de disposer d'un certain nombre d'éléments pour en déduire des interprétations objectivées et construites sur l'épisode toxique d'intérêt. Ces apports, complémentaires de ceux des données phytoplanctoniques, de la toxicité *in vivo* (signes cliniques, délais de mort), des données fournies par les analyses chimiques permettront de disposer d'une grille de lecture qui permettra de mieux caractériser le danger pour l'homme lié aux épisodes toxiques atypiques.

Tout comme les PlTXs, les spirolides sont considérés comme une famille de toxines émergentes sur le littoral français (Amzil et al., 2007). Caractérisée il y a une quinzaine d'années, cette famille de toxines a fait l'objet d'un nombre d'études toxicologiques limité. Dans la continuité des travaux présentés jusqu'ici, l'objet du chapitre suivant est d'investiguer les effets à l'échelle cellulaire d'un analogue représentatif de la famille des spirolides sur la lignée Neuro-2a afin de compléter notre connaissance de ce modèle face à une autre famille de neurotoxines, peu documentée du point de vue de son mode d'action et de ses effets cellulaires. L'objectif ultime étant d'obtenir des éléments permettant de mieux apprécier le risque pour l'homme, en complément des autres approches d'étude.

Chapitre 4

Investigations des effets toxiques à l'échelle cellulaire du 13-desméthyle-C spirolide

I. Revue bibliographique

I.1. Généralités

Les spirolides font partie de la famille de toxines désignées par Tindall et al. (1984) comme Fast-Acting-Toxins, soit toxines à action rapide car elles provoquent des symptômes neurologiques suivis de la mort rapide des souris (moins d'une heure) après injection intrapéritonéale. Cette famille inclut plusieurs groupes distincts que sont les gymnodimines, les spirolides, les pinnatoxines, les ptériatoxines et les prorocentrolides (Molgo et al., 2007). Les toxines à action rapide ont comme caractéristique commune de posséder un groupement imine cyclique.

I.2. Organismes producteurs et répartition mondiale

L'origine phytoplanctonique des spirolides a été mise en évidence par Cembella et al. (1998) et *Alexandrium ostenfeldii* (Figure 22) a été identifié comme étant l'organisme producteur de cette famille de toxines (Cembella et al., 2000).

Figure 22 : *Alexandrium ostenfeldii* – dissection (E. Nezan, Ifremer)

Alexandrium ostenfeldii est un dinoflagellé mixotrophe qui a longtemps été considéré comme une espèce arctique (Okolodkov et Dodge, 1996). On estime à présent qu'*A. ostenfeldii* est largement réparti dans les eaux tempérées du globe. Il a ainsi été observé sur les côtes nord-ouest de l'océan Atlantique, dans le golfe du Saint-Laurent (Levasseur et al., 1998) et en Nouvelle-Ecosse au Canada (Cembella et al., 1998, 2000; Gribble et al., 2005). *A. ostenfeldii* a été identifié sur les côtes méditerranéennes en Espagne (Fraga et Sanchez, 1985), en France

(Amzil et al., 2007), sur les côtes nord-ouest de l'océan Pacifique (Steidinger et Tangen, 1996) et en Nouvelle-Zélande (MacKenzie et al., 1996). Ce dinoflagellé a été récemment observé sur les côtes italiennes de la mer Adriatique (Ciminiello et al., 2006 ; 2009). Enfin, Alvarez et al. (2009) ont mis en évidence la présence de spirolides dans des bivalves (*Mesodesma donacium* et *Mulinia edulis*) récoltés sur les côtes nord du Chili.

En comparaison avec d'autres espèces d'*Alexandrium*, on connaît assez mal la biologie et l'écologie d'*A. ostenfeldii*. Selon Kremp et al., 2009, cela est probablement lié au fait que cette espèce est présente dans la colonne d'eau à de faibles densités cellulaires (entre 100 et 1000 cellules par litre) et souvent en même temps que d'autres genres de dinoflagellés.

Au cours d'une étude sur la diversité morphogénétique et les variations de la production de toxines du genre *Alexandrium* des côtes irlandaises, Touzet et al. (2008) ont isolé puis mis en culture des cystes recueillis dans les sédiments. Ils ont ainsi pu détecter les spirolides 13-desMe-C et 13-desMe-D dans une culture obtenue à partir d'un cyste d'*Alexandrium peruvianum*, espèce proche d'*A. ostenfeldii*.

Alexandrium ostenfeldii est également connu comme producteur potentiel de saxitoxines. Cembella et al. (2000) ont d'ailleurs montré qu'*A. ostenfeldii* pouvaient produire en faibles quantités les deux familles de toxines. A ce jour, aucune étude de toxicité aiguë ou chronique chez l'animal ou *in vitro* n'a été menée pour évaluer un possible effet synergique ou antagoniste de ces deux familles de neurotoxines.

Par ailleurs, John et al. (2003) ont montré que sur les côtes écossaises, *Alexandrium tamarense*, producteur potentiel de saxitoxines, et *A. ostenfeldii* étaient présents simultanément. L'identification de ces deux espèces repose essentiellement sur des techniques de microscopie à balayage qui nécessitent des connaissances spécifiques en taxonomie et sont relativement longues et coûteuses à mettre en œuvre. La mise en place d'outils moléculaires pour l'identification de ces deux espèces est en cours de développement (Metfies et al., 2005).

I.3. Relation structure / toxicité

En 1995, Hu et al. caractérisent pour la première fois par spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire la structure des spirolides B et D isolés à partir de moules *Mytilus edulis* et de coquilles Saint-Jacques *Pacopecten magellanicus* collectées en Nouvelle-Ecosse. Ce sont des macrocycles de poids moléculaire compris entre 677,5 et 709,5 en fonction des analogues.

Les analogues B et D ont été détectés chez des bivalves en Ecosse (Rühl et al., 2001), en Norvège (Aasen et al., 2005), en Espagne (Villar Gonzalès et al., 2006), en Italie (Ciminiello

et al., 2009) et en France (Amzil et al., 2007). Une dizaine de analogues de spirolides ont été caractérisés (Figure 23).

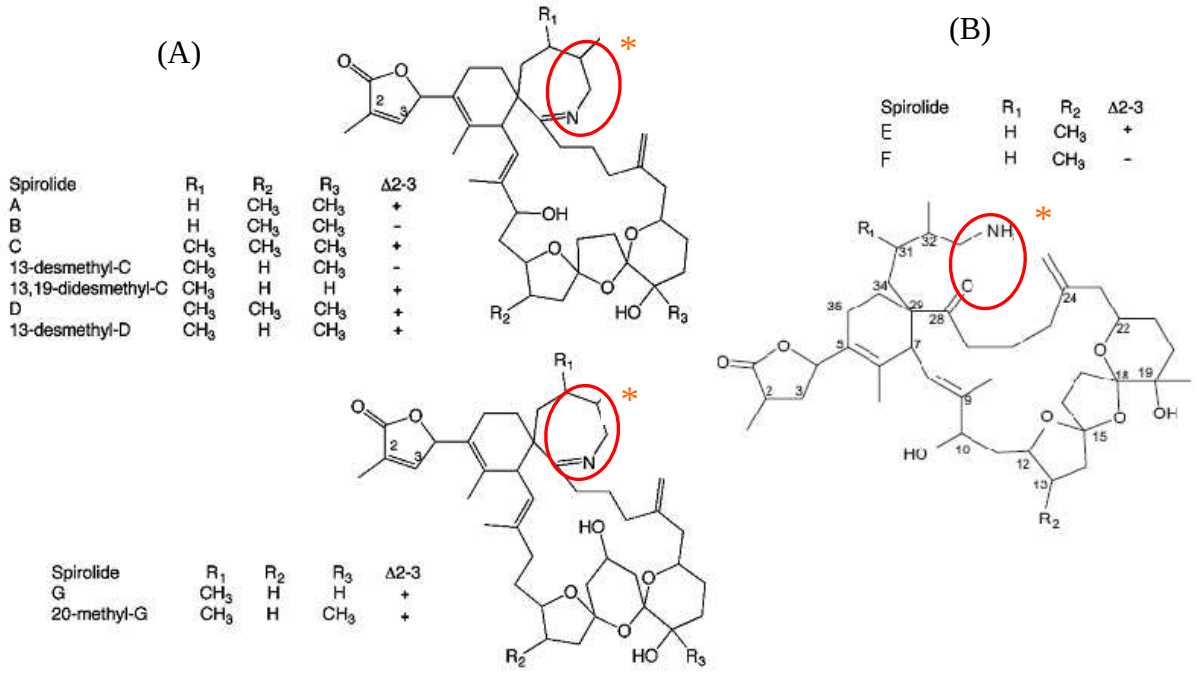


Figure 23 : Structure chimique des composés de la famille des spirolides (A) Composés biologiquement actifs contenant un motif spiro-imine (*). (B) Composés biologiquement inactifs, issus du métabolisme des bivalves et dans lesquels le système bicyclique incluant le motif spiro-imine (*) est ouvert. (d'après Marrouchi et al., 2008).

Tous les analogues biologiquement actifs sur la souris renferment dans leur structure un système bicylique incluant un motif spiro-imine. Seuls les analogues E et F caractérisés à partir de glandes digestives de bivalves ne sont pas actifs sur la souris (Hu et al., 1996).

A la différence des analogues A-D et G et de leurs analogues (dé)-méthylés, les SPX E et F ne possèdent pas ce motif spiro-imine (Figure 23). L'hypothèse selon laquelle ce motif serait le pharmacophore, *i. e*. la partie pharmacologiquement active des spirolides a donc été proposée par Hu et al. dès 1996.

Les spirolides E et F n'ont jamais été mis en évidence dans des cultures d'*Alexandrium ostenfeldii* ni dans des prélèvements de phytoplancton. Hu et al. (1996 ; 2001) ont donc considéré que les SPX E et F résultaient d'une hydrolyse conduisant à l'ouverture du motif spiro-imine des SPX A et B qui se produirait exclusivement dans les coquillages ayant accumulé des SPX.

I.4. Aspects toxicologiques chez l'animal

L'administration par voie intrapéritonéale à des souris de doses létales de spirolides ou d'extraits d'*A. ostenfeldii* ou de bivalves contaminés provoque des symptômes d'ordre

neurologique qui apparaissent quelques minutes après l'injection (Richard et al., 2001 ; Gill et al., 2003). Ces symptômes sont une pilo-érection, une diminution des mouvements et du comportement exploratoire, une hyper extension du dos, une baisse de la coordination, une queue courbée en arc et des convulsions. La respiration abdominale est caractéristique, indiquant une détresse respiratoire. La mort survient rapidement (entre 3 et 20 minutes après l'injection), ce qui a permis de qualifier les spirolides de toxines à action rapide (Fast Acting Toxins).

Chez la souris, les valeurs de la DL_{50} pour le spirolide C (forme 13-desMe-C, SPX-dC) sont de 6,5 $\mu g\ kg^{-1}$, 157 $\mu g\ kg^{-1}$ et 500 $\mu g\ kg^{-1}$ après que la toxine ait été injectée respectivement par voie intrapéritonéale, administrée par gavage et ajoutée dans l'alimentation (Munday et al., 2004 cité par Marrouchi et al., 2008).

Gill et al. (2003) ont montré que chez le rat et la souris injectés avec des doses létales, il n'y a aucune atteinte macroscopique et histologique de la rétine, du foie, du cœur, des reins, des poumons, de la rate et du tractus gastro-intestinal. En revanche, le SPX-dC affecte spécifiquement certaines régions du système nerveux central, notamment le tronc cérébral et l'hippocampe avec une intensité liée à la quantité de toxine administrée (Gill et al., 2003). L'injection d'atropine ou d'autres antagonistes des récepteurs cholinergiques diminue le temps de survie des animaux injectés avec le SPX-dC alors que l'injection d'agonistes (méthacholine) de ces mêmes récepteurs augmente ce temps de survie (Richard et al., 2001). Enfin, des analyses transcriptionnelles réalisées à partir des cerveaux d'animaux traités ont montré que l'expression des gènes codant pour certaines sous-unités des récepteurs nicotiniques (RnAChα2 et RnAChβ4) et muscariniques (RmACh1, RmACh4 et RmACh5) est augmentée chez les animaux traités (Gill et al., 2003).

Bien que le mode d'action des SPXs ne soit pas encore élucidé, un certain nombre d'éléments tendent à montrer que ces toxines agiraient au niveau des récepteurs cholinergiques nicotiniques et/ou muscariniques.

I.5. Une action au niveau des récepteurs nicotiniques et/ou muscariniques ?

I.5.1. Les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine

Les récepteurs nicotiniques (RnAChs) font partie de la famille des récepteurs-canaux extracellulaires (LGIC ou Ligand Gated Ion Channel) (Dutertre et Lewis, 2006). Ces récepteurs canaux jouent un rôle crucial dans la transmission synaptique. Les RnAChs sont

présents à la fois dans le système nerveux central, dans le système périphérique et au niveau des jonctions neuromusculaires. Ils sont constitués de cinq sous-unités protéiques transmembranaires qui s'arrangent symétriquement autour d'un axe perpendiculaire à la membrane plasmique (Figure 24).

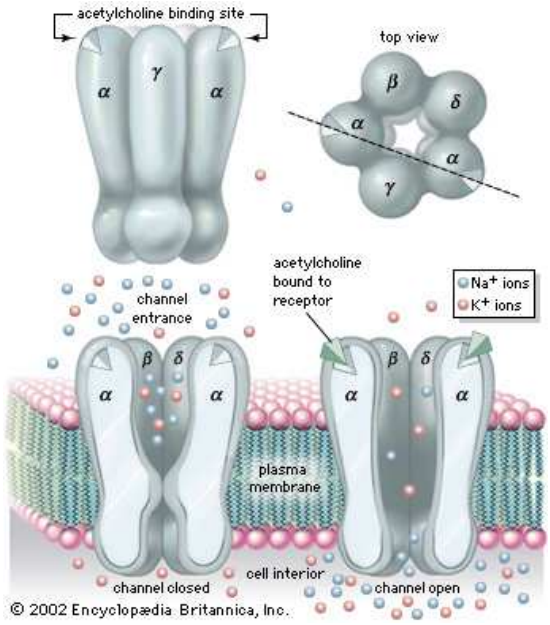


Figure 24 : Structure du récepteur nicotinique de l'acétylcholine situé dans la plaque motrice musculaire

Selon les sous-types, les RnAChs sont constitués de cinq sous-unités identiques (homopentamères) ou différentes (hétéropentamères) (Le Novère et al., 2002).

I.5.1.1. La synapse cholinergique

Les RnAChs font partie des récepteurs canaux situés au niveau des synapses cholinergiques. Ils contribuent, avec l'acétylcholinestérase (AChE), à réguler l'intensité et la durée du signal. En effet, l'influx nerveux se propageant dans le bouton présynaptique provoque la libération d'acétylcholine (ACh) dans la fente synaptique. La liaison de l'ACh sur le RnACh va activer le récepteur, ce qui se traduit par un bouleversement structural aboutissant à l'ouverture du canal. Un flux entrant de Na^+ et sortant de K^+ provoque alors la dépolarisation de la membrane post-synaptique et la transmission de l'influx nerveux ou la contraction musculaire.

Le RnACh va ensuite se refermer et, en présence continue d'ACh, entrer dans un état désensibilisé. Le RnACh existe donc au moins dans trois états différents :

- un état de repos fermé et sensible à l'ACh,

- un état actif ouvert,
- un état désensibilisé fermé.

Les molécules d'acétylcholine sont ensuite hydrolysées par l'AChE en choline et acétate. La choline est ensuite prise en charge par un transporteur à choline. En présence de choline et de coenzyme-A, la choline acétyltransférase (ChAT) catalyse la formation d'acétylcholine dans le cytosol. Celle-ci est ensuite incorporée dans des vésicules synaptiques au niveau du bouton présynaptique avant d'être libérée par exocytose dans la fente synaptique. Au niveau de la synapse cholinergique, un signal chimique (ACh) est donc converti en signal électrique par l'intermédiaire du RnACh (Figure 25).

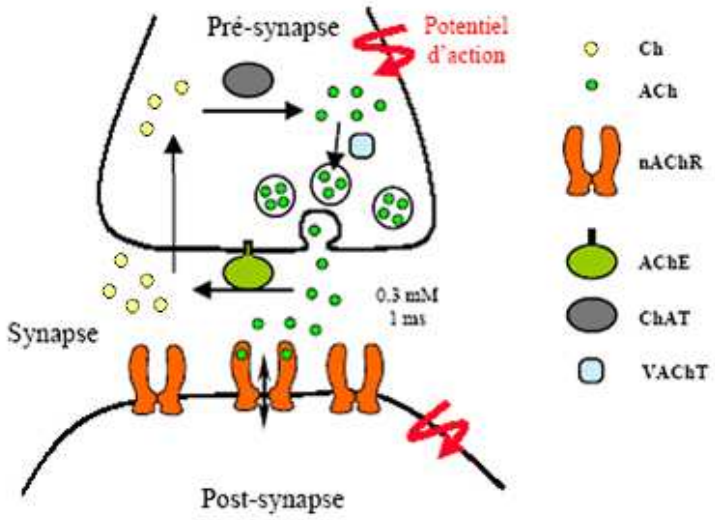


Figure 25 : Fonctionnement d'une synapse cholinergique
L'élément présynaptique renferme la machinerie nécessaire à la synthèse (ChAT), au stockage, au transport (VAChT), à la libération et à l'inactivation (AChE) du neurotransmetteur (ACh). L'élément post-synaptique, spécialisé dans la réception des messages, renferme dans sa membrane plasmique les protéines réceptrices du neurotransmetteur : les RnAChs. (d'après Mourot, 2004)

I.5.1.2. Les différents types de RnAChs

- Les récepteurs nicotiniques de type musculaire sont localisés de manière très dense dans les membranes post-synaptiques du myocyte (cellule du muscle strié squelettique) au niveau de la jonction neuromusculaire ou plaque motrice. L'activation de ces récepteurs par l'ACh se traduit par une initiation de la contraction musculaire. Les propriétés biochimiques et biophysiques des RnAChs ont été établies grâce aux études intensives menées sur le récepteur de poisson torpille disponible en quantité non négligeable (pour revue, voir Whittaker, 1998).

- Les récepteurs nicotiniques neuronaux quant à eux, exercent une influence modulatrice sur le système nerveux central. Ils sont constitués de sous unités α (α7, α9 ou α10) ou d'une combinaison de sous unités α et β (e.g. α4β2, α6α3β) (Le Novère et al., 2002). Une grande diversité de combinaisons est donc possible impliquant des propriétés pharmacologiques variées. Les récepteurs montrent notamment des cinétiques de désensibilisation très différentes (e.g. très rapide chez α7, quasi absente chez α4β2), ils peuvent être inhibés par la nicotine (e.g. α9 et α9α10), être insensibles à l'α-bungarotoxine ou être activés par la choline (e.g. α7, α3β4, α4β4, α9 et α9α10. Pour revue, voir Pereira et al. (2002).

I.5.1.3. Sites de liaison des RnAChs

Des études électrophysiologiques et des expériences de liaison ont permis de distinguer pour ce récepteur RnACh plusieurs sites pharmacologiques distincts. Les études structurales, la mutagenèse et les marquages chimiques dirigés ont permis d'affiner la position de ces sites (Corringer et al., 2000). Parmi ceux-ci, les sites ACh ou sites agonistes sont capables de lier des agonistes et des antagonistes compétitifs. Ils se trouvent dans la partie N-terminale synaptique du récepteur à l'interface de deux sous-unités : une sous-unité principale (α) et une sous-unité complémentaire (γ, δ ou ε pour les RnAChs musculaires, α ou β pour les RnAChs neuronaux) On dénombre soit deux (RnAChs type musculaire et type neuronal III) soit cinq (RnAChs de type neuronal I et II) sites de liaison par récepteur. L'agoniste endogène est l'acétylcholine, mais de nombreuses molécules de structures très différentes (nicotine, épibatidine, curare…) se lient aussi au site ACh (e.g. l'agoniste anatoxine-a ou l'antagoniste α-bungarotoxine). D'autres sites de liaison ont également été décrits tels que les sites des bloquants non compétitifs ou encore les sites agonistes non compétitifs (Mourot, 2004).

I.5.1.4. Effets du SPX-dC au niveau des récepteurs nicotiniques

Récemment, Amar et al. (2008) ont montré que le SPX-dC bloque les RnAChs de façon irréversible au niveau du muscle squelettique de souris et au niveau d'ovocytes de Xénope ayant incorporé dans leur membrane des récepteurs de Torpille de type musculaire $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\gamma$. Ces auteurs ont également montré que le SPX-dC bloque les récepteurs neuronaux de type α7 humain exprimés dans des ovocytes de Xénope après injection de l'ADNc spécifique. Le SPX-dC déplace l'α-bungarotoxine (antagoniste compétitif) radio-iodée de ces sites de liaison au niveau des membranes de cellules HEK exprimant le RnACh α7-$5HT_3$ de poulet. Enfin, le

SPX-dC déplace également l'épibatidine tritiée (agoniste) de ses sites de liaison au niveau des membranes de cellules HEK exprimant les récepteurs neuronaux α4β2 humain et α3β2 de rat. Ces résultats constituent la première mise en évidence de l'effet inhibiteur de SPX-dC sur les RnAChs homo- et hétéropentamériques, effet participant sûrement à sa neurotoxicité.

Des études en cristallographie permettant d'accéder aux liaisons à l'échelle moléculaire entre une molécule et les protéines fixant l'ACh (ACh Binding Proteins, AChBP) représentent un outil de choix pour la compréhension du mode d'action et l'étude de nouveaux ligands des RnAChs. Cette technique a été employée par Bourne et al. (2008) pour visualiser le complexe formé par l'AChBP et le spirolide ou la gymnodimine, et comparer ces résultats avec d'autres complexes associant une AChBP et un ligand compétitif organique ou protéique des RnAChs. Selon les auteurs, le spirolide et la gymnodimine occupent une position et une orientation similaire au niveau du site de fixation.

L'ensemble de ces résultats mettent donc en évidence une interaction entre le spirolide et différents sous-types de RnAChs, ce qui conforte les symptômes neurologiques mis en évidence précédemment sur la souris par Richard et al. (2001) et Gill et al. (2003).

I.5.2. Les récepteurs muscariniques à l'acétylcholine

I.5.2.1. La transduction du signal

Les récepteurs muscariniques à l'ACh (RmAChs) sont des récepteurs métabotropiques qui, à l'inverse des récepteurs ionotropiques, ne délimitent pas de canal ionique. Les récepteurs métabotropiques s'associent au niveau de leur face intracellulaire avec des protéines qui constituent un ensemble de réactions en chaîne correspondant à un système de transduction du signal. Le signal intracellulaire transmis par ces récepteurs peut revêtir deux formes :

- addition d'atomes de phosphore sur des protéines (phosphorylations)
- synthèse de molécules de transmission intracellulaire appelées seconds messagers (le premier messager étant le médiateur extracellulaire, ici l'ACh).

Il existe donc deux sous-types de récepteurs métabotropiques : les récepteurs tyrosine-kinase et les récepteurs couplés aux protéines G.

Les récepteurs muscariniques appartiennent à la famille des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G. Typiquement, l'acétylcholine se lie au récepteur muscarinique, ce qui entraine *via* la stimulation de protéines G, la transmission du signal vers un effecteur, une enzyme qui réalise la synthèse de seconds messagers variés (AMPc, IP3 ou Ca^{2+}). Ces

seconds messagers stimulent des enzymes (des kinases) qui catalysent la phosphorylation de protéines (Figure 26).

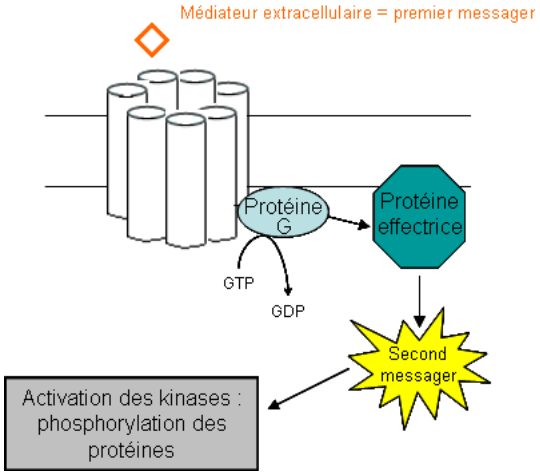


Figure 26 : La transduction du signal au niveau des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine (modifié d'après Bartolami, 2006)

I.5.2.2. Les différents types de RmAChs

Les RmAChs sont largement distribués dans l'organisme au niveau du système nerveux central et du système parasympathique contrôlant entre autres le tonus musculaire de différents organes (e.g. cœur, vessie, poumon, intestin). Ils sont de ce fait impliqués dans un grand nombre de maladies, notamment dans la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la maladie de Parkinson. La recherche de nouvelles molécules à potentiel thérapeutique ciblant les RmAChs est donc toujours active (Langmead et al., 2008).

Grâce au clonage des gènes codant pour les différents types de RmAChs, on distingue actuellement cinq sous-types de RmAChs : M1, M2, M3, M4 et M5 (Caulfield et Birdsall, 1998). Les récepteurs de sous-type M1, M3 et M5 sont couplés à la protéine Gq et leur activation conduit à celle de la phospholipase C (PLC), ce qui provoque la libération de Ca^{2+} intracellulaire. L'activation des sous-types M2 et M4 conduit à l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC), provoquant une baisse du taux d'AMPc circulant (Figure 27).

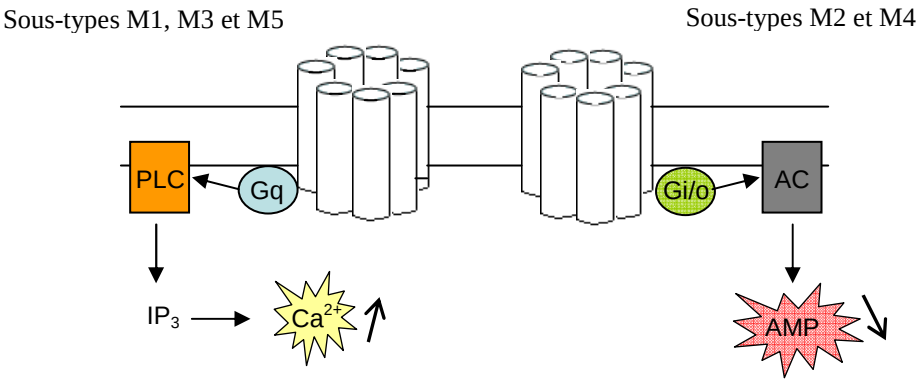


Figure 27 : Les différents sous-types de récepteurs muscariniques de l'acétylcholine (modifiée d'après Fruchart-Gaillard et al., 2008)

Les sous-types M1, M4 et M5 sont principalement localisés dans le système nerveux central (cortex, hippocampe, substance noire). Les sous-types M2 et M3 sont présents dans le système nerveux central et dans le système périphérique (Servent et Fruchart-Gaillard, 2009).

I.5.2.3. Sites de liaison des RmAChs

Les RmAChs présentent deux types de sites de liaison des ligands. De façon simplifiée, on distingue le site de liaison de l'agoniste endogène (ou des antagonistes compétitifs) et des sites allostériques capables de lier des ligands modulateurs de l'activité biologique (Chritopoulos et Kenakin, 2002).

I.6. Aspects réglementaires et méthodes de détection

Concernant les aspects réglementaires, bien que le potentiel neurotoxique des spirolides ait été mis en évidence, ils ne font pour l'instant l'objet d'aucune réglementation au niveau européen car les données toxicologiques et épidémiologiques les concernant sont considérées comme insuffisantes (Hess et al., 2006 ; Toyofuku, 2006). Une évaluation du risque représenté par les spirolides est actuellement en cours à l'Efsa. En France, les spirolides ne font pas actuellement partie des toxines recherchées de façon systématique lors de la surveillance des coquillages (Krys et al., 2007).

Les spirolides ont été mises en évidence en 1991 à partir de coquillages (moules et coquilles Saint-Jacques) de Nouvelle-Ecosse, au Canada, lors de tests réalisés par bioessais sur souris pour le dépistage des toxines diarrhéiques.

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) a permis d'identifier et de quantifier les spirolides présents dans des extraits de bivalves et dans des cultures d'*A. ostenfeldii* (e.g. Aasen et al., 2006 ; Ciminiello et al., 2006 ; Fux et al., 2007). Amzil et al. (2007) font état d'une limite de détection de 1 µg SPXs / kg chair par LC-MS/MS. Bien que ces méthodes aient une sensibilité et une reproductibilité satisfaisantes, elles ne permettent pas de mettre en évidence d'analogues structuraux de toxines non encore identifiés et/ou pour lesquels aucun standard n'est disponible.

Récemment, Vilarino et al. (2009) ont développé une méthode de détection des spirolides et des gymnodimines par polarisation de fluorescence. Cette méthode de détection a été conçue comme un test d'inhibition. Elle repose sur la compétition entre l'α-bungarotoxine couplée à un fluorophore et les spirolides pour la liaison au récepteur nicotinique isolé du poisson *Torpedo marmorata* (Figure 28).

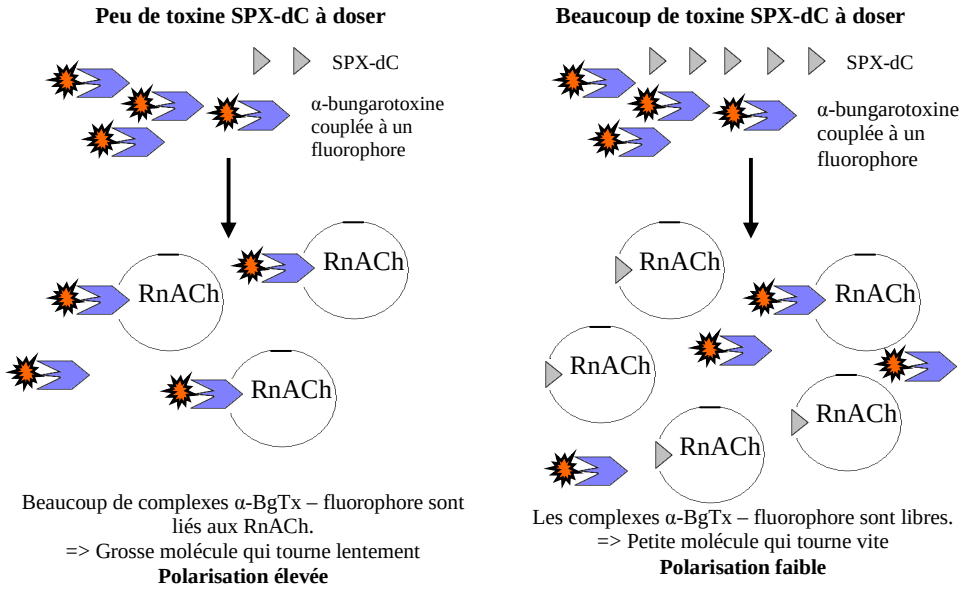


Figure 28 : Principe du test d'inhibition reposant sur la mesure de la polarisation de fluorescence

Ce test d'inhibition, basé sur le mode d'action des toxines, présente l'avantage de pouvoir détecter les différents types de toxines liant le récepteur nicotinique de l'acétylcholine. Selon les auteurs, la sensibilité du test est comprise entre 70 et 700 µg de 13-desméthyle-SPX par kg de chair de moule. Les gymnodimines et les spirolides sont deux groupes de toxines à action rapide qui agissent sur ce type de récepteurs (Amar et al., 2008 ; Kharrat et al., 2008). Si ces deux types de toxines sont présents simultanément, il n'est pas possible de les distinguer avec cette approche, à moins d'avoir une extraction spécifique pour chaque famille de toxines.

II. Questions

Dans le contexte de l'apparition de neurotoxines marines émergentes telles que les spirolides, il est important de pouvoir évaluer le risque pour l'homme lié à la consommation de denrées contaminées par cette famille de toxines. Si les spirolides ont dans un premier temps été mis en évidence par le bioessai sur souris (Hu et al., 1995), ils ne sont actuellement pas recherchés de façon systématique puisqu'ils ne font l'objet d'aucune réglementation dans l'attente de l'évaluation du risque qu'ils représentent pour le consommateur en cours à l'Efsa et de la décision de la pertinence de la mise d'une réglementation au niveau européen. Néanmoins, leur potentiel neurotoxique a été démontré *in vivo* (Richard et al., 2001 ; Gill et al., 2003) et une étude *in vitro* a montré qu'ils se liaient au récepteur nicotinique (Amar et al., 2008).

Dans la continuité des études présentées précédemment pour les autres neurotoxines, nos travaux se sont donc orientés vers la mise en place de tests sensibles au SPX-dC, faciles à mettre en œuvre. Dans ce contexte, notre but est d'investiguer les effets à l'échelle cellulaire du SPX-dC, seul analogue commercialisé à l'heure actuelle.
Les spirolides étant des neurotoxines à action rapide, les lignées cellulaires sélectionnées pour la mise en place des tests sont des lignées de cellules nerveuses riches en récepteurs à l'acétylcholine, dont le Neuro-2a, ou bien des cellules transfectées exprimant en quantité plus importante ce type de récepteur, comme la lignée M1WT3. Les expériences de compétition peuvent permettre de mettre en évidence l'effet d'une toxine sur les récepteurs nicotiniques ou muscariniques en s'appuyant sur l'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes radiomarqués (e.g. Jerusalinski et al., 2000 ; Daly, 2005 ; Fruchart-Gaillard et al., 2008 ; Kharrat et al., 2008). Mais, l'utilisation d'éléments radiomarqués est limité à des laboratoires de recherche ayant des dispositions particulières pour ces matériaux, nous avons opté pour une approche plus simple et plus généralisable. A cette fin, notre étude a donc consisté à mettre en place une démarche expérimentale répondant aux questions suivantes afin d'investiguer les effets à l'échelle cellulaire du SPX-dC :

Quelle est la réponse des modèles cellulaires Neuro-2a et M1WT3 suite à leur exposition aux spirolides ?
A notre connaissance, aucune étude sur la toxicité *in vitro* du 13-desméthyle-C spirolide (SPX-dC) n'a été conduite. Nous avons donc évalué l'effet cytotoxique du SPX-dC sur ces

lignées cellulaires au moyen d'un test de cytotoxicité. Différents marqueurs peuvent être utilisés :

- la mesure du taux de lactate déshydrogénase dans le milieu extracellulaire témoignant d'une atteinte de la membrane cytoplasmique,

- le taux d'incorporation du rouge neutre (RN) dans les lysosomes,

- la mesure du taux de cristaux de formazan formés à partir du MTT (méthyle tétrazolium) par la succinate deshydrogénase au niveau mitochondrial,

- la dégradation de la résazurine (Alamar Blue) dans les cellules viables.

Dans ce travail de thèse, seuls les tests au MTT et à l'Alamar Blue ont été utilisés pour l'évaluation de la CE_{50}.

L'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes des récepteurs nicotiniques et/ou muscariniques a-t-elle un effet sur la mortalité cellulaire ?

Des études menées sur la souris (Richard et al., 2001) ont notamment montré que l'atropine (antagoniste des récepteurs cholinergiques) diminue le temps de survie des animaux injectés avec du SPX tandis que la méthacholine (agoniste des récepteurs muscariniques) et la physostigmine (inhibiteur des cholinestérases) augmentent ce temps de survie (Tableau XIII).

Tableau XIII : Effets sur le temps de survie de souris de différentes drogues (d'après Richard et al., 2001)

Drogue	Effet et/ou mode d'action	Effet sur le temps de survie de la souris
Tropicamide	Antagoniste des récepteurs muscariniques de l'ACh	Diminution
Atropine	Antagoniste des récepteurs muscariniques de l'ACh	Diminution
Pirenzepine	Antagoniste des récepteurs muscariniques de l'ACh	Diminution
Gallamine	Curare non dépolarisant	Diminution
Propanolol	Bêta-bloquant	Légère augmentation
Epinephrine (=adrénaline)	Neurotransmetteur des systèmes adrénergiques	Légère augmentation
Physostigmine	Inhibiteur des cholinestérases	Augmentation
Méthacholine	Agoniste des récepteurs muscariniques de l'ACh	Augmentation

Sur la base de ces travaux, nous nous sommes attachés à voir l'effet sur la mortalité cellulaire de différentes combinaisons impliquant d'une part le SPX-dC et d'autre part l'atropine, la méthacholine et la néostigmine.

Quels paramètres complémentaires à la cytotoxicité a-t-on mesuré pour évaluer l'effet toxique du SPX-dC sur lignée cellulaire ?

Nous avons choisi de mesurer trois paramètres pour évaluer les effets du SPX-dC sur des lignées cellulaires. Notre choix s'est porté sur des expériences réalisables en format microplaque afin de pouvoir avoir un grand nombre de réplicats et de comparer les effets du SPX-dC avec ceux de l'acide okadaïque (OA). Ce dernier a été utilisé comme témoin positif car l'effet de l'OA sur les paramètres étudiés ont fait l'objet de plusieurs travaux (*cf*. Chapitre 1).

1- Afin d'évaluer la toxicité du SPX-dC sur le stress oxydant, nous avons mesuré le **taux de glutathion réduit** (GSH) (Figure 29), molécule essentielle pour différents aspects du fonctionnement cellulaire.

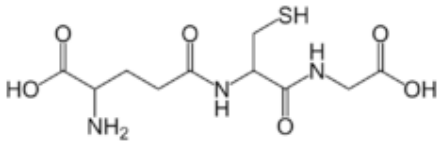
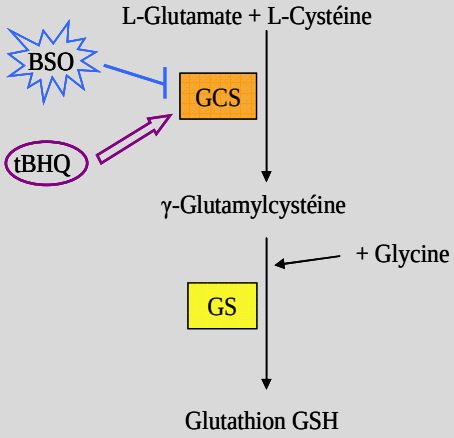


Figure 29 : Structure chimique du glutathion réduit (le groupement thiol R-SH est impliqué dans des réactions avec les radicaux libres et les groupements électrophiles d'autres molécules).

Il intervient notamment dans la détoxification des xénobiotiques en neutralisant divers produits du stress oxydant grâce à son potentiel réducteur mais également dans la prolifération cellulaire et la régulation de l'apoptose (e.g. Sies, 1999 ; Dringen, 2000). Une baisse du taux de GSH peut être considérée comme un indicateur de toxicité via la génération d'un stress oxydant. La voie de biosynthèse du GSH est constituée de deux étapes principales : la liaison du glutamate à la cystéine est catalysée par la γ-glutamylcystéine synthase (GCS), puis la liaison entre la glutamyle-cystéine et la glycine est catalysée par la glutathion synthétase (GS) (Lavoie et al., 2009) (Encart 5).

La buthionine sulfoximine et la tert-butyle hydroquinone sont deux molécules qui agissent sur la synthèse du GSH (*cf*. Encart 5).

Encart 5 - Effets de la buthionine sulfoximine et de la tert-butyle hydroquinone sur la synthèse du GSH



La buthionine sulfoximine (BSO) provoque une baisse du taux de GSH intracellulaire en inhibant l'enzyme clé de la voie de biosynthèse du GSH : la γ-glutamylcystéine synthase (Hamilton et al., 2007).
La tert-butyle-hydroquinone (tBHQ) est un antioxydant phénolique de synthèse. Lavoie et al. (2009) ont montré sur des cultures d'astrocytes et de neurones que des concentrations non toxiques de tBHQ induisent l'expression de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse du GSH et que cela s'accompagne d'une augmentation de la synthèse de GSH.
Dans notre étude, la BSO et la tBHQ ont donc été utilisées comme molécules témoins pour obtenir respectivement soit une baisse du taux de GSH, soit une augmentation du taux de GSH dans les cellules.

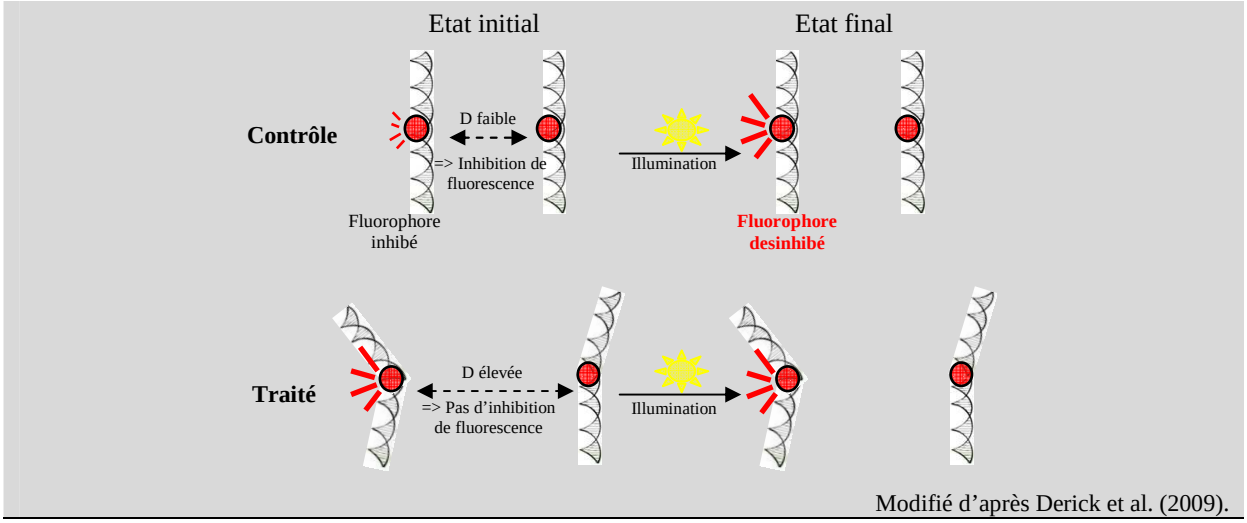
La méthode de mesure du GSH utilisée repose sur la réaction catalysée par la glutathion transférase entre le dibromobimane et le groupement thiol du GSH pour former un produit fluorescent hydrosoluble (Kosower et Kosower, 1995). La quantité de produit fluorescent formé dépend donc de la quantité de GSH disponible.

2- Les **changements au niveau du potentiel de membrane mitochondriale** (PMM) sont caractéristiques de la voie intrinsèque de l'apoptose impliquant les mitochondries (Hengartner, 2000 ; Elmore, 2007). Afin de confirmer le processus apoptotique, d'autres expériences (e.g. activation de la caspase 3, fragmentation de l'ADN) doivent être menées en complément.

3- Le **potentiel génotoxique du SPX-dC** a été évalué avec le marqueur fluorescent SYTO13 (Encart 6). Le SYTO13 est un marqueur fluorescent de l'apoptose qui se lie aux acides nucléiques. Il pénètre dans les cellules dont la membrane plasmique n'est pas altérée.

Encart 6 - Principe méthodologique pour le SYTO13

Dans des cellules « contrôle », le SYTO13 se lie aux acides nucléiques et va établir des interactions homologues qui se traduisent par un phénomène de « quenching » (inhibition) de fluorescence. Le SYTO13 ne fluoresce que lorsqu'il est lié aux acides nucléiques.
A l'inverse, dans des cellules traitées avec un composé agissant sur les acides nucléiques, la désorganisation des acides nucléiques ne permet pas au SYTO13 d'établir ce type d'interaction et donc l'inhibition de fluorescence est levée. La mesure de l'état d'inhibition de fluorescence du SYTO13 dans les cellules permet ainsi de mesurer le niveau de désorganisation des acides nucléiques lié au traitement.



Modifié d'après Derick et al. (2009).

III. Matériel et méthodes

III.1. Les lignées cellulaires

III.1.1. La lignée de neuroblastomes Neuro-2a

Les tests de toxicité ont été réalisés sur une lignée cellulaire cancéreuse de neuroblastomes de souris (Neuro-2a, ATCC CCL-131, (LGC Promochem, France)). Ce sont des cellules adhérentes qui, une fois en culture dans des conditions favorables, se développent et forment un tapis sur le fond de la flasque.

La lignée cellulaire est cultivée dans du milieu de culture complet composé de RPMI 1640 sans glutamine additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), de L-glutamine (600 $mg.L^{-1}$), de pyruvate de sodium (88 $mg.L^{-1}$) et 1% d'une solution antibiotique pénicilline 10 000 U et streptomycine 10 $mg.mL^{-1}$.

Les cultures ont été effectuées dans des flasques Nunc stériles de 75 cm^2 maintenues dans une chambre de culture à 37°C et 5% de CO_2.

Dans nos conditions de laboratoire, les cellules ont été repiquées tous les cinq jours (ce qui correspond à une confluence de 80%-90%), sous une hotte à flux laminaire, en conditions stériles. Le repiquage a été effectué par décollement des cellules grâce à une projection de milieu de culture.

III.1.2. La lignée M1WT3

La lignée de cellules ovariennes de hamster M1WT3 (ATCC CRL-1985, (LGC Promochem, France)) a été obtenue par transfection de la lignée CHO-K1 avec le vecteur d'expression pSVL contenant le gène m1 codant pour le récepteur muscarinique à l'acétylcholine du rat. Les cellules ainsi obtenues ont été co-transfectées avec pMSVNeo puis les cellules M1WT3 ont été sélectionnées pour leur aptitude à croitre dans un milieu de culture contenant 0,5 $mg.mL^{-1}$ de généticine G418.

La lignée cellulaire M1WT3 est cultivée dans du milieu de culture complet composé de Ham's F12 additionné de 10 % de sérum de veau fœtal, de L-glutamine (0,6 $g.L^{-1}$), de pyruvate de sodium (88 $mg.L^{-1}$), d'hydrogénocarbonate de sodium (1,5 $g.L^{-1}$) et 50 $\mu g.mL^{-1}$ de généticine G418 pour maintenir la pression de sélection.

Les cultures ont été effectuées dans des flasques Nunc stériles de 75 cm^2 maintenues dans une chambre de culture à 37 °C et 5% de CO_2.

Dans nos conditions de laboratoire, les cellules ont été repiquées par trypsination tous les cinq jours (ce qui correspond à une confluence de 80%-90 %), sous une hotte à flux laminaire, en conditions stériles.

III.2. Tests utilisés

III.2.1. Le test de cytotoxicité au MTT

Les cellules sont inoculées à la densité de 2.10^5 cellules par mL dans des plaques transparentes 96 puits (100 µL par puits). Après 24 heures de culture, le milieu est éliminé par retournement de la microplaque. Une gamme de toxine est préparée dans du milieu sans sérum (n=3 réplicats par concentration). Le solvant (méthanol) n'excède pas 5% du volume. Les cellules sont exposées à la toxine (200 µL par puits) pendant 6, 24 ou 48 heures. Des contrôles « Cellules » (cellules incubées avec du milieu de culture sans sérum) et « Solvant » (cellules incubées avec la dose maximale de solvant utilisée pour la gamme de toxine) sont systématiquement réalisés sur chaque plaque (minimum 3 puits par contrôle).

Après la période d'exposition, la morphologie des cellules est observée au microscope inversé puis le milieu est éliminé par retournement de la microplaque avant ajout de 100 µL de solution de MTT à 5 $mg\ mL^{-1}$. Les microplaques sont ensuite incubées pendant 1 heure à 37°C. Des cristaux de formazan se sont formés dans les cellules viables, résultant de la conversion du MTT par la succinate déshydrogénase au niveau mitochondrial. Après

élimination du MTT, les cristaux de formazan sont dissous dans du diméthyle sulfoxide (DMSO). Les microplaques sont placées sur table d'agitation à l'abri de la lumière pour homogénéiser la coloration avant lecture de l'absorbance à 540 nm dans un lecteur de microplaques UVM 340 (Asys).

III.2.2. Le test de cytotoxicité avec l'Alamar Blue

Les cellules sont inoculées à la densité de 2.10^5 cellules par mL dans des plaques transparentes 96 puits (100 µL par puits). Après 24 heures de culture, le milieu est éliminé par retournement de la microplaque. Une gamme de toxine est préparée dans du milieu sans sérum (n=3 réplicats par concentration). Le solvant (méthanol) n'excède pas 5% du volume. Les cellules sont exposées à la toxine (200 µL par puits) pendant 24 heures. Des contrôles « Cellules » (cellules incubées avec du milieu de culture sans sérum) et « Solvant » (cellules incubées avec la dose maximale de solvant utilisée pour la gamme de toxine) sont systématiquement réalisés sur chaque plaque (minimum 3 puits par contrôle).

A l'issue du temps d'exposition, la microplaque est vidée par retournement. Tous les puits reçoivent ensuite 100 µL de solution d'Alamar Blue diluée au 1/25^{è} dans du milieu de culture sans sérum afin d'évaluer le pourcentage de survie des cellules. La microplaque est incubée une heure à 37°C et 5% CO_2. Une mesure de la fluorescence permettant d'évaluer la quantité de cellules par puits est faite à une longueur d'onde d'excitation 525 nm et d'émission comprise entre 580 nm et 640 nm dans un lecteur de microplaques Modulus (Turner Biosystems, USA).

III.2.3. Mesure du taux de glutathion réduit intracellulaire avec un marqueur fluorescent : le dibromobimane

Cette méthode est adaptée de Cox et Cardozo-Pelaez (2007). Les cellules Neuro-2a sont inoculées à la densité de 2.10^5 cellules par mL dans des plaques noires à fond transparent 96 puits (100 µL par puits). Après 24 heures de culture, le milieu est éliminé par retournement de la microplaque. Les cellules sont ensuite exposées 24 heures à une toxine (SPX-dC ou OA). Deux molécules témoin ont également été utilisées : la buthionine sulfoximine (BSO) et la tert-butyle-hydroquinone (tBHQ) induisant une inhibition de la synthèse du GSH et une induction de la synthèse de GSH, respectivement.

A l'issue du temps d'exposition, la microplaque est vidée par retournement ou aspiration. Tous les puits reçoivent ensuite 100 µL de solution d'Alamar Blue diluée au 1/25è dans du milieu de culture sans sérum afin d'évaluer le pourcentage de survie des cellules. La microplaque est incubée une heure à 37°C et 5% CO_2. Une mesure de la fluorescence permettant d'évaluer la quantité de cellules par puits est faite à une longueur d'onde d'excitation 525 nm et d'émission comprise entre 580 nm et 640 nm. Une solution fille de dibromobimane à 80 µM est préparée extemporanément dans du PBS stérile à partir de la solution stock à 4 mM dans du DMSO. Tous les puits de la microplaque reçoivent ensuite 100 µL de la solution de dibromobimane à 80 µM. La microplaque est incubée pendant 30 min à 37°C et 5% CO_2. Une mesure de la fluorescence est faite à une longueur d'onde d'excitation de 365 nm et d'émission comprise entre 410 nm et 460 nm.

Pour comparer l'effet des différents traitements, une ANOVA suivie de post-test de Dunnett ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism (version 5). Le seuil de 5 % est retenu pour déclarer une différence significative entre les contrôles et les différents traitements.

III.2.4. Evaluation de la baisse du potentiel de membrane mitochondriale sur la lignée de neuroblastomes Neuro-2a

Cette méthode est adaptée de Leira et al. (2001a ; 2001b). Les cellules sont inoculées à la densité de 2.10^5 cellules par mL dans des plaques noires à fond transparent 96 puits (100 µL par puits). Après 24 heures de culture, le milieu est éliminé par retournement de la microplaque. Une gamme de toxine est préparée dans du milieu sans sérum (n=3 réplicats par concentration). Le solvant (méthanol) n'excède pas 5% du volume. Chaque puits reçoit 200 µL de solution contenant la toxine (ou 200 µL de milieu sans sérum pour les contrôles « Cellules » ou 200 µL de milieu contenant la dose maximale de solvant utilisée pour la gamme de toxine (contrôle « Solvant »)).

Les cellules sont exposées 24 h à la toxine puis les microplaques sont centrifugées à 725 g pendant 5 min à 25°C afin que les cellules qui auraient perdu leur capacité d'adhérence ne soient pas éliminées dans les étapes suivantes. Cinquante µL de milieu sont prélevés dans chaque puits et remplacés par 50 µL d'une solution de Mitotracker Red CMXRos (Invitrogen) permettant d'avoir une concentration finale de 750 nM. Les cellules sont incubées 45 min à 37°C. Les microplaques sont à nouveau centrifugées à 725 g pendant 5 min puis le milieu est éliminé par aspiration. Les cellules sont ensuite rincées avec 100 µL de PBS. La mesure de la fluorescence est réalisée à une longueur d'onde d'excitation de 525 nm et aux longueurs

d'ondes d'émission comprises entre 580 et 640 nm. Après soustraction du bruit de fond, le pourcentage de fluorescence moyenne est calculé par rapport au contrôle « solvant ».

III.2.5. Effet du SPX-dC sur la fragmentation des acides nucléiques des cellules Neuro-2a

Cette méthode est adaptée de Derick et al. (2009). Les cellules Neuro-2a sont inoculées à la densité de 2.10^5 cellules par mL dans des plaques noires à fond transparent 96 puits (100 µL par puits). Après 24 heures de culture, le milieu est éliminé par retournement de la microplaque. Une gamme de toxine est préparée dans du milieu sans sérum (n=3 réplicats par concentration). Le solvant (méthanol) n'excède pas 5% du volume. Chaque puits reçoit 200 µL de solution contenant la toxine (ou 200 µL de milieu sans sérum pour les contrôles « Cellules » ou 200 µL de milieu contenant la dose maximale de solvant utilisée pour la gamme de toxine (contrôle « Solvant »)). Les cellules sont ensuite exposées 24 heures ou 48 heures à une gamme de SPX-dC. Une solution de SYTO13 (Molecular Probes) à 10 µM est préparée dans du milieu de culture non complémenté à partir de la solution stock commerciale à 5 mM. Sans vider la microplaque, on dépose 25 µL de la solution de SYTO13 à 10 µM dans les puits. Les cellules sont incubées 30 minutes à 37°C et 5% de CO_2. A l'issue de ce temps d'incubation, une première mesure de fluorescence (I_{ini}) de la microplaque est réalisée dans le lecteur de microplaques à fluorescence à la longueur d'onde d'excitation de 490 nm et aux longueurs d'ondes d'émission comprises entre 510 et 570 nm. La microplaque est ensuite illuminée pendant 10 secondes sur un dispositif (développé par la société Novaleads) de façon à induire une photodégradation du SYTO13. Une deuxième mesure (I_{fin}) de la fluorescence est alors réalisée. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un pourcentage entre l'intensité de fluorescence finale et l'intensité de fluorescence initiale avant illumination ($100 * I_{fin}/I_{ini}$).

IV. Résultats

IV.1. Effet du 13-desméthyle-C spirolide (SPX-dC) sur la viabilité des lignées cellulaires Neuro-2a et M1WT3

IV.1.1. Evaluation de la cytotoxicité du SPX-dC avec le test au MTT sur les lignées cellulaires Neuro-2a et M1WT3

Les effets cytotoxiques du SPX-dC ont été évalués par le test MTT après deux durées d'exposition (24 et 48 heures) pour les cellules Neuro-2a et M1WT3 (Figures 30 et 31). Aucun effet cytotoxique significatif n'a pu être mis en évidence sur les deux lignées cellulaires Neuro-2a et M1WT3.

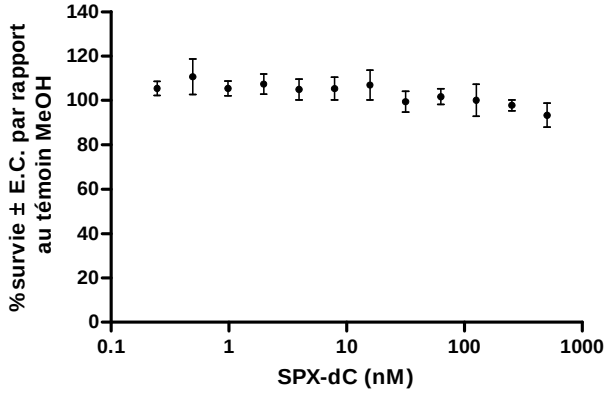


Figure 30 : Viabilité des cellules Neuro-2a (évaluée par le test au MTT) exposées à une gamme de SPX-dC pendant 48 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie (± écarts-types) par rapport au contrôle solvant et correspondent à la moyenne de trois expériences réalisées en triplicats.

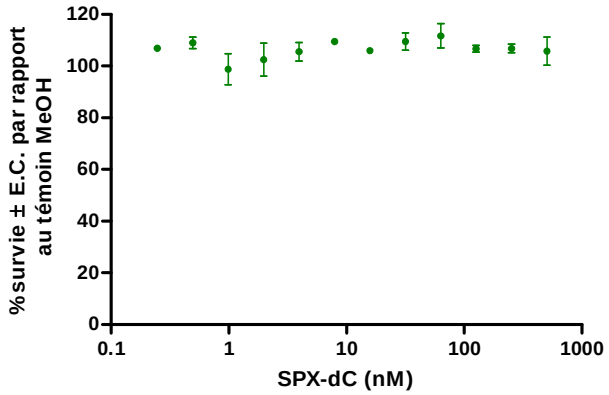


Figure 31 : Viabilité des cellules M1WT3 (évaluée par le test au MTT) exposées à une gamme de SPX-dC pendant 24 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie (± écarts-types) par rapport au contrôle solvant et correspondent à la moyenne de trois expériences réalisées en triplicats.

IV.1.2. Evaluation de la cytotoxicité du SPX-dC avec l'Alamar Blue sur la lignée cellulaire Neuro-2a

L'effet du SPX-dC sur a été évalué sur la lignée Neuro-2a après un temps d'exposition de 24 heures. Aucun effet cytotoxique n'a pu être mis en évidence avec l'Alamar Blue (Figure 32).

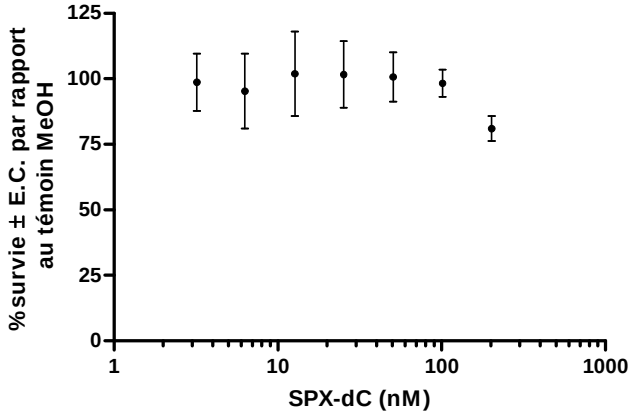


Figure 32 : Viabilité des cellules Neuro-2a (évaluée par le test avec l'Alamar Blue) exposées à une gamme de SPX-dC pendant 24 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie (± écarts-types) par rapport au contrôle solvant et correspondent à la moyenne de trois expériences réalisées en triplicats.

IV.2. Effets d'antagonistes ou d'agonistes des récepteurs muscariniques et du SPX-dC sur la survie des cellules Neuro-2a évaluée avec le test au MTT

La cytotoxicité de l'atropine, de la néostigmine et de la méthacholine a été évaluée sur la lignée Neuro-2a après 24 heures de traitement. Une CE_{50} de 5 mM a été déterminée pour l'atropine. Les deux autres composés testés se sont avérés être non cytotoxiques dans nos conditions expérimentales.

Aucun effet synergique de l'atropine et du SPX-dC n'a pu être mis en évidence.

IV.3. Effets du SPX-dC sur le taux de glutathion réduit de la lignée Neuro-2a

Deux molécules (la BSO et la tBHQ) ont été testées pour leur cytotoxicité sur les cellules Neuro-2a en vue de leur utilisation comme molécules témoins sur le taux de GSH (e.g. Sebastia et al., 2003 ; Cox et Cardozo-Pelaez, 2007) et comparaison avec les effets du SPX-dC.

IV.3.1. Evaluation de la cytotoxicité de la BSO et de la tBHQ par le test au MTT sur la lignée Neuro-2a

Les effets cytotoxiques de la BSO et de la tBHQ après une durée d'exposition de 24 heures des cellules Neuro-2a ont été évalués par un test au MTT (Figure 33).

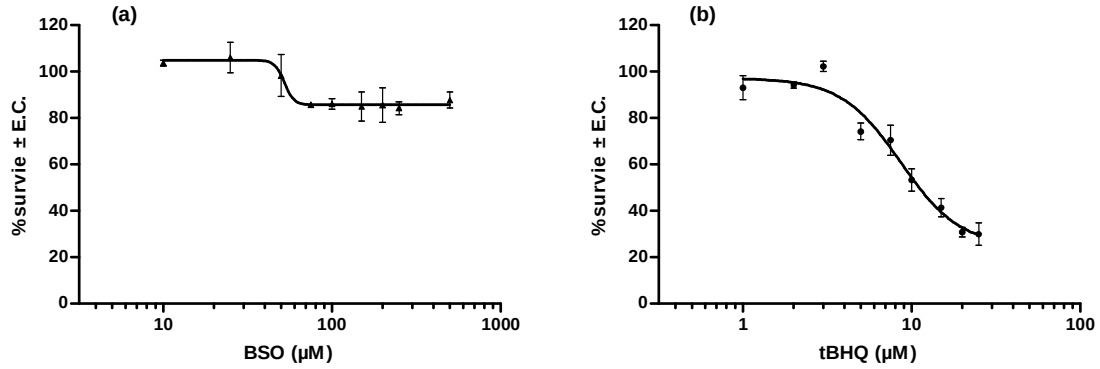


Figure 33 : Effets de la BSO (a) et de la tBHQ (b) sur la survie des cellules Neuro-2a exposées pendant 24 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie (± écarts-types) par rapport au contrôle et correspondent à la moyenne de deux expériences réalisées en triplicats.

Dans nos conditions expérimentales, la BSO est considérée comme non cytotoxique (% survie ≥ 80% pour des concentrations allant de 10 à 500 µM).

Pour la tBHQ, une CE_{50} de 8,6 µM a été déterminée, mettant ainsi en évidence un potentiel cytotoxique de ce composé.

IV.3.2. Evaluation de l'effet de la BSO et de la tBHQ sur le taux de GSH

Les effets de la BSO (inhibiteur de la synthèse de GSH) et de la tBHQ (inducteur de la synthèse de GSH) sur le taux de GSH des cellules Neuro-2a ont été évalués après 24 heures d'exposition des cellules Neuro-2a à l'une ou l'autre molécule. Les résultats obtenus exprimés en pourcentage de fluorescence par rapport au contrôle sont présentés sur la figure 34.

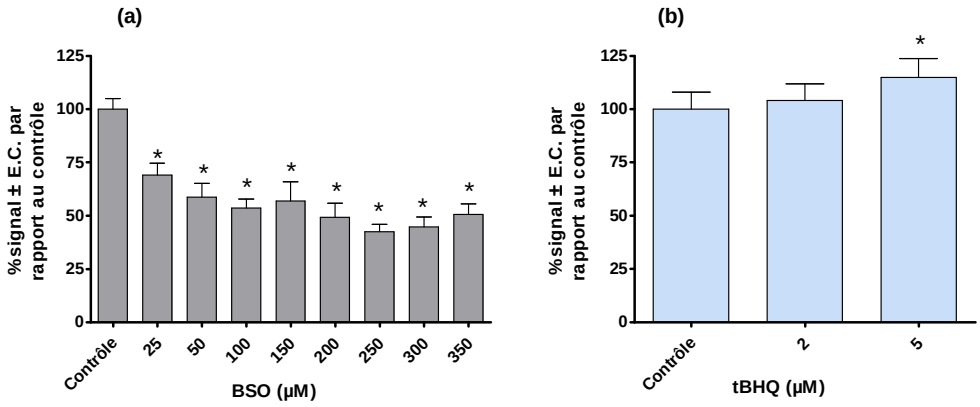


Figure 34 : Evolution du taux de GSH des cellules Neuro-2a exposées pendant 24 heures à la BSO (a) ou à la tBHQ (b). Les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence (± écarts-types) par rapport au contrôle et correspondent à la moyenne de deux expériences réalisées en quintuplicats.
* indique une différence significative à $p<0,05$ par rapport au contrôle.

Le pourcentage de fluorescence mesuré après traitement des cellules avec des concentrations de BSO allant de 25 à 350 µM est significativement plus faible que pour le contrôle, mettant ainsi en évidence une diminution du taux de GSH dans les cellules.

Dans les cellules traitées avec des concentrations non cytotoxiques de tBHQ (*i.e.* 2 et 5 µM), seule la concentration à 5 µM permet d'obtenir un pourcentage de fluorescence significativement plus élevé que le contrôle.

Les concentrations de 100 µM de BSO et de 5 µM de tBHQ a donc été choisies pour la suite des expériences comme témoignant respectivement d'un effet inhibiteur de la BSO sur le taux de GSH et d'un effet inducteur de la tBHQ sur le taux de GSH.

IV.3.3. Evaluation de l'effet du SPX-dC et de l'OA sur le taux de GSH des cellules Neuro-2a

Nous avons évalué l'effet du SPX-dC et de l'OA sur le taux de GSH après 24 heures d'exposition des cellules Neuro-2a et comparé ces résultats avec ceux obtenus pour les deux marqueurs de stress BSO et tBHQ. La figure 35 montre que le SPX-dC et l'OA induisent une baisse significative du taux de GSH par rapport au contrôle.

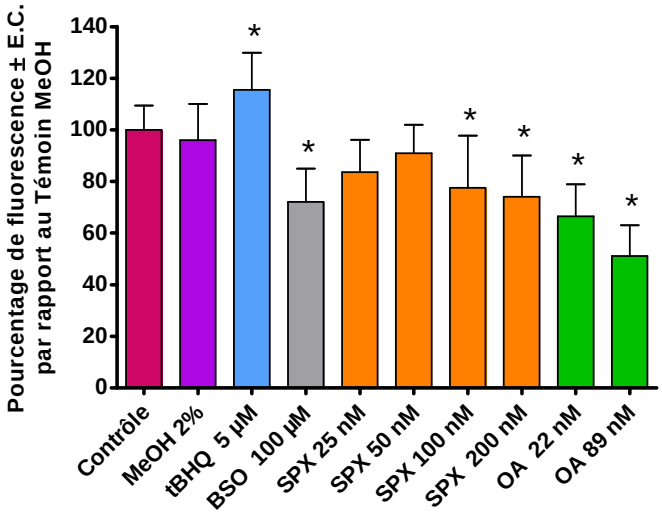


Figure 35 : Evolution du taux de GSH des cellules Neuro-2a exposées pendant 24 heures à tBHQ, à BSO, à SPX-dC et à OA. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence (± écarts-types) par rapport au contrôle et correspondent à la moyenne de trois expér iences réalisées en quintuplicats. * indique une différence significative à $p<0,05$ par rapport au contrôle.

Les deux plus fortes concentrations de SPX-dC testées (100 et 200 nM) permettent d'obtenir un pourcentage de fluorescence significativement différent du contrôle MeOH. L'OA provoque une diminution significative de GSH dès la plus faible concentration testée (22 nM).

IV.4. Effets du SPX-dC et de l'OA sur les changements de potentiel de membrane mitochondriale sur la lignée Neuro-2a

La concentration optimale de Mitotracker Red a été déterminée sur la lignée Neuro-2a en testant des concentrations allant de 10 à 2000 nM. Une coloration optimale a été obtenue pour une concentration de 750 nM de Mitotracker Red.

Dans nos conditions expérimentales, l'OA provoque une diminution du potentiel de membrane mitochondriale alors que le SPX-dC n'a pas d'effet significatif sur le potentiel de membrane mitochondriale des cellules Neuro-2a exposées pendant 24 heures (Figure 36).

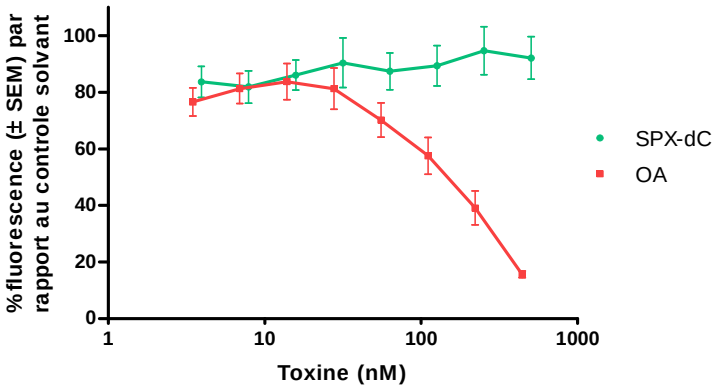


Figure 36 : Effets de l'OA et du SPX-dC sur le potentiel de membrane mitochondriale des cellules Neuro-2a exposées 24 heures aux toxines. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence (± SEM) par rapport au contrôle solvant et correspondent à la moye nne de quatre expériences réalisées en triplicats.

IV.5. Effet du SPX-dC et de l'OA sur la fragmentation des acides nucléiques sur la lignée Neuro-2a

Les cellules Neuro-2a ont été exposées pendant 30 min et 45 min à une gamme de SYTO13 afin de déterminer la concentration et la durée d'incubation permettant d'obtenir le ratio I_{fin}/I_{ini} le plus élevé. Une concentration de SYTO13 de 2 µM appliquée pendant 30 min aux cellules a été retenue.

Dans ces conditions, le SPX-dC ne provoque pas de fragmentation des acides nucléiques des cellules Neuro-2a (Figure 37) alors que pour l'OA, une CE_{50} de 49 nM a été déterminée, confirmant l'effet de l'OA sur la fragmentation des acides nucléiques.

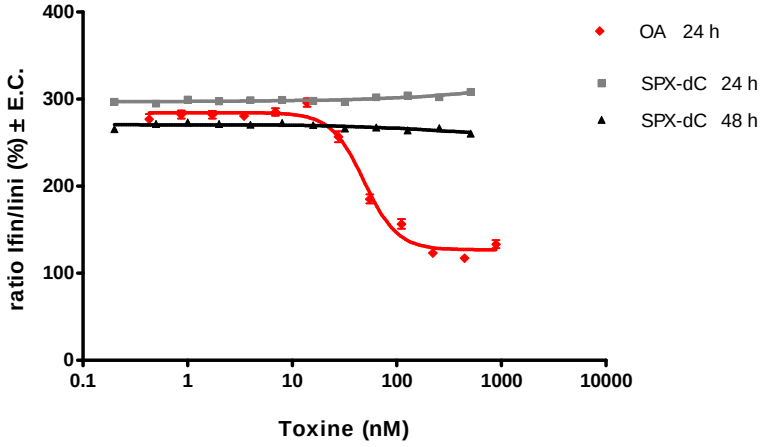


Figure 37 : Effets du SPX-dC et de l'OA sur la fragmentation des acides nucléiques des cellules Neuro-2a exposées pendant 24 ou 48 heures. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un ratio d'intensité de fluorescence finale après illumination des cellules par rapport à la fluorescence initiale et correspondent à la moyenne de deux expériences réalisées en triplicats.

V. Discussion

Notre étude nous a permis, dans nos conditions expérimentales, de mettre en évidence les points suivants (résumés sur la figure 38) :

- le SPX-dC n'est pas cytotoxique sur les lignées cellulaires Neuro-2a et M1WT3 exprimant toutes deux des récepteurs muscariniques de l'ACh,

- le test de cytotoxicité classique au MTT n'a pas permis de mettre en évidence un effet antagoniste ou synergique du SPX-dC avec l'atropine, la méthacholine ou la néostigmine,

- le SPX-dC induit un stress oxydant mis en évidence dans notre étude par une baisse significative du taux de GSH,

- -le SPX-dC n'induit pas de fragmentation des acides nucléiques.

Le fait que le SPX-dC induit une baisse du taux de GSH permet de montrer que la toxine pénètre dans la cellule et qu'elle est reconnue comme un composé xénobiotique, ce qui peut enclencher le processus de détoxification.

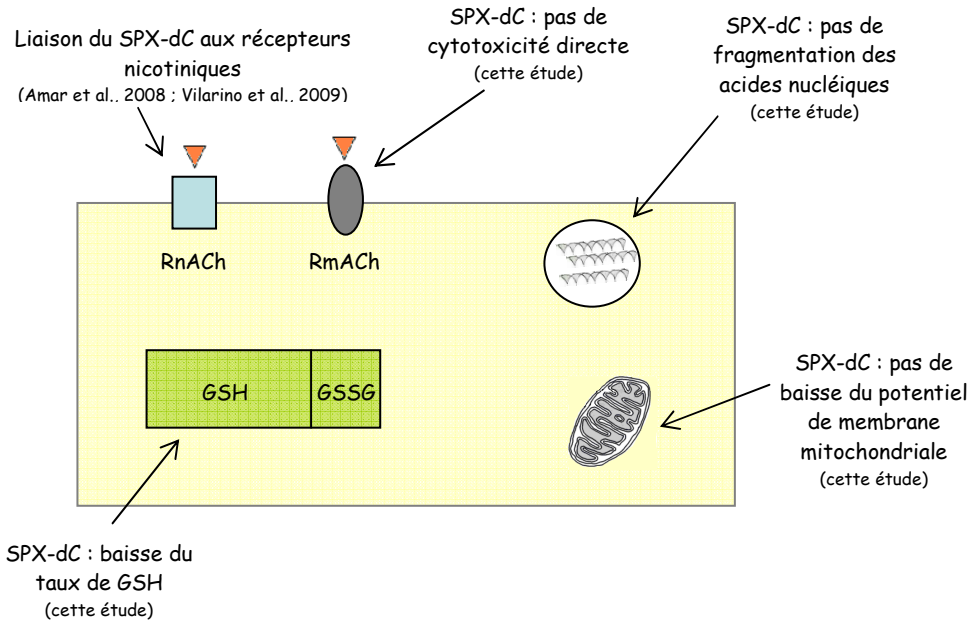


Figure 38 : Schéma récapitulatif des effets du SPX-dC à l'échelle cellulaire

Effets cytotoxiques du SPX-dC

La solution commerciale de SPX-dC a une concentration de 10 µM dans le méthanol. Afin de pouvoir considérer comme négligeable l'effet cytotoxique de ce solvant sur les cellules, une dose maximale de 5% de MeOH a été utilisée, correspondant à une concentration maximale de SPX-dC de 500 nM.

Après traitement des cellules Neuro-2a et M1WT3 pendant 24 ou 48 heures avec le SPX-dC, aucun effet cytotoxique significatif n'a pu être mis en évidence ni avec le test au MTT, ni avec l'Alamar Blue pour des concentrations en toxine allant jusqu'à 500 nM.

Ces deux indicateurs de cytotoxicité sont réduits par des enzymes mitochondriales (Mosmann, 1983 ; O'Brien et al., 2000). La cytotoxicité mesurée avec le MTT ou l'Alamar Blue en réponse à un toxique peut donc être interprétée comme la résultante d'une atteinte mitochondriale bien que Gonzalez et Tarloff (2001) aient montré que ces deux réactifs étaient également réduits par des enzymes cytosoliques et donc pouvaient refléter un stress plus global.

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'absence de réponse cytotoxique au SPX-dC mise en évidence sur les lignées Neuro-2a et M1WT3 est donc compatible avec le mode d'action envisagé du SPX-dC. Si on considère que le SPX-dC se lie aux récepteurs nicotiniques ou muscariniques, l'absence de cytotoxicité montre que des processus de compensation des flux ioniques sont sans doute mis en place par la cellule. On peut donc se poser la question du nombre et du (ou des) type(s) de récepteurs présents dans les lignées cellulaires utilisées ainsi que des configurations de fixation de la toxine à ces récepteurs.

En effet, à l'échelle cellulaire, la liaison du SPX-dC sur les récepteurs nicotiniques de l'ACh peut avoir comme effet une modulation des flux ioniques (Na^+, Ca^{2+}, K^+) qui, compensée par d'autres mécanismes, n'aurait pas d'effet de cytotoxicité directe. Une affinité du SPX-dC pour des récepteurs muscariniques (Gill et al., 2003) peut entraîner, en fonction du sous-type de récepteur impliqué, une modulation de l'activité de la phospholipase C ou de l'adénylate cyclase (*cf*. Figure 8) et donc des effets sur le taux d'inositol triphosphate, le taux de Ca^{2+} ou la quantité d'AMPc, ces paramètres pouvant eux-mêmes être soumis à d'autres types de régulations.

Effet du SPX-dC sur le taux de GSH

L'exposition des cellules Neuro-2a pendant 24 heures au SPX-dC provoque une baisse significative du taux de GSH. Dans nos conditions expérimentales, l'OA et la BSO conduisent au même type de résultat. S'il est à présent bien connu que la BSO inhibe l'enzyme clé de la synthèse du GSH (Hamilton et al., 2007), l'effet de l'OA sur la voie de biosynthèse du GSH n'a, à notre connaissance, pas été investigué. Il est donc actuellement impossible de savoir si la déplétion en GSH observée suite au traitement des cellules avec le SPX-dC ou l'OA est la conséquence d'une inhibition de la synthèse de GSH ou d'une consommation accrue de GSH, signe d'une métabolisation de ce composé dans le processus de détoxification.

Afin de s'assurer que la déplétion en GSH corresponde bien à une consommation plus importante sous l'effet du stress induit par la toxine, il serait intéressant de mesurer l'activité des enzymes impliquées (e.g. la glutathion peroxydase) dans le cycle redox du GSH/GSSG.
Si l'on se replace dans le schéma général du processus de détoxification des xénobiotiques (phase I de modification, phase II de conjugaison et phase III d'élimination), il pourrait également être intéressant d'étudier le métabolisme cellulaire du SPX-dC en utilisant par exemple une lignée cellulaire d'hépatocytes (le foie étant considéré comme l'organe détoxifiant principal). Cela permettrait dans un premier temps de caractériser la voie principale de détoxification (e.g. cytochromes P450, glutathion-S-transférase) en recherchant les conjugués formés par spectrométrie de masse. Cette approche a permis par exemple à Radwan et Ramsdell (2006) de montrer que la brévétoxine PbTx-2 est métabolisée par deux voies différentes : activation de cytochromes P450 et conjugaison au GSH grâce à la glutathion-S-transférase aboutissant à la formation de conjugués PbTx-2-cysteinyle[2].

Effet du SPX-dC sur les processus d'apoptose

Sur la lignée Neuro-2a, dans nos conditions expérimentales, le SPX-dC ne provoque pas de baisse du potentiel de membrane mitochondriale (mis en évidence avec le Mitotracker Red) ni de fragmentation des acides nucléiques (mis en évidence avec le SYTO13).

Spirolide, gymnodimine et acide okadaïque

Pour évaluer l'effet de doses supérieures sur les paramètres évoqués précédemment, une approche consisterait à évaporer la solution commerciale afin de la concentrer et de pouvoir tester des concentrations de SPX-dC allant jusqu'à 10 µM. Au-delà du coût représenté par une telle approche, l'intérêt semble limité. En effet, Dragunow et al. (2005) ont mis en évidence l'absence de cytotoxicité (test au MTT) de la gymnodimine (GYM), autre toxine à action rapide comportant le motif imine cyclique et agissant sur les récepteurs nicotiniques de l'ACh (Kharrat et al., 2008), sur la lignée Neuro-2a pour des concentrations allant jusqu'à 10 µM. Ils ont en revanche montré que les cellules sensibilisées avec un prétraitement à la GYM (10 µM pendant 24 heures) étaient plus sensibles à l'acide okadaïque (100 nM) que les cellules non pré-exposées (mortalité cellulaire plus élevée et augmentation du nombre de cellules apoptotiques) mais ne précisent pas si cet effet est spécifique. Les résultats de Dragunow et al. (2005) semblent mettre en évidence un effet synergique de la GYM sur le processus apoptotique induit par l'OA. Il pourrait donc être intéressant, dans le cas de SPX-dC, d'explorer les effets apoptotiques (e.g. modifications de la morphologie cellulaire,

fragmentation de l'ADN) avec un temps d'exposition des cellules et des concentrations en toxine plus élevés et également en combinaison avec l'OA.

Chapitre 5

Discussion générale et perspectives

Les efflorescences phytoplanctoniques ont augmenté en fréquence et en intensité ces dernières années, notamment en relation avec les changements climatiques (e.g. Miraglia et al., 2009) et l'eutrophisation des milieux aquatiques (Heisler et al., 2008). Dans ce contexte, sont mises en évidence d'une part de nouvelles espèces responsables d'efflorescences productrices de toxines connues et de nouvelles toxines, et, d'autre part, de nouvelles toxines ou des toxines connues affectant de nouvelles zones littorales.

Ce travail de thèse s'inscrit dans l'approche globale qui vise, sur la base des outils complémentaires que sont les tests de toxicité *in vivo*, les tests cellulaires *in vitro* et les analyses chimiques, à apporter des connaissances permettant de mieux identifier voire caractériser le danger pour l'homme représenté par les toxicités nouvelles ou émergentes. Notre démarche s'appuie sur la caractérisation des réponses obtenues sur un modèle cellulaire exposé à des neurotoxines connues présentant différents modes d'action. L'objectif est de disposer d'une batterie de tests *in vitro* qui permette de cribler l'effet de toxines inconnues sur des modèles dont les réponses ont été caractérisées préalablement. Les principaux résultats obtenus au cours de ce travail de thèse ont été discutés dans les sections « Discussion » des différents chapitres. Dans ce chapitre final, ils seront replacés dans un contexte plus général en essayant d'évaluer leurs apports et leurs limites vis à vis de la problématique des toxines produites par des efflorescences phytoplanctoniques et des moyens permettant d'apprécier le risque pour l'homme.

L'évaluation du risque est un objectif qui ne peut être mené que sur le long terme au vu de la complexité des processus mis en jeu. Afin de contribuer à cette évaluation, nous nous sommes focalisés sur la caractérisation des réponses de modèles cellulaires pour lesquels nous disposons déjà d'un certain nombre de connaissances. C'est une étape qui doit être considérée dans une démarche plus globale, et, l'une des perspectives est d'élargir à d'autres types de toxicité (e.g. hépatotoxicité, toxicité du développement, génotoxicité, immunotoxicité) afin de mettre en place une batterie de modèles cellulaires et de marqueurs spécifiques de chaque type de toxicité. L'interprétation des résultats donnera, selon les lignées et les marqueurs, des informations sur les cibles des toxiques à identifier, permettant une meilleure appréciation du risque associée à ces toxiques.

Un certain nombre d'éléments et d'étapes sont essentiels pour définir une batterie de tests *in vitro*. Le choix des modèles cellulaires et des marqueurs utilisés sont des éléments clés quelque soit le type de toxicité testée. Par ailleurs, l'obtention de réponses robustes des modèles cellulaires ne peut être garantie qu'à la condition de respecter une démarche

méthodologique rigoureuse et valide statistiquement. L'un des attendus d'une telle démarche peut être la mise en place d'un arbre décisionnel.

La cellule peut être considérée comme un ensemble intégratif des processus cellulaires et moléculaires en réponse à un effet toxique. Elle constitue donc un modèle intéressant pour étudier les effets de composés toxiques. D'un point de vue fondamental, l'utilisation des cultures cellulaires a notamment contribué à améliorer les connaissances concernant le mode d'action et les effets cellulaires de substances toxiques, en particulier des toxines phytoplanctoniques (*cf.* Chapitre 1). De plus, dans un contexte plus appliqué, différentes études ont montré que les cultures cellulaires utilisées comme système de base de tests fonctionnels peuvent permettre d'évaluer le niveau de toxicité d'un échantillon (e.g. Jellett et al., 1992 ; Louzao et al., 2001 ; Truman et al., 2002 ; Pierrotti et al., 2003).

Eléments de maîtrise des aspects méthodologiques

Les lignées cellulaires permettent de travailler dans des conditions physico-chimiques contrôlées, ce qui permet de conserver des conditions de fidélité entre plusieurs séries de manipulations. De plus, la variabilité liée à l'utilisation des lignées cellulaires est considérée comme plus faible que celle inhérente à la variabilité inter-individuelle lors d'essais sur animaux (Harry et al., 1998). Néanmoins, afin de conforter les résultats obtenus sur les lignées cellulaires, il est nécessaire d'adopter une démarche de «pré-validation » des résultats obtenus. La validation d'une méthode est définie comme étant le processus par lequel la fiabilité et la pertinence d'une méthode sont établis (e.g. Spielmann et al., 2008) (Encart 7).

Un des pré-requis pour le développement de tests sur lignées cellulaires est d'évaluer la variabilité des réponses obtenues pour chacune des toxines étudiées. Dans le cadre de la thèse, la prise en compte de cet aspect par des analyses statistiques a été facilitée par le travail en format microplaque qui permet d'effectuer un nombre suffisant de réplicats tout en consommant une quantité limitée de toxine. Afin de s'affranchir de la variabilité inter-plaques, les densités optiques mesurées sont converties en pourcentages de survie par rapport au contrôle. Ces données sont ensuite ajustées à un modèle sigmoïde plutôt qu'à un modèle linéaire (Jellett et al., 1992 ; 1995 ; Truman et al., 2002) car l'ajustement des données est moins subjectif et permet de prendre en compte la totalité des points des courbes dose - réponse obtenues.

Encart 7 - Démarche permettant de valider une méthode *in vitro*

Selon Balls et al. (1990), il y a quatre phases essentielles pour valider une méthode :

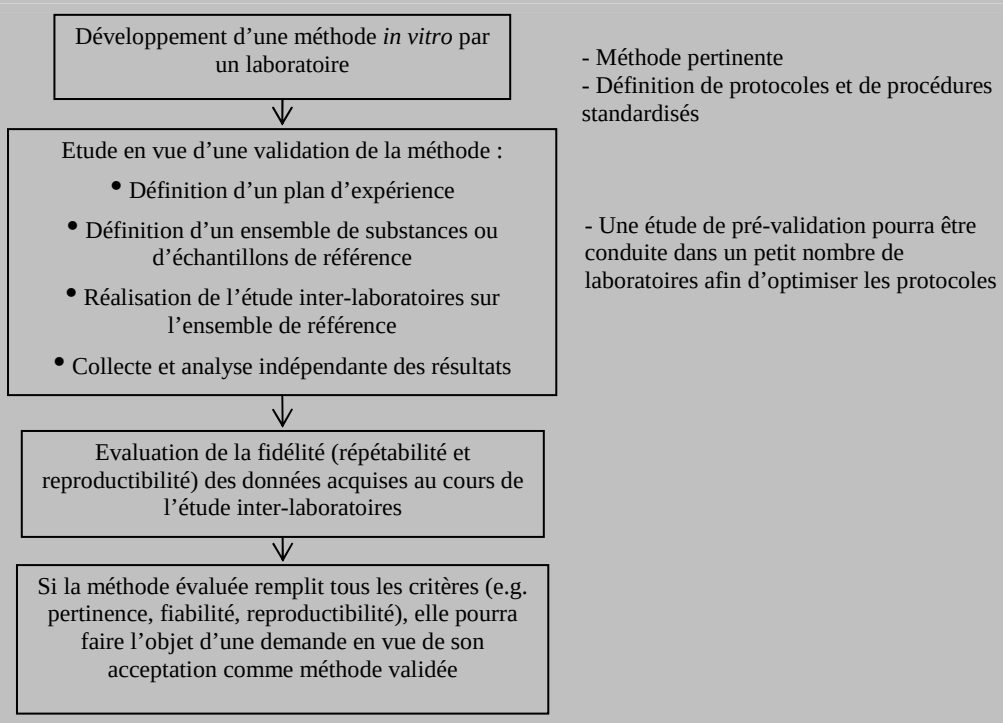


Schéma simplifié d'après Bruner et al. (1996)

L'une des perspectives de ce travail de thèse pourrait consister en la pré-validation, à l'échelle d'un petit nombre de laboratoires, du test sur la lignée de Neuro-2a qui permet, en fonction des conditions expérimentales, de détecter trois familles de neurotoxines (STXs, PbTXs et PlTXs). En 1998, une étude inter-laboratoires d'envergure internationale a été tentée par Jellett et al. (1998) pour un kit prêt à l'emploi (MIST™ Shippable Cell Bioassay for PSPs) permettant la détection des STXs dans les coquillages et reposant sur l'utilisation de cellules en culture. Cette tentative n'a pas abouti, probablement en raison de l'instabilité des cultures de cellules pendant le transport.

Importance de la connaissance des cibles cellulaires pour le développement de tests fonctionnels

Notre étude s'appuie sur la connaissance des cibles cellulaires pour la détection spécifique de différentes familles de neurotoxines et la mise au point de tests fonctionnels. Ceux-ci reposent sur la reconnaissance spécifique par un récepteur de ligands possédant une structure chimique particulière. Les méthodes fonctionnelles permettent donc de détecter et de quantifier tous les analogues d'une famille de toxines partageant le même mécanisme d'action et d'exprimer le résultat de toxicité sous la forme d'équivalent toxine.

Nos résultats concernant la famille des saxitoxines (Article 1) ont démontré l'intérêt du test basé d'une part, sur l'utilisation de la lignée cellulaire Neuro-2a et d'autre part, sur l'antagonisme des effets entre les STXs et le couple ouabaïne/vératridine pour la détection d'analogues de STXs d'origine phytoplanctonique différente de celle pour lequel le test avait été conçu initialement (e.g. Manger et al., 1993 ; Jellett et al., 1992).

La connaissance de la cible cellulaire des PlTXs nous a permis de proposer un test fonctionnel basé sur l'utilisation de la même lignée cellulaire, les Neuro-2a et sur l'antagonisme entre les effets de l'ouabaïne et ceux des PlTXs sur la pompe Na^+,K^+-ATPase (Article 3).

Dans le cas où la cible cellulaire n'est pas identifiée, différents paramètres doivent être pris en compte. Le choix du (ou des) modèle(s) cellulaire(s) ainsi que des marqueurs de cytotoxicité représentent des étapes cruciales pouvant permettre d'identifier les mécanismes cellulaires impliqués, voire à terme les cibles cellulaires du composé étudié. En effet, dans un contexte de vigilance face à l'apparition d'une toxicité nouvelle ou émergente mise en évidence avec le bioessai sur souris, l'approche complémentaire consistera à tester les extraits d'intérêt sur une batterie de tests *in vitro*. L'intégration des résultats de l'ensemble des approches complémentaires (*in vivo*, *in vitro*, phytoplancton, omics, etc.) devrait permettre d'obtenir un maximum de données et de mieux évaluer le risque pour l'homme. Mais, la définition et la conception d'une telle batterie de tests est encore largement sujette à discussion.

Quel(s) modèle(s) cellulaire(s) choisir pour détecter une neurotoxicité?

La complexité du système nerveux en termes de structure et de fonction est telle qu'il est impossible de le réduire à une ou plusieurs lignées cellulaires (Harry et al., 1998). De façon générale, deux types cellulaires prédominent dans le système nerveux : les neurones et les cellules gliales.

Les cultures primaires de neurones de rat constituent le modèle de choix pour évaluer la neurotoxicité de composés (Costa, 1998 ; Harry et al., 1998). En effet, elles sont généralement considérées comme plus sensibles aux composés neurotoxiques que les lignées cellulaires classiques (LePage et al., 2005). Néanmoins, la reproductibilité des résultats obtenus sur des cultures primaires est souvent moins bonne que celle obtenue à partir de lignées cellulaires classiques (Costa, 1998). Toutefois, les lignées cellulaires étant obtenues à partir de cellules « transformées », les effets observés peuvent ne pas refléter exactement les effets obtenus sur les cellules non transformées.

Dans notre étude, nous avons essentiellement travaillé sur la lignée de neuroblastomes murins Neuro-2a. Ce choix repose sur le fait que c'est une lignée de cellules nerveuses exprimant des

canaux ioniques et des récepteurs et pouvant permettre de mesurer les fonctions métaboliques de base (e.g. Kogure et al., 1988 ; Costa 1998).

Dans le cadre de la directive REACH qui vise notamment à combler le déficit de connaissance sur les risques environnementaux et sanitaires de 30000 substances chimiques utilisées dans divers secteurs industriels, les méthodes alternatives aux essais *in vivo* sont privilégiées. Cela a eu pour conséquence d'initier une réflexion sur la stratégie *in vitro* à adopter pour détecter des composés neurotoxiques pouvant avoir un impact sur l'homme. Dans ce contexte, Gartlon et al. (2006) ont proposé d'utiliser des cultures primaires de cellules granuleuses de cervelet de rat (caractère neuronal fort) et la lignée cellulaire PC12 (issue d'une tumeur de glande médullo-surrénale de rat) à l'état différencié (caractère neuronal marqué) et indifférencié (caractère neuronal faible) en association avec des tests permettant, selon ces auteurs, d'évaluer l'effet neurotoxique de divers composés chimiques (potentiel de membrane mitochondriale, production d'espèces réactives de l'oxygène, production d'ATP). L'hypothèse testée est qu'une plus grande sensibilité des modèles cellulaires de type neuronal mettrait en évidence un composé à potentiel neurotoxique. Mais, compte tenu des réponses cytotoxiques étudiées qui sont non spécifiques, la stratégie proposée par Gartlon et al. (2006) n'a pas permis de distinguer dans tous les cas les composés neurotoxiques des composés cytotoxiques et il est donc souhaitable de prendre en considération d'autres marqueurs de neurotoxicité.

Quoiqu'il en soit, il est nécessaire pour évaluer un effet neurotoxique, de procéder en plusieurs étapes permettant d'aller de la recherche d'une cytotoxicité générale vers la mise en évidence d'une neurotoxicité au moyen de tests spécifiques sur différents types cellulaires incluant d'une part des lignées de cellules nerveuses, des cultures primaires neuronales ou gliales et d'autre part des lignées de cellules non nerveuses (Costa et al., 2007 ; Bal-Price et al., 2008).

Quels marqueurs de neurotoxicité utiliser ?

Lorsque la cible cellulaire d'une substance toxique n'est pas connue, la première étape pour en caractériser l'effet *in vitro* est d'évaluer son potentiel cytotoxique. Plusieurs marqueurs de cytotoxicité peuvent être utilisés :

- des marqueurs du métabolisme (e.g. le MTT, l'Alamar Blue) permettant d'évaluer la viabilité,

- des marqueurs de l'intégrité membranaire (e.g. le détachement des cellules adhérentes, la libération de la LDH, l'incorporation du rouge neutre dans les lysosomes),
- des marqueurs permettant d'apprécier l'inhibition de la prolifération cellulaire (e.g. le nombre de cellules, la quantité de protéines, la quantité d'acides nucléiques, l'inhibition de la synthèse d'ADN).

Ces marqueurs de cytotoxicité classiques ne permettent pas de mettre en évidence de façon spécifique un effet neurotoxique. En effet, de nombreux composés neurotoxiques exercent leur neurotoxicité sans pour autant avoir d'effet sur la mortalité cellulaire. Cependant, le criblage rapide d'effets neurotoxiques *in vitro* doit commencer par une estimation de l'effet cytotoxique du composé afin de déterminer une CE_{50} ou une CE_{20} (Bal-Price et al., 2008 ; Forsby et al., 2009). Dans un second temps, des fonctions cellulaires essentielles doivent être testées (e.g. métabolisme énergétique, stress oxydant, homéostasie calcique). Enfin, des tests spécifiques des fonctions neuronales mais plus difficiles à mettre en œuvre dans des laboratoires non spécialisés tels que la croissance axonale, la neurotransmission, l'activité électrique, l'activation de récepteurs et de canaux spécifiques peuvent être envisagées. L'emploi d'inhibiteurs ou d'activateurs jouant sur des cibles précises (récepteurs de médiateurs, pompe Na^+,K^+-ATPase) intervenant dans la transmission nerveuse permet de moduler les réponses de manière significative.

Réponses des modèles cellulaires : d'un composé pur à une matrice complexe

Les marqueurs de cytotoxicité et ceux spécifiques d'une neurotoxicité sont sensibles et généralement utilisés pour évaluer l'effet d'une substance pure, comme c'est le cas dans la directive REACH.

Plusieurs études ont montré que les marqueurs de cytotoxicité classiques tels que le MTT (e.g. Jellett et al., 1992 ; Truman et al., 1996 ; Humpage et al., 2007 ; Ledreux et al., 2009), la libération de la LDH (Bellocci et al., 2008), et l'Alamar Blue (Espina et al., 2009) peuvent être utilisés pour détecter et quantifier des toxines phytoplanctoniques présentes dans des matrices complexes. Les marqueurs spécifiques de la neurotoxicité cités précédemment n'ont, à notre connaissance, pas été testés dans le contexte de la détection de toxines contaminant des matrices complexes telles que des efflorescences phytoplanctoniques ou de la chair de coquillages.

Les extraits préparés à partir de ces deux types de matrices contiennent un grand nombre de composés co-extraits qui peuvent interférer avec les analyses et notamment avec les tests sur lignées cellulaires.

Les extraits d'efflorescences contiennent, par rapport aux extraits de coquillages ou de poissons, moins de composés susceptibles de provoquer un effet matrice sur les lignées cellulaires. Par ailleurs, le solvant d'extraction utilisé conditionne la nature des composés co-extraits (pigments, protéines, lipides, phospholipides, etc.).

Dans nos conditions expérimentales nous avons montré que la limite de détection pour les STXs du test sur Neuro-2a permet de détecter 5 µg éq.STX par g de lyophilisat d'efflorescence naturelle (Article 1). Sur les souches non axéniques d'*Aphanizomenon gracile* obtenues après isolement, le test Neuro-2a a une limite de détection de 0,4 pg éq.STX par cellule (Article 2). Lors de l'étude des extraits d'*Ostreopsis* contenant des PlTXs (Article 3), un effet cytolytique direct visible en microscopie optique des extraits a été observé. Un effet similaire a été rapporté par Jellett et al. (1992) et Alvito et al. (2000). Il s'avère donc nécessaire de travailler les extraits d'efflorescences phytoplanctoniques avec une large gamme de dilutions sur la microplaque de façon à s'affranchir de cet effet sans pour autant perdre en sensibilité puisqu'une dilution de l'extrait au quart suffit généralement pour s'affranchir de l'effet cytolytique.

L'effet cytolytique des extraits de coquillages sur les lignées cellulaires a également été décrit dans la littérature (e.g. Jellett el al., 1992 ; Caillaud et al., 2009). Il est attribuable en partie aux acides gras libres co-extraits qui perturbent les membranes cellulaires. Un effet cytotoxique (e.g. altérations des niveaux d'actine, quantité d'ADN) sur la lignée MCF-7 d'extraits d'hépatopancréas de moules non contaminées a également été mis en évidence par Malaguti et al. (2002b).

Il est donc important de considérer la quantité d'équivalent chair de coquillage qui est ajoutée aux cellules. En effet, dans l'article 3, nous n'avons observé qu'un effet matrice faible (*cf.* Fig. 4, Article 3) car la quantité de chair de coquillages déposée sur les cellules équivalait à un mg de chair totale. Des expériences ultérieures ont montré que les CE_{50} pour des extraits d'hépatopancréas de moules et d'huîtres, obtenus après une extraction spécifique des toxines lipophiles, sont de l'ordre de 10 $mg.mL^{-1}$. L'effet matrice étant lié à la préparation des extraits, il est difficile de comparer différentes études entre elles car les méthodes de préparation des extraits de coquillages diffèrent d'un laboratoire à l'autre. De plus, des différences ont également été mises en évidence entre des extraits provenant de moules et des

extraits issus d'huîtres, mettant en évidence la complexité des réponses induites par ces deux types de matrices.

Afin d'évaluer l'effet matrice d'extraits de nature différente, de manière prospective, nous avons travaillé avec des extraits de chair de poisson supplémentés avant extraction avec des quantités de PbTx-3 proches du seuil réglementaire, à savoir 800 µg éq.PbTx-3 par kg de chair. Deux méthodes d'extractions ont été utilisées (*cf.* Annexe 4). Les résultats obtenus, bien que préliminaires, ont montré que dans nos conditions expérimentales, le test Neuro-2a est sensible à la PbTx-3 présente dans les extraits de chair de poisson. Toutefois, une variabilité importante a été observée (allant de 11 à plus de 60% en fonction des lots d'extraits), mettant en avant l'importance des procédures d'extraction de façon à s'affranchir au maximum des effets cytotoxiques de matrices complexes.

L'une des façons de s'affranchir des effets des composés co-extraits est d'appliquer une procédure de clean-up qui permet d'éliminer en partie des interférences liées aux composés co-extraits. Le tableau XIV résume quelques procédures décrites dans la littérature.

Tableau XIV : Exemples de procédures de clean-up d'extraits de coquillages (*) et de culture de dinoflagellés (#) décrites dans la littérature

Famille de toxines	Procédure testée	Intérêt	Références
Saxitoxines *	Filtration cut-off 10 kD	Aucun	Jellett et al. (1992)
	SPE-C18 avec élution en conditions acides	Elimination des interférences sur test Neuro-2a	
Toxines lipophiles *	SPE Strata™-X avec élution en conditions acides	Réduction des interférences en LC-MS/MS	Gerssen et al. (2009)
Ciguatoxines et maïtotoxine #	Fractionnement sur SPE Florisil™ avec élution hexane/acétone/méthanol	Isolement de fractions contenant des CTXs et d'autres contenant MTX pour test Neuro-2a	Caillaud et al. (2009)

Les procédures de clean-up ont montré leur intérêt pour éliminer les composés interférents des extraits de coquillages, permettant ainsi une meilleure détermination des quantités de toxines connues présentes dans les extraits.

Dans un contexte de vigilance face à l'apparition d'une toxicité de nature inconnue, le fractionnement bio-guidé sur lignées cellulaires des extraits bruts doit permettre la séparation des fractions toxiques et l'isolement de l'agent responsable de la toxicité observée.

L'extraction et la purification des extraits sont donc des étapes clés pour une utilisation des modèles cellulaires comme méthodes complémentaires aux bioessais sur souris et aux techniques analytiques. Suite à ce travail de thèse, une des perspectives serait d'appliquer des

procédures de purification sur des extraits de coquillages contenant des PlTXs afin d'optimiser le rendement d'extraction.

Stratégies d'étude pour une évaluation du risque pour l'Homme

Les tests de cytotoxicité classiques (e.g. viabilité cellulaire, intégrité membranaire) appliqués à l'étude de composés hépatotoxiques sur la lignée cellulaire d'origine humaine HepG2 ont une faible concordance avec la toxicité de ces composés chez l'homme (O'Brien et al., 2006). Cela est probablement lié au fait que ces tests conventionnels ciblent des processus cellulaires tardifs lorsque la cellule est proche de la mort. Des tests qui permettraient d'obtenir des informations sur les mécanismes cellulaires précoces mis en jeu par la cellule exposée à un toxique devraient avoir un potentiel prédictif plus élevé. En utilisant une technique de microscopie à épifluorescence, O'Brien et al. (2006) ont mis en évidence que la mesure du stress oxydant par l'estimation du taux de GSH ainsi que le potentiel de membrane mitochondriale, la quantité d'ADN et la perméabilité de la membrane plasmique représentent de bons indicateurs permettant de prédire, pour 80 à 90% des drogues testées, un potentiel hépatotoxique chez l'homme.

Une autre option qui est largement étudiée en recherche repose sur les « omics ». Cette approche permet d'obtenir la signature d'un toxique après exposition d'un modèle cellulaire défini. Pour l'étude des toxines environnementales, l'approche « toxicogénomique » a été développée il y a une dizaine d'années (Nuwaysir et al., 1999). Dans ce contexte, la toxicogénomique a trois objectifs principaux : (i) découvrir des marqueurs biologiques d'intérêt reflétant l'exposition à un toxique donné, (ii) examiner le mécanisme d'action à l'échelle moléculaire de toxiques et (iii) mieux comprendre les relations entre les maladies de l'homme et l'interaction gène-environnement.

Lorsque des cellules sont exposées à un toxique, elles répondent en modifiant l'expression de certains gènes, modifiant par conséquent le niveau des protéines liées à ces gènes. La neurotoxicité par exemple est la conséquence de modulations de transports ioniques ou de transduction de signaux qui entrainent des activations ou inhibitions de voies métaboliques.

La génomique et la protéomique qui ont déjà été employées sur différents types cellulaires pour évaluer les changements liés à l'exposition à certaines phycotoxines (e.g. Ryan et al., 2007 ; Kellman et al., 2009) ont conduit à déceler des acteurs critiques de la toxicité induite. Ces techniques permettent d'acquérir un large panel de données sur les modifications

engendrées sur le génome ou le protéome par un toxique et peuvent fournir une empreinte spécifique du toxique étudié.

Ainsi, Twiner et al. (2008b) ont montré en utilisant des puces à ADN que l'AZA1 provoque une augmentation de la transcription des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol et des acides gras. Une étude récente en protéomique sur la lignée cellulaire SH-SY5Y (neuroblastomes humains) a montré que l'AZA1 provoque une surexpression de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique ainsi que de protéines régulant le cytosquelette tandis que des protéines impliquées dans la transcription, la traduction et la modification de protéines sont sous-exprimées (Kellman et al., 2009).

Encore peu développées pour des études de neurotoxicité, la protéomique et la génomique pourraient contribuer à mieux appréhender le mode d'action de composés toxiques et à terme aboutir à la mise au point de méthodes de détection spécifiques.

La spécificité de modification d'expression de marqueurs liée à une famille de neurotoxines devra être étroitement corrélée aux observations de modifications réalisées sur lignées cellulaires telles que celles observées lors de ce travail de thèse.

La génomique et l'utilisation de puces à ADN sont des outils en cours de développement en recherche pour la mise au point d'outils de surveillance relatifs non seulement aux espèces de microalgues toxiques mais aux effets toxiques induits par ces microorganismes.

Malgré l'intérêt de l'apport des modèles cellulaires et de l'approche « omics », il faut garder à l'esprit que l'extrapolation de la réponse pour conclure au risque pour l'homme est complexe et non directe.

L'utilisation des modèles cellulaires a pris de l'ampleur ces dernières années pour l'étude des toxines, et en particulier des phyco- et des cyanotoxines. Ce travail de thèse y contribue. Dans d'autres domaines tels que ceux de la cosmétique, la pharmacie et l'industrie chimique, les réponses des modèles cellulaires sont un support permettant d'évaluer la toxicité de nombreux composés.

Au vu de l'ampleur de la tâche, plusieurs organismes s'attachent à apporter des supports scientifiques, financiers, opérationnels pour promouvoir le développement et la validation de méthodes alternatives aux essais *in vivo* et en particulier pour le développement de tests cellulaires. Ainsi, la DG Recherche de la Commission Européenne a-t-elle récemment financé un programme nommé ACuteTox dans le cadre du 6ème PCRD (http://www.acutetox.org/). Ce programme vise (i) à acquérir des données toxicologiques *in vivo* et *in vitro* pour une analyse comparative, (ii) à identifier des facteurs qui influencent la corrélation entre la toxicité *in vitro*

et *in vivo* et définir un algorithme reliant les deux toxicités, (iii) à explorer des outils innovants et des modèles cellulaires pour identifier de nouveaux marqueurs et des stratégies pour mieux prédire la toxicité sur l'animal et humaine et enfin (iv) à construire une stratégie d'analyse *in vitro* automatisable, aboutissant à un modèle prédictif de toxicité aiguë.

Le centre européen de validation des méthodes alternatives (ECVAM) créé par la Commission européenne apporte son concours à ce type de projet, notamment pour soutenir l'effort de validation indispensable pour une application en recherche et *a fortiori* à large échelle.

Vu la complexité et l'ampleur des données nécessaires pour une telle validation, la contribution des travaux scientifiques présentés dans ce mémoire est un support indispensable aux programmes de validation. L'objectif est d'améliorer l'aide à la décision autour des services rendus par les écosystèmes aquatiques (lacustres ou côtiers) afin de protéger et d'informer les usagers des risques liés aux toxines phytoplanctoniques.

Références bibliographiques

Aas P, Eriksen S, Kolderup J, Lundy P, Haugen J-E, Skulberg OM, Fonnum F, 1996. Enhancement of acetyl choline release by homoanatoxin-a from *Oscillatoria formosa*. *Environ Toxicol Pharmacol* 2: 223-32.

Aasen J, MacKinnon SL, LeBlanc P, Walter JA, Hovgaard P, Aune T, Quilliam MA, 2005. Detection and identification of spirolides in Norwegian shellfish and plankton. *Chem. Res. Toxicol* 18: 509-515.

Aasen J, Hardstaff W, Aune T, Quilliam MA, 2006. Discovery of fatty acid ester metabolites of spirolide toxins in mussels from Norway using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrometry* 20: 1531-1537.

AFSSA, 2006. Rapport commun de l'AFSSA et de l'AFSSET. Risques sanitaires liés à la présence de cyanobactéries dans l'eau.
http://www.afsset.fr/upload/bibliotheque/956281926257495258460016195562/06_cyanobacteries_rapport_afsset.pdf

Alcala AC, Alcala LC, Garth JS, Yasumura D, Yasumoto T, 1988. Human fatality due the ingestion of the crab *Demania reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin. *Toxicon* 26: 105-107.

Alfonso A, Louzao M.C., Vieytes M.R., Botana L.M., 1994. Comparative study of the stability of saxitoxin and neosaxitoxin in acidic solutions and lyophilised samples. *Toxicon* 32: 1593-1598.

Alfonso A, De la Rosa L, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM, 2003. Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesteras activity - Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes. *Biochemical Pharmacology* 65: 193-208.

Aligizaki K, 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, 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.

Allingham JS, Miles CO, Rayment I, 2007. A structural basis for regulation of actin polymerization by pectenotoxins. *J. Mol. Biol.* 371: 959-970.

Alvarez G, Uribe E, Avalos P, Marino C, Blanco J, 2009. First identification of azaspiracide and spirolides in *Mesodesma donacium* and *Mulinia edulis* from Northern Chile. *Toxicon* doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.014

Alvito PC, Gallacher S, Gago A, Lawrence JF, Martins CA, Pereira P, Sam Bento F, Franca F, 2000. Application of the mouse neuroblastoma bioassay to the study of PSP toxins from Dinoflagellates and cyanobacteria; a comparison of data generated by the MNB assay to pre and post column HPLC. In: *Harmful Algae Blooms*, Intergovernmental Oceanographic Commisssion of UNESCO, Hobart, Tasmania, pp. 257-260.

Amar M, Araoz R, Servent S, Lecardeur S, Benoit E, Molgo J, 2008. Le 13-desméthyle spirolide C, une phycotoxine émergente qui bloque avec une haute affinité les récepteurs nicotiniques musculaire et neuronaux de l'acétylcholine. IXème colloque de la section 30 du CNRS « Thérapeutique, médicaments et bio-ingénierie : concepts et moyens »

Amzil Z, Vernoux J-P, Pottier I, 2001. Les principales classes de phycotoxines. In: *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Frémy J-M, Lassus P. (Eds), Editions Ifremer, Plouzané, pp. 159-188.

Amzil Z, Sibat M, Royer F, Masson N, Abadie E, 2007. Report on the first detection of pectenotoxin-2, spirolide-A and their derivatives in French shellfish. *Mar.Drugs* 5: 168-179.

Anderson DM, 2009. Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs). *Ocean and Coastal Management* 52: 342-347.

Antolovic R, Bruller H-J, Bunk S, Linder D, Schoner W, 1991. Epitope mapping by amino-acid-sequence-specific antibodies reveals that both ends of the α subunit of Na^+/K^+-ATPase are located on the cytoplasmic side of the membrane. *Eur. J. Biochem.* 199: 195-202.

Araoz R, Molgo J, Tandeau de Marsac N, 2009. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon* doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.036.

Ares IR, Louzao MC, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM, 2005. Actin cytoskeleton of rabbit intestinal cells is a target for potent marine phycotoxins. *Journal of Experimental Biology* 208: 4345-4354

Ares IR, Louzao MC, Espina B, Vieytes MR, O.Miles C, Yasumoto T, Botana LM, 2007. Lactone ring of pectenotoxins: a key factor for their activity on cytoskeletal dynamics. *Cellular Physiology and Biochemistry* 19: 283-292.

Aronstam RS, Witkop B, 1981. Anatoxin-a interactions with cholinergic synaptic molecules. *PNAS* 78: 4639-43.

Artigas P, Gadsby DC, 2004. Large diameter of palytoxin-induced Na/K pump channels and modulation of palytoxin interaction by Na/K pump ligands. *J. Gen. Physiol.* 123: 357-376.

Aune T, Sorby R, Yasumoto T, Ramstad H, Landsverk T, 2002. Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice. *Toxicon* 40: 77-82.

Aune T, Larsen S, Aasen JA, Rehmann N, Satake M, Hess P, 2007. Relative toxicity of dinophysistoxin-2 (DTX-2) compared with okadaic acid, based on acute intraperitoneal toxicity in mice. *Toxicon* 49: 1-7.

Aune T, Aasen JA, Miles CO, Larsen S, 2008. Effect of mouse strain and gender on LD_{50} of yessotoxin. *Toxicon* 52: 535-540.

Backer LC, Fleming LE, Rowan A, Cheng Y-S, Benson J, Pierce RH, Zaias J, Bean J, Bossart GD, Johnson D, Quimbo R, Baden DG, 2003. Recreational exposure to aerosolized brevetoxins during Florida red tide events. *Harmful Algae* 2: 19-28.

Backer LC, Kirkpatrick B, Fleming LE, Cheng YS, Pierce R, Bean JA, Clark R, Johnson D, Wanner A, Tamer R, Zhou Y, Baden DG, 2005. Occupational exposure to aerosolized brevetoxins during Florida red tide events: effects on a healthy worker population. *Environ Health Perspect*. 113: 644-649.

Baden DG, Adams DJ, 2000. Brevetoxins: chemistry, mechanism of action, and methods of detection. In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection.* Botana LM (Ed), Marcel Dekker, New York, pp. 505-532.

Baker PD, Humpage AR, 1994. Toxicity associated with commonly occurring cyanobacteria in surface waters of the Murray-Darling river basin, Australia. *Aust. J. Freshwater Res*. 45: 773-786.

Balls M, Blaauboer B, Brusik D, Frazier J, Lamp D, Pemberton M, et al. Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures. *ATLA* 18: 313-337.

Bal-Price AK, Sunol C, Weiss DG, van Vliet E, Westerink RHS, Costa LG, 2008. Application of in vitro neurotoxicity testing for regulatory purposes: Symposium III summary and research needs. *NeuroToxicology* 29: 520-531.

Bartolami S, 2006. La transduction du signal. http://schwann.free.fr/transduction_du_signal.htm

Bellocci M, Ronzitti G, Milandri A, Melchiorre N, Grillo C, Poletti R, Yasumoto T, Rossini GP, 2008. A cytolytic assay for the measurement of palytoxin based on a cultured monolayer cell line. *Anal. Biochem.* 374 : 48-55.

Benson JM, Gomez AP, Statom GL, Tibetts, BM, Fleming LE, Backer LC, Reich A, Baden DG, 2006. Placental transport of brevetoxin-3 in CD-1 mice. *Toxicon* 48: 1018-1026.

Berry JP, Lind O, 2009. First evidence of "paralytic shellfish toxins" and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in "tegogolo" snails (*Pomacea patula catemacensis*). *Toxicon* di:10.1016/j.toxicon.2009.07.035.

Bignami GS, Raybould TJG, Sachinvala ND, Grothaus PG, Simpson SB, Lazo CB, Byrnes JB, Moore RE, Vann DC, 1992. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunoassays for the measurement of palytoxin in biological samples. *Toxicon* 30: 687-700.

Biré R, Krys S, Frémy J-M, Dragacci S, Stirling D, Kharrat, R, 2002. First evidence on occurrence of gymnodimine in clams from Tunisia. *J Nat Toxins* 11: 269-275.

Blunt JW, Copp BR, Hu W-P, Munro MH, Northcote PT, Prinsep MR, 2008. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep*. 25: 35-94.

Bossart GD, Baden DG, Ewing RY, Roberts B, Wright SD, 1998. Brevetoxicosis in manatees (*Trichechus manatus*) from the 1996 epizooty: gross, histologic and immunohistochemical features. *Toxicol. Pathol.* 26**:** 276-282

Böttinger H, Béress L, Habermann E, 1986. Involvement of $(Na^+ + K^+)$-ATPase in binding and actions of palytoxin on human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 861: 164-176.

Botana LM, Alfonso A, Botana A, Vieytes MR, Vale C, Vilarino N, Louzao C, 2009. Functional assays for marine toxins as an alternative, high-throughput screening solution to animal tests. *Trends in Analytical Chemistry* 28: 603-611.

Bottein Dechraoui M-Y, 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: 261-70.

Bourdeau P, Lassus P, Turquet J, Quod J-P, 2001. Rôle écologique et transfert des phycotoxines dans les chaînes alimentaires. In : *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Frémy J-M, Lassus P, (Eds), Editions Ifremer, Plouzané, pp. 251-295.

Bourne Y, Radic Z, Talley TT, Conrod S, Taylor P, Molgo J, Marchot P, 2008. Utilisation des « protéines liant l'acétylcholine » (AChBP) en toxinologie structurale : nouveaux exemples. In: *Toxines et fonctions cholinergiques neuronales et non neuronales.* Benoit E, Goudey-Perrière F, Servent D, Marchot P (Eds.), Collection Rencontres en Toxinologie, Librairie Lavoisier, Paris, France, pp. 27-28.

Bowling L, 1994. Occurrence and possible causes of a severe cyanobacterial bloom in lake Cargelligo, New South Wales. *Aust. J. Freshwater Res*. 45: 737-745.

Bruner LH, Carr GJ, Chamberlain M, Curren RD, 1996. Validation of alternative methods for toxicity testing. *Toxicol. in vitro* 10: 479-501.

Cadel-Six S, Peyraud-Thomas C, Brient L, Tandeau de Marsac N, Rippka R, Méjean A, 2007. Different genotypes of anatoxin-producing cyanobacteria coexist in the Tarn River, France. *Appl Environ Microbiol*. 73: 7605-7614.

Caillaud A, Cañete E, de la Iglesia P, Giménez G, Diogène J, 2009. Cell-based assay coupled with chromatographic fractioning: A strategy for marine toxins detection in natural samples. *Toxicol. In Vitro* doi:10.1016/j.tiv.2009.08.013

Canete E, Diogène J, 2008. Comparative study of the use of neuroblastoma cells (Neuro-2a) and neuroblastoma x glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins. *Toxicon* 52: 541–550

Carmichael WW, 1994. Les toxines de cyanobactéries. *Pour la science* 197: 44-51.

Carmichael WW, Eans WR, Yin QQ, Bell P, Moczydlowsky E, 1997. Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb.nov. *Appl Environ Microbiol*. 63: 04-3110

Carmichael WW, Azevedo SMFO, An JS, Molica RJ, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR, Eaglesham GK, 2001. Human fatalities from Cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives* 109: 663-668.

Catterall W, 1980. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 20: 15-43.

Catterall W, 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26: 13-25.

Catterall WA, Cestèle S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K, Scheuer T, 2007. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* 49: 124-141.

Cattet M, Geraci JR, 1993. Distribution and elimination of ingested brevetoxin (PbTx-3) in rats. *Toxicon* 31: 1483-1486.

Caulfield MP, Birdsall NJ, 1998. International Union of Pharmacologists. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacological Reviews* 50: 279-290.

Cembella A, Quilliam MA, Lewis NI, Bauder AG, Wright JLC, 1998. Identifying the planktonic origin and distribution of spirolides in coastal Nova Scotian waters. In: Harmful Algae, Reguera B, Blanco J, Fernández ML, Wyatt T (Eds.), Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Vigo, Spain, pp. 481-484.

Cembella A, Lewis N, Quilliam MA, 2000. The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* as the causative organism of spirolide shellfish toxins. *Phycologia* 39: 67-74.

Cembella A, Bauder A, Lewis N, Quilliam M, 2001. Association of the gonyaulacoid dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* with spirolide toxins in size-fractionated plankton. *J. Plankton Res.* 23: 1413-1419.

Cestèle S, Catterall WA, 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82: 883-892.

Chritopoulos A, Kenakin T, 2002. G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* 54: 323-374

Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Magno GS, 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. *Analytical Chemistry* 78: 6153-6159.

Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Magno S, Tartaglione L, Cangini M, Pompei M, Guerrini F, Boni L, Pistocchi R, 2006. Toxin profile of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) from the Northern Adriatic Sea revealed by liquid chromotagraphy-mass spectrometry. *Toxicon* 47: 597-604.

Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N, 2008. Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. *J Am Soc Mass Spectrom* 19: 111-120.

Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Boschetti L, Rubini S, Cangini M, Pigozzi S, Poletti R, 2009. Complex toxin profile of *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea revealed by LC–MS. *Toxicon* doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.037.

Codd GA, Bell SG, Kaya K, Ward CJ, Beattie KA, Metcalf JS, 1999. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *Eur J Phycol.* 34: 405-415.

Corringer PJ, Le Novere N, Changeux J-P, 2000. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 431-458.

Costa IAS, Azevedo SMFO, Senna PAC, Bernardo RR, Costa SM, Chellappa NT, 2006. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Brazilian Journal of Biology* 66: 11-219.

Costa LG, 1998. Neurotoxicity testing: a discussion of in vitro alternatives. *Environ Health Perpect Suppl* 106: 505-510.

Costa LG, Fattori V, Giordano G, Vitalone A, 2007. An in vitro approach to assess the toxicity of certain food contaminants: Methylmercury and polychlorinated biphenyls. *Toxicology* 237: 65-76.

Cox P, Cardozo-Pelaez F, 2007. High throughput method for assessment of cellular reduced glutathione in mammalian cells. *Journal of Environmental Protection Science* 1: 23-28.

Crossetti LO, Bicudo DC, Bicudo CEM, Bini LM, 2008. Phytoplankton biodiversity changes in a shallow tropical reservoir during the hypertrophication process. *Brazilian Journal of Biology* 68: 1061-1067.

Daly JW, 2005. Nicotinic agonists, antagonists, and modulators from natural sources. *Cellular and Molecular Neurobiology* 25: 513-552.

Dechraoui Bottein M-Y, Maucher Fuquay J, Munday R, Selwood AI, van Ginkel R, Miles CO, Loader JI, Wilkins AL, Ramsdell JS, 2010. Bioassay methods for detection of *N*-palmitoylbrevetoxin-B2 (BTX-B4). *Toxicon* doi:10.1016/j.toxicon.2009.09.022.

Dechraoui M-Y, Naar J, Pauillac S, Legrand A-M, 1999. Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compouds active on sodium channels. *Toxicon* 37: 125-143.

Deeds JR, Schwartz MD, 2009. Human risk associated with palytoxin exposure. *Toxicon* doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.035.

De Haro L, 2007. Les différentes formes de mytilisme. 45ème Congrès de la Société Française de Toxicologie Clinique. Bordeaux, Décembre 2006.

De la Rosa L, Alfonso A, Vilarino N, Vieytes MR, Botana LM, 2001. Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin. *Biochemical Pharmacology* 61: 827-833.

Dell'Aversano C, Hess P, Quilliam MA, 2005. Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. *J. Chromatogr. A* 1081: 190-201.

Dell'Ovo V, Bandi E, Coslovich T, Florio C, Sciancalepore M, Decorti G, Sosa S, Lorenzon P, Yasumoto T, Tubaro A, 2008. In vitro effects of yessotoxin on a primary culture of rat cardiomyocytes. *Toxicol. Sci.* 106 : 392–399.

Derick S, Tocanne J-F, Morin B, Narbonne JF, Furger C, 2009. DAP, a new fluorescent cell-based assay which predicts human acute toxicity to 82%. VII World Congress on Alternative and Animal Uses in the Life Science, Roma, Italy, September 2009.

Devlin JP, Edwards OE, Gorham PR, Hunter NR, Pike RK, Starvic B, 1977. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h. *Can. J. Chem.* 55: 1367–1371.

Dickey R, Jester E, Granade R, Mowdy D, Moncreiff C, Rebarchick D, Robl M, Musser S, Poli M, 1999. Monitoring brevetoxins during a *Gymnodinium breve* red tide: comparison of sodium channel specific cytotoxicity assay and mouse bioassay for determination of neurotoxic shellfish toxins in shellfish extracts. *Natural toxins* 7: 157-65.

Dickey RW, Plakas SM, 2009. Ciguatera: A public health perspective. *Toxicon* doi:10.1016/j.toxicon.2009.09.008.

Dominguez HJ, Paz B, Daranas, AH, Norte M, Franco, JM, Fernandez JJ, 2009. Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: characterization, analysis and human health implications. *Toxicon* doi:10.1016/j.toxicon.2009.11.005

Dragunow M, Trzoss M, Brimble MA, Cameron R, Beuzenberg V, Holland P, Mountfort D, 2005. Investigations into the cellular actions of the shellfish toxin gymnodimine and analogues. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20: 305-12.

Draisci R, Lucentini L, Giannetti L, Boria P, Poletti R, 1996. First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon* 34: 923-935.

Dringen R, 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology* 62: 649-671.

Durando P, Ansaldi F, Oreste P, Moscatelli P, Marensi L, Grillo C, Gasparini R, Icardi G, 2007. *Ostreopsis ovata* and human health: epidemiological and clinical features of respiratory syndrome outbreaks from a two-year syndromic surveillance, 2005-2006 in north-west Italy. *Eurosurveillance* 12: 191-193.

Dutertre S, Lewis RJ, 2006. Toxin insights into nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* 72: 661-670.

EFSA, 2007. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – Okadaic acid and analogues. The *EFSA Journal* 589: 1-62.

EFSA, 2008a. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – azaspiracids. *The EFSA Journal* 723: 1-52.

EFSA, 2008b. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – Yessotoxin Group. *The EFSA Journal* 907: 1-62.

EFSA, 2009a. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish – Saxitoxin Group. *The EFSA Journal* 1019: 1-76.

EFSA, 2009b. Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Palytoxin Group. *The EFSA Journal* doi:10.2903/j.efsa.2009.1393.

EFSA, 2009c. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – Pectenotoxin Group. *The EFSA Journal* 1109: 1-47.

EFSA, 2009d. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – Domoic acid. *The EFSA Journal* 1181: 1-61.

Elmore S, 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35: 495-516.

Espina B, Cagide E, Louzao MC, Martinez-Fernandez M, Vieytes MR, Katikou P, Villar A, Jaen D, Maman L, Botana LM, 2009. Palytoxins specific and dynamic detection by in vitro microplate assay with human neuroblastoma cells. *Biosci. Rep.* 29: 13-23.

Falconer IR, Bartram J, Chorus I, Kuiper-Goodman T, Utkilen H, Burch M, Codd G, 1999. Safe levels and safe practices. In: *Toxic cyanobacteria in water*. Chorus I, Bartram J, (Eds), E & FN Spon, London, pp.155-178.

Fastner J, Rücker J, Wiedner C, Nixdorf B, Chorus I, 2009. Long-term trends and seasonal patterns of cyanobacterial hepato- and neurotoxins in German water bodies. In: *International Symposium on Toxicity Assessment*, Metz, France, p. 57.

Fawell JK, Mitchell RE, Hill RE, Everett DJ, 1999. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II Anatoxin-a. *Human and Experimental Toxicology* 18: 168-173.

Fernandez ML, Shumway S, Blanco J, 2003. Management of shellfish resources. In: *Manual on harmful marine microalgae*. Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD, (Eds), Unesco publishing, Paris, pp. 657-692.

Ferreira FMB, Franco JM, Fidalgo ML, Fernandez-Vila P, 2001. PSP toxins from *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacteria) collected in the Crestuma-Lever reservoir (Douro river, Northern Portugal). *Toxicon* 39: 757-761

Fladmark KE, Serres MH, Larsen NL, Yasumoto T, Aune T, Doskeland SO, 1998. Sensitive detection of apoptogenic toxins in suspension cultures of rat and salmon hepatocytes. *Toxicon* 36: 1101-1114.

Fleming LE, Bean JA, Kirkpatrick B, Cheng YS, Pierce R, Naar J, Nierenberg K, Backer LC, Wanner A, Reich A, Zhou Y, Watkins S, Henry M, Zaias J, Abraham WM, Benson J, Cassedy A, Hollenbeck J, Kirkpatrick G, Clarke T, Baden DG, 2009. Exposure and effect assessment of aerosolized red tide toxins (brevetoxins) and asthma. *Environ Health Perspect*. 117: 1095-1100.

Forsby A, Bal-Price AK, Camins A, Coecke S, Fabre N, Gustafsson H, Honegger P, Kinsner-Ovaskainen A, Pallas M, Rimbau V, Rodríguez-Farré E, Suñol C, Vericat JA, Zurich MG, 2009. Neuronal in vitro models for the estimation of acute systemic toxicity. *Toxicol. In Vitro* doi:10.1016/j.tiv.2009.07.017

Fraga S, Sanchez FJ, 1985. Toxic and potentially toxic dinoflagellates in Galician Rias (NW Spain). In: *Toxic Dinoflagellates.* Anderson D, White AW, Baden DG, (Eds.), Elsevier, New York, USA, pp. 51-55.

Francis G, 1878. Poisonous Australian lake. *Nature* 18: 11-12.

Fruchart-Gaillard C, Mourier G, Marquer C, Stura E, Birdsall NJM, Servent D, 2008. Different interactions between MT7 toxin and the human muscarinic M1 receptor in its free and N-methylscopolamine-occupied states. *Mol Pharmacol* 74: 1554-1563.

Fujiki H, Suganuma M, Nakayasa M, Hakii H, Horiuchi T, et al, 1986. Palytoxin is a non-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 7: 707–710.

Fukui M, Murata M, Inoue M, Gawel M, ., Yasumoto T, 1987. Occurrence of palytoxin in the trigger fish *Melichtys vidua*. *Toxicon* 25:1121-1124.

Fux E, McMillan D, Biré R, Hess P, 2007. Development of an ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins. *J Chromatogr. A* 1157: 273-280.

Gallitelli M, Ungaro N, Addante LM, Silver NG, Sabba C, 2005. Respiratory illness as a reaction to tropical algal blooms occuring in a temperate climat. *Jounal of the American Medical Association* 293: 2599-2600.

Galvao JA, Oetterer M, Bittencourt-Oliveira MC, Gouvêa-Barros S, Hiller S, Erler K, Luckas B, Pinto E, Kujbida P, 2009. Saxitoxins accumulation by freshwater Tilapia (*Oreochromis niloticus*) for human consumption. *Toxicon* 54: 891-894.

Garcia C, del Carmen Bravo M. , Lagos M., Lagos N., 2004. Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords. *Toxicon* 43: 149-158.

Garcia C, Barriga A, Diaz JC, Lagos M, Lagos N, 2009. Route of metabolization and detoxication of paralytic shellfish toxins in humans. *Toxicon* doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.018.

Gartlon J, Kinsner A, Bal-Price, A, Coecke S, Clothier RH, 2006. Evaluation of a proposed in vitro test strategy using neuronal and non-neuronal cell systems for detecting neurotoxicity. *Toxicol. in vitro* 20: 1569-1581.

Gessner BD, 2000. Neurotoxic toxins. In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection.* Botana LM (Ed), Marcel Dekker, New York, pp. 65-90.

Gerssen A, McElhinney MA, Mulder PP, Bire R, Hess P, de Boer J, 2009. Solid phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 394: 1213-1226.

Gill DM, 1982. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol Rev*. 46: 86-94.

Gill S, Murphy M, Clausen J, Richard D, Quilliam MA, MacKinnon S, LeBlanc P, Mueller R, Pulido O, 2003. Neural injury biomarkers of novel shellfish toxins, spirolides: a pilot study using immunochemical and transcriptional analysis. *Neurotoxicology* 24: 593-604.

Gonzalez RJ, Tarloff JB, 2001. Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar Blue and MTT reductase activity. *Toxicol in vitro* 15: 257-259.

Gribble KE, Keafer BA., Quilliam MA, Cembella AD, Kulis DM, Manahan A, Anderson D M, 2005. Distribution and toxicity of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in the Gulf of Maine, USA. *Deep-Sea Research II* 52: 2745-2763.

Guerrini F, Pezzolesi L, Feller A, Riccardi M, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Tartaglione L, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Pistocchi R, 2009. Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon* doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.019

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.

Habermann E, Ahnert-Hilger G, Chhatwal GS, Béress L, 1981. Delayed haemolytic action of palytoxin general characteristics. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 649: 481-486.

Habermann E, Chhatwal GS, 1982. Ouabain inhibits the increase due to palytoxin of cation permeability of erythrocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*. 319: 101-107.

Hallegraeff GM, Bolch CJ, 1991. Transport of toxic dinoflagellate cysts via ships' ballast water. *Marine Pollution Bulletin* 22: 27-30.

Hallegraeff GM, 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32: 79-99.

Hallegraeff GM, 2003. Harmful algal blooms: a global overview. In: *Manual on Harmful Marine Microalgae*, Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD, (Eds), Unesco publishing, Paris, pp. 25-49.

Halstead BW, 1965. Poisonous and venomous marine animals of the world. Washington: United States Government, 184-189.

Hamilton D, Wu JH, Batist G, 2007. Structure-based identification of novel human γ-glutamylcysteine inhibitors. *Mol. Pharmacol*. 71: 1140-1147.

Harry GJ, Billingsley M, Bruinink A, Campbell IL, Classen W, Dorman DC, Galli C, Ray D, Smith RA, Tilson HA, 1998. In Vitro techniques for the assessment of neurotoxicity. *Environ Health Perspect Suppl* 106: 131-158.

Hartung T, 2009. Toxicology for the twenty-first century. *Nature* 460: 208-212.

Harvey M, La Vieille S, 2003. Aspects cliniques et données épidémiologiques. Journée scientifique d'échanges sur les biotoxines - Toxines de microalgues et cyanobactéries, Paris. AFSSA, 23-33.

Heisler J, Glibert PM, Burkholder JM, Anderson DM, Cochlan W, Dennison WC, Dortch Q, Gobler CJ, Heil CA, Humphries E, Lewitus A, Magnien R, Marshall HG, Sellner K, Stockwell DA, Stoecker DK, Suddleson M, 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus. *Harmful Algae* 8: 3-13.

Hengartner MO, 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-777.

Hess P, Grune B, Anderson DB, Aune T, Botana LM, Caricato P, van Egmond HP, Halder M, Hall S, Lawrence JF, Moffat C, Poletti R, Richmond J, Rossini GP, Seamer C, Vilageliu JS, 2006. Three Rs approaches in marine biotoxin testing. *ATLA* 34: 193-224.

Hess P, Aasen AB, 2007. Chemistry, origins, and distribution of yessotoxin and its analogues. In: *Phycotoxins – Chemistry and biochemistry*. Botana LM (Ed), Blackwell publishing, Iowa, USA, pp. 187-202.

Hess P, McCarron P, Rehmann N, Kilcoyne J, McMahon T, Ryan G, Ryan MP, Twiner MJ, Doucette GJ, Satake M, Ito E, Yasumoto T, 2007. Isolation and purification of AZAs from naturally

contaminated materials, and evaluation of their toxicological effects (ASTOX). Rapport du Marine Institute, Irlande, 128 p.

Hirsh JK,Wu CH,1997. Palytoxin-induced single-channel currents from the sodium pump synthesized by in vitro expression. *Toxicon* 35: 169-176.

Hoeger SJ, Shaw G, Hitzfeld BC, Dietrich DR, 2004. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in two Australian drinking water treatment plants. *Toxicon* 43: 639-649.

Hoffmann K, Hermanns-Clausen M, Buhl C, Büchler MW, Schemmer P, Mebs D, Silke Kauferstein S, 2008. A case of palytoxin poisoning due to contact with zoanthid corals through a skin injury. *Toxicon* 51: 1535-1537.

Holtrop G, Petrie J, McElhiney J, Dennison N, 2006. Can general anaesthesia be used for the paralytic shellfish poison bioassay? *Toxicon* 47: 336-347.

Horisberger J-D, Kharoubi-Hess S, Guennoun S, Michielin O, 2004. The fourth transmembrane segment of the Na,K-ATPase subunit - A systematic mutagenesis study. *Journal of Biological Chemistry* 279: 29542-29550.

Hu T, Curtis JM, Oshima Y, Quilliam MA, Walter JA, Watson-Wright WM, Wright JLC, 1995. Spirolides B and D, two novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish. *J. Chem. Soc. Chem. Commun*. 20: 2159-61.

Hu T, Curtis JM, Walter JA, Wright JL, 1996. Characterization of biologically inactive spirolides E and F: identification of the spirolide pharmacophore. *Tetrahedron Letters* 37: 7671-7674.

Hu T, Burton IW, Cembella AD, Curtis JM, Quilliam MA, Walter JA, Wright JL, 2001. Characterization of spirolides A, C, and 13-desmethyl C, new marine toxins isolated from toxic plankton and contaminated shellfish. *J. Nat. Prod*. 64: 308-12.

Hudnell HK (Ed), 2008. Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. Advances in Experimental Medicine and Biology (Vol. 619), Springer-Verlag, Berlin, Germany, 950 p.

Humpage AR, Ledreux A, Fanok S, Bernard C, Briand J-F, Eaglesham G, Papageorgiou J, Nicholson B, Steffensen D, 2007. Application of the neuroblastoma assay for paralytic shellfish poisons to neurotoxic freshwater cyanobacteria: interlaboratory calibration and comparison with other methods of analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 1512-1519.

Ibelings BW, Chorus I, 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution* 150: 177-192

Ito E, Ohsuku M, Yasumoto T, 1996. Intestinal injuries caused by experimental palytoxicosis in mice. *Toxicon* 34: 643-652.

Ito E, Satake M, Ofuji K, Kurita N, McMahon T, James K, Yasumoto T, 2000. Multiple organ damage caused by a new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland. *Toxicon* 38: 917-930.

Ito E, Satake M, Ofuji K, Higashi M, Harigaya K, McMahon T, Yasumoto T, 2002. Chronic effects in mice caused by the oral administration of sublethal doses of azaspiracid, a new marine toxin isolated from mussels. *Toxicon* 40: 193-203.

Ito E, Frederick MO, Koftis TV, Tang W, Petrovic G, Ling T, Nicolaou KC, 2006. Structure toxicity relationships of synthetic azaspiracid-1 and analogs in mice. *Harmful Algae* 5: 586-591.

Ito E, Suzuki T, Oshima Y, Yasumoto T, 2008. Studies of diarrhetic activity on pectenotoxin-6 in the mouse and rat. *Toxicon* 51: 707-716.

Ito E, Yasumoto T, 2009. Toxicological studies on palytoxin and ostreocin-D administered to mice by three different routes. *Toxicon* 54: 244-251.

Iverson F, Truelove J, Nera E, Tryphonas L, Campbell J and Lok E, 1989. Domoic acid poisoning and mussel-associated intoxication - preliminary investigations into the response of mice and rats to toxic mussel extract. *Food and Chemical Toxicology* 27: 377-384.

James KJ, Crowley J, Duphard J, Lehane M, Furey A, 2007. Anatoxin-a and analogues: discovery, distribution, and toxicology. In: *Phycotoxins – Chemistry and biochemistry*. Botana LM (Ed), Blackwell publishing, Iowa, USA, pp. 141-158.

Jellett JF, Marks LJ, Stewart JE, Dorey ML, Watson-Wright W, Lawrence JF, 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* 30:1143-56.

Jellett JF, Stewart JE, Laycock MV, 1995. Toxicological evaluation of saxitoxin, neosaxitoxin, gonyautoxin II, gonyautoxin II plus III and decarbamoylsaxitoxin with the mouse neuroblastoma cell bioassay. *Toxic. in vitro* 9: 57-65.

Jellett JF, Doucette LI, Belland ER, 1998. The Mist™ shippable cell bioassay kits for PSP: an alternative to the mouse bioassay. *Journal of Shellfish Research* 17: 1653-1655.

Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Alfaro P, Quillfeldt J, Ferreira A, Rial VE, Duran R, Cervenansky C, 2000. Muscarinic toxins: novel pharmacological tools for the muscarinic cholinergic system. *Toxicon* 38: 747-761.

Jochimsen EM, Carmichael WW, An J, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CES, Antunes MB, Fihlo DA, Lira TM, Barreto VS, Azevedo SM, Jarvis WR, 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal Medic*. 338: 873-878.

John U, Cembella A, Hummert C, Elbrächter M, Groben R, Medlin L, 2003. Discrimination of the toxigenic dinofagellates *Alexandrium tamarense* and *A. ostenfeldii* in co-occurring natural populations from Scottish coastal waters. *Eur. J. Phycol*. 38: 25-40.

Jones GJ, Negri AP, 1997. Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) in freshwaters. *Water Research* 31: 525-533.

Jung JH, Sim CJ, Lee CO, 1995. Cytotoxic compounds from a two-sponge association. *Journal of Natural Products* 58: 1722-1726.

Kaas H, Henriksen P, 2000. Saxitoxins (PSP toxins) in Danish lakes. *Water Res*. 34 : 89-2097.

Kalaitzis JA, Chau R, Kohli GS, Murray SA, Neilan BA, 2009. Biosynthesis of toxic naturally-occurring seafood contaminants. *Toxicon* doi:10.1016/j.toxicon.2009.09.001

Katikou P, 2007. Chemistry of palytoxins and ostreocins. In: *Phycotoxins – Chemistry and biochemistry*. Botana LM (Ed), Blackwell publishing, Iowa, USA, pp. 75 – 94.

Kellmann R, Mihali TK, Jeon YJ, Pickford R, Pomati F, Neilan BA, 2008. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* 74: 4044-4053.

Kellmann R, Schaffner CA, Grønset TA, Satake M, Ziegler M, Fladmark KE, 2009. Proteomic response of human neuroblastoma cells to azaspiracid-1. *Journal of proteomics* 72: 695-707.

Kermarec F, Dor F, Armengaud A, Charlet F, Kantin R, Sauzade D, de Haro L, 2008. Les risques sanitaires liés à la présence d'*Ostreopsis ovata* dans les eaux de baignade ou d'activités nautiques. *Environnement, Risques et Santé* 7: 357-363.

Kharrat R, Servent D, Girard E, Ouanounou G, Amar M, Marrouchi R, Benoit E, Molgo J, 2008. The marine phycotoxin gymnodimine targets muscular and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes with high affinity. *J. Neurochem*. 107: 952-963.

Kim M-O, Moon D-O, Heo M-S, Lee J-D, Jung JH, Kim S-K, Choi YH, Kim G-Y, 2008. Pectenotoxin-2 abolishes constitutively activated NF-κB, leading to suppression of NF-κB related gene products and potentiation of apoptosis. *Cancer Letters* 271: 25-33

Kirkpatrick B, Pierce R, Cheng YS, Henry MS, Blum P, Osborn S, Nierenberg K, Pederson BA, Fleming LE, Reich A, Naar J, Kirkpatrick G, Backer LC, Baden D, 2009. Inland transport of aerosolized Florida red tide toxins. *Harmful Algae* doi:10.1016/j.hal.2009.09.003

Kosower EM, Kosower NS, 1995. Bromobimane probes for thiols. *Methods Enzymol*. 251: 133-48.

Kogure K, Tamplin ML, Simidu U, Colwell RR, 1988. A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. *Toxicon* 26: 191-197.

Kozlowsky-Suzuki B, Koshi M, Hallberg E, Wallen R, Carlsson P, 2009. Glutathione transferase activity and oocyte development in copepods expodes to toxic phytoplankton. *Harmful Algae* 8: 395-406.

Kremp A, Lindholm T, Dreßler N, Erler K, Gerdts G, Eirtovaara S, Leskinen E, 2009. Bloom forming *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in shallow waters of the Aland Archipelago, Northern Baltic Sea. *Harmful Algae* 8: 318-328.

Krys S, Frémy J-M, 2002. Phycotoxines et produits de la mer : risques sanitaires associés et mesures de prévention. *Revue française des laboratoires* 348: 29-38.

Krys S, Arnich N, Fremy JM, 2007. Emergence de nouvelles toxicités d'origine marine : vers une évolution significative des dispositifs de sécurisation des coquillages ? In: *Toxines*

émergentes: nouveaux risques. Goudey-Perrière F, Benoit E, Marchot P, Popoff MR (Eds.), Collection Rencontres en Toxinologie, Librairie Lavoisier, Paris, France, pp. 117-122.

Kumar-Roine 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.

Lagos N, Onodera H, Zagatto PA, Andrinolo D, Azevedo SM, Oshima Y, 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37: 1359-1373.

Landsberg JH, 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Rev. Fish. Sci*. 10: 113-390.

Larm JA, Beart PM, Cheung NS, 1997. Neurotoxin domoic acid produces cytotoxicity via kainate and AMPA sensitive receptors in cultured cortical neurones. *Neurochem. Int.* 31: 677-682.

Lassus P, 2003. Les proliférations de microalgues toxiques en milieu côtier. Journée scientifique d'échanges sur les biotoxines - Toxines de microalgues et cyanobactéries, Paris. AFSSA, 9-12.

Langmead CJ, Watson J, Reavill C, 2008. Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacology and Therapeutics* 117: 232-43.

Lau CO, Tan CH, Li QT, Ng FH, Yuen R, Khoo HE, 1995. Bioactivity and mechanism of action of *Lophozozymus pictor* toxin. *Toxicon* 33: 901-908.

Lavoie S, Chen Y, Dalton TP, Gysin R, Cuénod M, Steullet P, Do KD, 2009. Curcumin, quercetin, and tBHQ modulate gluthatione levels in astrocytes and neurons: importance of the glutamate cysteine ligase modifier. *J. Neurochem.* 108: 1410-1422.

Ledoux M. 1991. Optimisation d'un dosage par CLHP des phycotoxines paralysantes : application à l'étude de la contamination des fruits de mer. Mémoire d'Ingénieur, Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris. 81 pp.

Lefebvre KA, Noren DP, Schultz IR, Bogard SM, Wilson J, Eberhart B-T, 2007. Uptake, tissue distribution and excretion of domoic acid after oral exposure in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquatic Toxicology* 81: 266-274

Lefebvre KA, Robertson A, 2009. Domoic acid and human exposure risks: A review. *Toxicon* doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.034

Lehane L, Lewis RJ, 2000. Ciguatera: recent advances and but the risk remains. *Int. J. Food Microbiol.* 61: 91-125.

Leira F, Alvarez C, Vieites JM, Vieytes MR, Botana LM, 2001a. Study of cytoskeletal changes induced by okadaic acid in BE(2)-M17 cells by means of a quantitative fluorimetric microplate assay. *Toxicology in Vitro* 15: 277-282.

Leira F, Vieites JM, Vieytes MR, Botana LM, 2001b. Apoptotic events induced by the phosphatase inhibitor okadaic acid in normal human lung fibroblasts. *Toxicology in Vitro* 15: 199-208.

Leira F, Alvarez C, Vieites JM, Vieytes MR, Botana LM, 2002. Characterization of distinct apoptotic changes induced by okadaic acid ans yessotoxin in the BE(2)-M17 neuroblastoma cell line. *Toxic. in vitro* 16: 23-31.

Leira F, Cabado AG, Vieytes MR, Roman Y, Alfonso A, Botana LM, Yasumoto T, Malaguti C, Rossini GP, 2002b. Characterization of F-actin depolymerisation as a major toxic event induced by pectenotoxin-6 in neuroblastoma cells. *Biochemical Pharmacology* 63: 1979-1988.

Lejeusne C, Chevaldonné P, Pergent-Martini C, Boudouresque CF, Pérez T, 2009. Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. Trends in Ecology and Evolution doi:10.1016/j.tree.2009.10.009

Lenoir S, 2006. Complexes neurotoxiques impliqués dans la contamination des produits de la mer de l'Océan Indien : Caractérisation toxinique et contribution des toxines de *Gambierdiscus toxicus* et *Ostreopsis mascarenensis*. Thèse du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, 330p.

Lenoir S, Ten-Hage L., Turquet J., Quod J.-P., Bernard C., Hennion M.-C., 2004. First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dynophyceae) benthic bloom in southwestern indian ocean. *J. Phycol.* 40: 1042-1051.

Le Novère N, Corringer P-J, Changeux J-P, 2002. The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J. Neurobiology* 53: 447-456.

LePage KT, Dickey RW, Gerwick WH, Jester EL, Murray TF, 2005. On the use of Neuro-2a neuroblastoma cells versus intact neurons in primary culture for neurotoxicity studies. *Critical Reviews™ in Neurobiology* 17: 27-50.

Levasseur M, Berard-Therriault L, Bonneau E, Roy S, 1998. Distribution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* in the Gulf of St. Lawrence, Canada. In: *Harmful Algae*. Reguera B, Blanco J, Fernández ML, Wyatt T, (Eds.), Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Vigo, Spain, pp. 54-57.

Levine L, Fujiki H, Gjika HB, Van Vunakis H, 1987. Production of antibodies to palytoxin: neutralization of several biological properties of palytoxin. *Toxicon* 25: 1273-1282.

Levine L, Fujiki H, Gjika HB, Van Vunakis H, 1988. A radioimmunoassay for palytoxin. *Toxicon* 26: 1115-1121.

Lewis RJ, Sellin M, Poli MA, Norton RS, MacLeod JK, Sheil MM, 1991. Purification and characterization of ciguatoxins from moray eel (*Lycodontis javanicus*, Muraenidae). *Toxicon* 29: 1115-1127.

Lipkind GM, Fozard H., 1994. A structural model of the tetrodotoxin and saxitoxin binding site of the Na+ channel. *Biophys. J.* 66: 1-13.

Liu Y, Chen W, Li D, Shen Y, Liu Y, Song L, 2006. Analysis of paralytic shellfish toxins in Aphanizomenon DC-1 from Lake Dianchi, China. *Environ. Toxicol*. 21: 289-295.

Llewellyn LE, Doyle J, 2001. Microtitre plate assay for paralytic shellfish toxins using saxiphilin: gauging the effects of shellfish extract matrices, salts and pH upon assay performance. *Toxicon* 39: 217-224.

Llewellyn LE, 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Nat. Prod.Rep*. 23: 2000-222.

Loader JI, Hawkes AD, Beuzenberg V, Jensen DJ, Cooney JM, Wilkins AL, Fitzgerald JM, Briggs LM, Miles CO, 2007. Convenient large scale purification of yessotoxin from *Protoceratium reticulatum* culture and isolation of a novel furanoyessotoxin. *J. Agric. Food Chem*. 55: 11093-11100.

Lombet A, Bidard J-N, Lazdunski M, 1987. Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage dependent Na^+ channel. FEBS Lett. 219: 355-359.

Louzao MC, Vieytes MR, Baptista de Sousa JMV, Leira F, Botana LM, 2001. A fluorimetric method based on changes in membrane potential for screening paralytic shellfish toxins in mussels. *Analytical Biochemistry* 289: 246-250.

Louzao MC, Ares IR, Cagide E, 2008. Marine toxins and the cytoskeleton: a new view of palytoxin toxicity. FEBS J 275: 6067-6074.

MacKenzie L, White D, Oshima Y, Kapa J, 1996. The resting cyst and toxicity of Alexandrium ostenfeldii (Dinophyceae) in New Zealand. *Phycologia* 35: 148-155.

Mahmood NA, Carmichael WW, 1986a. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxicon* 24: 175-186.

Mahmood NA, Carmichael WW, 1986b. The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Toxicon* 24: 425-434.

Malagoli D, Marchesini E, Ottaviani E, 2006. Lysosomal as target of yessotoxin in invertebrate and vertebrate cells. *Toxicol. Lett.* 167: 75-83.

Malaguti C, Ciminiello P, Fattorusso E, Rossini GP, 2002. Caspase activation and death induced by yessotoxin in HeLa cells. *Toxicol. in Vitro* 16: 357-363.

Malaguti C, Milandri A, Poletti R, Rossini GP, 2002b. Cytotoxic responses to unfractionated extracts from digestive glands of mussels. *Toxicon* 40: 573-578.

Manger RL, Leja LS, Lee SY, Hungerford JM, Wekell MM, 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 RL, Leja LS, Lee SY, Hungerford JM, Hokama Y, Dickey RW, Granade HR, Lewis R, Yasumoto T, Wekell MM, 1995. Detection of sodium channel toxins: directed cytotoxicity assays for purified ciguatoxins, brevetoxins, saxitoxins and seafood extracts. *Journal of AOAC International* 78: 521-527.

Marcaillou-Le Baut C, Krys S, Bourdeau P, 2001. Syndromes observés et données épidémiologiques. In : *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Frémy J-M, Lassus P, (Eds), Editions Ifremer, Plouzané, pp. 369-399.

Marrouchi R, Schlumberger S, Benoit E, Araoz R, Kharrat R, Molgo J, 2008. Les spirolides : une famille de toxines émergentes qui contaminent les mollusques bivalves. In: *Toxines et fonctions cholinergiques neuronales et non neuronales.* Benoit E, Goudey-Perrière F, Servent D, Marchot P (Eds.), Collection Rencontres en Toxinologie, Librairie Lavoisier, Paris, France, pp. 13-17.

Mattéi C, Dechraoui M-Y, Molgo J, Meunier FA, Legrand A-M, Benoit E, 1999. Neurotoxins targetting receptor site 5 of voltage-dependent sodium channels increase the nodal volume of myelinated axons. *Journal of Neuroscience Research* 55: 666–673.

Mayer AMS, Hamman MT, 2005. Marine pharmacology in 2001-2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 140: 265 - 286

McMahon T, Silke J, 1996. Winter toxicity of unknown aetiology in mussels. Harmful Algae News 14: 2.

McMahon T, Silke J, 1998. Re-occurrence of winter. Harmful Algae News 17: 12.

Mebs D, 1998. Occurrence and sequestration of toxins in food chains. *Toxicon* 36: 1519-1522.

Méjean A, Mann S, Maldiney T, Vassiliadis G, Lequin L, Ploux O, 2009a. Evidence that biosynthesis of the neurotoxic alkaloids anatoxin-a and homoanatoxin-a in the cyanobacterium *Oscillatoria* PCC 6506 occurs on a modular polyketide synthase initiated by L-proline. *J. Am. Chem. Soc*. 131: 7512–7513.

Méjean A, Peyraud-Thomas C, Kerbrat A-S, Golubic S, Pauillac S, Chinain M, Laurent D, 2009b. First identification of the neurotoxin homoanatoxin-a from mats of *Hydrocoleum lyngbyaceum* (marine cyanobacterium) possibly linked to giant clam poisoning in New Caledonia. *Toxicon* 10.1016/j.toxicon.2009.10.029

Mercado JA, Viera M, Escalona de Motta G, Tosteson TR, Gonzalez I, Silva W, 1994. An extraction procedure modification changes the toxicity, chromatographic profile and pharmacologic action of *Ostreopsis lenticularis* extracts. *Toxicon* 32: 256.

Messineo V, Bogialli S, Melchiorre S, Sechi N, Luglie A, Casiddu P, Mariani MA, Padedda BM, Di Corcia A, Mazza R, Carloni E, Bruno M, 2009. Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters. *Limnologica* 39: 95-106.

Metfies K, Huljic S, Lange M, Medlin LK, 2005. Electrochemical detection of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* with a DNA-biosensor. *Biosens. Bioelectron*. 20: 1349-1357.

Micheli L, Di Stefano S, Moscone D, Palleschi G, Marini S, Coletta M, Draisci R, delli Quadri F, 2001. Production of antibodies and development of highly sensitive formats of enzyme immunoassay for saxitoxin analysis. *Anal Bioanal Chem* 373: 678-684.

Miles CO, Wilkins AL, Stirling DJ, MacKenzie AL, 2000. New analogue of gymnodimine from a *Gymnodinium* species. *J. Agric. Food Chem*. 48: 1373-1376.

Miles CO, Wilkins AL, Stirling DJ, MacKenzie AL, 2003. Gymnodimine C, an isomer of Gymnodimine B, from *Karenia selliformis. J. Agric. Food Chem*. 51: 4838-4840.

Miles CO, Wilkins AL, Munday R, Dines MH, Hawkes AD, Briggs LR, Sandvik M, Jensen DJ, Cooney JM, Holland PT, Quilliam MA, MacKenzie AL, Beuzenberg V, Towers NR, 2004. Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities. *Toxicon* 43: 1-9.

Miles CO, Samdal IA, Aasen JA, Jensen DJ, Quilliam MA, Petersen D, Briggs LM, Wilkins AL, Rise F, Cooney JM, MacKenzie AL, 2005. Evidence for numerous analogs of yessotoxin in *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae* 4: 1075–1091.

Miles CO, 2007. Pectenotoxins. In: *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*, Botana LM (Ed), Blackwell Publishing, Iowa, USA, pp. 159-186.

Miraglia M, Marvin HJP, Kleter GA, Battilani P, Brera C, Coni E, Cubadda F, Croci L, De Santis B, Dekkers S, Filippi L, Hutjes RWA, Noordam MY, Pisante M, Piva G, Prandini A, Toti L, van

den Born GJ, Vespermann A, 2009. Climate Change and Food Safety: an Emerging Issue with Special Focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology* doi: 10.1016/j.fct.2009.02.005

Moffit MC, Neilan BA, 2000. The expansion of mechanistic and organismic diversity associated with non-ribosomal peptides. *FEMS Microbiology Letters* 191 : 159-167.

Molgo J, Girard E, Benoit E, 2007. The cyclic imines: an insight into this emerging group of bioactive marine toxins. In: *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*. Botana L (Ed), Blackwell Publishing, Iowa, USA, pp. 319-335.

Molica R, Onodera H, Garcia G, Rivas M, Andrinolo D, Nascimento S, Meguro H, Oshima Y, Azevedo S, Lagos N, 2002. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia* 41: 606-611.

Mons MN, Van Egmond HP, Speijers GJA, 1998. Paralytic shellfish poisoning: A review.National Institute of Public Health and Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands.RIVM Report 388802005.

Moore RE, Bartolini G, 1981. Structure of palytoxin. *J. Am. Chem. Soc*. 103: 2491-2494.

Moore RE, Scheuer PJ, 1971. Palytoxin: a new marine toxin from a Coelenterate. *Science* 172: 495-498.

Moore SK, Trainer VL, Mantua NJ, Parker MS, Laws EA, Backer LC, Fleming LE, 2008. Impacts of climate variability and future climate change on harmful algal blooms and human health. *Environ Health*. 7(Suppl 2) doi:10.1186/1476-069X-7-S2-S4

Mosmann T, 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.

Mourot A, 2004. Structure et dynamique du récepteur nicotinique. Thèse de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg I, 313 p.

Moustafa A, Loram JE, Hackett JD, Anderson DM, Plumley FG, Bhattacharya D, 2009. Origin of saxitoxin biosynthetic genes in cyanobacteria. Plos One 4: e5758.

Munday R, 2006. Toxicological requirements for risk assessment of shellfish contaminants: a review.
African Journal of Marine Science 28: 447-449.

Munday R, Towers NR, MacKenzie AL, Beuzenberg V, Holland PT, Miles CO, 2004. Acute toxicity of gymnodimine to mice. *Toxicon* 44: 173-178.

Mur LR, Skulberg OM, Utkilen H, 1999. Cyanobacteria in the environment. In: *Toxic cyanobacteria in water*. Chorus I, Bartram J, (Eds), E & FN Spon, London and New York, pp. 15-40.

Murata M, Kumagai M, Lee JS, Yasumoto T, 1987. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. Tetrahedron Lett. 28, 5869-5872.

Naghashima Y, Noguchi T, Tanaka M, Hashimoto K, 1991. Thermal degradation of paralytic shellfish poison. *Food Sci*. 56: 1572-1575.

Negri AP, Jones GJ, 1995. Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis* by the freshwater mussel *Alathyria condola*. *Toxicon* 33: 667-78.

Negri AP, Jones GJ, Blackburn S, Oshima Y, Onodera H, 1997. Effect of culture and bloom development and of storage on paralytic shellfish poisons in the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *J. Phycol.* 33: 26-35

Negri AP, Stirling D, Quilliam MA, Blackburn S, Bolch C, Burton I, 2003. Three novel hydroxybenzoate saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Chem. Res. Toxicol* 16: 1029-1033.

Nogueira ICG, Pereira P, Dias E, Pflugmacher S, Wiegand C, Franca S, Vasconcelos VM, 2004. Accumulation of paralytic shellfish toxins (PST) from the cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* by the cladoceran *Daphnia magna*. *Toxicon* 44: 773-780.

Nordt SP, Wu J, Zahller S, Clark RF, Cantrell FL, 2009. Palytoxin poisoning after dermal contact with zoanthid coral. *The Journal of Emergency Medicine* doi:10.1016/j.jemermed.2009.05.004

Nuwaysir EF, Bittner M, Trent J, Barrett JC, Afshari CA, 1999. Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. *Molecular Carcino*genesis 24: 153-159.

O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F, 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem*. 267: 5421-5426.

O'Brien PJ, Irwin W, Diaz D, Howard-Cofield E, Krejsa CM, Slaughter MR, Gao B, Kaludercic N, Angeline A, Bernardi P, Brain P, Hougham C, 2006. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Arch Toxicol*. 80: 580-604.

Ofuji K, Satake M, McMahon T, Silke J, James KJ, Naoki H, Oshima Y, Yasumoto T,1999. Two analogs of azaspiracid isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland. *Nat. Toxins* 7: 99-102.

Ofuji K, Satake M, McMahon T, James KJ, Naoki H, Oshima Y, Yasumoto T, 2001. Structures of azaspiracid analogs, azaspiracid-4 and azaspiracid-5, causative toxins of azaspiracid poisoning in Europe. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 740-742.

Ohtani I, Moore RE, Runnegar MTC, 1992. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc*. 114: 7941-7942.

Okano H, Masuoka H, Kamei S, Seko T, Koyabu S, Tsuneoka K, Tamai T, Ueda K, Nakazawa S, Sugawa M, Suzuki H, Watanabe M, Yatani R, Naka no T, 1998. Rhabdomyolysis and myocardial damage induced by palytoxin, a toxin of blue humphead parrotfish. *Internal Medicine* 37: 330-333.

Okolodkov YB, Dodge JD, 1996. Biodiversity and biogeography of planktonic dinoflagellates in the Artic Ocean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 202: 19-27.

Oku N, Sata NU, Matsunaga S, Uchida H, Fusetani N, 2004. Identification of palytoxin as a principle which causes morphological changes in rat 3Y1 cells in the zoanthid *Palythoa* aff. *margaritae*. *Toxicon* 43: 21-25.

OMS, 1998. Directives OMS de qualité pour l'eau de boisson (2nd éd.), additif au volume 1. OMS, Genève, Suisse, pp. 8-10.

OMS, 2003. Algae and cyanobacteria in fresh water. In: *Guidelines for safe recreational water environments*. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 136-158.

OMS, 2004. Guidelines for Drinking-water Quality (3rd ed.), Volume 1. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Onodera H, Satake M, Oshima Y, Yasumoto T, Carmichael WW, 1997. New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*. *Natural toxins* 5: 146-51.

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 clupeotoxism. *Toxicon* 37: 55-65.

Orr PT, Jones GJ, Hamilton GR, 2004. Removal of saxitoxins from drinking water by granular activated carbon, ozone and hydrogen peroxide - implications for compliance with the Australian drinking water guidelines. *Water Research* 38: 4455-4461.

Oshima Y, 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *Jounal of AOAC International* 78: 528-532.

Osswald J, Rellan S, Gago A, Vasconcelos V, 2007. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environment International* 33: 1070-1089.

Paz B, Daranas AH, Norte M, Riobó P, Franco JM, Fernández JJ, 2008. Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: an overview. *Mar. Drugs* 6: 73-102.

Paerl HW, Huisman J, 2008. Blooms like it hot. *Science* 320: 57-58.

Pearson LA, Neilan BA, 2008. The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 281-288.

Penna A, Vila M, Fraga S, 2005. Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophycea) isolates in the western Mediterranean Sea based on morphology toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences. J Phycol. 41: 212-225.

Peng YG, Ramsdell JS, 1996. Brain Fos induction is a sensitive biomarker for the lowest observed neuroexcitatory effects of domoic acid. *Fundamental and Applied Toxicology* 31: 162-168.

Pereira EF, Hilmas C, Santos MD, Alkondon M, Maelicke A, Albuquerque EX, 2002. Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors. *J Neurobiol* 53: 479-500.

Pereira P, Onodera H, Andrinolo D, Franca S, Araujo F, Lagos N, Oshima Y, 2000. Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon* 38: 1689-1702.

Pereira P, Li RH, Carmichael WW, Dias E, Franca S, 2004. Taxonomy and production of paralytic shellfish toxins by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* LMECYA40. *Eur. J. Phycol*. 39 : 361-368.

Pérez-Gómez A, Ferrero-Gutiérrez A, Novelli A, Franco JM, Paz B, Fernández-Sánchez MT, 2006. Potent neurotoxic action of the shellfish biotoxin yessotoxin on cultured cerebellar neurons. *Toxicol. Sci*. 90: 168-177.

Pierotti S, Malaguti C, Milandri A, Poletti R, Rossini GP, 2003. Functional assay to measure yessotoxins in contaminated mussel samples. *Anal. Biochem*. 312: 208-216.

Pilotto LS, Douglas RM, Burch MD, Cameron S, Beers M, Rouch GJ, Robinson P, Kirk M, Cowie CT, Hardiman S, Moore C, Attewell RG, 1997. Health effects of recreational exposure to cyanobacteria (blue-green) during recreational water related activities. *Australian and New Zealand Journal of Public Health* 21: 562-566.

Plakas SM, El Said KR, Jester ELE, Granade HR, Musser SM, Dickey RW, 2002. Confirmation of brevetoxin metabolism in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by controlled exposures to pure toxins and to *Karenia brevis* cultures. *Toxicon* 40: 721-729.

Plakas SM, Dickey RW, 2009. Advances in monitoring and toxicity assessment of brevetoxins in molluscean shellfish. *Toxicon* doi:1016/j.toxicon.2009.11.007

Poli MA, Templeton CB, Thompson WL, Hewetson JF, 1990. Distribution and elimination of brevetoxin PbTx-3 in rats. *Toxicon* 28: 903-910

Pomati F, Sacchi S, Rossetti C, Giovannardi S, Onodera H, Oshima Y, Neilan BA, 2000. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp. FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Phycol*. 36: 553-562.

Pomerat CM, Leake CD, 1954. Short term cultures for drugs assays: general considerations. *Annals of the New York Academy of Sciences* 58: 1110-1128.

Puiseux-Dao S, Molgo J, Benoit E, Fessard V, Puech L, Ten-Hage L, 2001. Toxicologie. In: *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Frémy J-M, Lassus P, (Eds), Editions Ifremer, Plouzané, pp. 301-367.

Pulido OM, 2008. Domoic acid toxicologic pathology: a review. *Mar. Drugs* 6: 180-219.

Radwan FF, Ramsdell JS, 2006. Characterization of in vitro oxidative and conjugative metabolic pathways for brevetoxin (PbTx-2). *Toxicological Sciences* 89: 57-65.

Randall JE, 2005. Review of Clupeotoxism, an often fatal illness from the consumption of Clupeoid fishes. *Pacific Science* 59 : 73-77.

Rao PVL, Bhattacharya R, Gupta N, Parida MM, Bhaskar ASB, Dubey R, 2002. Involvement of caspase and reactive oxygen species in cyanobacterial toxin anatoxin-a-induced cytotoxicity and apoptosis in rat thymocytes and Vero cells. *Arch Toxicol* 76: 227–235.

Rapala J, Robertson A, Negri AP, Berg KA, Tuomi P, Lyra C, Erkomaa K, Lahti K, Hoppu K, Lepisto L, 2005. First report of saxitoxin in Finnish lakes and possible associated effects on human health. *Environ. Toxicol*. 20: 331-340

Rehmann N, Hess P, Quilliam MA 2008. Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels (*Mytilus edulis*) by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 22: 549-558.

Rein KS, Borrone J., 1999. Polyketides from dinoflagellates: origin, pharmacology and biosynthesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 124: 117-131.

Rein KS, Snyder RV, 2006. The biosynthesis of polyketide metabolites by dinoflagellates. *Appl Environ Microbiol* 59: 93-125.

Rellan S, Osswald J, Saker M, Gago-Martinez A, Vasconcelos V, 2009. First detection of anatoxin-a in human and animal dietary supplements containing cyanobacteria. *Food and Chemical Toxicology* 47: 2189-2195.

Rhodes L, Towers N, Briggs L, Munday R, Adamson J, 2002. Uptake of palytoxin-like compounds by shellfish fed with *Ostreopsis siamensis* (Dinophyceae). *N Z. J. Mar. Freshwater Res*. 36: 631-636.

Richard D, Arsenault E, Cembella A, Quilliam M. 2001. Investigations into the toxicology and pharmacology of spirolides - a novel group of putative biotoxins. In: *Harmful and Toxic Algal Blooms,* Hallegraeff GM, Blackburn SI, Bolch CJ, Lewis RJ (Eds), Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 383-387.

Riobo P, Paz, B, Franco, JM, 2006. Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 566: 217-223.

Riobo P, Paz B, Franco JM, Vazquez JA, Murado MA, 2007. Proposal for a simple and sensitive haemolytic assay for palytoxin: Toxicological dynamics, kinetics, ouabain inhibition and thermal stability. *Harmful Algae* 7: 415-429.

Riobo P, Paz B, Franco JM, Vazquez JA, Murado MA, Cacho E, 2008. Mouse bioassay for palytoxin. Specific symptoms and dose-response against dose-death time relationships. *Food and Chemical Toxicology* doi : 10.1016/j.fct.2008.04.020

Roman Y, Alfonso A, Louzao MC, de la Rosa L, Leira F, Vieites JM, Vieytes MR, Ofuji K, Satake M, Yasumoto T, Botana LM, 2002. Azaspiracid-1, a potent, non apoptotic new phycotoxin with several cell targets. *Cellular signaling* 14: 703-716.

Ronzitti G, Hess P, Rehmann N, Rossini GP, 2007. Azaspiracid-1 alters the E-cadherin pool in epithelial cells. *Toxicological Sci*. 95 : 427-435.

Rossini GP, 2005. Functional assays in marine biotoxin detection. *Toxicology* 207: 451-462.

Rühl A, Hummert C, Gerdts G, Luckas B, 2001. Determination of new algal neurotoxins (spirolides) near the Scottish east coast. In: *International Council for the Exploration of the Sea publications*, C.M. documents (Oslo, Norway), Copenhagen, Denmark, S:09.

Ryan JC, Bottein Dechraoui M-Y, Morey JS, Rezvani A, Levin ED, Gordon CJ, Ramsdell JS, Van Dolah FM, 2007. Transcriptional profiling of whole blood and serum protein analysis of mice exposed to the neurotoxin Pacific Ciguatoxin-1. *NeuroToxicology* 28: 1099-1109.

Satake M, Ofuji K, Naoki H, James KJ, Furey A, McMahon T, Silke J, Yasumoto T, 1998. Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *J. Am. Chem. Soc*. 120: 9967-9968.

Satoh E, Ishii T, Nishimura M, 2003. Palytoxin-induced increase in cytosolic-free Ca^{2+} in mouse spleen cells. *European Journal of Pharmacology* 465: 9-13

Sayfritz SJ, Aasen JA, Aune T, 2008. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in Norwegian shellfish by liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometry detection. *Toxicon* 52: 330-340.

Scheiner-Bobis G, 2002. The sodium pump - its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur. J. Biochem.* 269: 2424-2433.

Sebastia J, Cristofol R, Martin M, Rodriguez-Farre E, Sanfeliu C, 2003. Evaluation of fluorescent dyes for measuring intracellular glutathione content in primary cultures of human neurons and neuroblastoma SH-SY5Y. *Cytometry Part A* 51: 16-25.

Servent D, Fruchard-Gaillard C, 2009. Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. *Journal of neurochemistry* 109: 1193-1202.

Shears NT, Ross PM, 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 RE, Adler M, 1989. The actions of a red tide toxin from *Ptychodiscus brevis* on single sodium channels in mammalian neuroblastoma cells. *FEBS Lett*. 247: 448-452.

Shinzato T, Furusu A, Nishino T, Abe K, Kanda T, Maeda T, Kohno S, 2008. Cowfish (Umisuzume, *Lactoria diaphana*) poisoning with rhabdomyolysis. *Inter Med* 47: 853-856.

Sivonen K, Jones G, 1999. Cyanobacterial toxins. In: *Toxic cyanobacteria in water*. Chorus I, Bartram J, (Eds.), E&FN Spon, London, pp. 41-111.

Sivonen K., 2000. Freshwater cyanobacterial neurotoxins: Ecobiology, chemistry, and detection. In: *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology and detection*. Botana LM (Ed), Marcel Dekker, New York, pp. 567-582.

Sies H, 1999. Glutathione and ist role in cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine* 27: 916-921.

Skulberg OM, Carmichael WW, Andersen RA, Matsunaga S, Moore RE, Skulberg R, 1992. Investigations of a neurotoxic oscillatorialean strain (Cyanophyceae) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. Environ. Toxicol. Chem. 11: 321-329.

Sosa S, Del Faveroa G, De Bortoli M, Vitab F, Soranzob MR, Beltramoc D, Ardizzonec M, Tubaro A, 2009. Palytoxin toxicity after acute oral administration in mice. *Toxicol. Lett*. doi:10.1016/j.toxlet.2009.09.009

Spielmann H, Grune B, Liebsch M, Seiler A, Vogel R, 2008. Successful validation of in vitro methods in toxicology by ZEBET, the National Centre for Alternatives in Germany at the BfR (Federal Institute for Risk Assessment). *Experimental and Toxicologic Pathology* 60: 225-233.

Steidinger KA, Tangen K, 1996. Dinoflagellates. In: Tomas CR (Ed.), Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates, Academic Press, New York, USA, pp. 387-598.

Su Z, Sheets M, Ishida H, Li F, Barry WH, 2004. Saxitoxin blocks L-Type Ica. *J. Pharmacol. Exp.Ther*. 308: 324–329.

Suarez Korsnes M, Hetland DL, Espenes A, Aune T. 2006. Induction of apoptosis by YTX in myoblast cell lines via mitochondrial signalling transduction pathway. *Toxicol. in Vitro* 20: 1419-1426.

Suarez Korsnes M, Hetland DL, Espenes A, Aune T, 2007. Cleavage of tensin during cytoskeleton disruption in YTX-induced apoptosis. *Toxicol. in Vitro* 21: 9-15.

Taniyama S, Mahmud Y, Tanu MB, Takatani T, Arakawa O, Noguchi T, 2001. Delayed haemolytic activity by the freshwater puffer *Tetraodon* sp. toxin. *Toxicon* 39: 725-727.

Taniyama S, Nahmud Y, Terada M, Takatani T, Arakawa O, Noguchi T, 2002. Occurrence of a food poisoning incident by palytoxin from a serranid *Epinephelus* sp. in Japan. *J. Nat. Toxins* 11: 277-282.

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.

Teitelbaum JS, Zatorre RJ, Carpenter S, Gendron D, Evans AC, Gjedde A, Cashman NR, 1990. Neurologic sequelae of domoic acid intoxication due to the ingestion of contaminated mussels. *New England Journal of Medicine* 322: 1781-1787.

Terao K, Ito E, Oarada M, Ishibashi Y, Legrand A-M, Yasumoto T, 1991. Light and electron microscopic studies of pathologic changes induced in mice by ciguatoxin poisoning. *Toxicon* 29: 633-643.

Terlau H, Heinemann SH, Stuhmer W, Pusch M, Conti F, Imoto K, Numa S, 1991. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBs Lett* 293 : 93-96.

Tibetts BM, Baden DG, Benson JM, 2006. Uptake, tissue distribution, and excretion of brevetoxin-3 administered to mice by intratracheal instillation. *J Toxicol Environ Health A* 69: 1325-1335.

Tillmann U; Elbrachter M, Krock B, Uwe J, Cembella A, 2009. *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. *European Journal of Phycology* 44: 63-79.

Tindall DR, Dickey RW, Carlson RD, Morey-Gaines G, 1984. Ciguatoxic dinoflagellates from the Carribean Sea. In: *Seafood toxins*. Ragelis P, (Ed), ACS Symposium Series 262. American Chemical Society, Washington DC, pp. 225-240.

Tindall DR, Miller DM, Tindall PM, 1990. Toxicity of *Ostreopsis lenticularis* from the British and United States Virgin Islands. In: *Toxic Marine Phytoplankton*. Granéli E, Sundström B, Edler L, Anderson DM (Eds), Elsevier, New York, pp. 424-429.

Thomazeau S, Bernard C, soumis. Trends in reports of toxic cyanobacteria in the literature from 1999 to 2009.

Tosteson MT, Scriven DR, Bharadwaj AK, Kishi Y, Tosteson DC, 1995. Interaction of palytoxin with red cells: structure-function studies. *Toxicon* 33:799-807.

Totti C, Accoroni S, Cerino F, Cucchiari E, Romagnoli T, 2009. *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata. *Harmful Algae* doi:10.1016/j.hal.2009.10.006

Touzet N, Franco, J, Raine, R, 2008. Morphogenetic diversity and biotoxin composition of *Alexandrium* (Dinophyceae) in Irish coastal waters. *Harmful Algae* 7: 782–797

Toyufuku H, 2006. Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). *Marine Pollution Bulletin* 52: 1735-1745.

Tréguer P-Y, 1993. Des effets délétères de certaines toxines phytoplanctoniques sur la santé humaine en France. Thèse de l'Université Rennes I - Faculté de Médecine, Rennes, p.

Tréguer P-Y, 1998. Les intoxications alimentaires humaines causées par les algues phytoplanctoniques toxiques. *Med. Nut*. 4: 145-149.

Truelove J, Mueller R, Pulido O, Martin L, Fernie S, Iverson F, 1997. 30-day oral toxicity study of domoic acid in cynomolgus monkeys: lack of overt toxicity at doses approaching the acute toxic dose. *Natural toxins* 57: 111-114.

Truman P, Lake RJ, 1996. Comparison of mouse bioassay and sodium channel cytotoxicity assay for detecting paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish extracts. *Journal of AOAC International* 79: 1130-1133.

Truman P, Stirling DJ, Northcote P, Lake RJ, Seamer C, Hannah DJ, 2002. Determination of brevetoxins in shellfish by the neuroblastoma assay. *Journal of AOAC International* 85: 1057-1063.

Tryphonas L, Truelove J, Todd E, Nera E, Iverson F, 1990. Experimental oral toxicity of domoic acid in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) and rats – preliminary investigations. *Food and Chemical Toxicology* 28: 707-715.

Tubaro A, Sosa S, Carbonatto M, Altinier G, Vita F, Melato M, Satake M, Yasumoto T, 2003. Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. *Toxicon* 41: 783-792.

Tubaro A, Dell'Ovo V, Sosa S, Florio C, 2009. Yessotoxins: A toxicological overview. *Toxicon* doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.038

Twiner MJ, Hess P, Bottein Dechraoui M-Y, McMahon T, Samons MS, Satake M, Yasumoto T, Ramsdell JS, Doucette GJ, 2005. Cytotoxic and cytoskeletal effects of azaspiracid-1 on mammalian cell lines. *Toxicon* 45: 891-900.

Twiner MJ, Rehmann N, Hess P, Doucette GJ, 2008a. Azaspiracid shellfish poisoning: a review on the chemistry, ecology, and toxicology with an emphasis on human health impacts. *Marine Drugs* 6: 39-72.

Twiner MJ, Ryan JC, Morey JS, Smith KJ, Hammad SM, Van Dolah FM, Hess P, McMahon T, Satake M, Yasumoto T, Doucette GJ, 2008b. Transcriptional profiling and inhibition of cholesterol biosysnthesis in human T lymphocyte cells by the marine toxin azaspiracid. *Genomics* 91: 289-300.

Uemura D, Ueda K, Hirata Y, 1981. Further studies on palytoxin. II. Structure of palytoxin. *Tetrahedron Lett.* 22: 2781-2784.

Uemura D, Hirata Y, Iwashita T Naoki H, 1985. Studies on palytoxin. *Tetrahedron* 41:1007-1017.

Ukena T, Satake M, Usami M, Oshima Y, Naoki H, Fujita T, Kan Y, Yasumoto T, 2001. Structure elucidation of ostreocin D, a palytoxin analog isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis. Biosci Biotechnol Biochem.* 65: 2585-2588.

Usami M, Satake M, Ishida S, 1995. Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis. J. Am. Chem. Soc* 117: 5389-5390.

Usleber E, Schneider E, Terplan G, 1991. Direct enzyme immunoassay in microtitration plate and test strip format for the detection of saxitoxin in shellfish. *Letters in Applied Microbiology* 13: 275-277.

Vale C, Nicolaou KC, Frederick MO, Gómez-Limia B, Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM, 2007. Effects of azaspiracid-1, a potent cytotoxic agent, on primary neuronal cultures. A structure-activity relationship study. *J. Med. Chem*. 50: 356-363.

Vale C, Alfonso A, Vieytes MR, Romars XM, Arvalo F, Botana AM, Botana LM, 2008. In vitro and in vivo evaluation of paralytic shellfish poisoning toxin potency and the influence of the pH of extraction. *Anal. Chem*. 80: 1770-1776.

Vale-Gonzalez C, Pazos MJ, Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM, 2007. Study of the neuronal effects of ouabain and palytoxin and their binding to Na,K-ATPases using an optical biosensor. *Toxicon* 50: 541-552.

Valverde I, Lago J, Reboreda A, Vieites JM, Cabado AG, 2008. Characteristics of palytoxin-induced cytotoxicity in neurobalstoma cells. *Toxic. in vitro* 22:1432-9.

Van Dolah FM, 2000. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. Environ Health Perspect. 108: 33-141.

Van Egmond H, Aune T, Lassus P, Speijers GJA., Waldock M, 1993. Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *Nat. Toxins* 2: 41-83.

Vieites JM, Botana LM, Vieytes M., Leira FJ. 1999. Canning process that diminishes paralytic shellfish poison in naturally contaminated mussels (Mytilus galloprovincialis). *J. Food Prot*. 62: 515-519.

Vilarino N, Nicolaou KC, Frederick MO, Cagide E, Ares IR, Louzao MC, Vieytes MR, Botana LM, 2006. Cell growth inhibition and actin cytoskeleton disorganization induced by azaspiracid-1 structure-activity studies. *Chem. Res. Toxicol*. 19: 1459-1466.

Vilarino N, Fonfria ES, Molgo J, Araoz R, Botana LM, 2009. Detection of gymnodimine-A and 13-desmethyl C spirolide phycotoxins by fluorescence polarization. *Anal. Chem.* 81: 2708-2714.

Villar González A, Rodriguez-Velasco ML, Ben-Gigirey B, Botana LM, 2006. First evidence of spirolides in Spanish shellfish. *Toxicon* 48: 1068-1074.

Wang S-Y, Wang GK, 2003. Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. *Toxicon* 15: 151-159.

Welker M, von Döhren H, 2006. Cyanobacterial peptides - Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 30: 530-563.

WG Toxicology, 2005. Report of the First Meeting of the Working Group on Toxicology, Cesenatico, Italy, 24–25 October 2005.

Wiberg GS, Stephenson NR, 1960. Toxicologic studies on paralytic shellfish poison. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2: 607-615.

Wiedner C, Rücker J, Brüggemann R, Nixdorf B, 2007. Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. *Oecologia* 152: 473-484.

Wiegand C, Pflugmacher S, 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. *Toxicol. Applied Pharmac*. 203: 201-218.

Whittaker VP, 1998. Arcachon and cholinergic transmission. *J Physiology (Paris)* 92: 53-57.

Wright JLC, Boyd RK, Defreitas ASW, Falk M, Foxall RA, Jamieson WD, Laycock MV, McCulloch AW, McInnes AG, Odense P, Pathak VP, Quilliam MA, Ragan MA, Sim PG, Thibault P, Walter JA, Gilgan M, Richard DJA, Dewar D, 1989. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino-acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward island. *Canadian Journal of Chemistry* 67: 481-490.

Wu CH, 2009. Palytoxin: Membrane mechanisms of action. *Toxicon* doi:10.1016/ j.toxicon.2009.02.030

Yasumoto T, Yasumura D, Ohizumi Y, Takahashi M, Alcala AC, Alcala LC, 1986. Palytoxin in two species of xanthid crab from the Philippines. *Agric. Biol. Chem.* 50: 163-167.

Yokoyama A, Murata M, Oshima Y, Iwashita T, Yasumoto T, 1988. Some chemical properties of maitotoxin, a putative calcium channel agonist isolated from a marine dinoflagellate *J Biochem* 104: 184-187

Zeliadt NA, Warmka JK, Wattenberg EV, 2003. Mitogen activated protein kinases selectively regulate palytoxin-stimulated gene expression in mouse keratinocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 192: 212-221.

Zingone A, Siano R, D'Alelio D, Sarno D, 2006. Potentially toxic and harmful microalgae from costal waters of the Campania region (Tyrrhenian Sea, Mediterranean Sea). *Harmful Algae* 5: 321-337.

Annexes

Annexe 1

Phycotoxines, organismes producteurs, voies d'intoxication et zones géographiques concernées

Phycotoxines	Acide okadaïque, dinophysistoxines	Pecténotoxines	Yessotoxines	Azaspiracides	Saxitoxine et analogues	Brévétoxines	Ciguatoxines
Mécanismes d'action des toxines	Inhibition de protéines phosphatases	nd	nd	nd	Blocage des canaux sodiques voltage-dépendants	Activation des canaux sodiques voltage-dépendants	Activation des canaux sodiques voltage-dépendants
Organismes producteurs	*Dinophysis* spp., *Prorocentrum* spp	*Dinophysis* spp.	*Gonyaulax spinifera, Lingoludinium polyedrum, Protoceratium reticulatum,*	*Azadinium spinosum*	*Alexandrium* spp., *Gymnodinium catenatum, Pyrodinium bahamense*	*Karenia brevis*	*Gambierdiscus* spp.
Voie d'intoxication	Bivalves (moules, huîtres, clams, etc.)				Bivalves (moules, huîtres, clams), crabes	Bivalves (moules, huîtres, clams) et autres espèces spécifiques des régions concernées	Poissons récifaux
Zones géographiques	Japon, Europe, Amérique	Australie, Japon, Mer Adriatique	Japon, Mer Adriatique, Nvelle Zélande	Mer du Nord	Tous les continents	Floride, Japon, Mexique, Nouvelle Zélande	Antilles, Océan Indien, Océan Pacifique

nd : non déterminé

Phycotoxines, organismes producteurs, voies d'intoxication et zones géographiques concernées (suite)

Phycotoxines	Maïtotoxines	Gambiérol	Palytoxine et analogues	Spirolides	Gymnodimines	Acide domoïque
Mécanismes d'action des toxines	Activation de canaux cationiques non spécifiques	Canaux sodiques ou potassiques voltage-dépendants ?	Liaison à la pompe Na^+, K^+-ATPase	Liaison aux récepteurs nicotiniques et/ou muscariniques de l'acétylcholine	Liaison aux récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine	Activation des récepteurs glutamatergiques
Organismes producteurs	*Gambierdiscus toxicus*	*Gambierdiscus toxicus*	*Ostreopsis* spp.	*Alexandrium ostenfeldii*	*Karenia selliformis*	*Pseudo-nitzschia* spp.
Voie d'intoxication	Poissons		Crabes, poissons	Bivalves	Palourdes	Bivalves (moules, coquilles Saint-Jacques, pétoncles) et poissons (anchois)
Zones géographiques	Polynésie française	Polynésie française	Espagne, France, Grèce, Italie, Japon, Océan Indien, Nouvelle-Zélande	Canada, Etats-Unis, France, Nouvelle-Zélande, Océan Pacifique	Amérique du Nord, Europe, Nouvelle-Zélande, Tunisie,	Canada, Mer du Nord, Nord USA

Principales cyanotoxines, mécanismes d'action, organismes producteurs et zones géographiques touchées

Cyanotoxines	Mécanismes d'action des toxines	Cyanobactéries productrices	Zones géographiques
Cylindrospermopsine	Génotoxicité	*Anabaena* spp., *Aphanizomenon* spp., *Cylindrospermopsis* spp.,*Lyngbya* sp., *Raphidiopsis* sp., *Umezakia* sp.	Australie, Brésil, Espagne, Etats-Unis,
Microcystines, nodularines	Inhibition de protéines phosphatases	*Microcystis* spp., *Oscillatoria* spp., *Planktothrix* spp.	Canada, Europe du Nord, Japon, Suisse
Anatoxine-a, homoanatoxine-a	Fixation au récepteur nicotinique de l'acétylcholine	*Anabaena* spp., *Aphanizomenon* spp., *Oscillatoria* spp., *Phormidium sp.*	Allemagne, Australie, Brésil, Chine, Etats-Unis, France, Finlande, Irlande, Italie, Norvège, Nouvelle-Zélande
Anatoxine-a(s)	Inhibition de l'acétylcholine estérase	*Anabaena* spp.	Brésil, Canada, Danemark, Etats-Unis
Saxitoxine et analogues	Blocage des canaux sodiques voltage-dépendants	*Anabaena circinalis, Aphanizomenon* spp., *Cylindrospermopsis* spp., *Lyngbya wollei, Planktothrix* sp.	Allemagne, Australie, Brésil, Canada, Chine, Etats-Unis, France, Portugal
β-N-méthylamino-L-alanine	Neurotoxicité	Toutes les souches testées en produisent	Tous les continents

Annexe 2

Organismes producteurs de saxitoxines et répartition mondiale

En eau douce, les toxines paralysantes ont été détectées pour la première fois au début des années 1980 en Amérique du Nord dans une efflorescence à *Aphanizomenon flos-aquae* (Mahmood et Carmichael, 1986a). Depuis, d'autres genres de cyanobactéries ont été rapportés comme producteurs de STXs (Tableau A-1).

Tableau A-1 : Cyanobactéries productrices de saxitoxines et zones géographiques concernées (d'après Thomazeau et Bernard, soumis)

Organismes producteurs	Zones géographiques concernées	Références bibliographiques
Anabaena circinalis	Australie	Bowling, 1994 Baker et Humpage, 1994
Anabaena flos-aquae	Portugal	Perreira et al. 2000
Anabaena lemmermannii	Danemark Finlande	Kaas et Henriksen, 2000 Rapala et al., 2005
Aphanizomenon flos-aquae	Canada Chine Etats-Unis Portugal	Mahmood et Carmichael, 1986a Liu et al., 2006 Pereira et al., 2000 Ferreira et al., 2001
Aphanizomenon gracile	Brésil Portugal France	Costa et al., 2006 Pereira et al., 2004 Ledreux et al., soumis
Aphanizomenon issatschenkoi	Brésil Portugal	Costa et al., 2006 Nogueira et al., 2004
Cylindrospermopsis catemaco	Mexique	Berry et Lind, 2009
Cylindrospermopsis phillippensis	Mexique	Berry et Lind, 2009
Cylindrospermopsis raciborskii	Brésil	Lagos et al., 1999 Molica et al., 2002
Limnothrix redekei	Italie	Pomati et al., 2000
Lyngbya wollei	Etats-Unis	Carmichael et al., 1997

En milieu marin, une dizaine d'espèces appartenant à trois genres de dinoflagellés (*Alexandrium*, *Pyrodinium* et *Gymnodinium)* sont actuellement reconnus comme producteurs de STXs.

Les saxitoxines en eau douce (Tableau A-1) tout comme en milieu marin présentent une distribution mondiale (Figure A-1).

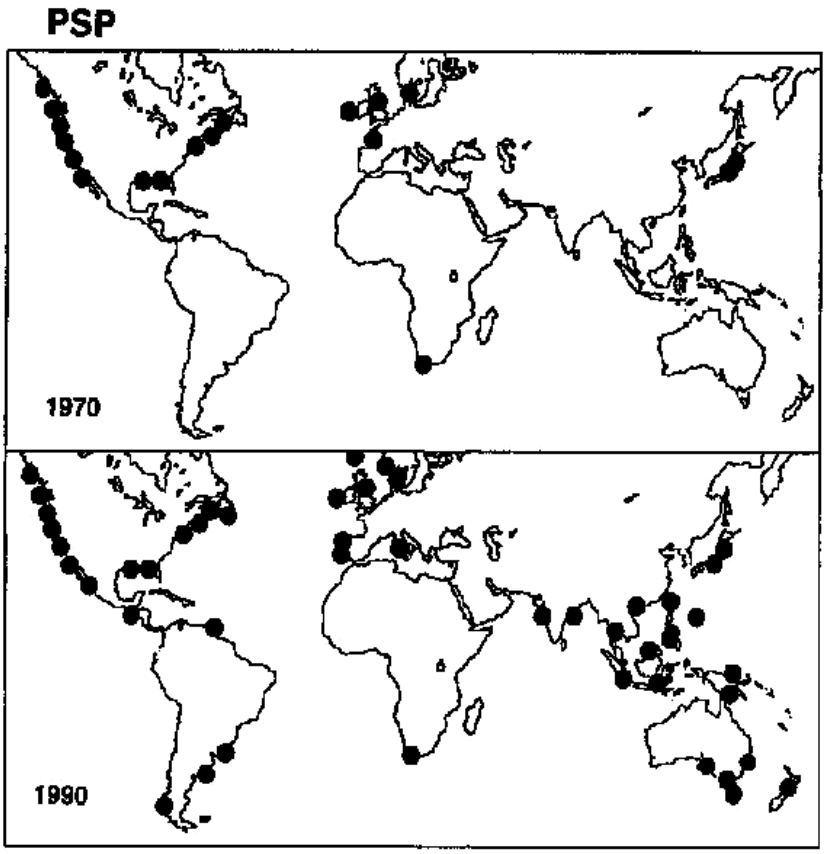


Figure A-1 : Répartition des épisodes toxiques attribués aux toxines paralysantes en milieu côtier en 1970 et 1990 (d'après Hallegraeff, 1993)

En Europe, presque tous les pays ayant une façade maritime ont été confrontés à des épisodes d'intoxication paralysante par fruits de mer (IPFM). Aux Etats-Unis, les blooms à *Alexandrium catenella* et *A. tamarensis* sont observés de façon récurrente chaque année. Sur la côte Est, *A. tamarensis* est présent des côtes du Maine au Massachusetts et plus rarement jusqu'au New Jersey. Depuis 1991, *A. catenella* est rencontré chaque année du nord de la Californie jusqu'en Alaska. En Asie, le Japon découvre l'IPFM en 1948 suite à une contamination de coquilles Saint Jacques par *A. tamarense* qui a rendu malade 90 personnes et causé trois morts. En Asie du Sud, bien que le recensement soit difficile à établir, des cas d'IPFM ont été signalés en Thaïlande, en Indonésie, aux Philippines. L'Australie et la Nouvelle-Zélande connaissent aussi régulièrement des épisodes d'efflorescences produisant des toxines paralysantes. Concernant le continent africain, peu de données existent hormis pour les pays du Maghreb et l'Afrique du Sud qui commencent à mettre en place des réseaux de surveillance.

Cet inventaire est loin d'être exhaustif mais il permet de mettre en évidence le risque présenté par ces toxines, l'ubiquité du phénomène et l'impact considérable qu'il induit sur le plan

économique, notamment du fait de l'interdiction de la commercialisation de différents fruits de mer.

Annexe 3

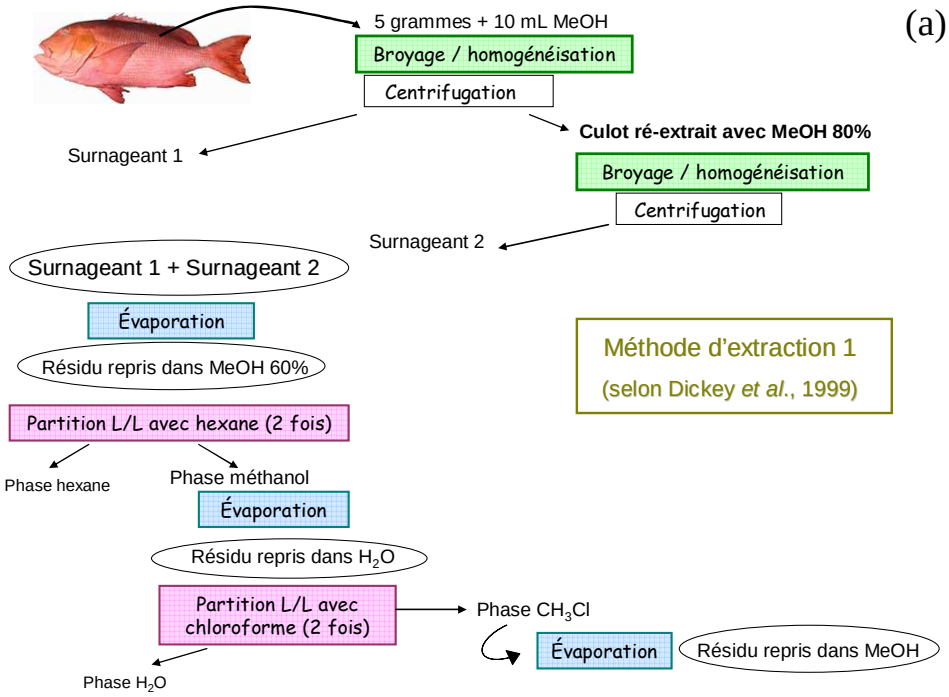
Toxicités exprimées en DL_{50} chez la souris pour la toxine botulique, les cyano- et les phycotoxines.

Toxine	DL_{50} ($\mu g.kg^{-1}$) sur souris (voie i.p.)	Origine	Références
Toxine botulique type A	0,0012	*Clostridium botulinum*	Gill (1982)
Anatoxine(a)-s	20	Cyanobactéries	Mahmood et Carmichael (1986b)
Anatoxine-a, homoanatoxine-a	200250	Cyanobactéries	Devlin et al. (1977) ; Skulberg et al. (1992)
Microcystines et nodularines	50 à 1200	Cyanobactéries	Sivonen et Jones (1999)
Cylindrospermopsine	2100	Cyanobactéries	Ohtani et al. (1992)
Saxitoxine	10	Cyanobactéries, Dinoflagellés	Wiberg et Stephenson (1960)
Brévétoxines	170 - 400	Dinoflagellés	Plakas et Dickey (2009)
Ciguatoxine (P-CTX1)	0,25	Dinoflagellés	Lewis et al. (1991)
Acide okadaïque	200	Dinoflagellés	Aune et al. (2007)
Azaspiracide (AZA1)	200	Dinoflagellés	Satake et al. (1998)
Palytoxine	0,7	Dinoflagellés	Munday, 2006
Yessotoxine (YTX)	100	Dinoflagellés	Tubaro et al. (2009)
Spirolide (SPX-dC)	6,5	Dinoflagellés	Marrouchi et al. (2008)
Pecténotoxine (PTX2)	220	Dinoflagellés	Miles et al. (2004)
Maïtotoxine	0,13	Dinoflagellés	Yokoyama et al. (1988)
Acide domoïque	3600	Diatomées	Peng et Ramsdell (1996)

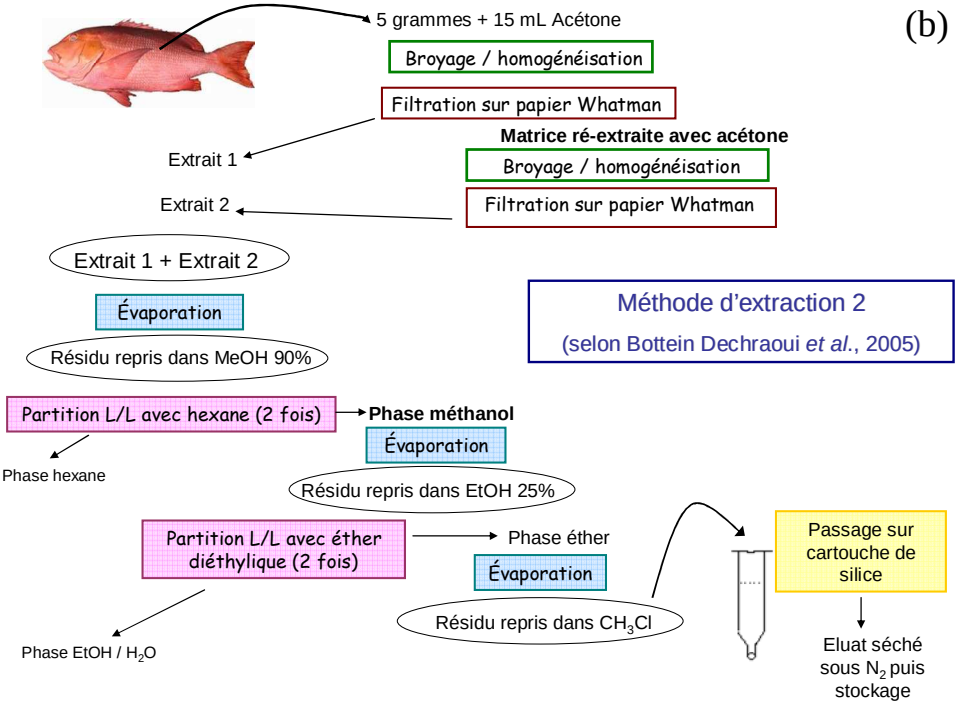
Annexe 4

Schéma récapitulatif de la méthode d'extraction de la brévétoxine PbTx-3 à partir de chair de poisson supplémentée (a) d'après Dickey et al. (1999) (b) d'après Bottein Dechraoui et al. (2005)

(a)



(b)



Annexe 5

Article publié dans Toxicon

Toxicon 52 (2008) 163–174

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

A non-radioactive ligand-binding assay for detection of cyanobacterial anatoxins using *Torpedo* electrocyte membranes

Rómulo Aráoz [a,*], Michael Herdman [b], Rosmarie Rippka [b], Aurélie Ledreux [c], Jordi Molgó [a], Jean-Pierre Changeux [d], Nicole Tandeau de Marsac [b], Hoàng-Oanh Nghiêm [d,1]

[a] CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard – FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire – UPR9040, 1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette, France
[b] Unité des Cyanobactéries (CNRS, URA 2172), Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France
[c] USM 505 Écosystèmes et interactions toxiques, Muséum National d'Histoire Naturelle, 57 rue Cuvier, 75231 Paris, France
[d] Unité Récepteurs et Cognition (CNRS URA 2182), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 11 January 2008
Received in revised form 10 May 2008
Accepted 12 May 2008
Available online 29 May 2008

Keywords:
α-Bungarotoxin biotin-XX conjugate (Biotin-BgTx)
Anatoxin-a
Cyanobacteria
Homoanatoxin-a
Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR)
Torpedo electrocyte membranes

ABSTRACT

Anatoxin-a (ANTX) and homoanatoxin-a (HANTX), neurotoxins exclusively produced by cyanobacteria (LD_{50} 200–250 μg kg^{-1}, i.p. mouse), are agonists of the nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) to which they tightly bind. We have exploited the high affinity of these neurotoxins for the nicotinic receptors to develop a non-radioactive ligand-binding assay using *Torpedo* electrocyte membranes and biotinylated α-bungarotoxin (Biotin-BgTx) as tracer for detection of this class of toxins. The affinity of the *Torpedo* nAChRs for Biotin-BgTx was determined by chemiluminescence ($K_d = 1.2 \times 10^{-8}$ M Biotin-BgTx) or color development ($K_d = 3.5 \times 10^{-8}$ M Biotin-BgTx). Binding of ANTX or HANTX to the nAChRs competitively inhibits the binding of Biotin-BgTx to the receptors in a concentration-dependent manner (chemiluminescence: IC_{50}: 6.2×10^{-8} M ANTX; color development: IC_{50}: 1.7×10^{-8} M ANTX). The proposed method was validated by HPLC/MS with detection in the single ion recording mode. The non-radioactive ligand receptor-binding assay was successfully applied to the analysis of extracts prepared from cyanobacteria in culture and from natural habitats, as well as from aqueous samples. This method is suitable for ANTX and HANTX early survey of environmental samples since it requires minimal manipulations, is highly sensitive and gives consistent signal-to-noise ratios.
© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Massive growth of cyanobacteria and seasonal bloom formation are among the most important signs of eutrophication of water reservoirs, lakes, and coastal waters. Cyanobacterial blooms, when dominated by toxic cyanobacteria, are of serious concern for public health, human activities, and wild and stock animals, since certain species of cyanobacteria can synthesize hepatotoxins and/or neurotoxins (Sivonen and Jones, 1999; Briand et al., 2003).

Anatoxin-a (ANTX) and its methyl homologue homoanatoxin-a (HANTX) are potent agonists of the nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) to which they tightly bind (Aronstam and Witkop, 1981; Skulberg et al., 1992). ANTX, formerly known as "Very Fast Death Factor", kills mice 2–5 min after intraperitoneal injection preceded by twitching, muscle spasm, paralysis and respiratory arrest (LD_{50} i.p. mouse: 200 μg kg^{-1}; Devlin et al., 1977). ANTX and HANTX, hereafter jointly termed cyanobacterial anatoxins, are produced by some members of the genera *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Oscillatoria* and *Planktothrix* (Sivonen and Jones, 1999; Viaggiu et al.,

* Corresponding author. Tel.: +33 (0) 1 69 82 36 42; fax: +33 (0) 1 69 82 41 41.
E-mail address: araoz@nbcm.cnrs-gif.fr (R. Aráoz).
[1] To the memory of whom this work is dedicated.

0041-0101/$ – see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.toxicon.2008.05.001

2004). Occurrence of anatoxins-producing cyanobacteria was linked to animal fatalities worldwide, e.g. cows in Canada (Carmichael and Gorham, 1978), dogs in Scotland, France and New Zealand (Edwards et al., 1992; Gugger et al., 2005; Wood et al., 2007, respectively), and lesser flamingos in Kenya (Krienitz et al., 2003). Massive proliferation of cyanobacteria constitutes a potential danger that needs to be monitored to prevent fatal episodes like the one that occurred to patients in Caruaru, Brazil (Pouria et al., 1998) where the haemodialysis water was contaminated with microcystin, or the massive human intoxication due to cylindrospermopsin in the water supply of Palm Island, Australia (Hawkins et al., 1985).

Most of the current methods for the detection of cyanobacterial anatoxins require sophisticated instruments (Maizels and Budde, 2004; Vasas et al., 2004; James et al., 2005). There is also a lack of reference toxins and standardized assays for the survey of this class of toxins. Although, the mouse bioassay is still used in many countries as the method of choice for marine biotoxin monitoring, recent European directives state that any functional method, if fully validated, can be used to replace the mouse bioassay (Hess et al., 2006).

In a previous study (Aráoz et al., 2005) we adapted a radio-ligand-binding assay for detection of anatoxins in cell extracts of axenic cyanobacteria. However, problems inherent to the use of radioactivity (safety, radioisotope decay, cost issues) prompted us to further improve the receptor ligand-binding assay by developing a specific non-radioactive method that allows simple visual detection of cyanobacterial anatoxins but cannot differentiate ANTX from HANTX. The non-radioactive receptor ligand-binding assay is based on: (i) the use of *Torpedo* electrocyte membranes rich in nAChRs, (ii) the high affinity of cyanobacterial anatoxins for the nAChRs, and, (iii) the use of α-bungarotoxin biotin-XX conjugate (Biotin-BgTx) as tracer. The non-radioactive receptor ligand-binding assay is suitable for cyanobacterial anatoxins survey of environmental samples, as it requires minimal manipulations, is highly sensitive and gives consistent signal-to-noise ratios.

2. Materials and methods

2.1. Axenic cyanobacteria, environmental samples and toxin standards

The axenic cyanobacterial strains used in this study (Table 1) were from the Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria (PCC). The culture conditions employed are described by Rippka and Herdman (1992). A range of environmental samples were analyzed for their content in cyanobacterial anatoxins: (1) a cyanobacterial biofilm from the La Loue River (France) dominated by *Phormidium favosum* and containing 8 mg g^{-1} ANTX (Gugger et al., 2005), (2) floating cyanobacterial mats collected from the La Loue River in the environs of the toxic biofilms, (3) a phytoplankton sample from the water reservoir of Dakar-Bango (Senegal) dominated by *Anabaena flos-aquae* and *Anabaena solitaria*, (4) a phytoplankton sample from Djoudj Lake (Senegal) dominated by *Microcystis aeruginosa* and (5) a cyanobacterial bloom sample collected in August 2006 from a small pond in Orsonville (Yvelines, France) containing planktonic (*Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* and *Anabaenopsis*) and benthic (*Oscillatoria* and *Pseudanabaena*) cyanobacteria, as well as diverse colonial unicellular cyanobacteria. The samples from the La Loue River, Dakar-Bango and Djoudj Lake were kindly provided by Dr. C. Bernard (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France). As toxin references, we used purified ANTX from *Oscillatoria*sp. strain PCC 9240 that was characterized by GC/MS and NMR (Aráoz et al., 2005), and (±)-anatoxin-a fumarate (ANTX-fumarate, Tocris, Ellisville, MO, USA).

2.2. Preparation of cell extracts

2.2.1. Axenic lyophilized cyanobacteria

Extracts from lyophilized axenic cyanobacterial cultures were prepared as described (Aráoz et al., 2005). Briefly, 20 mg of lyophilized filaments were homogenized in 4 ml of a solution containing 50 mM acetic acid in water using a high-speed Ultraturrax T25 homogenizer (Janke and Kunkel, Staufen, Germany). The homogenates were incubated under constant stirring for 4 h and then centrifuged (12,000*g*; 15 min; 15 °C). The supernatants were ultrafiltered through 5 kDa MWCO centrifugal units (Vivaspin, Sartorius, Göttingen, Germany) and stored at −20 °C until use.

2.2.2. Axenic senescent cyanobacteria

Two-months-old axenic cultures (40 ml) of *Oscillatoria* sp. PCC 9240 and *Oscillatoria formosa* PCC 10111 were harvested by centrifugation (5,000*g* for 15 min at 22 °C). The culture supernatant were passed through 0.1 μm filter units (Millex, Millipore, Billerica, MA, USA) and conserved at 4 °C until use (see Section 2.4). The cyanobacterial pellets (~100 mg wet weight) were frozen in liquid nitrogen and ground with a mortar and pestle in 2 ml of 50 mM acetic acid in water. The homogenates were incubated for 4 h at room temperature (22 °C) with constant stirring and then centrifuged (15 min, 12,000*g* at 15 °C). The supernatants were passed through 0.1 μm filter units and dried in a Speed-vac (Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA). The desiccated extracts were resuspended in 100 μl of 50 mM acetic acid in water and stored at −20 °C until use.

2.2.3. Cyanobacterial environmental samples

The environmental samples collected from the La Loue River (cyanobacterial biofilm and floating mats), the water reservoir of Dakar-Bango and the Djoudj Lake (Table 1) were processed as follows: 20 mg of lyophilized material was resuspended in 5 ml 50% (v/v) methanol (MeOH) in water and sonicated for 10 min (Branson Sonifier 250, Danbury, CT, USA). The homogenates were centrifuged (5,000*g* for 15 min at 22 °C) and the supernatants passed through 0.45 μm filter units (Millex, Millipore), aliquoted and stored at −20 °C until use.

The cyanobacterial bloom sample (2 l) from Orsonville pond was centrifuged at 5,000*g* for 30 min at 22 °C within 3 h after collection. The supernatant was passed through 0.1 μm filter units and conserved at 4 °C until use (see Section 2.4). One gram (wet weight) of the resulting pellet was frozen in liquid nitrogen and ground with a mortar and

Table 1
Cyanobacterial samples analyzed by the non-radioactive ligand-binding assay

1. Lyophilized axenic cyanobacteria, origin and medium	Toxin	Inhibition (%)[n]
Oscillatoria (Cluster 1)		
PCC 7515; Water tank, Stockholm, Sweden, 1972[a]; 2N	n.d.[b]	10
Oscillatoria (Cluster 2)		
PCC 7112; Soil, San Francisco, USA, 1970[a]; BG11	n.d.[b]	0
Oscillatoria (Cluster 3)		
PCC 6401; Marine mud, California, 1964[a]; BG11	n.d.[b]	0
Oscillatoria (Cluster 4)		
PCC 6412; Fresh water, California, USA, 1964[a]; BG11	ANTX[b]	48
PCC 6506; Source unknown; BG11	ANTX[b]	53
PCC 6602; Fresh water, California, USA, 1964[a]; BG11	n.d.[b]	5
PCC 9029; Source unknown, co-identic with PCC 6506[a]; 2N	ANTX/HANTX[b]	51
Oscillatoria (Cluster unknown)		
PCC 7823; Garden soil sample, Dundee, Scotland, 1978[a]; 2N	n.d.[b]	10
PCC 8808; Communal wash-house, Dijon, France, 1988[a]; 2N	n.d.[b]	15
PCC 9240; Lake Hormajärvi, Finland, 1986[c]; 2 N	ANTX[b,c]	85
PCC 10111; Lake Levrasjön, Skane, Sweden, 1981[d]; 2N	HANTX[b,d]	65
Planktothrix (ex *Oscillatoria* cluster 5)		
PCC 7805; Veluwemeer, The Netherlands, 1972[a]; BG11	MIC[e]	14
PCC 7811; Calcareous water, Vert le Petit, France, 1964[a]; 2N	n.d.[b]	11
PCC 7821; Lake Gjersjfen, Åkershus, Norway, 1971[a]; 2N	n.d.[b]	5
PCC 9214; Fish pond, Landjia, Central African Rep., 1989[a]; 2N	n.d.[b]	21
Symploca		
PCC 9410; Loamy soil, Kathmandu, Nepal[f]; 2N	n.d.[b]	15
Anabaena flos-aquae		
PCC 9302; Freshwater lake, Canada (525-17-b-1c)[b,g]; $2N_{10}$	MIC[h,i]	13
PCC 9332; Lake Windermere, Cumbria, England[b,j]; $BG11_{05}$	n.d.[b]	12
PCC 9349; Beaverhill Lake, Alberta, Canada[b,k]; $2N_{10}$	n.d.[b]	19
Aphanizomenon flos-aquae		
NH-5,[o] Fish pond, Durham, New Hampshire, USA, 1980[g]; $Z8o_5$	STX[g]	0[p]
Cylindrospermopsis raciborskii		
AWT205[q]; Oatley Pond, Sydney, Australia, 1997[l]; $Z8o_5$	CYN[l]	19
2. Senescent axenic cyanobacteria in culture		
Cell pellet of strain PCC 9240	ANTX[n]	59
Cell pellet of strain PCC 10111	HANTX[n]	50
3. Lyophilized environmental samples		
Biofilm; La Loue River, France, 2005[m]	ANTX[m]	100
Cyanobacterial floating mats; La Loue River, France, 2005	ANTX[n]	27/40
Water bloom; reservoir, Dakar-Bango, Senegal, 2005	n.d.[n]	0
Water bloom; Lake Djoud, Senegal, 2005	n.d.[n]	2
Water bloom; pond, Orsonville, France, 2006	n.d.[n]	0
4. Aqueous sample and culture supernatants		
Environmental pond water, Orsonville, France, 2006	n.d.[n]	0
Supernatant of a senescent culture of strain PCC 9240	ANTX[n]	50
Supernatant of a senescent culture of strain PCC 10111	HANTX[n]	75

ANTX, anatoxin-a; HANTX, homoanatoxin-a; MIC, microcystin; CYN, cylindrospermopsin; STX, saxitoxin; n.d. not detected.
[a] Rippka and Herdman (1992).
[b] Aráoz et al. (2005).
[c] Sivonen et al. (1989).
[d] Skulberg et al. (1992).
[e] Bouaïcha et al. (1996).
[f] Schlösser (1994).
[g] Mahmood and Carmichael (1986).
[h] Harada et al. (1991).
[i] Rinehart et al. (1994).
[j] Booker and Walsby (1979).
[k] Starr and Zeikus (1993).
[l] Hawkins et al. (1997).
[m] Gugger et al. (2005).
[n] This work: the percentage of inhibition is an average value of at least two independent experiments performed with chemiluminescence and color detection with triplicates and sometimes with duplicates.
[o] Strain NH-5, clonal but not axenic cyanobacterial strain kindly provided by W.W. Carmichael.
[p] Determined by ligand-binding assay with [^{125}I]-α-bungarotoxin as tracer.
[q] Strain AWT205, clonal but not axenic cyanobacterial strain kindly provided by Dr. Neilan, B.A.

pestle in 10 ml of 50 mM acetic acid in water. The homogenate was incubated for 4 h at room temperature with constant stirring and centrifuged (15 min, 12,000g at 15 °C). The supernatant was filtered through 0.1 μm filter units and dried in a Speedvac. The desiccated extract was resuspended in 500 μl of 50 mM acetic acid in water and stored at −20 °C until use.

2.3. Processing of aqueous samples

In order to test the applicability of the non-radioactive ligand-binding assay to the detection of cyanobacterial anatoxins from aqueous samples, we used filtered media from cultures of the ANTX-producing strain PCC 9240 and the HANTX-producing strain PCC 10111 (40 ml, each). Both cultures were two months old and showed signs of cell lysis such as phycobiliprotein leakage and therefore potentially released toxins into the medium. The supernatant (100 ml) of the environmental sample from Orsonville pond was also analyzed. The aqueous samples were passed through a solid phase extraction column in order to concentrate potential toxins. For this purpose, 500 mg of C_{18} resin (Baker bond phase C18, Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland) were conditioned with 2 ml MeOH and 6 ml water prior to sample loading. The pH of the aqueous samples was adjusted to 9 with NH_4OH and immediately loaded onto the conditioned C_{18} resin. The columns were washed consecutively with 6 ml water and 2 ml 10% (v/v) MeOH in water. The retained toxins, if any, were eluted with 5 ml MeOH. The eluate was concentrated with a Speedvac and the resulting pellet was resuspended in 100 μl of 5 mM acetic acid in water and stored at −20 °C.

2.4. Radioactive receptor-binding assay

Torpedo electrocyte membranes purified as described previously (Hill et al., 1991) were resuspended (0.05–0.10 mg ml^{-1} protein) in PBS (130 mM sodium chloride, 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0), containing 0.1% (w/v) BSA and 0.1% (v/v) Tween 20. Inhibition by competitive binding of α-bungarotoxin and anatoxins was performed at 10^{-8} M [^{125}I]-α-bungarotoxin ([^{125}I]-α-BgTx) as described (Aráoz et al., 2005).

2.5. Non-radioactive receptor-binding assay

Torpedo electrocyte membranes were resuspended (0.07–0.14 mg ml^{-1} protein) in TBS (150 mM sodium chloride, 50 mM Tris–HCl, pH 7.4) containing 0.1% (w/v) BSA and 0.1% (v/v) Tween 20. For K_d determination, aliquots of 100 μl *Torpedo* electrocyte membranes were incubated with increasing concentrations of α-bungarotoxin biotin-XX conjugate (Biotin-BgTx; Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

For inhibition assays, 100 μl of *Torpedo* electrocyte membranes were incubated in 96-well plates for 1 h at 22 °C with 1 μl of toxins standards (α-bungarotoxin or ANTX), or 10 μl of extracts from cyanobacteria or aqueous samples. Thereafter, 2 μl of 2×10^{-6} M Biotin-BgTx were added and the mixture was further incubated for 5 min. The reaction mixture was then transferred onto a 48-well Slot-Blot (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL, USA) holding a GF/C filter membrane (Whatman, Maidstone Kent, UK) presoaked with TBS containing 0.1% (w/v) BSA and immediately vacuum-filtered. Unbound Biotin-BgTx was washed out with 3 ml ice-cold TBT (TBS, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 7.4). The amount of Biotin-BgTx attached to the *Torpedo* electrocyte membranes was detected by chemiluminescence or the color reaction (see next sections).

2.5.1. Chemiluminescence detection

After adsorption of the Biotin-BgTx–nAChR complex onto the GF/C filter membrane, 50 μl streptavidin conjugated to horseradish peroxidase (streptavidin-HRP, Molecular Probes), diluted 1:7500 in TBS, were added to each well and further incubated for 10 min at 22 °C. The solution was removed by vacuum filtration and the membranes were washed successively with 3 ml ice-cold TBT and 250 μl H_2O. To detect peroxidase activity, 50 μl of ECL Plus detection reagent (Amersham Biosciences) were added to each well. After 5 min incubation at 22 °C the detection mixture was filtered out and the chemiluminescence was directly detected on the GF/C filter membrane using a STORM instrument (Amersham Biosciences) in the fluorescence mode. The signals were quantified with the Image Quant software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Alternatively, the treated GF/C filter membrane was placed in contact with a Hyperfilm ECL™ (Amersham Biosciences) for 15–60 s and the density of the signals quantified by densitometry in the transmissive mode (GS 800, Biorad, Hercules, CA, USA). In the inhibition assays, a decrease or lack of the chemiluminescent signals indicated the presence of ANTX and/or HANTX in the sample.

2.5.2. Color detection

After adsorption of the Biotin-BgTx–nAChR complex onto the GF/C filter membrane, 100 μl streptavidin conjugated to alkaline phosphatase (streptavidin-AP, Promega, Madison, WI, USA), diluted 1:5000 in TBS, were added to each treated well and incubated for 10 min at 22 °C. The solution was removed by vacuum filtration and the membranes were washed successively with 3 ml cold TBT and 1 ml water. For color development, 50 μl of a commercial solution of nitroblue-tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3 indolylphosphate (NBT/BCIP, Amersham Biosciences) were added to each well and the reaction continued until a good contrast between negative and positive controls was obtained. The membranes were scanned and quantification of the signals was performed by densitometry of the GF/C filter membrane in the reflective mode (GS 800, Biorad). In the inhibition assays, a decrease or lack of the color signal indicated the presence of ANTX and/or HANTX in the cyanobacterial sample.

2.6. Data analysis

Similar controls were performed for radioactive and non-radioactive protocols. Controls of 100% binding (C. 100%) were obtained in the absence of inhibitors. The specificity of binding was verified by incubating *Torpedo* electrocyte membranes with 1×10^{-6} M unlabeled α-bungarotoxin. Background noise due to non-specific

[^{125}I]-α-BgTx or Biotin-BgTx retention by the GF/C filter membranes was corrected from samples in which *Torpedo* electrocyte membranes and inhibitors were omitted (C. Filter). The percentage of inhibition was calculated according to: [100 × (signal 100% − signal sample)/(signal 100% − signal filter)]. Independent experiments were performed at least twice with duplicates. The affinity constant (K_d) for Biotin-BgTx and the inhibition affinity constants IC_{50} (concentration of inhibitor at which Biotin-BgTx binding is inhibited by 50%) were determined using the non-linear regression one site competition curve (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

2.7. Mass spectrometry

Quadrupole Time Of Flight tandem mass spectrometry (Q-TOF MS/MS) of the floating cyanobacterial mats extract from the La Loue River was made using an API Q-Star Pulsar i mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) equipped with an electrospray ionisation (ESI) source.

HPLC/MS analyses were performed using an Alliance HPLC HT coupled with a Waters ZQ mass detector (Waters, Milford, MA, USA). ANTX standards (10 μl) or environmental samples (20 μl) were separated in a SunFire C_{18} HPLC column (4.6 mm ID, 15 cm, Waters). Sample injections (two replicates) were performed automatically. The mobile phase comprised water containing 0.1% v/v formic acid (A) and 80% acetonitrile containing 0.1% v/v formic acid (B). The flow rate was 1 ml min^{-1}: 0–20 min: isocratic 0% B; 20–22 min: gradient 0–80% B; 22–27 min: isocratic 80% B; 27–28 min: gradient 80–0% B. The retention time of ANTX was 5.5 min. Ionisation was performed by positive-ion electrospray and the quadrupole filter mass spectrometer was operated in the single ion recording mode (SIR) at m/z 166.20 (ANTX $[M+H]^+$).

3. Results

3.1. Inhibition of Biotin-BgTx binding to nAChRs by α-bungarotoxin

Once the optimal conditions were set (i.e. *Torpedo* electrocyte membrane dilution, reaction time, reaction volume, Biotin-BgTx concentration) for the simultaneous detection of 48 samples on a Slot-Blot device, we performed a competition binding assay using unlabeled α-bungarotoxin as inhibitor for Biotin-BgTx binding to *Torpedo* electrocyte membranes. Increasing concentrations of α-bungarotoxin (3.1×10^{-10} to 5.0×10^{-6} M) were incubated with *Torpedo* electrocyte membranes and the inhibition signals revealed by the ECL method (Fig. 1, left panel). Incubation of *Torpedo* electrocyte membranes with Biotin-BgTx in the absence of inhibitor generates intense bands (see controls of 100% binding). Filter controls where *Torpedo* electrocyte membranes were omitted show very low background signals, ruling out adsorption of Biotin-BgTx and/or streptavidin-HRP to the GF/C filter membrane. The analysis of the data gave an IC_{50} of 1.2×10^{-7} M α-bungarotoxin, which is ~3 times the concentration of the tracer molecule (4×10^{-8} M Biotin-BgTx), validating the experimental design. Similar results were obtained for the unlabeled

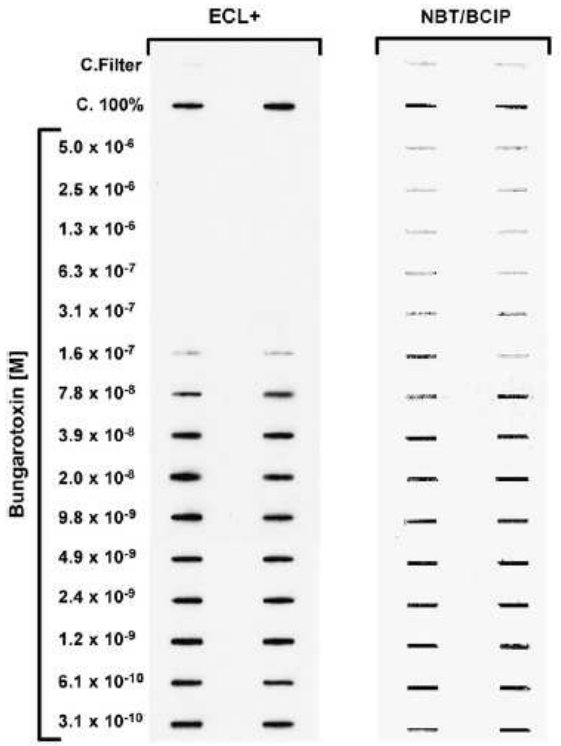


Fig. 1. Inhibition of Biotin-BgTx binding to *Torpedo* electrocyte nAChR-membranes by α-bungarotoxin. Dose-dependent inhibition of Biotin-BgTx binding to *Torpedo* electrocyte nAChR-membranes by α-bungarotoxin as detected by chemiluminescence (left panel) and color detection (right panel). Samples were run in duplicates and positioned in two columns with the corresponding α-bungarotoxin concentrations. C. Filter = control filter; C. 100% = controls of 100% binding.

α-bungarotoxin competition binding revealed by color detection (Fig. 1, right panel).

3.2. Saturation binding with Biotin-BgTx

Torpedo electrocyte membranes were incubated with increasing concentrations of Biotin-BgTx (1.1×10^{-11} to 2.4×10^{-6} M) and the binding signals detected by either chemiluminescence or the color method (NBT/BCIP). The data from typical saturation binding experiments followed by chemiluminescence and color detection are shown in Fig. 2A and C. The affinity constant (K_d) of Biotin-BgTx for the nAChRs was calculated by non-linear regression analysis: $K_{d(ECL)}$ 1.2×10^{-8} M Biotin-BgTx and $K_{d(NBT/BCIP)}$ 3.5×10^{-8} M Biotin-BgTx.

3.3. Inhibition of Biotin-BgTx binding to nAChRs by ANTX

We measured the dose-dependent inhibition of Biotin-BgTx binding to nAChRs using purified ANTX from *Oscillatoria* sp., strain PCC 9240 (Fig. 2B and D) and commercial ANTX-fumarate (data not shown). Binding of ANTX to the nAChRs competitively inhibits further binding of Biotin-BgTx to the receptors in a concentration-dependent manner (Fig. 3). The IC_{50} values calculated following detection

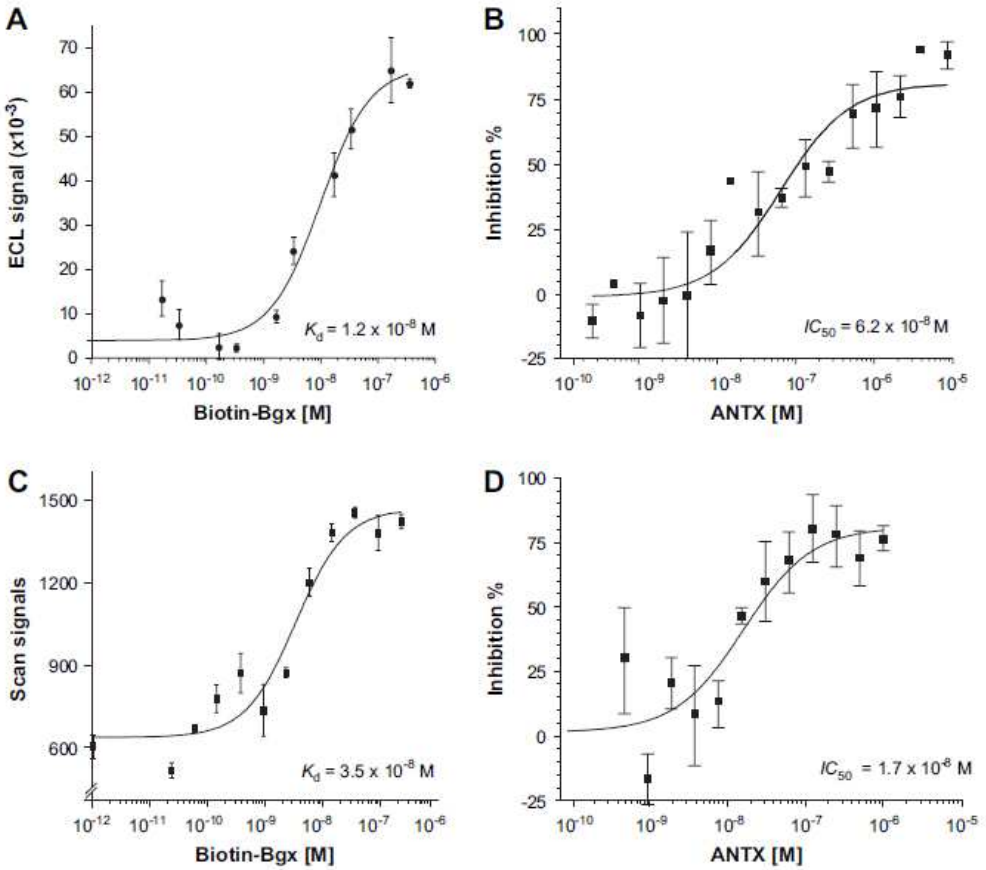


Fig. 2. Saturation binding and inhibition of Biotin-BgTx binding by purified ANTX. (A) Saturation curve of Biotin-BgTx binding to *Torpedo* electrocyte membranes. Streptavidin-HRP and ECL Plus detection followed by chemiluminescence quantification (STORM, mean ± SD of triplicates). (B) Dose-dependent inhibition of Biotin-BgTx binding to *Torpedo* electrocyte membranes by purified ANTX. Biotin-BgTx (4×10^{-8} M) was used as tracer. Streptavidin-HRP and ECL Plus detection followed by chemiluminescence quantification (STORM, mean ± SD of triplicates). (C) Saturation curve of Biotin-BgTx binding to *Torpedo* electrocyte membranes. Streptavidin-AP color detection. Quantification was performed by densitometry in the reflective mode (GS 800, Biorad, mean ± SD of triplicates). (D) Dose-dependent inhibition of Biotin-BgTx binding to *Torpedo* electrocyte membranes by purified ANTX. Biotin-BgTx (4×10^{-8} M) was used as tracer. Streptavidin-AP color detection. Quantification was performed by densitometry in the reflective mode (GS 800, Biorad, mean ± SD of triplicates).

by chemiluminescence (6.2×10^{-8} M ANTX; 95% confidence intervals 2.6×10^{-8} to 1.4×10^{-7} M), by color reaction (1.7×10^{-8} M ANTX; 95% confidence intervals 5.1×10^{-9} to 5.3×10^{-8} M) and by radioactivity (5.6×10^{-8} M ANTX; 95% confidence intervals 3.9×10^{-8} to 8.1×10^{-8} M) are of the same order of magnitude and with overlapping confidence intervals. The non-radioactive ligand-binding assay can thus be used instead of the [^{125}I]-α-BgTx-based assay for ANTX detection, without loss of sensitivity and with the advantage that no radioactive waste is generated. No significant differences could be established between the detection of ANTX by chemiluminescence or by color reaction (Fig. 2B and D).

The limit of detection (LOD) was estimated as the mean + 3 SD of the inhibition binding of Biotin-BgTx to the cholinergic receptors in the range of 1×10^{-9} to 1×10^{-10} M ANTX. The obtained LOD corresponds to 30% inhibition binding (3.7×10^{-8} and 0.9×10^{-8} M ANTX for both, chemiluminescence and color detection methods).

Although HANTX was also inhibitory of Biotin-BgTx binding to nAChRs (data not shown), the IC_{50} for this toxin was not determined because of limited availability of purified HANTX and lack of commercial standards. However, given that ANTX and its homologue HANTX are equally potent agonists in the radioactive ligand-binding assay (Aráoz et al., 2005), the non-radioactive method will, of course, also be applicable for the detection of HANTX.

3.4. Chemiluminescence detection of anatoxins in cyanobacterial extracts

Dose-dependent inhibition of Biotin-BgTx binding to nAChRs by ANTX and selected cyanobacterial strains are shown in Fig. 3 in a 48-well format. Detection was achieved by chemiluminescence. Binding of cyanobacterial anatoxins to the nAChRs inhibits Biotin-BgTx binding to the nicotinic receptors in a concentration-dependent manner. ANTX inhibition is reflected by a lack of or a reduction of the chemiluminescence signals compared to controls of 100% binding. Extracts of four cyanobacterial strains were run in parallel to the ANTX references. *Oscillatoria sancta* PCC 7515, which lacks cyanobacterial anatoxins according

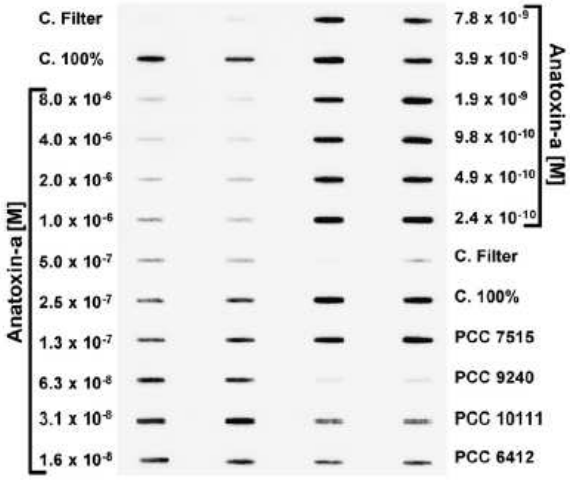


Fig. 3. Dose-dependent inhibition of Biotin-BgTx binding to *Torpedo* electrocyte nAChR-membranes by purified ANTX and extracts of cyanobacterial strains. Biotin-BgTx (4×10^{-8} M) was used as tracer. Chemiluminescence/ECL+ detection. C. Filter = control filter. C. 100% = controls of 100% binding. ANTX samples were run in duplicates and positioned in two columns at the indicated concentrations. Extracts of the axenic cyanobacterial strains PCC 7515, PCC 9240, PCC 10111 and PCC 6412 are also shown. A decrease or lack of the chemiluminescent signals compared to controls of 100% binding indicates the presence of cyanobacterial anatoxins.

to GC/MS, did not inhibit Biotin-BgTx binding to the nAChRs from *Torpedo* electrocyte membranes. In contrast, the ANTX-producing strains PCC 9240 and PCC 6412, as well as the HANTX-producing strain PCC 10111 did inhibit Biotin-BgTx binding to the nAChRs. With the toxin-positive strains PCC 6506, PCC 9029 and PCC 9240 inhibition was still observed with a 20-fold dilution of cell extracts (data not shown). The concentrations of ANTX in the extracts of the *Oscillatoria* strains PCC 9240 and PCC 6412 were determined by extrapolation from the inhibition curve calculated for ANTX (Fig. 2B). As a result, strain PCC 9240 was found to contain 3000 μg ANTX g^{-1} lyophilized filaments whereas for strain PCC 6412 the toxin concentration was 50 μg ANTX g^{-1} lyophilized filaments.

3.5. Color detection of anatoxins in extracts of cultured cyanobacteria

Fig. 4A illustrates a series of ligand-binding experiments using various types of extracts in which detection was performed by the NBT/BCIP color method. As described for chemiluminescence detection, intense bands indicate absence of inhibitor, while the lack or the reduction of the intensity of the bands indicates the presence of cyanobacterial anatoxins in the samples. The appropriate controls (C. Filter and C. 100%) and a series of ANTX dilutions were applied in parallel to the extracts, in order to estimate the degree of inhibition (Fig. 4B). Table 1 summarizes the inhibition results obtained by chemiluminescence and color detection.

As negative controls we used cyanobacterial strains that did not inhibit the binding of [^{125}I]-α-bungarotoxin to the nAChRs (*A. flos-aquae* PCC 9302, PCC 9332 and PCC 9349; *Oscillatoria* strains PCC 6401, PCC 6602, PCC 7112, PCC 7515, PCC 7823 and PCC 8808; *Planktothrix* strains PCC 7805, PCC 7811, PCC 7821 and PCC 9214; *Symploca* PCC 9410; Aráoz et al., 2005). A selection of toxin-negative strains is shown in Figs. 3 and 4A: as expected, none of these strains inhibited Biotin-BgTx binding to the nAChRs (Table 1). In contrast, the ANTX-producing strains *Oscillatoria* PCC 6412, PCC 6506 and PCC 9240, the ANTX- and HANTX-producing strain PCC 9029, as well as the HANTX-producing strain PCC 10111, inhibited Biotin-BgTx binding to the nAChRs from *Torpedo* electrocyte membranes, though to a different extent (Fig. 4A). Extracts of *Oscillatoria* sp. strain PCC 9240 and *O. formosa* strain PCC 10111 were used as internal positive controls (Fig. 4A, left, central and right panels). The observed differences in the degree of inhibition between anatoxin-positive strains (Table 1) might be thus related to the toxin production capacity of each strain, as we used the same starting dry weight (20 mg lyophilized material) for the preparation of all low molecular mass extracts.

3.6. Color detection of anatoxins in extracts from environmental samples

Extracts of the cyanobacterial bloom samples collected in Senegal (Dakar-Bango and Djoudj Lake) did not inhibit Biotin-BgTx binding to the nicotinic receptors (Fig. 4A, left panel and right panel). The extract of the cyanobacterial bloom sample collected in Orsonville gave 30% inhibition in a first experiment in which clogging of its corresponding wells was observed (Fig. 4A, left panel). Although the Orsonville samples were filtered as described in Section 2.2.3, the concentration of the 10 ml extract to a final volume of 500 μl resulted in insoluble precipitates that might have caused the GF/C filter membrane to clog. Consequently, the precipitates from the concentrated Orsonville extract were eliminated by centrifugation and the experiment was repeated with the corresponding supernatant several times. Neither the extracts of the cyanobacterial bloom sample nor of the water sample from Orsonville pond were inhibitory in the non-radioactive ligand-binding assay (Fig. 4A, right panel).

The environmental biofilm sample from the La Loue River (France), for which ANTX presence was fully documented (Gugger et al., 2005), showed 100% Biotin-BgTx binding inhibition to the nAChRs (Fig. 4A, left panel and right panel, and B). We also analyzed the free floating cyanobacterial mats sample collected in the surroundings of the toxic cyanobacterial biofilms from the La Loue River. The corresponding extract slightly inhibited Biotin-BgTx binding to the nAChRs in a first experiment (27% inhibition, Fig. 4A, left panel and B). The sample loading of this extract in the assay was doubled to 20 μl and the percent inhibition of Biotin-BgTx binding to the nAChRs was 40% ± 38 (Fig. 4A right panel and B).

3.7. Validation of the non-radioactive ligand-binding assay by mass spectrometry

To validate the detection of ANTX in the extracts of environmental samples by HPLC/MS, we performed a calibration curve using commercial ANTX-fumarate as

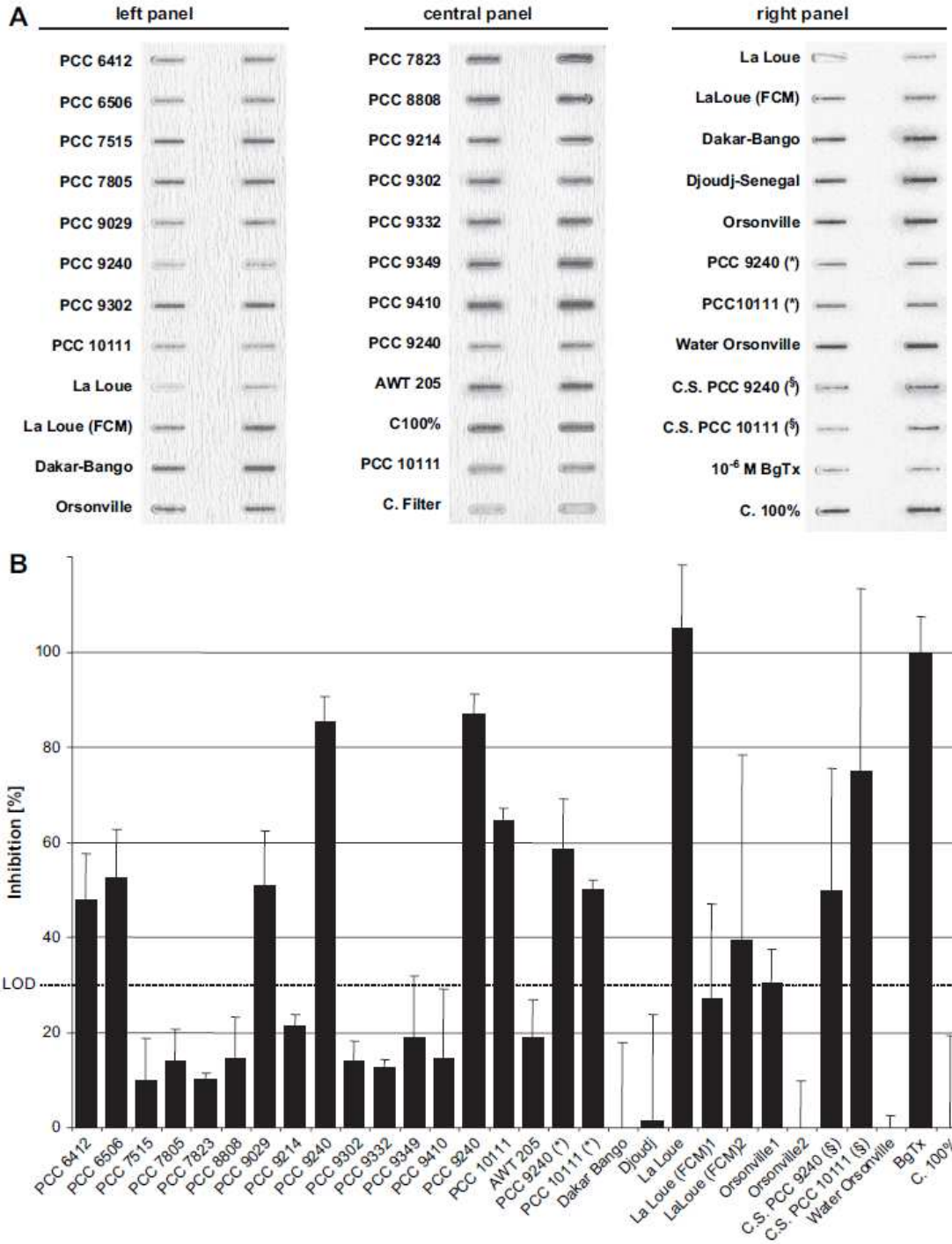


Fig. 4. (A) NBT/BCIP detection of the inhibition of Biotin-BgTx binding to *Torpedo* electrocyte membranes by cyanobacterial extracts, environmental blooms and aqueous samples. The various cyanobacterial samples were run in triplicates and positioned in two columns. (B) Histogram showing the percent of inhibition of Biotin-BgTx binding to *Torpedo* electrocyte membranes by extracts of axenic cyanobacterial strains and environmental cyanobacterial samples. Quantification of the NBT/BCIP signals was performed by densitometry in the reflective mode. C. Filter = control filter. C. 100% = controls of 100% binding. The percentage of inhibition was calculated according to: [100 × (signal 100% − signal sample)/(signal 100% − signal filter)]. All the experiments were performed in triplicate. Error bars indicate the SD. La Loue (BF) = extract of cyanobacterial biofilm from the La Loue River, France. La Loue (FCM) = extract of the floating cyanobacterial mats from the La Loue River, France. (*) Extracts from the cellular fraction of senescent cultures of the cyanobacterial strains PCC 9240 and PCC 10111. (§) Culture supernatants (CS) from senescent cultures of strains PCC 9240 and PCC 10111 that were concentrated by solid phase extraction. LOD: limit of detection.

standard (Fig. 5A and B). Mass quantification was achieved in the SIR mode. LC/MS is a direct method and results in a linear calibration curve over the studied range (Fig. 5A). The estimated LOD (background mean + 3 SD) was of 1.2×10^{-7} M ANTX. The non-radioactive ligand-binding assay was more sensitive (LOD_{ECL}: 3.7×10^{-8} M and $LOD_{NBT/BCIP}$: 0.9×10^{-8} M ANTX) than the HPLC/MS method used here. The environmental samples (20 μl) were analyzed by LC/MS using the same conditions as described (see Section 2.7). ANTX was detected in the samples corresponding to the biofilm and to the free floating cyanobacterial mats collected in La Loue River. The presence of ANTX in the environmental extracts from Dakar-Bango, Djoudj Lake and Orsonville pond was neither detected by HPLC/MS (Fig. 5C) nor by ESI-MS (data not shown). HPLC/MS quantification of La Loue biofilm sample (3×10^{-5} M ANTX) correlates with the inhibition percent of 100% obtained with the non-radioactive ligand-binding assay. However, the estimated concentration for the floating mats from La Loue River differs: 5×10^{-7} M ANTX by LC/MS and 1×10^{-8} M ANTX by the non-radioactive ligand-binding assay. The high variability of the signals observed between the replicates of this sample (Fig. 4A, right panel and B) could explain such differences. Moreover, Q-TOF MS/MS analysis of the cyanobacterial mats sample from the La Loue River confirmed unequivocally the presence of ANTX in this sample (Fig. 5D). The fragmentation pattern following MS/MS of the protonated parental ion (m/z 166) corresponds to the mass spectra of ANTX-fumarate shown in Fig. 5B.

4. Discussion

We previously developed a radioactive ligand-binding assay for the detection of ANTX and/or HANTX from cyanobacterial extracts and demonstrated that only extracts from anatoxins-producing cyanobacteria bind to the nAChRs (Aráoz et al., 2005). Here, we propose a non-radioactive method based, as before, on the use of *Torpedo* electrocyte membranes rich in nAChRs and on the high affinity of ANTX and HANTX for the nicotinic receptors, but using Biotin-BgTx as tracer. The post-synaptic membranes from *Torpedo* electroplaque tissue contain muscle-type nAChRs with high specific activity that can be easily purified by sucrose density gradient centrifugation (Hill et al., 1991). The

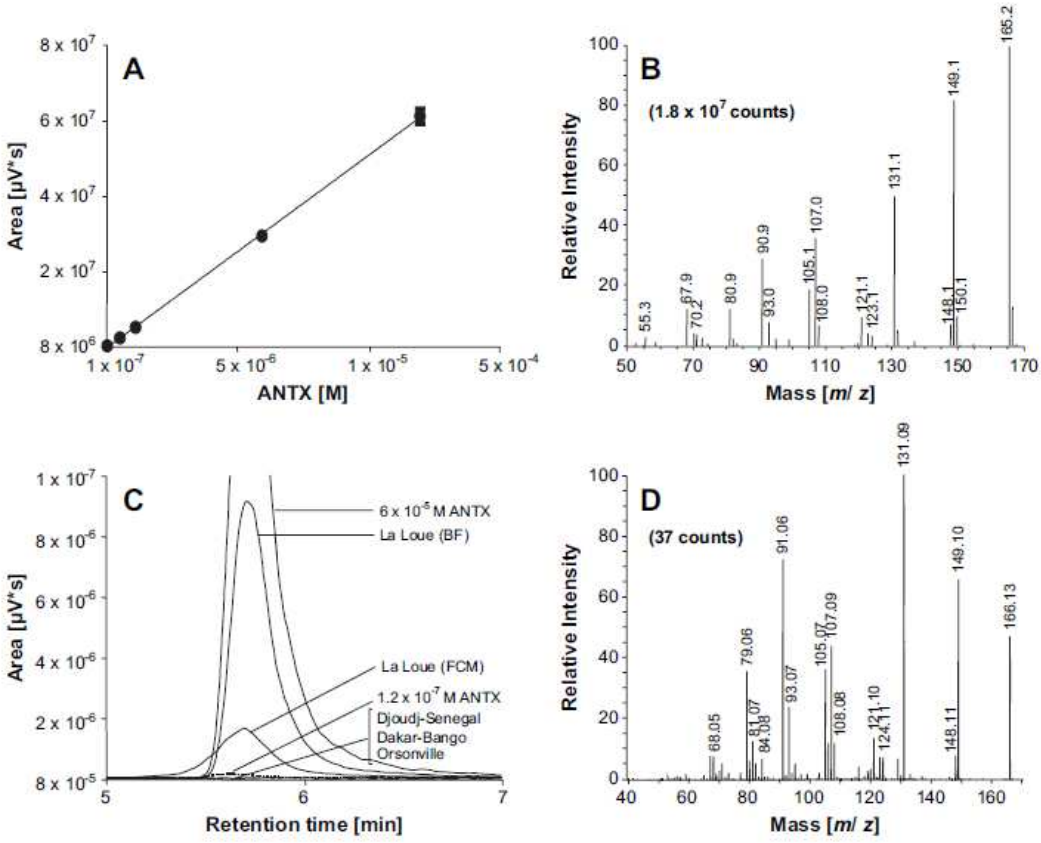


Fig. 5. Validation of the non-radioactive ligand-binding assay by HPLC/MS. (A) Calibration curve of ANTX-fumarate by HPLC/MS. Mass detection was performed in the SIR mode. Two replicates for each ANTX concentration were performed. Each point represents the peak area ± SD of the response versus the retention time ($r^2 = 0.99$). (B) HPLC/MS spectra of ANTX-fumarate standard. Ten microlitres of 1.2×10^{-5} M ANTX-fumarate was loaded into the SunFire HPLC column. (C) SIR HPLC/MS chromatograms resulting from the injection of 10 μl of ANTX-fumarate or 20 μl of environmental cyanobacterial bloom samples. La Loue (BF) = extract of cyanobacterial biofilm from the La Loue River, France. La Loue (FCM) = extract of the floating cyanobacterial mats from the La Loue River, France. (D) ESI-Q-TOF MS/MS analysis of the extract of the La Loue (FCM). Sample size: 5 μl. Parental ion: m/z 166.1.

membrane preparations are stable, since no major differences were observed in the capacity of *Torpedo* electrocyte membranes purified in 1989 to bind Biotin-BgTx with those purified in 2006 and 2007, except that the degree of membrane dilution needed to be adjusted to have similar Biotin-BgTx binding kinetics (data not shown). *Torpedo* electrocyte membranes rich in nAChRs therefore provide a model system for different methodological approaches (Cartaud et al., 2000) including ligand-binding assays as is the case in the present communication.

The binding of ANTX and HANTX to the nAChRs prevents further binding of Biotin-BgTx in a concentration-dependent manner. The calculated IC_{50} values for ANTX inhibition obtained by the radioactive and non-radioactive ligand-binding assays were fairly similar (Table 2) with overlapping 95% confidence intervals. The LOD for ANTX in the radioactive method was 1×10^{-8} M (Aráoz et al., 2005), which is close to the LOD determined here for the Biotin-BgTx assays (3.7×10^{-8} and 0.9×10^{-8} M ANTX for the chemiluminescence and color detection methods, respectively). All of these values are in a range close to the recommended margin of security of 1 μg l^{-1} (0.6×10^{-8} M) ANTX for safe drinking water, as proposed by Fawell et al. (1999).

The non-radioactive ligand-binding assay gives consistent results as evidenced by the inhibition signals of extracts from strains PCC 9240 and PCC 10111, used as toxin-positive internal controls (Figs. 3 and 4A). There are, however, some experimental factors such as the viscosity of the sample that may alter the inhibition results, as was the case for the Orsonville bloom extract (Fig. 4A, left panel and right panel). The clogging of the filter by viscous samples could hamper the proper washing of unbound Biotin-BgTx, or streptavidin-AP leading to an increase of the color signal. It is thus highly recommended to filter the samples through disposable capsule filters of 0.2 μm, or to centrifuge the samples prior to the incubation with the *Torpedo* electrocyte membranes. Since the method is based on the amount of Biotin-BgTx bound to the nAChR-membrane, it is essential that a similar amount of *Torpedo* electrocyte membranes is retained on the GF/C filter. Therefore, it is necessary to avoid the clogging of the GF/C filter membrane and to ensure that there is no leakage of the nAChR-membrane suspension during the washing and filtration processes.

Axenic cyanobacterial strains of diverse origin were studied (Table 1) some of which were previously shown to produce toxins other than anatoxins. Extracts from *Anabaena flos-aquae* PCC 9302, co-identic with strain NRC-525-17, and from *Planktothrix* sp. PCC 7805, both of which produce microcystin (Harada et al., 1991; Rinehart et al., 1994; Bouaïcha et al., 1996), and an extract from the non-axenic *Cylindrospermopsis raciborskii* AWT205, known to produce cylindrospermopsin (Hawkins et al., 1997) did not interfere with the Biotin-BgTx ligand-binding assay (Fig. 4A and B). In addition, an extract of the non-axenic *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5, a saxitoxin producer (Mahmood and Carmichael, 1986), was also not inhibitory in the [^{125}I]-α-BgTx binding assay (Table 1). Thus, according to our results, cyanotoxins not belonging to the ANTX/HANTX group should not interfere with the non-radioactive ligand-binding assay.

Toxin release into the culture medium occurs in ageing cyanobacterial cells, particularly if grown under low light conditions (Rapala and Sivonen, 1998). With the aim to apply the non-radioactive ligand-binding assay to aqueous environmental samples containing cyanobacterial anatoxins, we tested extracts of media supernatants from senescent cultures of the control strains *Oscillatoria sp.* PCC 9240 and *O. formosa* PCC 10111. Extracts from the senescent filaments of strain PCC 9240 and PCC 10111 inhibited Biotin-BgTx binding to the nAChRs (59 and 50% inhibition, respectively, Fig. 4A and B, Table 1). Furthermore, the corresponding supernatants, concentrated by solid phase extraction, gave Biotin-BgTx inhibition values of 50 and 75% for strains PCC 9240 and PCC 10111, respectively (Fig. 4A, right panel and B, Table 1), confirming toxin leakage into the culture medium. The percent inhibition of 50% calculated for the supernatant of the senescent culture of strain PCC 9240 corresponds to 1.7×10^{-8} M ANTX (Fig. 2D). The fact that we were able to detect ANTX in this relatively low range of concentration encourages the application of the non-radioactive ligand-binding assay for the detection of ANTX in aqueous environmental samples, provided a step of solid phase extraction is performed prior to the assay.

Dog neurotoxicosis reported for the La Loue River in France (Gugger et al., 2005), the Hutt River in New Zealand (Wood et al., 2007) and the Tarn River in France (Cadel-Six et al., 2007) confirmed the importance of benthic cyanobacteria as anatoxins producers. Benthic cyanobacteria, which grow attached to the bottom substrate of a water course, may also form free floating scums that accumulate at the river shore (Wood et al., 2007). The cyanobacterial mats samples collected in the La Loue River, showed inhibition values close to the LOD of this method (Fig. 4A, left panel). By increasing the sample loading of this extract in the assay, its inhibitory activity towards Biotin-BgTx binding to nAChRs was confirmed (Fig. 4A, right panel). In agreement with, the analysis of the extract from

Table 2
Kinetic parameters and LOD determined for the radioactive and non-radioactive ligand-binding assays

	[^{125}I]-α-BgTx binding assay	Non-radioactive ligand-binding assay	
		Chemiluminescence detection	NBT/BCIP detection
K_d	n.d.	1.2×10^{-8} M Biotin-BgTx	3.5×10^{-8} M Biotin-BgTx
$IC_{50(ANTX)}$	5.6×10^{-8} M ANTX	6.2×10^{-8} M ANTX	1.7×10^{-8} M ANTX
$IC_{50(HANTX)}$	7.4×10^{-8} M HANTX[a]	n.d.	n.d.
LOD	1×10^{-8} M ANTX	3.7×10^{-8} M ANTX	0.9×10^{-8} M ANTX

n.d., Not determined.
[a] Aráoz et al. (2005).

cyanobacterial mats from La Loue River by Q-TOF MS/MS confirmed the presence of ANTX.

To validate the non-radioactive ligand-binding assay we performed a standard curve for ANTX using HPLC/MS. To maximize the sensitivity of MS detection, SIR for ANTX $[M+H]^+$ at m/z 166.2 was performed (Fig. 5A). SIR mode of detection is very sensitive as only the molecular ions are monitored and along with the retention time in the HPLC column and the simultaneous detection with a photodiode array, this method confirmed the presence of ANTX in the extracts of the two environmental samples collected in La Loue River. Mass spectrometry based methods show variable sensitivity according to the HPLC column and the mass detector used: e.g. Bogialli et al. (2006) developed a HPLC/MS/MS method with a LOD of 0.5×10^{-10} M ANTX whereas the HPLC/MS methods developed by Furey et al. (2003) and James et al. (2005) showed a LOD of 3.6×10^{-9} and 1.2×10^{-8} M ANTX, respectively. The bioassay proposed here is, therefore, suitable for the survey of cyanobacterial anatoxins in environmental samples.

5. Conclusions

This is the first visual detection method for cyanobacterial anatoxins. The non-radioactive Biotin-BgTx binding assay is specific for this class of toxins, sensitive and rapid, allowing the simultaneous analysis of 48 samples as well as toxin quantification. It could be applied directly to the analysis of cyanobacterial cell extracts, environmental cyanobacterial blooms and aqueous samples. Whenever inhibition values close to the LOD of the method are observed, the samples need to be concentrated in order to confirm the presence or absence of cyanobacterial anatoxins. Taken together, the proposed non-radioactive ligand-binding assay is suitable as an early detection method for the survey of ANTX and HANTX from environmental samples and could also be applied to the discovery of novel ligands for the nAChRs.

Acknowledgments

This work was supported by the "Institut Pasteur" and its "Programme Transversal de Recherche" (PTR 2000/25), by the CNRS (URA 2172 and URA 2182) and the "College de France". We are much indebted to M.A. Bloch and B. Robert for their support and to D. Berneman for her encouragement. The expertise of T. Coursin and T. Laurent for culture maintenance and for providing freeze-dried cyanobacterial samples is acknowledged. The authors are thankful to Miss Odile Thoison for performing the HPLC/MS analysis.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest related to the present publication.

References

Aráoz, R., Nghiêm, 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.

Aronstam, R.S., Witkop, B., 1981. Anatoxin-a interactions with cholinergic synaptic molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78 (7), 4639–4643.

Bogialli, S., Bruno, M., Curini, R., Di Corcia, A., Laganà, A., 2006. Simple and rapid determination of anatoxin-a in lake water and fish muscle tissue by liquid-chromatography–tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1122 (1–2), 180–185.

Booker, M.J., Walsby, A.E., 1979. Relative form resistance of straight and helical blue-green algal filaments. Br. Phycol. J. 14 (2), 141–150.

Bouaïcha, N., Rivasseau, C., Hennion, M.-C., Sandra, P., 1996. Detection of cyanobacterial toxins (microcystins) in cell extracts by micellar electrokinetic chromatography. J. Chromatogr. B 685 (1), 53–57.

Briand, J.F., Jacquet, S., Bernard, C., Humbert, J.F., 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. Vet. Res. 34 (4), 361–377.

Cadel-Six, S., Peyraud-Thomas, C., Brient, L., Tandeau de Marsac, N., Rippka, R., Mejean, A., 2007. Different genotypes of anatoxin-producing cyanobacteria co-exist in the Tarn River, France. Appl. Environ. Microbiol. 73 (23), 7605–7614.

Carmichael, W.W., Gorham, P.R., 1978. Anatoxins from clones of *Anabaena flos-aquae* isolated from lakes of western Canada. Mitt. Internat. Verein. Limnol. 21, 285–295.

Cartaud, J., Cartaud, A., Kordeli, E., Ludosky, M.A., Marchand, S., Stetzkowski-Marden, F., 2000. The torpedo electrocyte: a model system to study membrane-cytoskeleton interactions at the postsynaptic membrane. Microsc. Res. Technol. 49 (1), 73–83.

Devlin, J.P., Edwards, O.E., Gorham, P.R., Hunter, N.R., Pike, R.K., Starvic, B., 1977. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h. Can. J. Chem. 55 (8), 1367–1371.

Edwards, C., Beattie, K.A., Scrimgeour, C.M., Codd, G.A., 1992. Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. Toxicon 30 (10), 1165–1175.

Fawell, J.K., Mitchell, R.E., Hill, R.E., Everett, D.J., 1999. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II anatoxin-a. Hum. Exp. Toxicol. 18 (3), 168–173.

Furey, A., Crowley, J., Lehane, M., James, K.J., 2003. Liquid chromatography with electrospray ion-trap mass spectrometry for the determination of anatoxins in cyanobacteria and drinking water. Rapid Commun. Mass Spectrom. 17 (6), 583–588.

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 (7), 919–928.

Harada, K., Ogawa, K., Kimura, Y., Murata, H., Suzuki, M., Thorn, P.M., Evans, W.R., Carmichael, W.W., 1991. Microcystins from *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. Chem. Res. Toxicol. 4 (5), 535–540.

Hawkins, P.R., Runnegar, M.T.C., Jackson, A.R.B., Falconer, I.R., 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. Appl. Environ. Microbiol. 50 (5), 1292–1295.

Hawkins, P.R., Chandrasena, N.R., Jones, G.J., Humpage, A.R., Falconer, I.R., 1997. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. Toxicon 35 (3), 341–346.

Hess, P., Grune, B., Anderson, D.B., Aune, T., Botana, L.M., Caricato, P., van Egmond, H.P., Halder, M., Hall, S., Lawrence, J.F., Moffat, C., Poletti, R., Richmond, J., Rossini, G.P., Seamer, C., Serratosa Vilageliu, J., 2006. Three Rs approaches in marine biotoxin testing. The report and recommendations of a joint ECVAM/DG SANCO workshop (ECVAM Workshop 55). ATLA 34 (2), 193–224.

Hill, J.A., Nghiêm, H.O., Changeux, J.P., 1991. Serine-specific phosphorylation of nicotinic receptor associated 43K protein. Biochemistry 30 (22), 5579–5585.

James, K.J., Crowley, J., Hamilton, B., Lehane, M., Skulberg, O., Furey, A., 2005. Anatoxins and degradation products, determined using hybrid quadrupole time-of-flight and quadrupole ion-trap mass spectrometry: forensic investigations of cyanobacterial neurotoxin poisoning. Rapid Commun. Mass Spectrom. 19 (9), 1167–1175.

Krienitz, L., Ballot, A., Kotut, K., Wiegand, C., Pütz, S., Metcalf, J.S., Codd, G. A., Pflugmacher, S., 2003. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya. FEMS Microbiol. Ecol. 43 (2), 141–148.

Mahmood, N.A., Carmichael, W.W., 1986. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. Toxicon 24 (2), 175–186.

Maizels, M., Budde, W.L., 2004. A LC/MS method for the determination of cyanobacteria toxins in water. Anal. Chem. 76 (5), 1342–1351.
Pouria, S., de Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R.L., Barreto, V.T., Ward, C.J., Preiser, W., Poon, G.K., Neild, G.H., Codd, G.A., 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. Lancet 352 (9121), 21–26.
Rapala, J., Sivonen, K., 1998. Assessment of environmental conditions that favor hepatotoxic and neurotoxic *Anabaena* spp. strains cultured under light limitation at different temperatures. Microb. Ecol. 36 (2), 181–192.
Rinehart, K.L., Namikoshi, M., Choi, B.W., 1994. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (Cyanobacteria). J. Appl. Phycol. 6 (2), 159–176.
Rippka, R., Herdman, M., 1992. Pasteur Culture Collection of Cyanobacterial Strains in Axenic Culture: Catalogue & Taxonomic Handbook. In: Catalogue of Strains, vol. 1. Institut Pasteur, Paris.
Schlösser, U.G., 1994. SAG – Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen, Catalogue of Strains 1994. Bot. Acta 107 (3), 113–186.
Sivonen, K., Himberg, K., Luukkainen, R., Niemelä, S.I., Poon, G.K., Codd, G. A., 1989. Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacteria blooms and strains from Finland. Toxic Assess. 4 (3), 339–352.
Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. E & FN Spon, London, pp. 41–111.
Skulberg, O.M., Carmichael, W.W., Andersen, R.A., Matsunaga, S., Moore, R.E., Skulberg, R., 1992. Investigations of a neurotoxic oscillatorialean strain (Cyanophyceae) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. Environ. Toxicol. Chem. 11 (3), 321–329.
Starr, R.C., Zeikus, J.A., 1993. UTEX – the culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures. J. Phycol. 29 (2), 1–106.
Vasas, G., Gáspár, A., Páger, C., Surányi, G., Máthé, C., Hamvas, M.M., Borbely, G., 2004. Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. Electrophoresis 25 (1), 108–115.
Viaggiu, E., Melchiorre, S., Volpi, F., Di Corcia, A., Mancini, R., Garibaldi, L., Crichigno, G., Bruno, M., 2004. Anatoxin-a toxin in the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* from a fishing pond in northern Italy. Environ. Toxicol. 19 (3), 191–197.
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 (2), 292–301.

Annexe 6

Article publié dans Toxicon

ELSEVIER

Toxicon 45 (2005) 919–928

TOXICON

www.elsevier.com/locate/toxicon

First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis

Muriel Gugger[a,*], Séverine Lenoir[a,b], Céline Berger[a], Aurélie Ledreux[a], Jean-Claude Druart[c], Jean-François Humbert[c], Catherine Guette[a], Cécile Bernard[a]

[a]*USM0505 Ecosystèmes et interactions toxiques, M.N.H.N., 12 rue Buffon, 75005 Paris, France*
[b]*Unité Toxines, Polluants Organiques et Pesticides, A.F.S.S.A., 23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex, France*
[c]*I.N.R.A.-UMR CARRTEL, B.P. 511, 74203 Thonon-les-Bains Cedex, France*

Received 26 November 2004; revised 12 February 2005; accepted 15 February 2005
Available online 13 April 2005

Abstract

The first identification of anatoxin-a in a French lotic system is reported. Rapid deaths of dogs occurred in 2003 after the animals drank water from the shoreline of the La Loue River in eastern France. Sediments, stones and macrophytes surfaces at the margin of the river were covered by a thick biofilm containing large quantities of several benthic species of filamentous, non-heterocystous cyanobacteria.

Known cyanotoxins, such as microcystins, saxitoxins and anatoxins were screened from biofilm samples by biochemical and analytical assays. A compound with similar UV spectra to the anatoxin-a standard was detected by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with photo-diode array detector. This toxin was further identified by HPLC coupled with a UV detector and by electrospray ionisation-Quadrupole-Time-Of-Flight mass spectrometer, and confirmed by tandem mass spectrometry. These two techniques were necessary to discriminate anatoxin-a in phenylalanine-containing matrices such as liver samples of poisoned dogs. The toxin and the aromatic amino acid, phenylalanine, present the same pseudomolecular ion at *m/z* 166, but have differing fragmentation patterns, retention times and UV spectra. Finally, several cyanobacterial strains were isolated from the green biofilm and tested for anatoxin-a production. *Phormidium favosum* was identified as a new anatoxin-a producing species.
© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Anatoxin-a; Phenylalanine; Benthic cyanobacteria; *Phormidium favosum*; Neurotoxin; Environmental health risks

1. Introduction

Cyanobacteria are known worldwide to produce toxins implicated in animal and human poisoning incidents (Carmichael, 1997; Sivonen and Jones, 1999). In fresh water bodies, the hepatotoxic cyanotoxins consist mainly of microcystins and cylindrospermopsins, whereas the neurotoxic cyanotoxins are anatoxins and saxitoxins. These compounds are found mainly in planktonic cyanobacteria, but in some rare cases, benthic filamentous cyanobacteria have also been shown to produce anatoxins, microcystins or saxitoxins (Edwards et al., 1992; Mez et al., 1997; Verschuren et al., 2002).

Anatoxin-a (ANTX-A) was the first cyanobacterial toxin of which the toxicological effects and chemical structure

* Corresponding author. Tel.: +33 1 40793179; fax: +33 1 40793495.
E-mail address: mgugger@mnhn.fr (M. Gugger).

0041-0101/$ - see front matter © 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.toxicon.2005.02.031

were established (Carmichael et al., 1975; Devlin et al., 1977). This small alkaloid acts as a postsynaptic depolarising neuromuscular blocking agent (Carmichael, 1997), which binds to the nicotinic receptor with a higher affinity than acetylcholine (Spivak et al., 1980). Subsequently, the presence of this neurotoxin has been reported occasionally in five countries of Europe, three of Asia, two of North America and one of Africa (Park et al., 1998; Sivonen and Jones, 1999; Krienitz et al., 2003). With the exception of a Japanese *Microcystis* sp. that produces small amounts of ANTX-A (Park et al., 1993), this toxin has been found mainly in filamentous cyanobacteria such as *Anabaena* spp. (Carmichael et al., 1975; Sivonen et al., 1989; James et al., 1997; Bruno et al., 1994), *Aphanizomenon flos-aquae* (Rapala et al., 1993), *Oscillatoria* sp. (Edwards et al., 1992), *Raphidiopsis mediterranea* (Namikoshi et al., 2003), and more recently in *Planktothrix rubescens* (Viaggiu et al., 2004) and *Arthrospira fusiformis* (Ballot et al., 2005).

So far, the cyanobacterial blooms reported in France had been found to be either non-toxic or hepatotoxic (Vezie et al., 1997; Vezie et al., 1998; Humbert et al., 2001; Briand et al., 2002; Bernard et al., 2003). In 2003, this country experienced a long period of warm and dry weather. Because this weather could favour phytoplankton proliferation, particular attention was paid by the French national sanitary services to cyanobacterial blooms in drinking water reservoirs and recreational areas. Consequently, when two dogs died soon after drinking water from the shoreline of the La Loue River (in the Jura region, in eastern France) within 4 days during September 2003, this highly regarded (category 1) fishing site was closed for bathing, and not recommended for fishing. Moreover, the potential causes of the deaths were investigated.

In this paper, we report the cyanobacterial determination and screening for potential cyanotoxins of water from the La Loue River and samples of the dogs' contents. The analysis of complex matrices containing the amino acid phenylalanine required both chromatographic and mass spectrometric methods to ascertain the presence of ANTX-A in animal samples. For the first time in France, this neurotoxin was detected in the field and in animal samples, and this very probably led to the poisoning of these dogs. Subsequently, the benthic cyanobacterial species *Phormidium favosum* PMC240.04 isolated from these French sites was shown to produce ANTX-A.

2. Materials and methods

2.1. Material examined

On the 14th September 2003, stomach samples from two dead dogs (a 2.5 kg Yorkshire terrier and a 25-kg Dogue of Bordeaux) were collected and fixed in formalin for phytoplankton identification. On the 20th November 2003, samples of the stomach and intestine contents and of the liver were taken from the bigger frozen animal for toxin detection. The samples were freeze-dried and kept at −20 °C until toxin analysis was performed.

Samples were collected from the biofilms covering the sediments, stones and macrophytes surfaces of the La Loue River on September 16 and 18 2003. Field samples were transferred onto Z8 solid media for cyanobacterial isolation, fixed in formalin (5% final volume) for phytoplankton determination under light microscopy, or freeze-dried and kept at −20 °C for toxin analysis.

2.2. Screening for toxins

2.2.1. Screening for microcystins

The microcystins content of 10-mg, freeze-dried field samples was extracted in 1.5 ml of pure methanol, sonicated 10 min twice, centrifuged and evaporated before being resuspended in 200 µl of pure methanol. The extracts were analysed by a method based on the protein phosphatase 2A (PP2A) inhibition assay as described by Rivasseau et al. (1999) with some modifications (Briand et al., 2002).

2.2.2. Cell toxicity screening for saxitoxin and derivates

The saxitoxins content of 10-mg, freeze-dried field samples was extracted in 3 ml of ultra pure water (pH 2), sonicated 10 min three times, and filtered on 0.22-µm filters (Analypore Labosi). The filtrates were analysed by a cellular bioassay on mouse neuroblastoma 2A cells (N2A) versus a saxitoxin standard (Institute of Marine Biosciences, Canada) following a modified method described by Manger et al. (1993).

2.2.3. HPLC-DAD screening for ANTX-A

ANTX-A content was extracted in 6 ml of acetic acid 50 mM and centrifuged twice, before filtering the supernatant on 0.22 µm filters (Analypore Labosi). The filtrates were analysed by high-performance liquid chromatography coupled with photo-diode array detection (HPLC-DAD). The HPLC-DAD analysis was carried out by injecting 20 µl into an EQUISIL BDS C_{18} column (5 µm, 250×4.6 mm d.i, Cluzeau). Isocratic chromatography was performed using water/acetonitrile (97.5/2.5, v/v) containing NaH_2PO_4 (5.10^{-3} M, pH 3.5), at a flow rate of 0.8 ml min^{-1}. The photo-diode array UV detection (Prostar 9065 polychrom, Varian) was carried out with absorbance monitored in the range 200–300 nm (ANTX-A; λ_{max} = 227 nm). ANTX-A fumarate (Sigma, St Louis, USA) was used as a reference standard in this study.

2.3. Determination and discrimation of ANTX-A from complex matrices

2.3.1. Extraction of the field and dog samples to retrieve ANTX-A

Freeze-dried field samples (20 mg) were extracted with 15 ml of methanol/water (4/1, v/v), stirred, then sonicated

and centrifuged to eliminate cellular debris. The process was carried out twice. The combined supernatants were evaporated to dryness and then reconstituted in milli-Q water acidified with 0.1% formic acid prior to solid phase extraction (SPE). The cartridge (C_{18} Chromabond Elut, 3 ml, 500 mg, Macherey-Nagel) was preconditioned with pure methanol (6 ml), followed by water (6 ml), and the extract was applied to the cartridge, which was washed successively with acidified water, methanol/acidified water (20/80%, v/v, 7 ml each) and pure methanol (8 ml). The fractions eluted with 0–20% methanol were collected, evaporated to concentrate and dissolved in 1 ml of water for HPLC-UV analyses. The samples analysed by mass spectrometry (MS) were similarly extracted as described above, except that the fractions were eluted from another cartridge (Bakerbond SPE SDB 200 mg, Mallinchradt Baker) and kept at +4 °C until analysis. A similar procedure was used to isolate ANTX-A from dog samples and from cultured strains. The reference standards of anatoxin-a fumarate and *l*-phenylalanine (Prolabo, France) were used.

2.3.2. HPLC-UV analysis for anatoxin-a/phenylalanine discrimination

HPLC-UV analyses were performed with a Merck LC system workstation, equipped with a Model LaChrom L-6200 pump (Merck-Hitachi, USA), a Model LaChrom L-7400 UV detector mode, a degassing solvent, a LaChrom L-7200 autosampler, and a post-column reactor (Kratos PCRS 520, ABI Analytical Kratos division) thermostatted at 37 °C. Data were acquired and processed using the Borwin system. Separations were carried out on a 150×2.1 mm i.d. column packed with 5-μm reversed-phase Zorbax SB 300 C_{18} silica (Agilent Technologies, USA). Mobile phase A contained milli-Q water acidified with 0.1% formic acid, adjusted at pH 3.5 and mobile phase B, pure acetonitrile. The chromatography run consisted of a linear gradient extending from 5 to 20% B over 30 min to elute the analytes. The flow rate was 0.8 ml min^{-1}.

2.3.3. Mass spectrometry analyses for anatoxin-a/phenylalanine discrimination

Mass spectra data were performed with a typical hybrid tandem mass spectrometer time of flight (Q-Star Pulsar i Applied Biosystems) equipped with an electrospray ionisation (ESI) source. All experiments were performed in the positive-ion mode. Data were acquired and processed using Analyst Qs software. The capillary voltage was set to 2500 V, and the declustering potential was typically of 20 V for Tof MS mode. The mass scan range was from *m/z* 100–1000, and the scan cycle was 1 s. For MS/MS experiments, the mass scan range was from *m/z* 30–170, with selection of the ion at *m/z* 166, and the collision energy was set to 30 eV with a declustering potential of 60 V.

3. Results

3.1. Canine neurotoxicosis and cyanobacterial inventory in the field and dog samples

Both dogs died beside the La Loue River at a distance of 5 km on September 11 and 14, 2003. As reported by the veterinarian, both dogs (a Yorkshire terrier weighing 2.5 kg and a Dogue de Bordeaux weighing 25 kg) showed similar clinical symptoms such as vomiting, paralysis of the muscles of the hind legs and respiratory failure before death. In the small dog, the symptoms and death were devastating, as they appeared as soon as it emerged from the river. In the bigger dog, the symptoms were delayed, with death occurring within 5 h.

In this region, the river is surrounded by meadows and forests. Insecticide and herbicide treatments were not observed around either of the sites. Pathogens were not detected in the water by routine tests in the bathing area nearby. Nevertheless, the river flow was very slow (11 $m^3 s^{-1}$, recorded at both sites) due to the drought. For about 10 km along the shoreline of the river, all surfaces (sediments, plants and stones) were covered by 1-m wide

Table 1
Cyanobacterial diversity in field samples from the La Loue River (September 16 and 18, 2003) and in stomach contents from dogs which died on September 11 and 14, 2003

Cyanobacterial species	Water column of La Loue	Green biofilm at shoreline of La Loue	Stomach contents	
			Yorkshire terrier	Dogue de Bordeaux
Lyngbya sp.		+		+
Oscillatoria cf. *limosa*	++	+		+
Oscillatoria sp.	++	+	+	+
Phormidium favosum		+	++	+
Phormidium sp.		+		
Pseudanabaena sp.		+		
Tolypothrix sp.				+

Symbols: (+) present, (++) dominant.

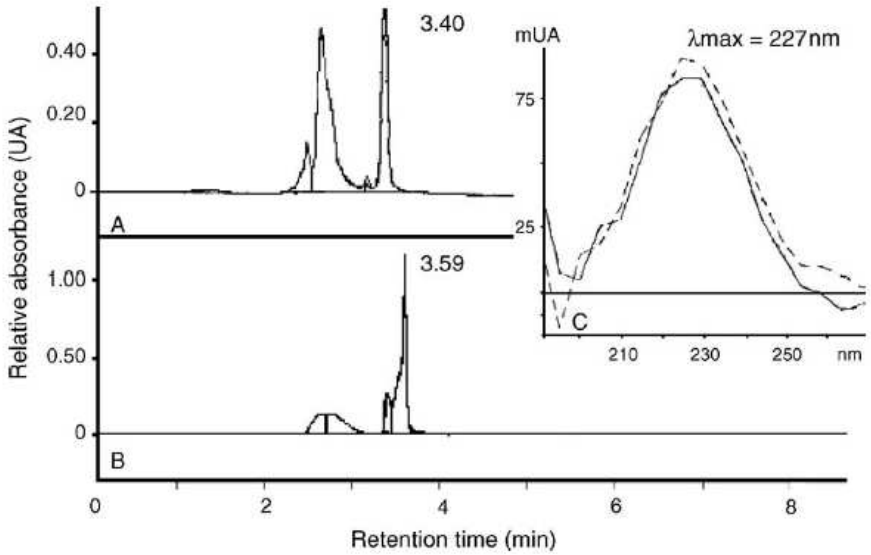


Fig. 1. HPLC/DAD screening for ANTX-A in La Loue field samples. (A) Green biofilm extract from the La Loue River. (B) ANTX-A standard. (C) UV spectra of the peaks eluted at 3.40 min from green biofilm extract (—) and 3.59 min corresponding to ANTX-A standard (- - - -).

green marginal biofilm. Microalgae (diatoms, green algae) and cyanobacteria were observed in fixed samples originating from the water column, the green biofilm and the dogs' stomach contents (Table 1). Cyanobacteria were dominant in the two latter samples. On the basis of morphological criteria, seven filamentous morphotypes belonging to the *Oscillatoriales* order were identified in the different samples (Table 1).

3.2. Screening for known cyanotoxins

As neurological signs occur in the context of contamination by anatoxins and saxitoxins, but also in the early stages of microcystins intoxication, rough screening for these three types of cyanotoxin was performed on the green biofilm samples with HPLC-DAD, N2A bioassay and PP2A inhibition assay. No microcystins or saxitoxins were found (data not shown). A compound with a characteristic UV spectra at 227 nm, and with a retention time of 3.40 min, which is close to that observed for the ANTX-A standard, was detected by HPLC-DAD (Fig. 1).

3.3. Identification of anatoxin-a in field and dog samples

The ESI-MS spectra of the studied samples in the mass scan range from *m/z* 166.0–166.5 and their corresponding ESI-MS-MS fragmentation patterns are summarised in Table 2. The presence of ANTX-A in the green biofilm samples was confirmed by MS/MS experiments using the Qq TOF mass spectrometer. The $[M+H]^+$ ion peak at *m/z*, 166.13 characteristic of ANTX-A standard (Table 2), was found in the three green biofilm samples tested (Fig. 2(A)). The fragmentation pattern of this $[M+H]^+$ ion peak at *m/z* 166.13 was identical for the green biofilm samples

Table 2
Comparison of the ESI-MS/MS fragmentation patterns for the major $[M+H]^+$ peaks determined by ESI-MS at *m/z* 166.13 and 166.07 in extracts of green biofilm, an isolated strain of *Phormidium favosum*, dog liver and dog stomach and intestine contents, ANTX-A and Phe standards

Sample	$[M+H]^+$ at *m/z*	ESI-MS/MS major ions at *m/z*							
ANTX-A standard	166.13	149.10	131.09	120.08	107.09	105.07	93.07	91.06	79.06
Green biofilm	166.13	149.10	131.09	120.08	107.09	105.07	93.07	91.06	79.06
Phormidium favosum	166.12	149.10	131.08	120.08	107.08	105.06	93.06	91.05	79.05
Liver	166.09	149.07	131.06	120.09	107.06	103.07	93.08	91.07	79.07
Stomach/intestine content	166.09			120.08	107.05	103.06	93.07		79.06
Phe standard	166.07			120.07	107.05	103.04	93.06		79.04

Samples were spiked with 1–5 µl, except for the liver extract, for which 15 µl were used.

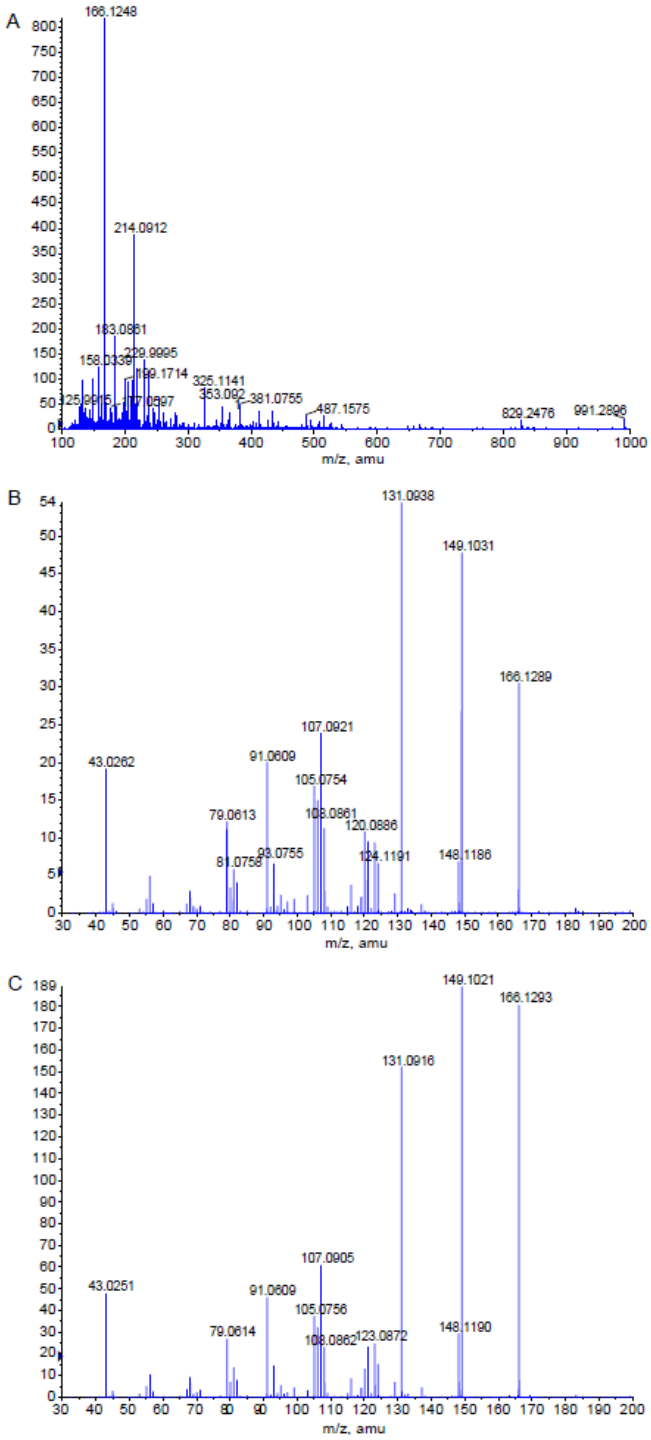


Fig. 2. ESI-MS spectrum and ESI-MS/MS fragmentation pattern of the La Loue field samples compared to the ANTX-A standard. (A) ESI-MS spectrum of the green biofilm from the La Loue River. (B) ESI-MS/MS fragmentation pattern of the $[M+H]^+$ peak at *m/z* 166.13 of the green biofilm. (C) ESI-MS/MS fragmentation pattern of the $[M+H]^+$ peak at *m/z* 166.13 of the ANTX-A standard.

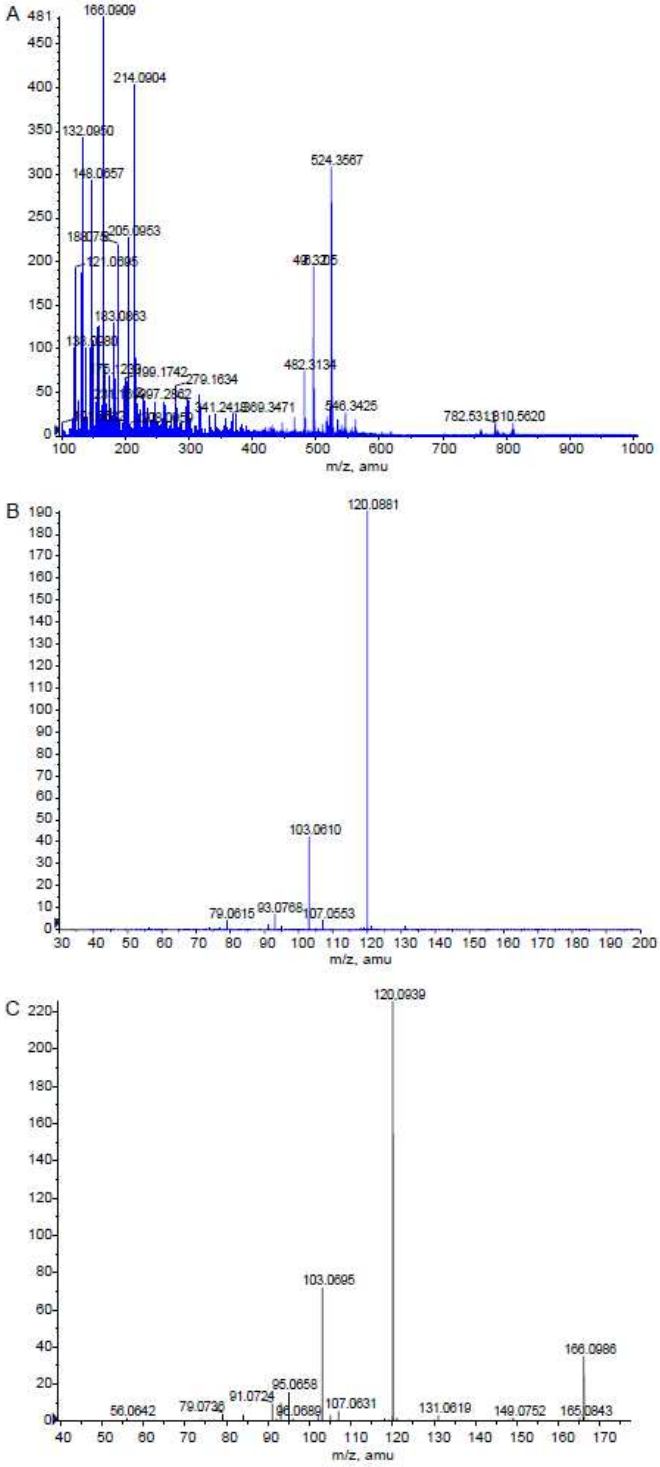


Fig. 3. ESI-MS and ESI MS-MS spectra of dog samples (stomach and intestine contents, liver). (A) ESI-MS spectrum of intoxicated dog samples. (B) ESI-MS/MS fragmentation pattern of the peak at *m/z* 166.09 for the dog stomach and intestine content extracts and for the Phe standard. 5–15 µl were injected. (C) ESI-MS/MS fragmentation pattern of the peak at *m/z* 166.09 of the 15 µl injection of the dog liver extract.

and the ANTX-A standard (Fig. 2(B) and (C); Table 2). The dog stomach and intestine content samples showed a predominant peak at *m/z* 166.09, with a fragmentation pattern giving a major peak at *m/z* 120.09 (Fig. 3(A) and (B); Table 2). This peak at *m/z* 166.09 corresponded to the amino acid Phe, as shown by comparison with ESI-MS and ESI-MS/MS spectra of Phe standard (Fig. 3(B)). Phe is an essential aromatic amino acid that mammals acquire in their diet.

The ESI-MS analysis of a 15-µL spike of dog liver extracts also revealed a peak at *m/z* 166.09. Selected ions at *m/z* values of 166.09, 166.10 up to 166.15 in the MS/MS experiments gave the same pattern as that found for the Phe standard, whereas with ion selection set to *m/z* 166.16, the fragmentation pattern corresponded to a combination of major fragments of Phe and minor fragments of ANTX-A (Fig. 3(C), Table 2). This led us to suspect the presence of ANTX-A in dogs' liver samples.

3.4. Distinction between ANTX-A and Phe in the dog liver extracts by HPLC-UV

Similar experiments were conducted with different proportions of Phe and ANTX-A (1-1, 10-1, 100-1), showing that a predominance of Phe within an extract could mask a small amount of ANTX-A during ESI-MS detection. Several extraction methods (pH variation, cartridge properties) were investigated, but none permitted the differential elution of these two compounds from crude extracts.

However, the UV spectra and the maximum absorption of these two compounds differed, making it possible to distinguish between them by HPLC-UV analysis. The ANTX-A absorption maximum occurs at 227 nm, whereas that of Phe occurs at 257 nm. Similarly, the retention time for the ANTX-A and Phe standards were 5.13 and 9.19 min, respectively. Chromatograms of the dog liver extracts (Fig. 4) revealed the concomitant presence of the cyanotoxin and the aromatic amino acid eluted at retention times of 5.17 and 9.20 min, respectively. The concentration of ANTX-A was high as 0.6 mg g^{-1} in the dog liver extracts, and estimated to reach a level of up to 8 mg g^{-1} in the green biofilm extract.

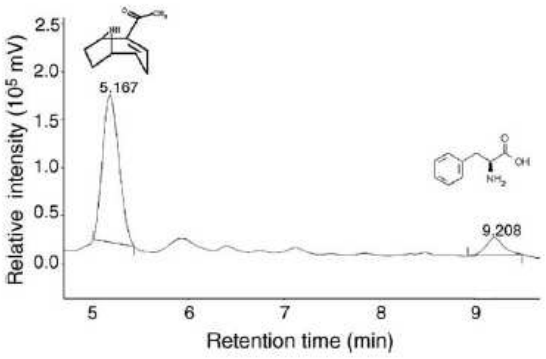


Fig. 4. HPLC-UV chromatogram from dog liver extract distinguish between anatoxin-a and phenylalanine 30 µl were injected. The retention times for ANTX-A and Phe standards were of 5.13 and 9.19 min, respectively. Chemical structures for anatoxin-a from http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/cyanotox/toxins.html and for phenylalanine http://www.chemie.fu-berlin.de/chemistry/bio/aminoacid/phe_en.html.

3.5. A new cyanobacterial ANTX-A producer

Three out of the seven benthic oscillatorioid morphotypes observed in the environmental samples were successfully isolated and tested for their ANTX-A producing potential. One of those, identified as *P. favosum* (Bory) Gom. according to the traditional classification (Fig. 5) and maintained in the Paris Museum Collection at MNHN, strain number PMC240.04, was shown by ESI-MS/MS and

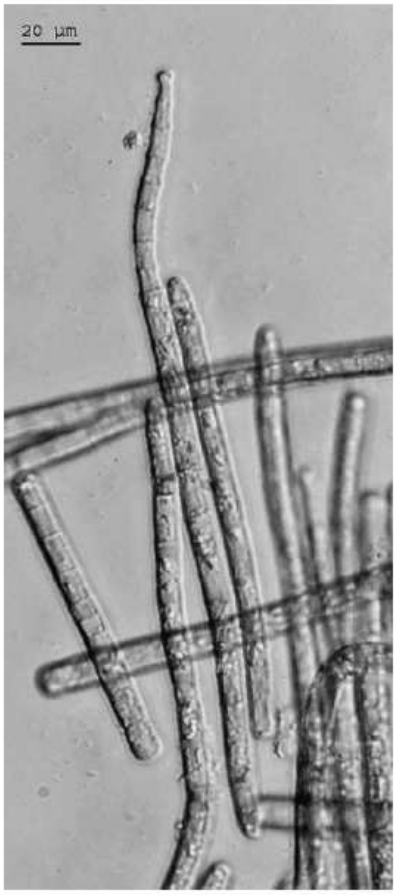


Fig. 5. Micrograph of an anatoxin-a—producing *Phormidium favosum* isolated from a cyanobacterial biofilm from the La Loue River. Scale bar: 20 µm.

HPLC-UV analysis to produce ANTX-A. This microorganism was present in the green biofilm and in canine samples, as well as being predominant in the smaller dog's stomach contents (Table 1).

4. Discussion

Cyanobacterial studies and surveys published to date have revealed that only microcystins have occurred in France, despite the reported presence of other cyanotoxins such as anatoxins, homoanatoxins, saxitoxins and cylindrospermopsins, in neighbouring countries. This is the first report of environmental and poisoned-animal samples containing anatoxin-a in France. Furthermore, the strain of *P. favosum* PMC240.04 that was producing this neurotoxic alkaloid was isolated.

4.1. Detection of anatoxin-a in natural samples

Despite early characterisation studies on ANTX-A (Devlin et al., 1977), the detection of anatoxins in the field is rare, and impeded by the rapid degradation of these toxins to form non-toxic compounds and by the availability and the complexity of the methods of detection. Recent improvements in chromatographic methods such as solid-phase microextraction and HPLC with fluorescence detection (Namera et al., 2002) or LC-ESI-MS (James et al., 1998; Takino et al., 1999; Furey et al., 2003) should make it possible to detect these neurotoxic alkaloids and to simplify their detection. In this study, the retrieval of the toxin was dependent on the methods used and on the complexity of the matrices. The detection of ANTX-A in different environmental samples e.g. *P. favosum*, green biofilm and dog's liver required both chromatographic methods and mass spectrometry. HPLC-UV was first used to screen for ANTX-A in field samples, and its presence was confirmed by tandem mass spectrometry. Mass spectrometry permitted to detect lower concentrations, and so it was selected for the analysis of the canine samples. The matrices of these samples were more complex, because the $[M+H]^+$ peak at *m/z* 166 corresponded to two different compounds. This indicates that the detection of the molecular ion $[M+H]^+$ at *m/z* 166 in animal and plant tissues is not sufficient to confirm the occurrence of ANTX-A, and needs to be completed by at least a fragmentation to confirm its presence. Moreover, depending of the proportions of these two compounds in the crude biological extracts examined, Phe might mask ANTX-A. Thus, the separation of the two compounds in the liver sample was satisfactorily achieved by chromatographic methods coupled with UV detection.

4.2. New occurrence and novel species producing the rare neurotoxin anatoxin-a

So far, the anatoxins-producing cyanobacteria have been restricted to few planktonic genera such as *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum*, *Planktothrix* and one benthic genus *Oscillatoria* (Sivonen and Jones, 1999). But recent studies have reported four new ANTX-A producing species (Namikoshi et al., 2003; Ballot et al., 2005; Viaggiu et al., 2004, this study), which indicates that the number of cyanobacterial species able to produce this neurotoxin has certainly been underestimated so far.

The genus *Phormidium* is cosmopolitan, and can be found in floating mats, in biofilms on water bodies and on wall surfaces. This microorganism, accompanied by other filamentous cyanobacterial morphotypes, had spread as a large green biofilm along the shoreline of the river, and this was most probably associated with the exceptional drought-related conditions of 2003, such as high water temperature and the lowest annual discharge ever observed for the La Loue River. *P. favosum* present in this mass development was shown to produce ANTX-A. Similarly, two other *Phormidium* species have been associated with toxin production: *Phormidium formosum* (Bory ex Gom) Anagn. & Kom., isolated from Norwegian freshwater phytoplankton that produces homoanatoxin-a (Skulberg et al., 1992, 1994), and more recently *Phormidium* aff. *formosum* and *Phormidium* aff. *amoenum*, isolated from growing mats on the surface of Australian water reservoirs and which are suspected of producing an unidentified toxin with protracted effects in the mouse bioassay (Baker et al., 2001). So far, the benthic cyanobacteria have been regarded as a nuisance organism, mainly when detached mats or biofilms enter in the water column. The commonly-occurring genus *Phormidium* should now be considered to consist of potential toxin producers, and therefore, a cause of concern for water and health authorities.

4.3. Toxicity potential and risk assessment

The smaller dog's stomach contained mainly the toxic species *P. favosum*, which can explain why the symptoms and death occurred more quickly in this animal. To evaluate the dose of biofilm potentially absorbed by each dog that had led to these fatal outcomes, the estimations of the toxicity of ANTX-A for mouse were assumed to be equivalent to those for dogs. The LD_{50} (lethal dose resulting in 50% deaths) of ANTX-A is 200 $\mu g\ kg^{-1}$ body weight via intraperitoneal injection in the mouse (Carmichael et al., 1979), and there was up to 8 $mg\ g^{-1}$ (dry weight) of ANTX-A in the green biofilm extract. These parameters indicate that a dose of 6 and 60 g of biofilm would be sufficient to kill the smaller (2.5 kg) and the bigger dog (25 kg), respectively. It also highlighted the high toxicity of this cyanobacterial biofilm and thus, the risk associated with its accidental consumption during recreational exposure.

According to monitoring reports (Sivonen et al., 1989; Park et al., 1993, 1998; Bumke-Vogt et al., 1999; Chorus, 2001), neurotoxins are less frequently encountered than hepatotoxins. Unlike the microcystins, the anatoxins have not been systematically investigated during bloom occurrences in France.

Furthermore, the production of cyanotoxins by benthic cyanobacteria is generally itemised in the context of animal intoxications, such as for Scottish and Irish dogs (Edwards et al., 1992; James et al., 1997) and for cattle in Swiss alpine pastures (Mez et al., 1997). The occurrence ANTX-A intoxication of this study may explain similar cases of neurotoxic symptoms observed in 37 dogs along the Tarn River valley (South France) in 2002 and 2003 that resulted in the death of 26 dogs. In the absence of any other neurotoxic compounds (e.g. agricultural pesticides), ANTX-A was suspected, but the neurotoxin-producing organism look for among the planktonic cyanobacteria has not yet been found. This means that it is still important to identify the causal agent and the organism responsible for its production by testing planktonic and benthic cyanobacteria.

The health risks associated with cyanotoxin exposure are difficult to extrapolate to human, even though considerable evidence of human poisoning has been reported (Falconer, 1999; Duy et al., 2000; Hitzfeld et al., 2000). The possible swallowing during the recreational use of lakes and rivers is relevant, particularly for children in age of mouthing behaviour (U. S. Environmental Protection Agency, 2002). This study demonstrated that the health risk of exposure to cyanobacteria and cyanotoxins could arise even from sediment from rivers, which are usually not affected by cyanobacterial proliferation. Consequently, the surveillance of bathing areas, mainly in terms of counting and identifying planktonic cyanobacteria or chlorophyll-a measurement of water column samples (Bartram et al., 1999) should be extended to include sediment examination in the context of biofilm proliferation.

Acknowledgements

The authors would like to thank J.P. Foulquié (Veterinary clinic, Dole, France), S. Plé and F. Houeder (Direction Départementale des Services Vétérinaires du Jura, France), B. Piot (Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales), and B. Le Berre, R. Chandevault, S. Jacquet and E. Menthon (Institut National de Recherche Agronomique, Thonon, France) for supplying with sample material. We would also like to thank J.P. Brouard and L. Dubost (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France) for technical assistance with the ESI-Qq-TOF. We are grateful to A. Couté (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France) and W.W. Carmichael (Wright State University, Dayton, USA) for helpful discussions.

References

Baker, P.D., Steffensen, D.A., Humpage, A.R., Nicholson, B.C., Falconer, I.R., Lanthois, B., Fergusson, K.M., Saint, C.P., 2001. Preliminary evidence of toxicity associated with the benthic cyanobacterium *Phormidium* in South Australia. Environ. Toxicol. 16, 506–511.

Ballot, A., Krienitz, L., Kotut, K., Wiegand, C., Pflugmacher, S., 2005. Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in the alkaline crater lakes Sonachi and Simbi, Kenya. Harmful Algae 4, 139–150.

Bartram, J., Burch, M., Falconer, I.R., Jones, G., Kuiper-Goodman, T., 1999. Situation assessment, planning and managment. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. E & FN Spon, London, pp. 179–209.

Bernard, C., Harvey, M., Briand, J.-F., Biré, R., Krys, S., Fontaine, J.J., 2003. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. Environ. Toxicol. 18, 176–186.

Briand, J.F., Robillot, C., Quiblier-Llobéras, C., Bernard, C., 2002. A perennial bloom of *Planktothrix agardhii* (cyanobacteria) in a shallow eutrophic French lake: limnological and microcystin production studies. Arch. Hydrobiol. 153, 605–622.

Bruno, M., Barbini, D.A., Pierdominici, E., Serse, A.P., Ioppolo, A., 1994. Anatoxin-a and a previously unknown toxin in *Anabaena planctonica* from blooms found in Lake Mulargia (Italy). Toxicon 32, 369–373.

Bumke-Vogt, C., Mailahn, W., Chorus, I., 1999. Anatoxin-a and neurotoxic cyanobacteria in German lakes and reservoirs. Environ. Toxicol. 14, 117–125.

Carmichael, W.W., 1997. The cyanotoxins. Adv. Bot. Res. 27, 211–256.

Carmichael, W.W., Biggs, D.F., Gorham, P.R., 1975. Toxicology and pharmacological action of *Anabaena flos-aquae* toxin. Science 187, 542–544.

Carmichael, W.W., Biggs, D.F., Peterson, M.A., 1979. Pharmacology of anatoxin-a, produced by freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NCR-44-1. Toxicon 17, 229–236.

Chorus, I., 2001. Cyanotoxin occurrence in freshwaters. In: Chorus, I. (Ed.), Cyanotoxins: Occurrence, Causes, Consequences. Springer, Berlin, pp. 5–82.

Devlin, J.P., Edwards, O.E., Gorham, P.R., Hunter, M.R., Pike, R.K., Stavric, B., 1977. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NCR-44h. Can. J. Chem. 55, 1367–1371.

Duy, T.N., Lam, P.K.S., Shaw, G.R., Connell, D.W., 2000. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 163, 113–186.

Edwards, C., Beattie, K.A., Scrigeour, C.M., Codd, G.A., 1992. Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. Toxicon 30, 1165–1175.

Falconer, I.R., 1999. An overview of problems caused by toxic blue green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. Environ. Toxicol. 14, 5–12.

Furey, A., Crowley, J., Lehane, M., James, K.J., 2003. Liquid chromatography with electrospray ion-trap mass spectrometry for the determination of anatoxins in cyanobacteria and drinking water. Rapid Commun. Mass Spectrom. 17, 583–588.

Hitzfeld, B.C., Höger, S.J., Dietrich, D.R., 2000. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. Environ. Health Perspect. 108, 113–122.

Humbert, J.F., Paolini, G., Le Berre, B., 2001. Monitoring a cyanobacterial bloom and its consequences for water quality, Intergovernmental Oceanographic Comm. UNESCO 2001 pp. 496–499.

James, K.J., Sherlock, I.R., Stack, M.A., 1997. Anatoxin-a in Irish freshwater and cyanobacteria, determined using a new fluorimetric liquid chromatographic method. Toxicon 35, 963–971.

James, K.J., Furey, A., Sherlock, I.R., Stack, M.A., Twohig, M., Caudwell, F.B., Skulberg, O.M., 1998. Sensitive determination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by liquid chromatography with fluorometric detection. J. Chromatogr. A 798, 147–157.

Krienitz, L., Ballot, A., Kotut, K., Wiegand, C., Pütz, S., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Pflugmacher, S., 2003. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at lake Bogoria, Kenya. FEMS Microbiol. Ecol. 43, 141–148.

Manger, R.L., Leja, L.S., Lee, S.L., Hungerford, J.M., Wekell, M.M., 1993. Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins and ciguatoxins. Anal. Biochem. 214, 190–194.

Mez, K., Beattie, K.A., Codd, G.A., Hanselmann, K., Hauser, B., Naegeli, H., Preisig, H.R., 1997. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. Eur. J. Phycol. 32, 111–117.

Namera, A., So, A., Pawliszyn, J., 2002. Analysis of anatoxin-a in aqueous samples by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and on-fiber derivatization. J. Chromatogr. A 963, 295–302.

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 a cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. Toxicon 42, 533–538.

Park, H.D., Watanabe, M.F., Harada, K.-I., Nagai, H., Suzuki, M., Watanabe, M., Hayashi, H., 1993. Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters. Nat. Toxins 1, 353–360.

Park, H.D., Kim, B., Kim, E., Okino, T., 1998. Hepatotoxic microcystins and neurotoxic anatoxin-a in cyanobacterial blooms from Korean lakes. Environ. Toxicol. Water Qual. 13, 225–234.

Rapala, J., Sivonen, K., Luukkainen, R., Niemelä, S.I., 1993. Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaenas*-strains—a laboratory study. J. Appl. Ecol. 5, 581–591.

Rivasseau, C., Racaud, P., Deguin, A., Hennion, M.-C., 1999. Development of a bioanalytical phosphatase inhibition test for the monitoring of microcystins in environmental water samples. Anal. Chim. Acta 394, 243–257.

Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. E &FN Spon, London, pp. 41–111.

Sivonen, K., Himberg, K., Luukkainen, R., Niemelä, S.I., Poon, G.K., Codd, G.A., 1989. Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacteria blooms and strains from Finland. Toxic. Assess. 4, 339–352.

Skulberg, O.M., Carmichael, W.W., Andersen, R.A., Matsunaga, T., Moore, R.E., Skulberg, R., 1992. Investigations of a neurotoxic oscillatorialean strain (Cyanophyceae) and its toxin, isolation and characterization of homoanatoxin-a. Environ. Toxicol. Chem. 11, 321–329.

Skulberg, O.M., Underdal, B., Utkilen, H., 1994. Toxic waterblooms with cyanophytes in Norway—current knowledge. Algol. Stud. 75, 279–289.

Spivak, C.E., Witkop, B., Albuquerque, E.X., 1980. Anatoxin-a: a novel potent agonist at the nicotinic receptor. Mol. Pharmacol. 18, 384–394.

Takino, M., Daishima, S., Yamaguchi, K., 1999. Analysis of anatoxin-a in freshwaters by automated on-line derivatization-liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. J. Chromatogr. A 862, 191–197.

U.S. Environmental Protection Agency (EPA), 2002. Child-specific Exposure Factors Handbook. National Center for Environmental Assessment, Washington, DC. EPA/600/P-00/002B, p. 448.

Verschuren, D., Johnson, T.C., Kling, H.J., Edgington, D.N., Leavitt, P.R., Brown, E.T., Talbot, M.R., Hecky, R.E., 2002. History and timing of human impact on lake Victoria, East Africa. Proc. R. Soc. London B 269, 289–294.

Vezie, C., Brient, L., Sivonen, K., Bertru, G., Lefeuvre, J.-C., Salkinoja-Salonen, M., 1997. Occurence of microcystin-containing cyanobacterial blooms in freshwaters of Brittany (France). Arch. Hydrobiol. 139, 401–413.

Vezie, C., Brient, L., Sivonen, K., Bertru, G., Lefeuvre, J.-C., Salkinoja-Salonen, M., 1998. Variation of microcystin content of cyanobacterial blooms and isolated strains in lake Grand-Lieu (France). Microb. Ecol. 35, 126–135.

Viaggiu, E., Melchiorre, S., Volpi, F., Di Corcia, A., Mancini, R., Garibaldi, L., Crichigno, G., Bruno, M., 2004. Anatoxin-a toxin in the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* from a fishing pond in northern Italy. Environ. Toxicol. 19, 191–197.