

# Sommaire

<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATIONS ET TERMES CONVENTIONNELS.....</b>	<b>4</b>
<b>INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES ANNEXES.....</b>	<b>7</b>
<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>9</b>
<b>I.1. La ciguatéra : du phénomène écologique à l'intoxication alimentaire.....</b>	<b>11</b>
I.1.1. Sciences humaines de la ciguatéra .....	11
I.1.1.1. Connaissance historique.....	11
I.1.1.2. Répartition géographique .....	13
I.1.1.3. Impact socio-économique et sanitaire .....	15
I.1.2. Toxicogénèse de la ciguatéra .....	17
I.1.2.1. Eco-toxicologie .....	17
I.1.2.2. Toxines ciguatériques.....	19
I.1.2.3. Action sur les courants ioniques.....	22
I.1.3. Tableau clinique de la ciguatéra.....	24
I.1.3.1. Symptômes classiques.....	24
I.1.3.2. Association de syndromes particuliers .....	26
<b>I.2. Les mécanismes inflammatoires dans la ciguatéra .....</b>	<b>29</b>
I.2.1. Médiateurs de l'inflammation .....	29
I.2.1.1. Le monde des cytokines .....	29
I.2.1.2. La voie de l'oxyde nitrique .....	31
I.2.1.3. Les endotoxines, inducteur de l'inflammation .....	33
I.2.2. Implication des facteurs de l'inflammation dans la ciguatéra .....	34
I.2.2.1. Hypothèses formulées à partir des observations cliniques .....	34
I.2.2.2. Modulation de l'iNOS par la P-CTX-1B.....	36
<b>I.3. Vers un traitement efficace contre la ciguatéra .....</b>	<b>39</b>
I.3.1. Pharmacopées disponibles .....	39
I.3.1.1. Médecine occidentale.....	39
I.3.1.2. Usage de plantes traditionnelles .....	41
I.3.2. Développement de tests in vitro .....	44
I.3.2.1. Etudes électrophysiologiques .....	44
I.3.2.2. Test de cytotoxicité .....	46
I.3.2.3. Test d'affinité sur le récepteur ou <i>Receptor Binding Assay</i> (RBA).....	49

I.3.3. Perspectives thérapeutiques .....	51
I.3.3.1. Substances naturelles d'origine marine .....	51
I.3.3.2. Développement d'anticorps anti-CTXs .....	52
<b>I.4. Cadre et objectifs du projet de thèse.....</b>	<b>54</b>
I.4.1. Objectif 1 : étude de la modulation des facteurs de l'inflammation par les ciguatoxines .....	54
I.4.2. Objectif 2 : caractérisation du potentiel anti-inflammatoire de remèdes traditionnellement utilisés dans le Pacifique .....	54
I.4.3. Développement de la technique de PCR quantitative .....	55
<b>I.5. Références de la partie I.....</b>	<b>56</b>
 <b>II. DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE LA TECHNIQUE DE PCR QUANTITATIVE.....</b>	 <b>81</b>
<b>II.1. Introduction.....</b>	<b>83</b>
II.1.1. Définition de la PCR conventionnelle .....	83
II.1.1.1. Historique.....	83
II.1.1.2. Phases de la PCR classique .....	84
II.1.1.3. De la PCR conventionnelle à la PCR quantitative .....	85
II.1.2. Technique de PCR quantitative .....	87
II.1.2.1. Chimie de détection .....	87
II.1.2.2. Spécificité de la qPCR .....	89
II.1.2.3. Définition du cycle seuil .....	91
II.1.3. Calcul de quantification.....	93
II.1.3.1. Normalisation.....	93
II.1.3.2. Quantifications absolue et relative .....	95
II.1.4. Objectif du chapitre .....	98
<b>II.2. Matériel et Méthodes .....</b>	<b>100</b>
II.2.1. Matériel.....	100
II.2.2. Culture et traitement cellulaire .....	100
II.2.3. Extraction d'ARN total et synthèse d'ADNc.....	101
II.2.4. Détermination des séquences nucléotidiques des couples d'amorces.....	101
II.2.5. qPCR et programme d'amplification .....	103
II.2.6. Electrophorèse sur gel d'agarose .....	103
II.2.7. Réalisation des courbes standards.....	104
<b>II.3. Mise au point de la qPCR.....</b>	<b>105</b>
II.3.1. Optimisation des conditions de qPCR .....	105
II.3.2. Spécificité et validation des couples d'amorces .....	107
II.3.3. Stabilité des gènes de référence .....	108
II.3.4. Evaluation de l'efficacité d'amplification .....	109
<b>II.4. Conclusions.....</b>	<b>112</b>
<b>II.5. Références de la partie II.....</b>	<b>113</b>
 <b>III. MODULATION DES FACTEURS INFLAMMATOIRES PAR LA CIGUATOXINE P-CTX-1B .....</b>	 <b>123</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>125</b>
<b>Evaluation de la modulation des médiateurs de l'inflammation par les CTXs <i>in vitro</i>.....</b>	<b>126</b>
Publication 1 : Mariko MATSUI, Shilpa KUMAR-ROINE, H. Taiana DARIUS, Mireille CHINAIN, Dominique LAURENT, Serge PAUILLAC (2009) Pacific ciguatoxin 1B-induced modulation of inflammatory mediators in a murine macrophage cell line, <i>Toxicon</i> , doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.039. ...	126

<b>IV. CARACTERISATION DU POTENTIEL ANTI-INFLAMMATOIRE DE REMEDES TRADITIONNELLEMENT UTILISES DANS LE TRAITEMENT DE LA CIGUATERA .....</b>	<b>137</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>139</b>
<b>Etude du potentiel anti-inflammatoire de quatre plantes traditionnellement utilisées dans le traitement de la ciguatéra .....</b>	<b>140</b>
Publication 2 : Mariko MATSUI, Shilpa KUMAR-ROINE, Mireille CHINAIN, Dominique LAURENT, Serge PAUILLAC (2009) Evaluation of the anti-inflammatory potential of plant extracts traditionally used for the treatment of Ciguatera Fish Poisoning in the South Pacific, Actes des Doctoriales de Tahiti 2009, ISBN: 978-2-9534554-0-3.....	140
<b>Caractérisation du potentiel anti-inflammatoire de <i>Vitex trifolia</i> in vitro .....</b>	<b>145</b>
Publication 3 : Mariko MATSUI, Shilpa KUMAR-ROINE, H. Taiana DARIUS, Mireille CHINAIN, Dominique LAURENT, Serge PAUILLAC (2009) Characterisation of the anti-inflammatory potential of <i>Vitex trifolia</i> L. ( <i>Labiatae</i> ), a multipurpose plant of the Pacific traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology, doi:10.1016/j.jep.2009.09.020.....	145
<b>V. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>153</b>
<i>Vers une meilleure compréhension de la physiopathologie de la ciguatéra... ..</i>	<i>155</i>
<i>...pour la découverte de nouvelles thérapeutiques de l'intoxication .....</i>	<i>157</i>
Références de la partie V .....	160
<b>ANNEXES .....</b>	<b>162</b>
<b>COMMUNICATIONS.....</b>	<b>171</b>

# Abréviations et termes conventionnels

ADN(c) : acide désoxyribonucléique (complémentaire)  
ARN(m) : acide ribonucléique (messenger)  
ATCC : *American Cell Type Culture Collection*  
BH<sub>4</sub> : tétrahydrobioptérine  
Ca<sup>2+</sup> : ion calcium  
cGMP : guanosine 3',5'-monophosphate cyclique  
CNRS : Centre Nationale de Recherche Scientifique  
CPS : Secrétariat général de la Communauté du Pacifique Sud  
CSSP : canal sodique sensible au potentiel  
CTX(s) : ciguatoxine (s)  
DL<sub>50</sub> : dose létale entraînant 50 % de mortalité  
DMSO : diméthylsulfoxyde  
DO : densité optique  
DRG : ganglion de la racine dorsale  
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique  
et al : et collaborateurs (*et alii*)  
FAD : flavine adénosine dinucléotide  
FMN : flavine mononucléotide  
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase  
GTP : guanosine triphosphate  
HEPES : acide N-2-hydroxyléthylpipérazine-N'-2-éthane sulfonique  
HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance (*High Performance Liquid Chromatography*)  
i.p. : intrapéritonéale  
IL-(1, 4, 6,...) : interleukine-(1, 4, 6, ...)  
INSERM : Institut Nationale de la Santé et de la Recherche Médicale  
IPNC : Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie  
IRD : Institut de Recherche pour le Développement  
K<sup>+</sup> : ion potassium  
L-Arg : L-arginine  
L-NAME : N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine méthyl ester  
L-NMA : N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine  
LPS : lipopolysaccharide  
M : molaire (mole / l) et ses dérivés  
m / v : masse/volume  
MEB : microscope électronique à balayage  
MS : spectrométrie de masse (*Mass Spectrometry*)  
MTT : bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tétrazolium  
Na<sup>+</sup> : ion sodium  
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate  
NCBI : National Center for Biotechnology Information  
Neuro-2a : cellules de neuroblastomes murins

NO : oxyde nitrique (*nitric oxide*)  
 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> : nitrite  
 NOS : oxyde nitrique synthase (*nitric oxide synthase*)  
 ODQ : H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one  
 PA : potentiel d'action  
 PBS : tampon phosphate salin (*phosphate buffer saline*)  
 PbTx(s) : brévétoxine (s)  
 qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction  
 qsp: quantité suffisante pour  
 RBA : Receptor Biding assay  
 RBC : globule rouge ou érythrocyte (*Red Blood Cell*)  
 RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
 rpm : rotation par minute  
 RPMI : *Roswell Park Memorial Institute*  
 RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction  
 SFC : Syndrome de Fatigue Chronique  
 sGC : guanylate cyclase cytoplasmique (soluble guanylate cyclase)  
 SVF : sérum de veau fœtal  
 TBE : TRIS borate-EDTA  
 TNF- : Facteur nécrosant des tumeurs (*Tumor Necrosing Factor*)  
 UK : Grande-Bretagne (United-Kingdom)  
 UMR : Unité Mixte de Recherche  
 US : américain (United States)  
 USA : Etats-Unis d'Amérique (United States of America)  
 v / v: volume/volume

# Index des figures et tableaux

Figure I.1.1.2.a : Distribution géographique de la ciguatéra dans la région intertropicale .....	13
Figure I.1.1.3.a : Incidence de la ciguatéra dans les îles du Pacifique Sud.....	17
Figure I.1.2.1.a : Observations d'une cellule de <i>Gambierdiscus toxicus</i> .....	18
Figure I.1.2.2.a : Structure chimique de diverses ciguatoxines et brévétoxines .....	20
Figure I.1.2.3.a : Observation des effets neurophysiologiques des ciguatoxines.....	23
Figure I.1.3.2.a : Observation de coupes transversales de muscle squelettique d'un patient présentant une polymyosite consécutive à une intoxication ciguatérique.....	28
Figure I.2.1.2.a : Biosynthèse de l'oxyde nitrique NO par la NO Synthase (NOS).....	31
Figure I.2.1.2.a : Cibles moléculaires du NO .....	32
Figure I.2.1.3.a : Induction des médiateurs de l'inflammation par le LPS .....	34
Figure I.2.2.2.a : Effet de la P-CTX-1B sur la masse d'IP3 dans des myotubes de rat .....	37
Figure I.2.2.2.b : Induction du NO par la P-CTX-1B sur les cellules RAW 264.7 .....	38
Figure I.3.1.2.a : Effet bénéfique de l'extrait d' <i>H. foertherianum</i> sur la progression pondérale de souris injectées avec de la CTX.....	43
Figure I.3.2.1.a : Inversion de l'hyperexcitabilité membranaire dépendante de la P-CTX-1B par un extrait de <i>Davallia solida</i> .....	45
Figure I.3.2.3.a : Déplacement de la PbTx-3 tritiée ( $[^3\text{H}]$ PbTx-3) de synaptosomes de cerveau de rat par le brévénal .....	50
Figure I.3.3.2.a : Neutralisation <i>in vivo</i> de la P-CTX-3C par des anticorps monoclonaux.....	53
Figure II.1.1.2.a°: Phases de la PCR conventionnelle.....	84
Figure II.1.1.3.a°: Système LightCycler basé sur un carrousel à 32 capillaires.....	86
Figure II.1.2.1.a°: Agent intercalant de l'ADN double brin, exemple du SYBR Green I .....	89
Figure II.1.2.2.a : Analyse des courbes de fusion établies lors des qPCR .....	90
Figure II.1.2.3.a°: Modèle graphique d'amplification de la qPCR .....	91
Figure II.1.2.3.a : Représentation graphique de la courbe standard de qPCR .....	93
Figure II.1.3.1.a : Valeurs de Ct de plusieurs gènes de référence d'échantillons de sang .....	94
Figure II.c : Recherche des conditions optimales de qPCR, exemple de l'ADN iNOS.....	106
Figure II.3.2.a : Evaluation de la spécificité des qPCR, exemple de l'ADN GAPDH .....	107
Figure II.3.3.a : Variabilité de l'expression des gènes GAPDH et $\beta$ -actine selon les conditions expérimentales appliquées aux cellules RAW 264.7 .....	109
Figure II.3.4.a : Courbes standard des gènes murins iNOS et GAPDH.....	110
Figure V.a : Explication possible quant à l'implication des médiateurs inflammatoire dans la ciguatéra .....	156
Figure V.b : Effet inhibiteur de <i>V. trifolia</i> sur la translocation de NFkB (p65).....	158
Tableau I.1.3.I : Comparaison des signes cliniques de trois régions du Pacifique Sud .....	26
Tableau I.3.2.I : Capacité de plantes à inhiber l'effet cytotoxique de la P-CTX-1B .....	48
Tableau II.2.4.I : Séquences des couples d'amorce des gènes étudiés par qPCR.....	102
Tableau II.3.4.I : Efficacité d'amplification des gènes d'intérêt.....	111

## Liste des annexes

Annexe I : La Nouvelle-Calédonie dans le Pacifique Sud .....	163
Annexe II : La chaîne trophique classique de la ciguatera.....	164
Annexe III : Fixation des CTXs et autres toxines marines sur le CSSP .....	165
Annexe IV : Les cytokines, médiateurs de l'inflammation.....	166
Annexe V : Plantes traditionnelles utilisées dans le traitement de la ciguatera .....	167
Annexe VI A : Publication, Kumar-Roiné et al, 2008, Nitric oxide.....	168
Annexe VI B : Publication, Kumar-Roiné et al, 2009, Journal of Ethnopharmacology .....	169
Annexe VII : Représentation schématique du principe de la technologie <i>TaqMan</i> .....	170





# I. INTRODUCTION

*« La science n'a pas de patrie »*

Louis Pasteur



## **I.1. La ciguatéra : du phénomène écologique à l'intoxication alimentaire**

### *I.1.1. Sciences humaines de la ciguatéra*

#### I.1.1.1. Connaissance historique

Les premiers écrits bibliques auraient autrefois limité les anciens Israélites du Moyen-Orient dans leur consommation de crustacés et de mollusques ainsi que celle de certaines espèces de poissons sans écailles (Dor, 1937) dont les poissons-ballons de la famille des Tetraodontidae, responsables d'une forme d'empoisonnement pouvant être fatale et appelée tétrodontisme (Isbister et Kiernan, 2005) ; d'aucun pourrait alors spéculer quant à l'origine de ces injonctions, pouvant alors être basées sur une expérience empirique de formes d'intoxications suite à la consommation de produits de la mer par les sociétés de l'époque. De nos jours, la majorité des nutritionnistes recommandent à l'inverse un apport accru de ces aliments car les acides gras polyinsaturés présents dans ces produits ont montré une action significative sur la réduction des risques de maladies cardiovasculaires et la prévention contre l'apparition possible de cancers (Kris-Etherton et al, 2002 ; Larsson et al, 2004). Cependant, la présence et l'accumulation de biotoxines dans les organismes marins peuvent conduire à certaines intoxications humaines comme les ichtyosarcotoxismes – étymologiquement du grec *ichthyos* pour « poisson », *sarcos* pour « chair » et *toxicon* pour « poison » - qui sont dues à l'ingestion de chairs de poissons contaminés par des biotoxines marines. Reportée dans les eaux chaudes des régions tropicales et subtropicales du globe, la ciguatéra est une forme complexe d'ichtyosarcotoxisme qui désigne à la fois l'intoxication alimentaire, caractérisée par un tableau clinique polymorphe survenant suite à la consommation de certains poissons récifaux habituellement consommables, et le phénomène écologique conduisant à l'apparition

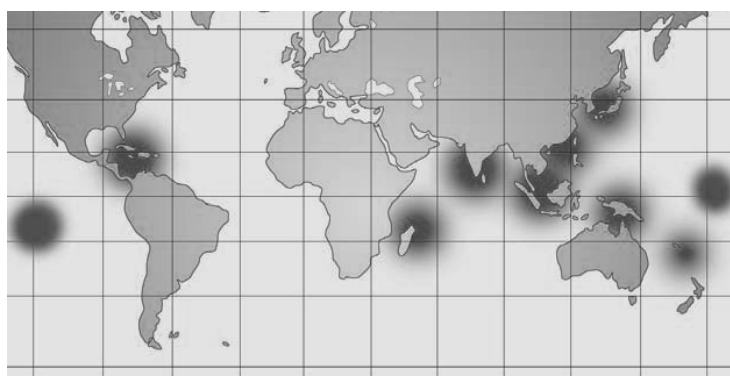
de cette manifestation auprès des populations touchées. Elle est également désignée par les termes d'Intoxication Ciguatérique par les Poissons (ICP) soit en anglais *Ciguatera Fish Poisoning* (CFP). Les habitants de Nouvelle-Calédonie, terre française du Pacifique Sud introduite dans l'Annexe I, connaissent bien également cette pathologie notamment le prurit caractéristique de l'intoxication qui explique l'utilisation plus commune de son appellation locale de « gratte » (Laurent, 1993).

A l'instar de ses synonymes, l'épithète *ciguatera*, quant à elle, fut introduite pour la première fois par l'ichtyologue cubain, Poey, en 1866 d'après la dénomination vernaculaire cubain *sigua* d'un petit mollusque gastéropode, *Livona pica*, dont l'ingestion fut à l'origine de plusieurs intoxications humaines (Laurent et al, 2005). Les plus anciennes notes concernant la ciguatera furent cependant reportées bien avant son appellation, dès le XVI<sup>ème</sup> siècle par les grands navigateurs tels que Magellan et Christophe Colomb et grâce aux récits de leurs hommes d'équipages (Legrand et Bagnis, 1991). Les marins de Fernandez da Queiros en ont pareillement fait la triste expérience dans les îles du Pacifique Sud et plus précisément au Vanuatu (anciennes Nouvelles-Hébrides) en 1606 (d'après Bagnis, 1968). En 1675, le philosophe anglais John Locke en donne une description clinique et épidémiologique qui situe déjà sa complexité (Bourée et al, 2002). A propos des îles Bahamas, il écrit : « *Certains poissons là-bas sont empoisonnés, entraînant de sévères douleurs dans les articulations de ceux qui les mangent et aussi des démangeaisons... Ces troubles disparaissent en deux ou trois jours... Dans un lot de poissons de même espèces, taille, forme couleur et goût, seuls certains renferment le poison. Les autres n'entraînent aucun préjudice chez l'homme... Nous n'avons jamais entendu dire que la maladie fut mortelle, mais pour les chats et chiens qui consomment ces poissons, c'est souvent le dernier repas... Chez les gens qui ont eu une fois cette maladie, une nouvelle ingestion de poisson, même sain peut raviver le ferment toxique dans l'organisme et faire réapparaître les douleurs.* ». Par la suite, le célèbre capitaine James

Cook reporta de même des cas d'intoxications ciguatériques lors de sa seconde expédition réalisée dans le Pacifique Sud entre 1772 et 1775 (Doherty, 2005). En Polynésie Française dans les îles de la Société, James Morrison, alors second maître à bord du *HMS Bounty* en 1792, mentionna également dans son journal de bord la présence de poissons toxiques dont la consommation provoqua des « *démangeaisons intolérables accompagnées d'une sensation de brûlure intense (...) dans la paume des mains et la plante des pieds* » (Morrison, 1935), rappelant le symptôme d'inversion de sensation du chaud et du froid souvent observé chez les patients atteints de la ciguatera (Randall, 1958).

#### I.1.1.2. Répartition géographique

Les faits historiques précédemment cités relatent des observations de cas de ciguatera dans le Pacifique Sud et les Caraïbes et confirment par là-même le fait que cette intoxication soit majoritairement présente dans la plupart des écosystèmes coralliens des zones intertropicales (Bagnis, 1979a ; 1979b ; Gollop et Pon, 1992 ; Habermehl et al, 1994 ; Glaziou and Legrand, 1994 ; Quod et Turquet 1996 ; Lewis, 2001a ; Morrison et al, 2008). De nombreux cas de gratte ont effectivement été reportés au niveau de l'Océan Pacifique dans des pays comme l'Australie, la Nouvelle-Calédonie, la Polynésie Française et le Vanuatu et dans le Nord du Pacifique, avec Hawaii et le Japon ; dans l'Océan Indien, Madagascar, l'Ile Maurice, les Seychelles, la Réunion ; en Floride et dans la Mer des Caraïbes (Figure I.1.1.2.a).



**Figure I.1.1.2.a : Distribution géographique de la ciguatera dans la région intertropicale**

Cette distribution géographique semble cependant évoluer avec des signalements de cas d'intoxication en dehors des zones de distribution classique de la ciguatera tels que sur les côtes Pacifique du nord du Mexique (Lechuga-Devéze et Sierra-Beltran, 1995) ou des états américains inhabituellement touchés comme le Texas et la Caroline du Sud ou encore le sud de la Californie (Barton et al, 1995 ; Villareal et al, 2006). Ces observations laissent alors penser que les régions propices au développement de la ciguatera pourraient s'étendre au cours des prochaines décennies.

En plus d'influer sur d'autres écosystèmes marins, les changements climatiques responsables de l'augmentation de la température des océans et des mers conduisent au blanchiment du corail (James et Crabbe, 2008) propice à l'apparition des dinoflagellés du genre *Gambierdiscus*, avérés comme étant les micro-organismes primaires impliqués dans le phénomène ciguatérique (Bagnis et al, 1980). Une recrudescence marquée du nombre d'empoisonnements ciguatériques a également été associée à la destruction des récifs coralliens par des perturbations climatiques ponctuelles – cyclones ou séismes – dans certains archipels comme les Iles Marquises (Bagnis, 1979a). Les suivis environnementaux réalisés en Polynésie Française concernant la présence de cette micro-algue ont par ailleurs montré que la croissance et la multiplication de cet organisme semblaient être corrélées à l'élévation de la température des mers survenant lors des saisons chaudes de cette région (Chinain et al, 1999a ; Chateau-Degat et al, 2005). Des travaux similaires tendent par ailleurs à démontrer la présence de *Gambierdiscus* dans des régions inhabituelles telle que la Mer Méditerranée, pouvant résulter de son introduction dans ces milieux conséquemment au réchauffement global (Aligizaki et al, 2008). Ajouté au vecteur climatique, des facteurs anthropiques peuvent également être à l'origine de l'apparition sporadique de la ciguatera. En effet, les chantiers de constructions de ports ou les projets d'extension de terres sur les récifs coralliens semblent conduire à l'apparition de flambées ciguatériques (Laurent, communication personnelle). La

construction de plates-formes pétrolières au large du nord-ouest du Golf du Mexique depuis les « années 40 » aurait pareillement été favorable au développement des dinoflagellés ciguatérigènes et l'extension de la zone d'intoxication (Villareal et al, 2007).

#### I.1.1.3. Impact socio-économique et sanitaire

Le développement du tourisme international ainsi que la croissance des échanges commerciaux à l'échelle mondiale impactent également sur la répartition géographique des intoxications. En effet, les différents recensements effectués ces dernières années ont mis à jour une augmentation du nombre de cas d'intoxication dans des pays non habituellement associés à ce phénomène, entre autres des pays de la communauté européenne, et les rapprochements effectués ont montré que les personnes touchées par cette pathologie l'ont été soit suite à la consommation de poissons tropicaux importés, soit lors d'un séjour à l'étranger (Geller et al, 1991 ; Moulignier et al, 1995 ; Crump et al, 1999 ; de Haro et al, 2003 ; Wong et al, 2005).

La ciguatera, tout comme les autres formes d'ichtyosarcotoxisme, a un retentissement socio-économique important dans les collectivités où les produits marins représentent la principale source de revenus. En Europe, quelques 15 milliards d'euros de produits pisciaires sont consommés chaque année et le taux de consommation de poissons et de coquillages est tout aussi significatif aux Etats-Unis avec 7,4 kg de fruits de mer consommés par habitant en 2003 (Whittle and Gallacher, 2000 ; National Oceanic and Atmospheric Administration, 2004). Les pertes économiques dues aux restrictions à la vente et aux coûts sanitaires peuvent alors devenir conséquents. Pour la période de 1987 à 1992, l'impact des intoxications alimentaires dues aux produits de la mer a été estimé entre 18 à 25 millions de dollars US (Anderson et al, 2000). Concernant la ciguatera, les coûts de santé publique ont été évalués à plus de 20 millions de dollars US par an aux Etats-Unis et dans les îles voisines (Anderson et al, 2000 ; Lehane and Lewis, 2000). De plus, la ciguatera impose des interdictions de pêche et

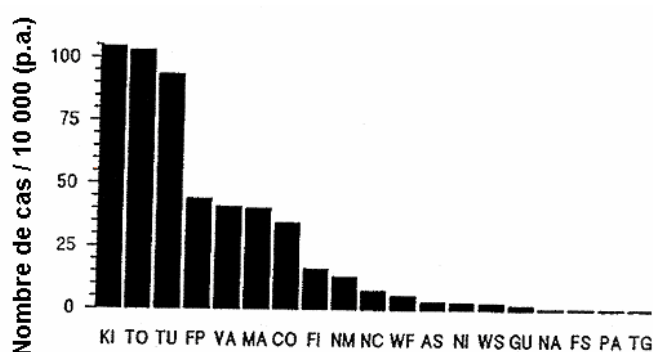
d'importation de poissons susceptibles d'être contaminés. Aux Antilles Françaises, un arrêté préfectoral régleme la pêche des poissons dans les eaux de la Guadeloupe (N° 2002-1249 du 19 août 2002 ; Pottier et Vernoux, 2003) et dans l'Océan Indien, les autorités de régulation de la Réunion et de l'île Maurice ont imposé des restrictions de vente interdisant l'importation et/ou la vente de certaines espèces de poissons potentiellement ciguatérigènes (Quod et Turquet, 1996).

Au-delà de son incidence socio-économique, la ciguatera a un impact sanitaire non négligeable dans les pays tropicaux où l'alimentation de base repose sur la consommation des poissons et des produits de la mer. La crainte d'une intoxication ciguatérique incite les populations insulaires à remplacer leur nourriture initiale par des produits d'importations tels que les boîtes de conserve plus riches en sel et en matières grasses. Cette transition alimentaire accroît alors les risques d'apparition de diabète, d'hypertension artérielle et de maladies cardio-vasculaires dans des régions déjà particulièrement touchées par ces fléaux (Lewis et Ruff, 1993 ; Chinain et al, 2009 ; Solomona et al, 2009). D'après certains spécialistes de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les pays insulaires tels que Tokelau et les Samoa Américaines battent les records avec 93,5 % de la population arborant des signes de surpoids et d'obésité (Tahiti Presse, 2009 ; Les Nouvelles de Tahiti, 2009). Viennent ensuite Nauru (93 %), Kiribati (81,5 %), les Iles Marshall (80,1 %), les Etats Fédérés de la Micronésie (73,1 %) la Polynésie Française (62 %) ou encore Fidji (62,9 %). Or ces territoires font partie des îles considérées à risque avec les plus forts taux d'incidence dans le Pacifique Sud.

Le nombre de personnes intoxiquées par la ciguatera est variable d'après les diverses études réalisées mais on estime aujourd'hui que cette pathologie affecte entre 10 000 à 50 000 personnes dans le monde chaque année (Anderson et Lobel, 1987 ; Van Dolah, 2000 ; Lewis, 2001a ; Fenner et Lewis, 2001). Dans les pays du Pacifique Sud, le plus haut taux d'incidence



moyenne, qui est approximativement de 100 cas pour 10 000 habitants par année, est signalé dans plusieurs îles comme Kiribati, Tokelau et Tuvalu (Figure I.1.1.3.a). Il est cependant à noter que ces chiffres peuvent être bien en-dessous de la réalité : en Australie, seuls 20 % des cas seraient reportés et moins de 10 % seraient inventoriés aux Samoa Occidentales (Lewis et Ruff, 1993). Cette sous-estimation s'explique par le fait que les personnes intoxiquées ne consultent pas systématiquement les médecins et par la prescription de traitements occidentaux peu efficaces à soigner cette intoxication.



**Figure I.1.1.3.a : Incidence de la ciguatera dans les îles du Pacifique Sud**

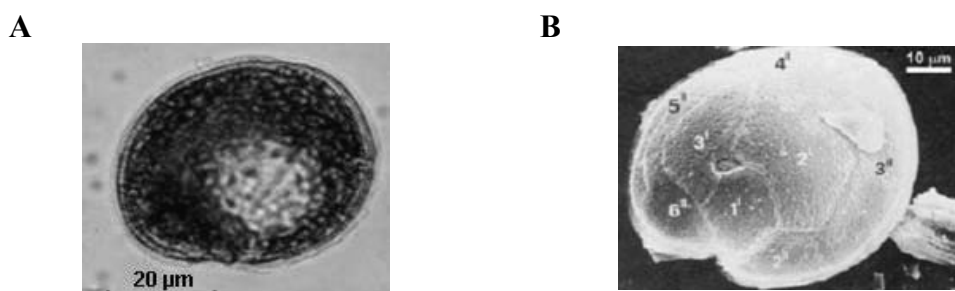
*Le nombre de cas pour 10 000 habitants est indiqué pour Kiribati (KI), Tokelau (TO), Tuvalu (TU), la Polynésie Française (FP), le Vanuatu (VA), les Iles Marshall (MA), les Iles Cook (CO), Fidji (FI), les Mariannes du Nord (NM), la Nouvelle-Calédonie (NC), Wallis et Futuna (WF), les Samoa Américaines (AS), Niue (NI), les Samoa Occidentales (WS), Guam (GU), Nauru (NA), les Etats Fédérés de la Micronésie (FS), Palau (PA), Tonga (TO). Les données sont obtenues par année (p.a.) sur la période 1985-1990. (D'après Lewis et Ruff, 1993).*

### *I.1.2. Toxicogénèse de la ciguatera*

#### *I.1.2.1. Eco-toxicologie*

L'évolution du nombre de cas d'intoxications ciguatériques est logiquement associée à l'extension des régions favorables à l'apparition du phénomène écologique. Or nous avons précédemment vu que la dispersion de ces zones dépend en partie de l'introduction et du

développement de la micro-algue de genre *Gambierdiscus* (Figure I.1.2.1.a). La première espèce, *G. toxicus*, a été découverte en 1979 dans les Iles Gambier en Polynésie Française (Adachi et Fukuyo, 1979) et neuf autres espèces ont depuis lors été répertoriées portant à dix, le nombre total de *Gambierdiscus* recensées à ce jour : *G. toxicus*, *G. belizeanus*, *G. yasumotoi*, *G. polynesiensis*, *G. australes*, *G. pacificus*, *G. carpenteri*, *G. carolinianus*, *G. caribaeus*, *G. ruetzleri* (Faust, 1995 ; Holmes, 1998 ; Chinain et al, 1999b ; Litaker et al., 2009). Considérés comme les maillons initiaux de la chaîne trophique ciguatérique (Bagnis et al, 1980), ces micro-organismes unicellulaires benthiques colonisent préférentiellement les coraux morts de façon naturelle ou anthropique (Bagnis, 1979a ; Gillespie et al, 1986) et certains produisent alors les toxines responsables de l'intoxication, les ciguatoxines (CTXs).



**Figure I.1.2.1.a : Observations d'une cellule de *Gambierdiscus toxicus***

*La micro-algue Gambierdiscus est l'agent primaire responsable de la production de toxines ciguatérigènes, les CTXs. Ici, est présentée l'espèce G. toxicus observée au microscope photonique (A ; photo de Yasukawa Fukuyo) et au microscope à balayage (B ; photo de Richard J. Lewis), les plaques thécales étant numérotées selon Adachi et Fukuyo (1979).*

L'étiologie du phénomène ciguatérique reste cependant non complètement élucidée de par la possible implication d'autres micro-organismes marins notamment les cyanobactéries du genre *Trichodesmium* ou *Hydrocoleum* sp. (Endean et al, 1993 ; Laurent et al, 2008 ; Golubic et al, 2009). Concernant le transfert des CTXs, John E. Randall (1958) émit initialement la possibilité que les toxines ciguatérigènes entraient dans la chaîne trophique par

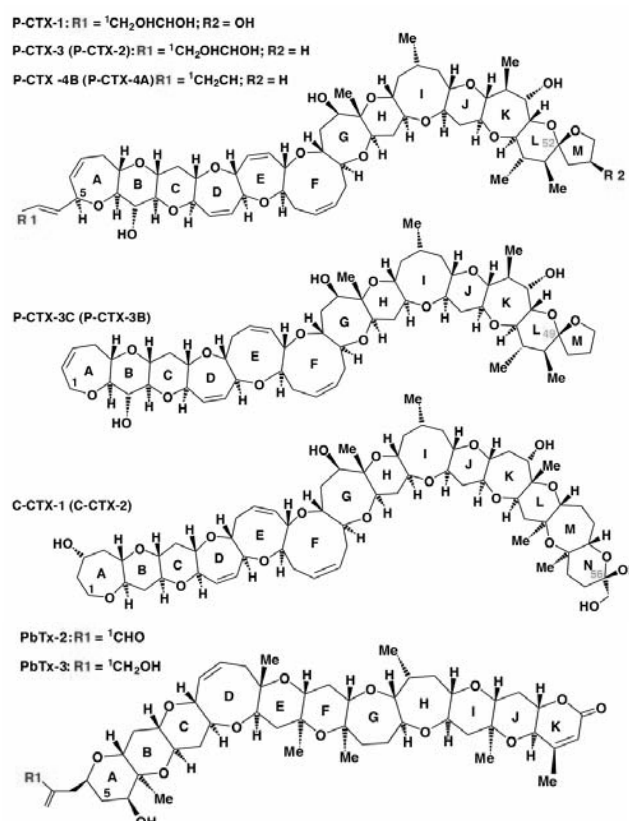
le biais de poissons herbivores comme les poissons perroquets (Scaridae) et s'accumulaient par la suite dans les poissons ichtyophages plus toxiques tels que les barracudas (Sphyraenidae) et les loches (Serranidae). Cette hypothèse a ensuite été confirmée avec l'établissement de la chaîne de transfert classique de la ciguatéra dans laquelle les toxines produites par les micro-algues sont ingérées dans un premier temps par les poissons herbivores brouteurs et détritivores avant d'être ensuite transférées *via* les espèces ichtyophages aux niveaux trophiques supérieurs jusqu'à l'homme qui s'intoxique alors par la pêche et la consommation des chairs pisciaires contaminées (Annexe II).

En règle générale, toutes les espèces de poissons peuvent potentiellement être vecteurs des CTXs dès lors que les individus ingèrent les CTXs : une expérience de Helfrich et Banner (1963) a en effet démontré qu'un poisson sain nourri avec de la chair de poisson ciguatérigène devient à son tour toxique. Cependant, la majorité des intoxications est attribuée à des espèces tropicales en fin de chaîne notamment les grands poissons des récifs coralliens (Randall, 1958 ; Legrand et Bagnis, 1991 ; Glaziou et Legrand, 1994) comme les barracudas (Sphyraenidae) et les loches (Serranidae) ainsi que les murènes (Muraenidae). C'est d'ailleurs à partir de ces dernières que les premiers isolements et déterminations structurales des CTXs ont été effectués (Murata et al, 1990 ; Lewis et al, 1991).

#### I.1.2.2. Toxines ciguatériques

Etant donnée leur grande stabilité chimique (Banner et al, 1963), les CTXs sont bio-accumulées lors de leur transfert dans la chaîne trophique et ce processus s'accompagne parallèlement de leur bio-transformation par le métabolisme oxydatif dans le foie de poissons entraînant une augmentation de leur potentiel toxique (Lewis et Holmes, 1993). Ces modifications structurales conduisent alors à l'élaboration d'une multitude de toxines ciguatérigènes distinguées en trois familles identifiées principalement selon leur origine géographique : les I-CTXs pour *Indian Ocean Ciguatoxins* présentes dans l'Océan Indien, les

P-CTXs pour *Pacific Ciguatoxins* observées dans l'Océan Pacifique et les C-CTXs pour *Caribbean Ciguatoxins* retrouvées dans la zone des Caraïbes.



**Figure I.1.2.2.a : Structure chimique de diverses ciguatoxines et brevéttoxines**

La figure présente la structure chimique de ciguatoxines de l'Océan Pacifique (P-CTX-) et de la région Caraïbe (C-CTX-) notamment la P-CTX-1, P-CTX-3, P-CTX-4B (anciennement la GTX-4B), la P-CTX-3C, et la C-CTX-1. Entre parenthèses sont indiqués les épimères conformationnels : la P-CTX-2 (52-*epi* P-CTX-3; cycle L), la P-CTX-4A (52-*epi* GT-4B; cycle L), la P-CTX-3B (49-*epi* P-CTX-3C; cycle L), et la C-CTX-2 (56-*epi* C-CTX-1; cycle N). Les structures des brevéttoxines PbTx-2 et PbTx-3 sont également reproduites (D'après Nicholson et Lewis, 2006).

L'étude chimique de ces biotoxines marines a débuté à la fin des « années 60 » avec les premières purifications de CTXs par l'équipe de Scheuer (1967). Cependant l'analyse et l'élucidation structurale de ces composés n'ont réellement porté leurs fruits qu'en 1990 grâce

à la collaboration établie entre une équipe de chimistes japonais (Tohoku University) et un laboratoire de recherche de Polynésie Française (Institut Louis Malardé). L'utilisation de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) a permis les premières identifications partielles de deux CTXs, la P-CTX-1B et la P-CTX-4B, respectivement à partir de viscères de murène et de cellules de *G. toxicus* sauvage (Murata et al, 1990). La résolution complète des structures chimiques est devenue possible par la suite avec l'utilisation de la spectrométrie de masse (MS pour *Mass Spectrometry*) puis le couplage de la MS à la technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC pour *High Performance Liquid Chromatography*) soit la HPLC/MS (Lewis et Jones, 1997) et pas moins de 39 CTXs sont aujourd'hui répertoriées (Lewis et al, 1991 ; Poli et al, 1997 ; Vernoux et Pottier, 1997 ; Satake et al, 1998 ; Hamilton et al, 2002 ; Pottier et al, 2003a ; Boydron-Le Garrec, 2005). L'élucidation structurale des CTXs montre que ces toxines sont des polyéthers polycycliques d'environ 1000 à 1150 Da (Nicholson et Lewis, 2006) avec des différences structurales observées dans les groupements greffés sur les cycles ainsi qu'au niveau de la structure même des squelettes (Figure I.1.2.2.a).

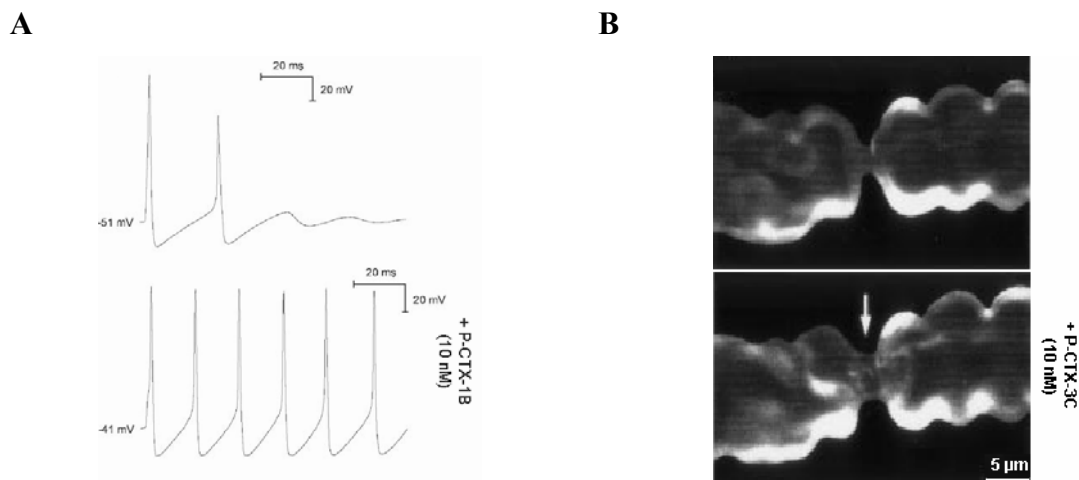
La complexité de ces molécules rend leur synthèse difficile et explique qu'elles ne soient pas commercialisées à l'heure actuelle. Pour pallier ce problème, la grande majorité des équipes entreprenant des recherches sur les CTXs fait appel à l'utilisation des brévétotoxines (PbTx) qui sont d'autres biotoxines marines synthétisées par le dinoflagellé *Karenia brevis* anciennement appelé *Gymnodinium breve* ou *Ptychodiscus brevis* (Shimizu et al, 1986). Ces molécules présentent en effet une structure polyéther polycyclique semblable à celle des CTXs (Figure I.1.2.2.a) et possèdent, de plus, la même cible pharmacologique (Poli et al, 1986 ; Lombet et al, 1987). Si les CTXs sont les composés avérés comme responsables de la ciguatéra, d'autres biotoxines marines peuvent aussi être impliquées dans cette intoxication. Parmi elles, la maïtotoxine (MTX) est un composé complexe de 32 cycles éthers plus volumineux que les CTXs (~ 3400 Da) et également synthétisé par *Gambierdiscus* d'où sa

possible implication dans l'étiologie de la ciguatéra (Yasumoto et al, 1987). Cette toxine possède une des plus importantes toxicités avec une  $DL_{50}$  de 0,13 ng / Kg de souris en i.p. (Yokohama et al, 1988 ; Yasumoto, 2005). Cependant, le mode d'action de la MTX diffère de celle des CTXs : alors que la première a montré une action sur la concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire (Yasumoto, 2001), les CTXs exercent quant à elles une action directe sur le canal sodique sensible au potentiel (Bidart et al, 1984).

#### I.1.2.3. Action sur les courants ioniques

Le canal sodique sensible au potentiel (CSSP) est une glycoprotéine transmembranaire formant un pore perméable aux ions sodium ( $Na^+$ ) qui participent à la propagation du potentiel d'action (PA). Les CTXs activent le CSSP *via* leur fixation directe sur le site 5 du récepteur, situé au niveau des segments S6 du domaine DI et S5 du domaine DIV du canal (Cestèle et Catterall, 2000 ; voir détails Annexe III). Les premières études neurophysiologiques menées sur les CTXs ont été réalisées *in vitro* en mesurant le potentiel membranaire de cellules de neuroblastomes murins N1E 115 grâce à la méthode de succion par pipette ou *patch-clamp* (Bidart et al, 1984). L'addition de CTX purifiée à partir de viscères de murène (*Gymnothorax javanicus*) à la concentration de 10 ng / ml dans le milieu de culture a conduit à l'apparition d'une dépolarisation immédiate et persistante de la membrane cellulaire déclenchant des PA répétées et / ou spontanées (Figure I.1.2.3.a.A). Ce phénomène dépendant des CTXs est réversible après ajout de 1  $\mu$ M de tétrodotoxine (TTX), une toxine marine qui est associée au tétrodotoxisme et connue pour inhiber le CSSP en se liant au site 1. Ces effets électrophysiologiques ont été confirmés par la suite sur des neurones de ganglion de la racine dorsale (DRG) de rat (Strachan et al, 1999; Birinyi-Strachan et al, 2005a). Des expériences similaires ont été effectuées sur des fibres myélinisées de nerfs sciatiques de grenouille (*Rana esculenta*) et les résultats ont montré que la P-CTX-1B, la P-CTX-4B, tout comme des échantillons de CTXs purifiés induisent pareillement des PA à une

fréquence d'environ 100 Hz (Benoit et al, 1986 ; Benoit et Legrand, 1994 ; Birinyi-Strachan et al, 2005). Cet effet des CTXs est supprimé par l'augmentation de la concentration du calcium externe ou par l'ajout de lidocaine, qui induit à la fois un blocage des canaux sodiques et une réduction de la libération du calcium des réservoirs intracellulaires par inhibition de la phospholipase C dans le milieu, laissant alors penser que les canaux calciques peuvent être également impliqués dans le mode d'action des CTXs.



**Figure I.1.2.3.a : Observation des effets neurophysiologiques des ciguatoxines**

*La fixation des CTXs sur le CSSP entraîne l'ouverture prolongée du récepteur qui provoque plusieurs effets visibles en électrophysiologie : l'apparition de potentiels d'actions spontanés et répétitifs est observée après ajout de 10 nM de P-CTX-1B sur des neurones de DRG de rat (A ; d'après Birinyi-Strachan et al, 2005) ; la perturbation osmotique consécutive entraîne le gonflement du Nœud de Ranvier de fibres nerveuses myélinisées de grenouille en présence de 10 nM de P-CTX-3C (B ; extrait de Mattei et al, 1999).*

L'équipe de Jordi Molgó (1994) a par la suite adapté la technique de microscopie confocale à balayage laser afin d'évaluer l'impact des CTXs sur le volume de cellules nerveuses. Cette technique combinée à l'utilisation de sondes fluorescentes consiste en la reconstitution d'une image tridimensionnelle à partir des structures marquées par la fluorescence. L'action de diverses CTXs (P-CTX-1B, P-CTX-4B, P-CTX-3C et C-CTX-1) a

ainsi pu être mise en évidence sur l'augmentation de la surface des terminaisons de nerfs moteurs et des cellules de Schwann de la jonction neuromusculaire de grenouille ainsi que l'observation du gonflement du Nœud de Ranvier (Figure I.1.2.3.a.B) provenant du même organisme (Benoit et al, 1996 ; Mattei et al, 1997 ; Mattei et al, 1999a; b). L'action directe des CTXs sur le CSSP modifie le courant  $\text{Na}^+$  induisant alors des PA spontanés et / ou répétés comme précédemment cités. Mais cela entraîne également une augmentation de la concentration intracellulaire de  $\text{Na}^+$  ainsi que de  $\text{Ca}^{2+}$ , causant par là-même le gonflement des cellules. Différents travaux ont récemment montré que la P-CTX-1 agissait aussi sur les canaux potassium  $\text{K}^+$  dépendant du voltage (Birinyi-Strachan et al, 2005) conduisant au blocage macroscopique de ces récepteurs dans des myotubes de rats (Hidalgo et al, 2002). L'impact des CTXs au niveau de la régulation de l'équilibre ionique des cellules neuronales peut alors expliquer les altérations neurologiques observées chez la plupart des patients souffrant de ciguatera notamment les troubles sensitifs caractéristiques de la maladie (Allsop et al, 1986 ; Cameron et al, 1991 ; Benoit et al, 2005).

### *1.1.3. Tableau clinique de la ciguatera*

#### *1.1.3.1. Symptômes classiques*

D'après une étude conséquente menée à la fin des « années 80 » sur les observations cliniques de 3009 personnes touchées par la ciguatera dans le Pacifique Sud, la mortalité de la maladie ne dépasse pas les 0,1 % (Bagnis et al, 1979). Cependant, cette intoxication constitue un syndrome polymorphe complexe caractérisé par une cohorte d'environ 30 symptômes (Gillespie et al, 1986) - dont les plus communs sont répertoriés dans le tableau I.1.3.1.I - classiquement répartis en 4 groupes : gastro-intestinaux, neurosensoriels, cardio-vasculaires et d'ordre général (Bagnis, 1968 ; Glaziou et Legrand, 1994). Les premières manifestations surviennent dans les quelques heures qui suivent l'ingestion du repas contaminé, avec l'apparition de troubles digestifs notamment de crampes et de douleurs abdominales, de



nausées, de vomissements et de diarrhées qui peuvent résulter en une déshydratation des personnes touchées et plus particulièrement des enfants (Gollop et Pon, 1992 ; Ruff et Lewis, 1994). Les manifestations neurosensorielles surviennent parallèlement avec des paresthésies et des dysesthésies superficielles telles que l'inversion de sensation du chaud et du froid, caractéristique de la maladie, du prurit, ainsi que de l'ataxie, des vertiges et des convulsions (Randall, 1958 ; Gollop et Pon, 1992). Les symptômes cardio-vasculaires et respiratoires apparaissent le plus souvent dans les formes d'intoxications graves avec une bradycardie, une hypotension artérielle, de la tachycardie et une arythmie visualisées par un électrocardiogramme perturbé (Bagnis, 1968 ; Glaziou et Legrand, 1994 ; Ruff et Lewis, 1994). La survenue de détresse respiratoire est une des principales causes des cas de décès nécessitant souvent une hospitalisation et une prise en charge des patients (Randall, 1958 ; Habermhel et al, 1994). Un état de fatigue généralisé est également observé, accompagné d'atteintes musculaires et articulaires ainsi qu'une asthénie importante et persistante (Miyahara et al, 1979 ; Laurent, 1993). Les diarrhées sévères, la salivation, la paralysie et la dyspnée sont parmi les signes également reportés lors des tests aigües *in vivo* sur souris injectées avec de la CTX en i.p. (Lehane et Lewis, 2000 ; Pottier et Vernoux 2003).

La complexité de la ciguatéra réside également dans le fait qu'une variabilité du tableau clinique est observée selon la zone de pêche du poisson incriminé : par exemple, l'ingestion de poissons ciguatérigènes de l'Océan Pacifique et de l'Océan Indien tend à conduire à une pathologie présentant une plus grande fréquence de symptômes neurologiques que de troubles digestifs alors que l'inverse semble être plus souvent observé dans les Caraïbes (Bagnis e al, 1979 ; Narayan, 1980 ; Gillespie et al, 1986 ; Pottier et al, 2001). Un syndrome supplémentaire caractérisé par un état d'incoordination, de dépressions et d'hallucinations associé à des cauchemars, a également été décrit suite à la consommation de poissons de l'Océan Indien (Quod et Turquet, 1996). La distinction entre poissons herbivores et

carnivores semble de même être importante, ces derniers étant le plus souvent incriminés dans des cas d'intoxications ciguatériques sévères (Glaziou et Martin, 1993). A l'inverse, une étude du sexe ratio réalisée en 1979 tendant à exposer une différence entre les signes cliniques observés (Bagnis et al, 1979) semblent être réfutée par d'autres observations épidémiologiques montrant qu'il n'y a pas de corrélation entre le sexe et la gravité de la maladie (Glaziou et Legrand, 1994 ; Château-Degat et al, 2007a).

**Tableau I.1.3.I : Comparaison des signes cliniques de trois régions du Pacifique Sud**

<i>Symptômes</i>	<i>Pourcentage de patients atteints</i>	
	Fidji <sup>a</sup>	Nouvelle-Calédonie Polynésie Française <sup>b</sup>
<b>- Neurologiques et généraux :</b>		
Paresthésie	52	89
Dysesthésie (inversion de température)	55	86
Arthralgie	69	86
Myalgie	-	82
Maux de tête	-	59
Fatigue	-	60
Vertiges	38	42
Prurit	35	45
Démangeaison	2	21
Salivation	10	19
<b>- Gastro-intestinaux :</b>		
Diarrhée	51	71
Nausée	-	43
Douleur abdominale	59	47
Vomissement	30	38
<b>- Cardio-vasculaires et respiratoires :</b>		
Difficulté à respirer	9	16
Hypotension	1	12

<sup>a</sup> données de Narayan, 1980 ; <sup>b</sup> données de Bagnis et al, 1980.

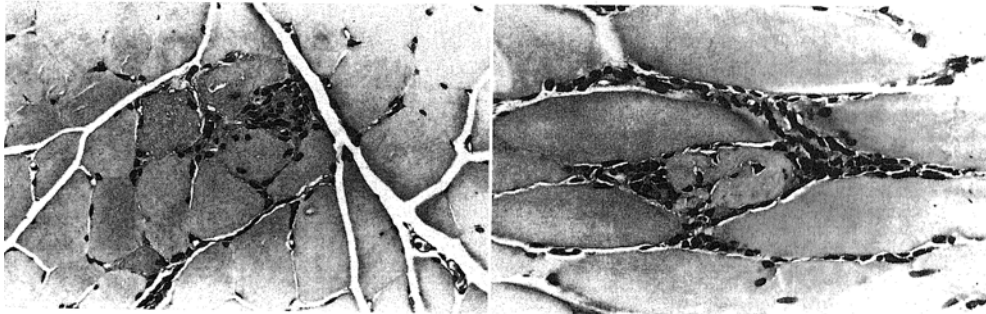
#### I.1.3.2. Association de syndromes particuliers

Si l'évolution de la pathologie est en général rapidement favorable avec l'amendement des signes digestifs et cardio-vasculaires en quelques jours, il n'est pas rare cependant que les paresthésies et le prurit perdurent pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois (Randall, 1958 ; Gillespie et al, 1986 ; Chateau-Degat et al, 2007a). Deux études statistiques réalisées

en 2004 par une équipe canadienne en Polynésie Française ont mis l'accent sur la persistance de la ciguatéra, montrant notamment que plus de 50 % des personnes atteintes par cette intoxication présentaient encore des troubles de la perception neurosensorielle 60 jours après déclaration de la maladie (Chateau-Degat et al, 2007a ; Chateau-Degat et al, 2007b). L'état de fatigue généralisée, l'arthralgie, la myasthénie et les maux de tête sont des symptômes tout aussi lents à disparaître (Gillespie et al, 1986) parallèlement à l'apparition possible de signes neuropsychologiques avec notamment une anxiété renforcée (Arena et al, 2004 ; Friedman et al, 2007), constituant alors une association de troubles généraux qui rappellent le Syndrome de Fatigue Chronique (SFC). Le SFC, dont l'étiologie est encore mal connue, est en effet caractérisé par une fatigue prolongée accentuée par l'exercice physique, et John Pearn (*Australian Defense Force*, Canberra, Australie) fut parmi les premiers à émettre l'hypothèse que cette forme de pathologie chronique puisse être associée à l'intoxication de type ciguatérique (Pearn, 1979 ; 2001).

Il faut savoir par ailleurs qu'une première intoxication ciguatérique ne confère pas l'immunité mais au contraire, un phénomène de sensibilisation ou d'accroissement de la susceptibilité à développer des symptômes plus intenses a été décrit suite à une deuxième atteinte ciguatérique (Glaziou et Martin, 1993). Il a également été noté que les manifestations d'ordres neurologiques s'exprimaient majoritairement lors des récurrences d'empoisonnements ayant lieu dans le Pacifique (Bagnis et al, 1979). Les individus ayant déjà été touchés par la ciguatéra présentent parfois une résurgence des signes cliniques consécutivement à la consommation de poissons considérés comme sains car n'entraînant pas d'intoxication chez d'autres personnes (Randall, 1958 ; Gillespie et al, 1986) ou par d'autres nourritures n'entrant pas dans les aliments déclenchant classiquement la ciguatéra. En effet, de petites quantités de fruits de mer peuvent suffire à causer des manifestations de type allergique chez des personnes sensibilisées (Bagnis, 1968). Il est également recommandé à ces patients de ne pas

consommer de noix, d'huiles de noix ou d'alcool pouvant de même entraîner une réapparition du phénomène (Gollop et Pon, 1992). L'ingestion de poulet peut parfois être impliquée dans la résurgence des symptômes de la ciguatera (Gillespie et al, 1986) et la consommation de substances nicotiques semblent tout autant participer à la persistance de la maladie (Chateau-Degat et al, 2007a).



**Figure I.1.3.2.a : Observation de coupes transversales de muscle squelettique d'un patient présentant une polymyosite consécutive à une intoxication ciguatérique**

*Les fibres musculaires nécrosées présentent des infiltrations de cellules inflammatoires mononuclées dont des lymphocytes, retrouvés autour des fibres musculaires et dans les tissus péri-vasculaires des vaisseaux sanguins (coloration à l'hématoxyline et à l'éosine ; grossissement X 150). D'après Stommel et al, 1991.*

Certains symptômes atypiques ont aussi été répertoriés chez des personnes intoxiquées par la ciguatera notamment des cas de myopathies et plus précisément des polymyosites (Stommel et al, 1991 ; 1993 ; Chan et Kwok, 2001). Il semblerait qu'il y ait alors un rapprochement entre cette forme d'empoisonnement et l'apparition de ces myopathies (Figure I.1.3.2.a). Deux cas de syndrome de Guillain-Barré (GBS) ont aussi été suspectés suite à une intoxication ciguatérique chez des personnes présentant des troubles d'alcoolisme sévère ou d'hypertension artérielle (Gatti et al, 2008). Cette forme d'atteinte neuropathique inflammatoire avait auparavant été associée à la ciguatera lors d'une étude rétrospective de 56 cas d'empoisonnements ciguatériques (Angibaud et Rambaud, 1998).

## **I.2. Les mécanismes inflammatoires dans la ciguatera**

### *I.2.1. Médiateurs de l'inflammation*

#### **I.2.1.1. Le monde des cytokines**

L'origine des symptômes particuliers et persistants pouvant apparaître chez certaines personnes atteintes par la ciguatera reste inexpliquée mais plusieurs travaux tendent à montrer que ces phénomènes semblent être reliés à des anomalies immunologiques par le biais de la régulation des médiateurs de l'inflammation tels que les cytokines (concept développé dans le paragraphe I.2.2.1). Afin de mieux appréhender la compréhension de ces phénomènes, le mode d'action de certaines cytokines essentielles dans l'inflammation est présenté dans l'Annexe IV et une brève introduction concernant le monde complexe des cytokines est proposée ci-après.

Les cytokines forment une classe de molécules protéiques solubles de structure variable, glycosylées ou non et de taille allant de 8 à 40 kDa (Dinarello, 2000). Depuis la découverte de l'interféron, première cytokine décrite en 1957 par Isaacs et Lindenmann, la connaissance de ces molécules n'a cessé d'évoluer avec plus de 200 cytokines humaines identifiées au début du XXI<sup>ème</sup> siècle (Balkwill, 2002). Initialement appelées « lymphokines », ces composés ne furent cependant désignées sous le terme de « cytokines », du grecque *cyto-* pour cellule, et – *kinos* pour mouvement, que plus tardivement en 1974 (Cavaillon, 1995). La caractérisation de ces médiateurs résulte essentiellement de la recherche en immunologie, mais il apparaît aujourd'hui que les cytokines constituent un vaste réseau, riche de complexités et de diversité, participant à la communication entre les différentes cellules de l'organisme. En effet, si la réponse inflammatoire est le fruit de l'interaction entre les diverses formes de lymphocytes T et B et les cellules présentatrices de l'antigène tels que les macrophages, elle ne peut être

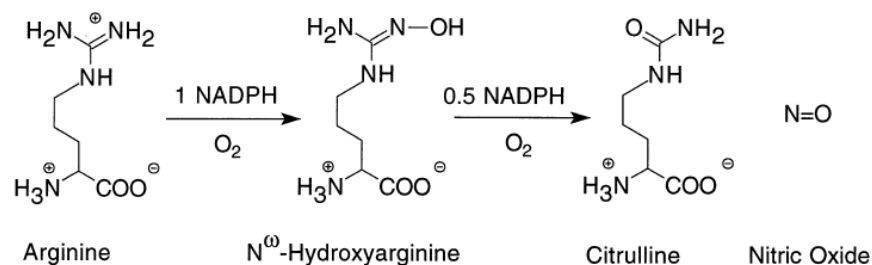
assurée sans la participation des facteurs solubles que sont les cytokines. Mais ces molécules sont également impliquées dans d'autres mécanismes biologiques tels que la prolifération cellulaire, la production d'anticorps, la différenciation de cellules cytotoxiques, l'augmentation de l'activité microbicide, et la régulation de l'hématopoïèse caractérisant par là même leurs fonctions pléiotropiques (Cavaillon, 1995 ; Baggiolini et al, 1995 ; Dinarello, 2000 ; Baud et Karin ; 2001 ; Billiau et Matthys, 2009). Ces composés agissent également selon plusieurs modes de signalisation : soit paracrine, autocrine, endocrine, ou encore juxtacrine et peuvent réguler l'activité de plusieurs cellules cibles à la fois, ce qui les distingue des hormones (Cannon, 2000 ; Revillard, 2001).

Outre les interférons (IFN), d'autres cytokines composent cette famille de molécules dont les facteurs hématopoïétiques (CSF pour *Colony Stimulating Factor*), les interleukines (IL), les facteurs chimiotactiques ou chémokines, les facteurs nécrosant des tumeurs ou *Tumor Necrosis Factors* (TNF) et certains facteurs de croissance tels que les facteurs transformant ou *Transforming Growth Factor* (TGF). Parmi ces nombreuses molécules, l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  jouent des rôles primordiaux dans la mise en place des processus inflammatoires, étant capables d'induire la production de facteurs pro-inflammatoires essentiels (Weinberg et al, 1995 ; Dinarello, 2000 ; Bodgan, 2001) comme les prostaglandines, les leucotriènes, les facteurs activant les plaquettes ou *Platelet Activating Factor* (PAF) et les radicaux libres comme l'anion superoxyde ou l'oxyde nitrique (NO). Par ailleurs, l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  sont des molécules connues pour être impliquées dans les phénomènes de régulation thermique endogène contrôlés par le système nerveux central conduisant au déclenchement de la fièvre (Dinarello et al, 1986 ; Dinarello, 1988 ; Malinowsky et al, 1995 ; Chai et al, 1996). Ces cytokines pyrogènes sont alors qualifiées de pro-inflammatoires par opposition aux cytokines anti-inflammatoires – comme l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 – qui contrecarrent l'action des premières en diminuant leur production ou en

inhibant la synthèse des facteurs de l'inflammation comme le PGE2 ou le NO (Hart et al, 1989 ; te Velde et al, 1990 ; de Waal Malefyt et al, 1991 ; Bodgan et al, 1994 ; Opal et DePalo, 2000). Il est intéressant de souligner que les médiateurs pro-inflammatoires peuvent être en retour également modulés par les métabolites inflammatoires comme le NO (Kunkel et al, 1988 ; Kim et al, 1998).

#### I.2.1.2. La voie de l'oxyde nitrique

L'oxyde nitrique  $\text{N}=\text{O}\cdot$  (NO), radical libre contenant un électron délocalisé, constitue une importante molécule de signalisation chez les mammifères et intervient dans différents mécanismes essentiels aux fonctions physiologiques. Présent sous forme gazeuse, ce métabolite secondaire est synthétisé à partir d'un acide aminé, la L-arginine (L-Arg), qui est d'abord hydroxylée en N-hydroxy-L-arginine puis oxydée en L-citrulline conduisant à la libération du NO (Figure I.2.1.2.a).

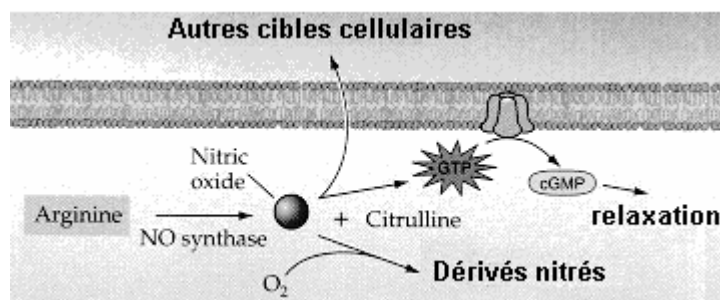


**Figure I.2.1.2.a : Biosynthèse de l'oxyde nitrique NO par la NO Synthase (NOS)**

*Mécanisme de biosynthèse du NO à partir de la L-arginine et du cofacteur Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH). D'après Stuehr, 1999.*

Les NO Synthases (NOS) sont les enzymes responsables de cette biosynthèse et nécessitent la présence de  $\text{O}_2$  et de divers cofacteurs : le NADPH, le FAD, le FMN et la tétrahydrobioptérine  $\text{BH}_4$  (Stuehr, 1999). Trois formes d'enzymes NOS ont été découvertes, les deux premières formant le groupe des NOS constitutives (cNOS) et regroupant la forme neuronale (nNOS) et endothéliale (eNOS). A l'état basal, les cNOS produisent du NO en

faible quantité mais en synthétisent d'avantage après stimulation des cellules neuronales ou endothéliales en utilisant le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline comme sous-unité (Alderton et al, 2001). La troisième NOS, dite « inductible » (iNOS) est, quant à elle, présente dans une grande variété de types cellulaires notamment les cellules inflammatoires (macrophages et neutrophiles), les cellules endothéliales vasculaires, les cellules musculaires lisses ainsi que les hépatocytes humains (Geller et al, 1993). La calmoduline est également recrutée par l'iNOS mais celle-ci reste indépendante de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Les NOS sont des enzymes pouvant être inhibées par des analogues de la L-Arg tels que le NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) ou le NG-methyl-L-arginine (L-NMA) (Alderton et al, 2001).



**Figure I.2.1.2.a : Cibles moléculaires du NO**

*L'oxyde nitrique NO produit par la NO synthase (NOS) à partir de l'arginine diffuse vers ses cibles moléculaires. Il active la guanylate cyclase qui synthétise le GMP cyclique (cGMP) par hydrolyse de GTP et l'accumulation de cGMP conduit alors à la relaxation des cellules musculaires lisses. Le NO réagit également avec l'oxygène  $\text{O}_2$  pour donner des dérivés nitrés tels que le nitrite  $\text{NO}_2^-$  ou le nitrate  $\text{NO}_3^-$ . D'après Purves et al, 2001.*

Cette molécule est considérée comme un vasodilatateur endogène qui permet le maintien du tonus vasculaire basal de l'organisme et l'inhibition des NOS par le L-NAME entraîne une vasoconstriction importante. Les eNOS des cellules endothéliales vasculaires produisent en effet le NO constitutif qui diffuse dans les cellules musculaires lisses et qui active par la même occasion l'enzyme guanylate cyclase membranaire et cytoplasmique

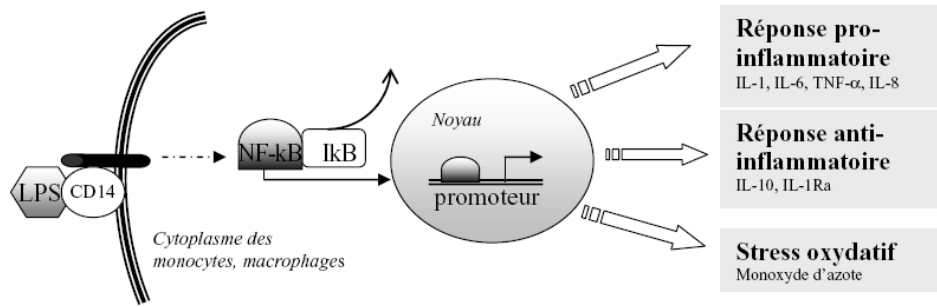


(sGC) produisant du cGMP à partir de GTP (Figure I.2.1.2.a). L'accumulation de cGMP dans les cellules musculaires lisses conduit alors à leur relaxation et à la vasodilatation (Conner et Grisham, 1995).

Parallèlement à ses cibles cellulaires, le NO réagit spontanément avec l'oxygène pour donner des dérivés nitrés comme le nitrite  $\text{NO}_2^-$ , composé plus stable pouvant être directement dosé (Miranda et al, 2001). L'activation des macrophages par les toxines bactériennes comme le LPS ou par des cytokines comme l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  ou encore l'IL-1 conduit à l'induction de l'iNOS et à l'augmentation de la production de NO qui va diffuser vers les cellules cibles (Geller et al, 1993). Le NO se combine alors aux noyaux fer/soufre des enzymes clé du cycle respiratoire ou de la réplication entraînant la mort cellulaire (Moncada et Higgs, 1993). Le NO réagit également avec l'anion superoxide conduisant à la formation d'anion peroxynitrite hautement cytotoxique. Il est, par la même, impliqué dans certaines formes d'inflammations chroniques et l'utilisation d'inhibiteurs de NOS est reconnu pour diminuer le degré d'inflammation de ces pathologies (Guzik et al, 2003).

#### I.2.1.3. Les endotoxines, inducteur de l'inflammation

En plus des divers facteurs pouvant induire la production de NO ainsi que celle des cytokines, un nombre croissant d'études indiquent que les endotoxines ou lipopolysaccharides (LPS) jouent également un rôle central dans l'induction des médiateurs de l'inflammation notamment au cours de l'apparition de plusieurs pathologies. (Figure I.2.1.3.a)



**Figure I.2.1.3.a : Induction des médiateurs de l'inflammation par le LPS**

*La fixation du LPS sur son récepteur CD14 situé sur les membranes des monocytes et des macrophages conduit à une cascade de signalisation cellulaire conduisant à la libération du facteur de transcription NFκB après dégradation de sa protéine inhibitrice IκB. Cela permet la translocation de ce facteur dans le noyau cellulaire et l'induction des cytokines pro- et anti-inflammatoires ainsi que celle du NO (monoxyde d'azote). D'après Amoureux, 2004.*

## I.2.2. Implication des facteurs de l'inflammation dans la ciguatera

### I.2.2.1. Hypothèses formulées à partir des observations cliniques

Les symptômes atypiques – persistance et chronicité des symptômes, phénomènes de sensibilisation, évolution de la maladie vers des myopathies et / ou des neuropathies – observés chez certaines personnes atteintes par la ciguatera peuvent être corrélés avec le mode d'action pharmacologique des CTXs sur le CSSP. En effet, nous avons précédemment décrit que la fixation directe de ces toxines sur ce type de canal entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire aux ions  $\text{Na}^+$  conduisant à des modifications électrophysiologiques mais surtout à une perturbation de l'équilibre ionique intracellulaire de certaines cellules neuronales et / ou musculaires (sous-chapitre I.1.2.3.).

Les variations morphologiques cellulaires entraînées par les perturbations osmotiques résultant de l'action des CTXs sur le CSSP pourraient mener à la rupture des membranes cellulaires libérant les organites et les protéines intracellulaires pouvant alors être reconnus

comme étant des composants allergènes par le système immunitaire. Il s'en suivrait un mécanisme inflammatoire déclenché par l'activation des leucocytes dans le cadre de l'apparition des polymyosites observées chez certaines personnes atteintes d'intoxications ciguatériques (Sheremata et al, 1974 ; Stommel et al, 1991 ; 1993). Les polymyosites représentent une classe de myopathies chroniques qui sont observées la plupart du temps suite à des infections causées par des agents pathogènes (Dalaks et Hohlfeld, 2003). Il est aussi à noter que ces formes de pathologie sont associées à des mécanismes immunitaires (Meché et Doorn, 1995) et semblent être reliées à l'induction des médiateurs de l'inflammation que sont les cytokines et les chimiokines tout comme les molécules d'adhésion cellulaire (Tournadre et Miossec, 2007 ; Figarella-Branger et al, 2003). Des coupes immunohistochimiques et des expériences de PCR réalisées sur des muscles de patients atteints de polymyosites ont ainsi révélé une accumulation de cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  et TGF- $\beta$  (Lundberg et al, 1997 ; Lepidi et al, 1998). L'augmentation de la concentration intracellulaire de Na<sup>+</sup> consécutive à la fixation des CTXs sur le CSSP a également été mise en relation avec l'apparition de dégénération neuronales observées dans les cas de neuropathies comme le GBS classé parmi les polyradiculonévrites inflammatoires aiguës (Bechtold et Smith, 2005). Alors que ce syndrome est majoritairement associé à des infections d'origines microbiennes tels que *Campylobacter jejuni* (4 – 66 %), les cytomégalovirus (5 – 15 %), ou encore le virus d'Epstein-Barr (2 – 10 % ; Hughes et al, 1999), des suspicions de GBS ont aussi été reportés suite à un épisode d'intoxication ciguatérique (Angibaud et Rambaud, 1998 ; Gatti et al, 2008). Tout comme dans les cas de polymyosites, la régulation des cytokines a aussi été associée au GBS, notamment la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  (Exley et al, 1994).

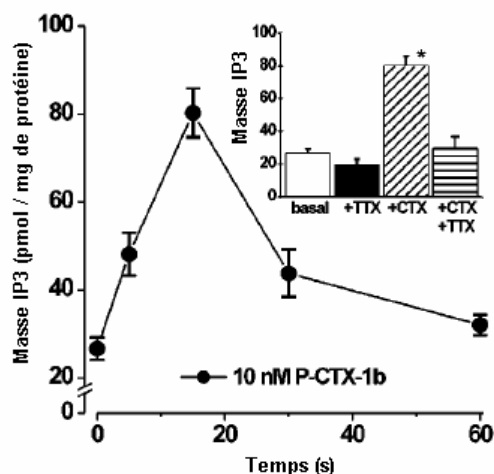
Le SFC pouvant être observé après une intoxication de type ciguatérique semble être relié à un dysfonctionnement des canaux ioniques à l'exemple de celui observé suite à l'action

de CTXs sur le CSSP (Chaudhuri et al, 2000). Or parallèlement aux cas de polymyosites et de GBS, le SFC peut aussi faire participer le système immunitaire dans la physiopathologie de la ciguatera (Pearn, 1979 ; 2001). Plusieurs résultats de travaux menés sur le sujet ont suggéré que ce syndrome pouvait en effet être associé à des désordres immunologiques. Les lymphocytes Natural Killer (NK) extraits à partir de sang de patients atteints de SFC ont montré une baisse de leur prolifération ainsi qu'une diminution de leur potentiel cytotoxique (Klimas et al, 1990). La même population de cellules prélevées à partir du sang périphérique de vétérans de la Guerre du Golf atteints de SFC semble aussi être diminuée contrastant avec l'augmentation des lymphocytes T observée chez les mêmes patients comparativement à d'autres vétérans non touché par cette pathologie (Zhang et al, 1999). La modulation des médiateurs de l'inflammation semble également être impliquée dans la physiopathologie du SFC, notamment la surproduction de radicaux libres tels que le NO ou encore de protéines circulantes comme la protéine C-réactive, la  $\beta$ -microglobuline ou les cytokines inflammatoires IL-2, IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$  (Buchwald et al., 1997; Gupta et al., 1997; Cannon et al., 1999, Zhang et al, 1999, Hanson, et al, 2001). D'autres résultats contrastent par ailleurs avec ces observations notamment le fait qu'il puisse y avoir une diminution de la production de certaines cytokines pro-inflammatoires (Natelson et al, 2002).

#### I.2.2.2. Modulation de l'iNOS par la P-CTX-1B

Les CTXs, impliquées dans l'étiologie de la ciguatera, sont connues pour leur faculté à fixer le CSSP participant à la transmission des influx nerveux, cette propriété des toxines menant alors aux troubles d'ordre neurologique rencontrés dans cette pathologie. Les signes chroniques et les syndromes de types inflammatoires pouvant aussi être observés dans cette intoxication constituent cependant de fortes présomptions quant à l'implication d'autres mécanismes cellulaires dans la physiopathologie de la ciguatera. Les équipes de l'IRD associées à celles du CNRS de Gif-sur-Yvette et de l'INSERM de Palaiseau ont montré

récemment que les CTXs, en plus de leur action privilégiée sur le CSSP, agissaient également sur les canaux calciques de type L (Sauviat et al, 2006). En effet, l'ajout de P-CTX-1 ou de C-CTX-1 sur des globules rouges de grenouille provoque une augmentation de leur surface qui est inhibée par la charybdotoxine et l'apamine, des inhibiteurs des canaux calciques de type L. L'ajout de L-NMA, inhibiteur des NOS, ou de l'ODQ qui inhibe la sGC prévient également le gonflement des érythrocytes de grenouilles et montrent que l'action de la P-CTX-1B sur les canaux calciques implique une cascade d'événements qui mettrait en jeu plusieurs enzymes dont les enzymes NOS. Ces résultats rejoignent par ailleurs ceux obtenus par Jorge Hidalgo et ses collaborateurs (2002) concernant l'action de la P-CTX-1B sur l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans les myotubes de rats. Cette équipe a également mis en évidence l'augmentation de l'inositol 1,4,5-phosphate (IP3) intracellulaire dans le même modèle sous l'action de la P-CTX-1B utilisée à raison de 10 nM, effet qui est inhibé par l'ajout de TTX (Figure I.2.2.2.a).

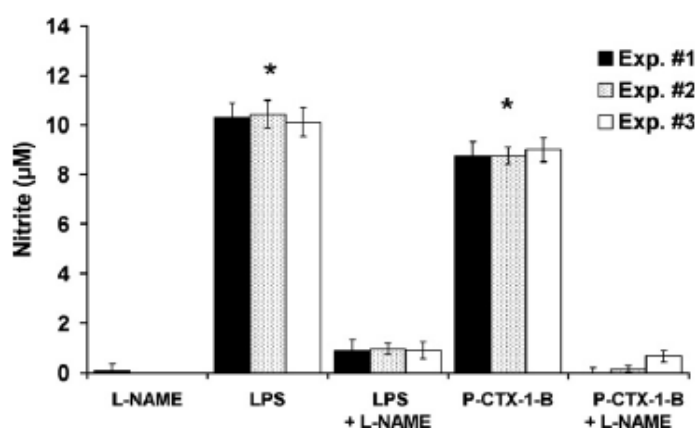


**Figure I.2.2.2.a : Effet de la P-CTX-1B sur la masse d'IP3 dans des myotubes de rat**

*Les myotubes de rat ont été incubés avec la P-CTX-1B à 10 nM en présence ou en l'absence de TTX à 1 mM. D'après Hidalgo et al, 2002.*

Dans la continuité de l'étude menée par Martin-Pierre Sauviat et ses collaborateurs, le Laboratoire de Biotoxines de l'IPNC, le Laboratoire de Pharmacochimie des Substances

Naturelles et Pharmacophores Redox de l'IRD et le Laboratoire des Microalgues Toxiques de l'Institut Louis Malardé de Tahiti ont étudié et mis en évidence l'induction du NO dans les cellules de macrophages murins RAW 264.7 traités par la P-CTX-1B (Kumar-Roiné et al, 2008 ; Annexe VI A). L'accumulation de NO a été quantifiée par la mesure des niveaux de nitrite dans le surnageant cellulaire grâce à la réaction de Griess alors que la modulation de l'ARNm iNOS est visualisée par des techniques de PCR quantitative (qPCR). La P-CTX-1B conduit à l'induction du NO par le biais de la surexpression de l'iNOS de façon dose-dépendante et en fonction du temps. Cette surproduction de NO est inhibée par l'ajout de L-NAME dans le milieu de culture (Figure I.2.2.2.b) montrant la spécificité de l'action de la P-CTX-1B sur les enzymes NOS.



**Figure I.2.2.2.b : Induction du NO par la P-CTX-1B sur les cellules RAW 264.7**

*La surproduction de NO par les cellules RAW 264.7 traitées pendant 24 h par la P-CTX-1B (3 nM) et par le LPS (0,5 µg / ml) est inhibée par l'action du L-NAME (10 mM). D'après Kumar-Roiné et al, 2008.*

L'induction du NO par la P-CTX-1B dans un modèle d'étude *in vitro* permet de mieux appréhender le mode d'action de CTXs dans l'étiologie de la ciguatera et ouvre également de nouvelles perspectives quant à l'étude des thérapies potentielles pour le traitement de cette pathologie.

### **I.3. Vers un traitement efficace contre la ciguatéra**

#### *I.3.1. Pharmacopées disponibles*

##### **I.3.1.1. Médecine occidentale**

La persistance des symptômes ciguatériques plusieurs jours à plusieurs mois après l'apparition de la maladie montre bien qu'à l'heure actuelle, il est difficile de traiter efficacement cette pathologie. De fait, les traitements préconisés par la médecine allopathique tendent essentiellement vers une approche symptomatique et palliative de la ciguatéra.

Les premiers troubles observés, souvent d'ordre digestif, s'estompent généralement de façon rapide et le repos complet au lit est alors préconisé pour une meilleure récupération (Ruff et Lewis, 1994). Les cliniciens peuvent également avoir recours aux traitements classiques incluant des antispasmodiques, des antiémétiques et des antidiarrhéiques afin d'y remédier et dans les cas de déshydratations sévères pouvant notamment atteindre les enfants, le retour à l'équilibre électrolytique peut être instaurée (Bagnis, 1968 ; Lewis, 2001b ; Bourée et al, 2002). Les formes aiguës d'intoxication ciguatérique incluant la détresse respiratoire, et parfois le coma, peuvent requérir l'hospitalisation et la mise sous assistance respiratoire des patients touchés ainsi que l'administration d'atropine pour corriger les problèmes cardiovasculaires comme la bradycardie et l'hypotension (de Haro et al, 2003 ; Friedman et al, 2008). Les manifestations cutanées *e.g.* le prurit sont généralement atténuées par la prescription d'antihistaminiques de synthèse et d'anesthésiques locaux ainsi que la prise de bains d'eau froide (Lewis et Ruff, 1993 ; Laurent, 1993 ; de Haro et al, 2003). Le traitement des troubles neurosensoriels, quant à eux, reposent sur la vitaminothérapie (B1, B6, B12), de la colchicine, de l'acide acétylsalicylique et du gluconate de calcium en injection (Bagnis, 1968, Lewis et Ruff, 1993 ; Moulignier et al, 1995). Le recours à un antidépresseur,

l'amitryptiline, est aussi préconisé pour soigner les symptômes neurologiques comme les dysesthésies et les paresthésies (Davis et al, 1986 ; Crump et al, 1999) et le paracétamol et la nifédipine sont utilisés contre les maux de tête (Friedman et al, 2008). L'emploi anecdotique d'autres molécules telles que la néostigmine ou la gabapentine a également été reporté pour traiter les désordres neurologiques (Banner et al, 1963 ; Perez et al, 2001).

Si la médication allopathique s'avère peu efficace dans le traitement de la ciguatéra, il existe une molécule de choix, le D-mannitol, qui reste fréquemment administrée pour soigner cette pathologie aussi bien chez des personnes atteintes dans les régions du Pacifique ou des Caraïbes (Blythe et al, 1994 ; Ting et Brown, 2001) que dans les pays d'Europe non habituellement touchés par le phénomène (de Haro et al, 2003). De nombreuses publications ont effectivement reporté l'emploi de ce polyol dès la fin des « années 80 » sous la forme hyper-osmotique à 20 % en perfusion intraveineuse dans les cas d'intoxication ciguatérique (Palafox et al, 1988 ; Pearn et al, 1989). Il est cependant à noter qu'étant donné les propriétés diurétiques de cette molécule, la condition *sine qua non* à son utilisation est que le patient ne soit pas déshydraté afin de ne pas aggraver son état physiologique. L'indication thérapeutique du mannitol concerne essentiellement les troubles d'ordre neurologique et sa posologie reste variable : son efficacité serait maximum s'il est administré dans les 24 à 48 heures après le diagnostic de la ciguatéra (Palafox et al, 1988 ; Stewart, 1991 ; Blythe et al, 1994 ; Ruff et Lewis, 1994) mais il peut être prescrit jusqu'à plusieurs jours après l'apparition des premiers symptômes (Eastaugh, 1996 ; Schwarz et al, 2008). La vraisemblable efficacité du mannitol serait attribuée à son potentiel de régulation osmotique (Pearn, 2001) mais son mode d'action exacte dans le traitement de la ciguatéra reste inexpliqué (Birinyi-Strachan et al, 2005). Plusieurs études cliniques ont été réalisées afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette molécule dans le traitement de cette pathologie. Donna Blythe et ses collaborateurs (1994) ont évalué le potentiel thérapeutique du D-mannitol administré en perfusion intraveineuse à raison



de 1 g/kg chez 107 personnes dont 70 patients atteints de ciguatéra dans la région Caraïbe. Bien que cette étude ne soit pas considérée comme un essai clinique conventionnel, il est intéressant de souligner que 91 % des personnes traitées au D-mannitol (29 / 32 réellement recensées) ont montré une complète rémission des symptômes dans les 48 h. Une seconde étude réalisée plus récemment contraste par ailleurs avec ces résultats : l'équipe de Hans Schnorf (2002) mena une étude aléatoire en double-aveugle quant à l'efficacité du mannitol comparativement à une solution saline sur un échantillonnage de 50 personnes atteintes par la ciguatéra. Les termes de l'essai conclurent que le mannitol n'avait pas d'effet supérieur à celui du placebo sur la réduction des signes cliniques de la ciguatéra chez les personnes intoxiquées. Ces conclusions rejoignent celles obtenues lors de deux séries d'expérimentations animales conduites sur souris (Lewis et al, 1993) et sur rats (Purcell et al, 1999) injectés en i.p. avec de la CTX et qui montrèrent que le mannitol ne semblait pas avoir d'effet inhibiteur sur l'action de cette toxine.

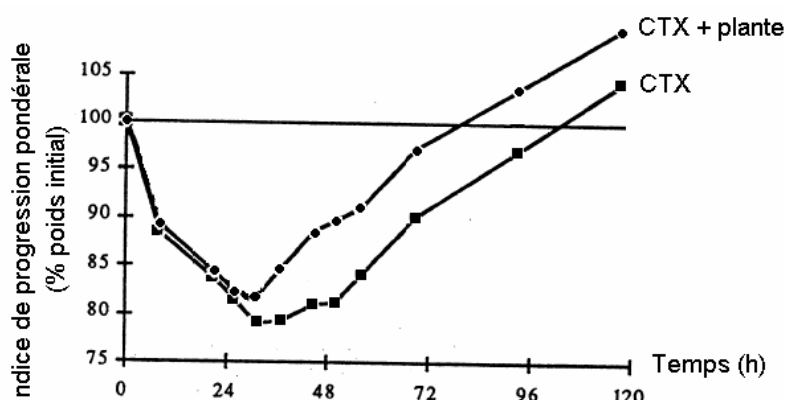
#### I.3.1.2. Usage de plantes traditionnelles

La recherche d'une thérapeutique spécifique efficace dans le traitement de la ciguatéra reste donc d'actualité et de nombreuses personnes dans la région du Pacifique ont le plus souvent directement recours aux guérisseurs (ou tradipraticiens) et à la médecine dite « traditionnelle » - par opposition à la médecine allopathique ou moderne - faisant essentiellement appel à la phytothérapie par le biais de l'utilisation de plantes ancestrales (communications personnelles). L'emploi des plantes à des fins thérapeutiques remonte à la préhistoire et reste perpétué depuis par les populations mélanésiennes qui peuplent le Pacifique Sud (Holdsworth, 1977 ; Limousin et Bessières, 2006 ; World Health Organisation Regional Publications, 1998). Il est également intéressant de souligner que de nombreux médicaments utilisés dans la thérapie occidentale font appel à des composés isolés de plantes : la morphine, un antalgique majeur extrait du pavot blanc (*Papaver somniferum*), la digitaline,

cardiotonique indispensable issu de la digitale (*Digitalis purpurea* et *Digitalis lanata*), et la célèbre aspirine provenant du saule blanc (*Salix alba*), pour ne citer que ces exemples. Ces dernières années ont vu renaître un regain d'intérêt pour les formes de médecine traditionnelle notamment la phytothérapie et cela pour plusieurs raisons : la prise de conscience des limites des thérapies occidentales notamment dans le traitement des affections chroniques, comme décrit précédemment dans le cas de la ciguatéra, ainsi que la crainte des effets secondaires entraînés par certains médicaments – à voir l'effet diurétique du mannitol.

Les études ethnopharmacologiques réalisées dans le Pacifique depuis les « années 70 » jusqu'aux « années 90 » et plus précisément en Nouvelle-Calédonie et au Vanuatu par les chercheurs de l'ex-ORSTOM, ont conduit au recensement de près de 90 plantes, dont certaines sont présentées dans l'Annexe V, utilisées à des fins curatives ou préventives contre la ciguatéra (Rageau, 1973 ; Bourdy et al, 1992 ; Amade et Laurent, 1992a). Suite à ces études, un livre fut élaboré traitant des remèdes traditionnels utilisés contre la ciguatéra dans la Pacifique Sud (Laurent et al, 1993) qui énumère la liste des propriétés de ces plantes dont les échantillons furent classés et conservés en herbiers dans quatre organismes de recherche de l'époque : le Muséum d'Histoire Naturelle de Paris, l'ex-ORSTOM de Nouméa, l'Herbarium de Kew Gardens (Surrey, Angleterre) et la Collection Nationale du Vanuatu. Les enquêtes réalisées auprès des populations locales ont mis en évidence la variabilité des modes d'administration de ces remèdes. Leur préparation reste cependant peu complexe en général, consistant majoritairement en la macération en eau froide ou en l'infusion ou la décoction en eau chaude des parties végétales récoltées qui sont le plus souvent soit les feuilles, soit les fibres d'écorces ou de rhizomes des plantes ou encore à partir de la sève des arbres comme c'est le cas pour *Cerbera manghas*. Ces extraits de plantes peuvent être soit consommés directement par prise orale soit être employés en usage externe par des bains permettant de soulager les prurits.

Le « faux tabac » est le nom vernaculaire de l'espèce *Heliotropium foertherianum* Diane & Hilger (Boraginaceae) qui fait partie des plantes les plus utilisées dans le traitement de l'intoxication ciguatérique (Bourdy et al, 1992 ; Laurent et al, 1993). Une enquête a révélée qu'en réalité cette plante était employée par 40 % des personnes interrogées (Laurent et al, 1992), ce qui explique qu'elle soit également dénommée « arbre à gratte » (Laurent et al, 1993). Avant l'attribution de son nom actuel (Hilger et Diane, 2003), l'espèce *H. foertherianum* était précédemment connue sous les appellations d'*Argusia argentea* (L. f.) Heine, *Messerschmidia argentea* (L. f.) I. M. Johnst, ou *Tournefortia argentea* (L. f.). Cet arbuste, observé communément sur les littoraux sablonneux, est originaire de la région Indo-Pacifique et se retrouve aujourd'hui dans les régions d'Asie tropicale, Madagascar, Australie, Malaisie, de Micronésie, de Polynésie ainsi que la Mélanésie (Laurent et al, 1993 ; Manner et Elevitch, 2006).



**Figure I.3.1.2.a : Effet bénéfique de l'extrait d'*H. foertherianum* sur la progression pondérale de souris injectées avec de la CTX**

*La progression pondérale par rapport au poids initial de souris de 20 g injectées en i.p. avec 30 µg de CTX purifiée de foie de murène ciguatérigène (CTX) est comparée à celle de souris intoxiquées auxquelles un extrait de feuilles d'*H. foertherianum* est également administré (CTX + plante). La quantité d'extrait de plante injectée 1 h après la CTX correspond à la moitié de la dose humaine utilisée. Modifié d'après Amade et Laurent, 1992b.*

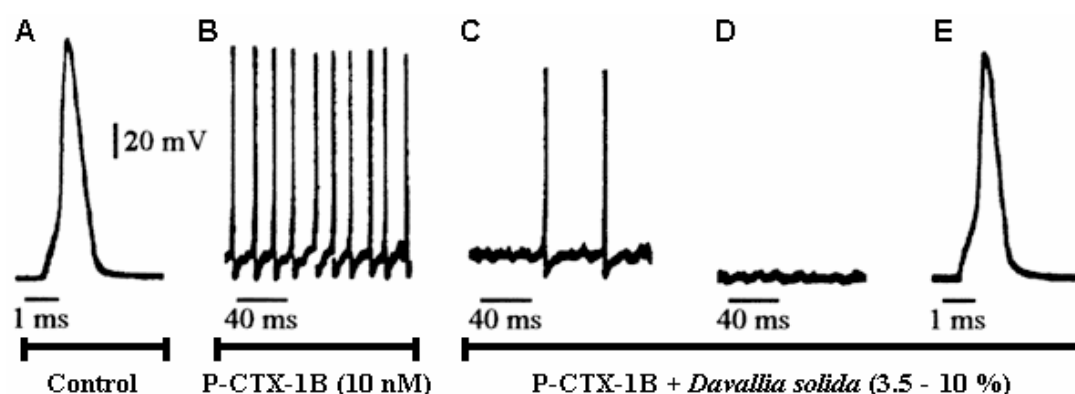
Dans le traitement des intoxications ciguatériques, les tradipraticiens préconisent l'emploi d'*H. foertherianum* sous la forme d'infusion de feuilles qui s'utilise à la fois par voie externe, sous forme de bains pour calmer les sensations prurigineuses, et par voie interne (Rageau, 1973 ; Bourdy et al, 1992). Bien qu'aucune étude clinique n'ait été réalisée pour évaluer l'efficacité de cette plante, une expérimentation animale a mis en évidence une action bénéfique de l'extrait de décoction de feuilles d'*H. foertherianum* pour contrecarrer l'effet négatif des CTXs sur la progression pondérale de souris intoxiquées (Figure I.3.1.2.a; Amade et Laurent, 1992b). De la même façon, un extrait aqueux de feuilles de *Schinus terebenthifolius* ou faux poivrier a révélé la capacité à réduire le potentiel toxique des CTXs sur le même modèle toxicologique (Laurent et al, 1993). Cette expérience effectuée *in vivo* montre ses limites car elle ne permet pas l'investigation du mode d'action précis des plantes potentiellement efficaces chez l'homme et ainsi des tests *in vitro* ont été élaborés lors de cette dernière décennie afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de remèdes traditionnels utilisés dans la région du Pacifique Sud.

### *1.3.2. Développement de tests in vitro*

#### *1.3.2.1. Etudes électrophysiologiques*

Le développement des techniques de microscopie confocale à balayage laser ainsi que l'utilisation de méthodes de *patch clamp*, utilisées dans un premier temps afin de caractériser le mode d'action des CTXs (Molgo et al, 1994 – sous chapitre I.1.2.3) ont permis par la suite d'évaluer le potentiel curatif de diverses molécules dans le but de développer la recherche thérapeutique dans le domaine de la ciguatera. La caractérisation des propriétés physiologiques du D-mannitol hyper-osmotique à la concentration de 100 mM a montré que cette molécule est capable d'inverser l'action de la P-CTX-1B (10 nM) sur le nœud de Ranvier en réduisant le nombre de PA spontanées ainsi que l'entrée de Na<sup>+</sup>, et en augmentant l'efflux d'eau à travers une action osmotique (Benoit et al, 1996). De plus, les effets

neurophysiologiques de la C-CTX-1 et de la P-CTX-3C sont également supprimés par l'ajout de D-mannitol à 100 mM dans le milieu extracellulaire sur le même modèle (Mattei et al, 1999a ; 1999b). Par ailleurs, les mesures réalisées lors d'une expérience de patch clamp sur cellule entière de neurones de DRG de rat révélèrent qu'une concentration hyper-osmotique de D-mannitol à 50 mM empêche la dépolarisation membranaire et la répétition des trains de PA induit par la P-CTX-1 (Birinyi-Strachan et al, 2005b).



**Figure I.3.2.1.a : Inversion de l'hyperexcitabilité membranaire dépendante de la P-CTX-1B par un extrait de *Davallia solida***

*Le potentiel d'action normal évoqué par un stimulus de 0,5 ms (A) est modifié par l'action de la P-CTX-1B à 10 nM (B). L'ajout d'extrait aqueux de macération de rhizome de D. solida (3,5 – 10 %) inhibe cet effet en réduisant la fréquence (C) et en supprimant les potentiels d'action spontanés (D). L'action de cet extrait de plante ne modifie pas l'amplitude du potentiel d'action à 0,5 ms (E). Résultats reproduits d'après Benoit et al, 2000.*

Suivant l'exemple des études réalisées sur le D-mannitol, notre groupe entreprit d'évaluer l'efficacité de traitements traditionnels utilisés contre la ciguatera en analysant leurs effets sur des axones myélinisés de grenouille exposés à la P-CTX-1B (Benoit et al, 2000). Les résultats ont montré que l'hyperexcitabilité de la membrane cellulaire induite par la P-CTX-1B est inversée par un extrait aqueux de macération de rhizomes de *Davallia solida* à la concentration de 3,5 - 10 % (Figure I.3.2.1.a), tout comme par un extrait de feuilles d'*H.*

*foertherianum*. L'augmentation du volume de l'axone est également inversée par l'extrait de *D. solida*. Ces résultats permettent de conclure que les extraits de *H. foertherianum* et de *D. solida*, tout comme le D-mannitol hyper-osmotique, sont capables de contrer les effets électrophysiologiques de la P-CTX-1B sur les axones myélinisés. Ces premières conclusions positives nous ont alors encouragé à poursuivre nos investigations dans le domaine des remèdes traditionnels et permis de prendre en considération la possibilité d'utiliser d'autres tests *in vitro* existant afin de les adapter à la recherche et la découverte de produits naturels actifs issus des remèdes traditionnels du Pacifique.

#### I.3.2.2. Test de cytotoxicité

Considérant une étude antérieure réalisée sur la TTX (Kogure et al, 1988), Ron Manger et ses collaborateurs ont ainsi développé un test de détection colorimétrique des CTXs basé sur la mesure de la viabilité de la lignée de cellules de neuroblastomes murins Neuro-2a (Manger et al, 1993). Ce test fait appel au mode d'action de ces toxines sur le CSSP combinée à celle de la vératridine, un second activateur de ce canal au site 2 (Ulbricht and Flacke, 1965; Barnes and Hille, 1988) en présence d'ouabaine, un inhibiteur de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, qui bloque alors l'efflux de sodium. L'association des effets pharmacologiques de ces agents résulte en une élévation de la concentration intracellulaire de sodium résultant en une perturbation osmotique et une altération morphologique des cellules, conduisant à leur mort. Ce test est complété par l'utilisation d'une méthode colorimétrique basée sur le sel de tétrazolium ou MTT (bromure de 3-[4, 5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tétrazolium) afin de mesurer la viabilité cellulaire résiduelle. Le MTT, originellement décrit par Mosmann (1983), possède la faculté d'être réduit par les déshydrogénases des mitochondries des cellules vivantes en cristaux de formazan bleu (Slater et al, 1963; Carmichael et al, 1987). Après solubilisation dans du DMSO, la quantité de formazan bleu produite est ensuite mesurée par

lecture de la densité optique à 490 nm, l'absorbance étant alors proportionnelle à la viabilité cellulaire.

Un extrait ciguatoxique préparé à partir de poisson du genre *Cheilinus rhodochrous* a été ainsi évalué par le test de cytotoxicité basée sur le MTT à raison de 1 à 5 µg / puits et les résultats ont montré une réponse cytotoxique dose-dépendante de l'échantillon après 6 à 22 h d'incubation (Manger et al, 1993 ; 1994a). Par la suite, un extrait purifié de P-CTX-1B et de P-CTX-3C conduisit également la mortalité des cellules Neuro-2a ; notons que la P-CTX-3C, présentant un potentiel cytotoxique inférieur à celui de la P-CTX-1B, nécessite une concentration de 50 % supérieure pour obtenir une réponse similaire à la P-CTX-1B, ce qui est comparable aux résultats observés lors de tests de toxicité aigue sur souris (Manger et al, 1994b ; Dechraoui et al, 1999). De la même façon, une concentration croissante de PbTx-1 (0,25 – 4 ng / puits) révéla une cytotoxicité détectée dès 4 h d'incubation (Manger et al, 1995). Une comparaison du potentiel cytotoxique de la PbTx-1, PbTx-2 et PbTx-3 a aussi été effectué et a montré une relation telle que  $PbTx-1 > PbTx-3$  comparable avec les valeurs de  $DL_{50}$  de ces toxines obtenues dans les expériences *in vivo* (Manger et al, 1995 ; Dechraoui et al, 1999). Il est important de signaler que cette technique représente un test de détection plus sensible que les expérimentations sur souris, requérant des concentrations de CTXs et de PbTxS respectivement de l'ordre du pg et du ng, au lieu des µg nécessaires dans les études *in vivo* (Manger et al, 1994; Dechraoui et al, 1999 ; Bottein Dechraoui et al, 2005). Par ailleurs, une variation minimale des valeurs a été observée avec le test de viabilité au MTT qui génère habituellement une déviation standard inférieure à 10 % (Carmichael et al, 1987).

Les raisons citées plus haut confirment le fait que ce test constitue une technique reproductible, rapide, sensible et évitant une grosse consommation de toxines pour la détection de l'activité des CTXs et de PbTxS. De fait, un test rapide basé sur le potentiel cytotoxique des PbTxS sur des cellules Neuro-2a traitées en concomitance par la vératridine et

l'ouabaïne a été proposé pour la détection de toxines antagonistes qui conduit alors à l'augmentation de la viabilité cellulaire (Manger et al, 2003).

**Tableau I.3.2.I : Capacité de plantes à inhiber l'effet cytotoxique de la P-CTX-1B**

<b>Plantes (5 g / l) - Partie végétale (préparation)</b>	<b>Effet sur la viabilité cellulaire<sup>a</sup></b>	<b>Activité<sup>b</sup></b>
<i>Euphorbia hirta</i> - Plante entière (décoction)	+++	101,9±4.6
<i>Piper methysticum</i> - Racine (macération)	+++	94,6±2.2
<i>Scaevola sericea</i> - Feuille (décoction)	+++	61,0±2.7
<i>Syzygium malaccense</i> – Ecorce de graine (décoction)	+++	49,3±3.7
<i>Spondias cytherea</i> - Ecorce de graine (macération)	+++	44,0±5.6
<i>Artocarpus altilis</i> - Feuilles (macération)	+++	36,0±1.3
<i>Stachytarpheta australis</i> - Racines (macération)	+	28,9±5.4

<sup>a</sup> La viabilité des cellules Neuro-2a traitées avec la vératridine à 417 mM, l'ouabaïne à 41,7 mM et la P-CTX-1B 5 pM (OVP) est déterminée en présence ou en l'absence d'extraits de plante à 5 g / l. + et +++ : augmentation de la viabilité cellulaire significative par rapport à la condition OVP avec respectivement  $P < 0,05$  et  $0,001$  ; <sup>b</sup> l'activité des extraits de plantes est exprimée en % de viabilité cellulaire par rapport à la condition OVP (moyenne ± SD de n expériences) comme décrit d'après Boydrón-Le Garrec et al, 2005.

Notre équipe a adapté ce modèle afin de pouvoir réaliser le criblage de composés actifs pouvant contrer de la même façon l'effet cytotoxique de la PbTx-3 ou de la P-CTX-1B (Boydrón-Le Garrec, 2005 ; Boydrón-Le Garrec et al, 2005). Le potentiel thérapeutique de 31 extraits de remèdes traditionnellement utilisés dans le traitement de la ciguatera a ainsi été étudié et après un premier criblage de ces plantes réalisé sur la PbTx-3, sept extraits végétaux se sont révélés capables de contrer significativement l'effet cytotoxique de la P-CTX-1B. Il s'agit des plantes suivantes : *Euphorbia hirta*, *Piper methysticum*, *Scaevola sericea*, *Syzygium malaccense*, *Spondias cytherea*, *Artocarpus altilis*, *Stachytarpheta australis* (Tableau I.3.2.2I). Cette étude fut ainsi la première du genre, réalisée à grande échelle qui a permis



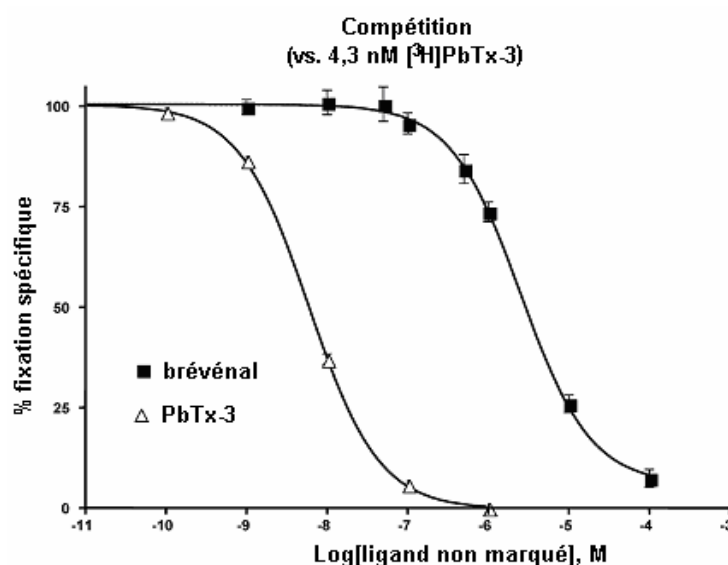
d'évaluer le potentiel anti-CTXs d'extraits de plantes traditionnelles ouvrant alors la voie à d'autres séries d'expériences orientées vers de nouvelles formes d'évaluation thérapeutique de ces remèdes, notamment la caractérisation de leur propriétés anti-inflammatoires (Kumar-Roiné et al, 2009).

#### I.3.2.3. Test d'affinité sur le récepteur ou *Receptor Binding Assay* (RBA)

Parallèlement à l'évaluation du potentiel thérapeutique de substances naturelles terrestres, la recherche de produits actifs dans le traitement de la ciguatera s'est également dirigée vers l'étude de nouvelles molécules d'origine marine. En effet, plusieurs composés polyéthérés polycycliques ont récemment été isolés dont le gambiérol et les acides gambiériques A-D extraits du dinoflagellé *Gambierdiscus toxicus* (Satake et al, 1992 ; Morohashi et al, 2000) ainsi que le brevénal qui, comme les PbTx, est issu du dinoflagellé *K. brevis* (Bourdélais et al, 2004). Or ces molécules ont montré une activité pharmacologique antagoniste des CTXs grâce à un test d'affinité pour le CSSP.

Basé sur la faculté des PbTx et des CTXs à se fixer spécifiquement sur le site 5 de ce récepteur des membranes excitables (Bidart et al, 1984 ; Lombet et al, 1987 ; Cestèle et Catterall, 2000), ce test d'affinité repose sur la compétition entre un ligand radioactif et un analyte pour ce même site de fixation et a été développé sous la dénomination anglophone de *Receptor Binding Assay* (RBA). Cherchant à déterminer le site de fixation des PbTx, Mark Poli et ses collaborateurs (1986) ont ainsi mis en place les fondements du RBA dans le domaine des neurotoxines marines en réalisant la synthèse de la PbTx-3 tritiée grâce à la réduction chimique de la PbTx-2 par le NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub>. La fixation sur des synaptosomes de cerveaux de rat du [<sup>3</sup>H]PbTx-3 produit, utilisé alors comme marqueur spécifique, fut ensuite visualisée grâce à des techniques de filtration et la radioactivité mesurée a montré que la PbTx-3 tritiée pouvait être déplacée par la PbTx-3 froide (Trainer et al, 1994). Concernant les toxines ciguatérigènes, des expériences complémentaires ont révélé qu'une fraction de CTX

purifiée de foie de murène agissait de même sur la fixation de la [ $^3\text{H}$ ]PbTx-3 avec une affinité de 20 à 50 fois supérieure à celle de la toxine tritiée (Lombet et al, 1987). La CTX-1, CTX-2 et CTX-3 ont par ailleurs inhibé la fixation de la PbTx-3 radioactive au CSSP avec une activité potentielle qualitativement (mais non quantitativement) comparable à la mortalité observée sur souris (Lewis et al, 1991 ; Dechraoui et al, 1999).



**Figure I.3.2.3.a : Déplacement de la PbTx-3 tritiée ([ $^3\text{H}$ ]PbTx-3) de synaptosomes de cerveau de rat par le brévénil**

*Les expériences de fixation de la PbTx-3 tritiée [ $^3\text{H}$ ]PbTx-3 sur les synaptosomes de rat ont été réalisées comparativement à ceux du brévénil. La courbe de déplacement de la [ $^3\text{H}$ ]PbTx-3 par la PbTx-3 non marquée est réalisée parallèlement comme référence. Données extraites de Bourdelais et al, 2004.*

La technique de RBA fut dès lors utilisée afin de détecter la présence des CTXs et / ou des PbTxs directement à partir d'extraits de poissons potentiellement ciguatérigènes lors de suivies épidémiologiques et environnementales réalisés en Floride (Bottein Dechraoui et al, 2005) et en Polynésie Française (Darius et al, 2007 ; Chinain et al, 2009). Ces trois études ont permis de valider cette technique pour la détection des CTXs au sein de populations de

poissons retrouvés à des niveaux trophiques différents car elle permet de discriminer les échantillons toxiques des extraits non toxiques. Bien que la méthode de RBA fasse appel à l'utilisation de marqueurs radioactifs qui requiert un équipement adéquat et une formation spéciale, elle représente une technique de détection efficace et sensible mais surtout spécifique de l'action directe des CTXs sur le CSSP (Jong et al, 2005 ; Bottein Dechraoui et al, 2005). Cette dernière propriété du RBA a fait que cette technique soit adaptée en un test utilisé dans l'évaluation du potentiel pharmacologique de composés d'origines marines pouvant également déplacer la PbTx-3 tritiée. Les propriétés antagonistes du gambiérrol et de l'acide gambiérique A (Inoue et al, 2003) tout comme celles du brévénal (Figure I.3.2.3.a ; Bourdelais et al, 2005) ont ainsi pu être mises en évidence.

### *I.3.3. Perspectives thérapeutiques*

#### *I.3.3.1. Substances naturelles d'origine marine*

L'amélioration des méthodes de détection *in vitro* des CTXs et PbTx a permis l'étude pharmacologique de composés actifs pouvant être considérés comme des agents thérapeutiques potentiels dans le traitement de la ciguatera. Dans ce contexte, la découverte des propriétés antagonistes de substances d'origines marines comme le brévénal ou le gambiérrol pour le site de fixation des CTXs appuie cette démarche. L'étude du brévénal a révélé que cette molécule diminuait par ailleurs la sécrétion de neurotransmetteurs par des cellules chromaffines bovines traitées avec de la P-CTX-1B (Mattei et al, 2008) et inhibait également la génotoxicité de lymphocytes humains induites par les PbTx (Sayer et al, 2005). A l'inverse, des expériences complémentaires ont mis en évidence que le gambiérrol, tout comme les CTXs, exerçait un effet délétère sur les courants ioniques des cellules neuronales de par leur action sur l'internalisation de l'ion calcium (LePage et al, 2007) et l'augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Louzao et al, 2006). Cette substance a, de plus,

révélé une activité inhibitrice du courant potassique de cellules sensibles de souris (Ghiaroni et al, 2005).

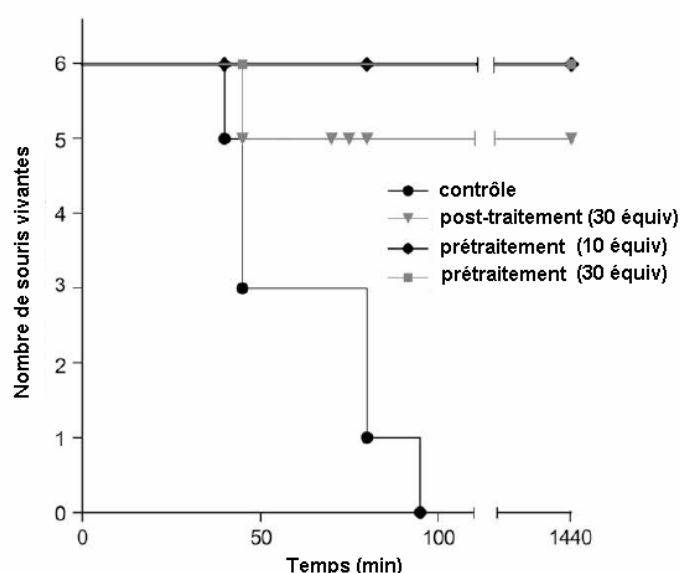
L'étude des activités biologiques de ces molécules parallèlement à l'approfondissement des connaissances du mode d'action des neurotoxines ont permis de mettre en œuvre un effort intense de recherche dans le domaine de la pharmacochimie des substances naturelles. Mais l'optimisation de leur potentiel pharmaceutique passe encore par le développement du « drug design » permettant de synthétiser des molécules ciblant spécifiquement les sites pharmacologiques d'intérêt évitant ainsi l'activité délétère des molécules originelles et les effets secondaires pouvant être associés.

#### I.3.3.2. Développement d'anticorps anti-CTXs

La vaccination, impliquant la fabrication d'anticorps capables de neutraliser les toxines ciguatériques après stimulation de l'immunité des individus exposés, pourrait théoriquement constituer une forme de thérapie préventive de la ciguatera. Cependant, les CTXs constituent une famille d'haptènes qui ne sont pas reconnus par les cellules immunitaires et qui ne confèrent donc pas d'immunité aux personnes atteintes par cette intoxication (Glaziou et Martin, 1993). De ce fait, il a été envisagé de pratiquer une thérapie basée sur la neutralisation passive des CTXs par le biais d'anticorps de synthèse spécifiquement dirigés contre ces toxines. Par ailleurs, le caractère non immunogène des CTXs implique qu'elles doivent être préalablement conjuguées à une molécule porteuse telles que l'albumine de sérum bovin (BSA) ou l'ovalbumine (OVA) afin d'induire une réponse du système immunitaire (Pauillac et al, 2000). La synthèse totale et partielle de la P-CTX-3C a également permis la production de fragments d'haptène non toxiques afin de préparer ces anticorps monoclonaux spécifiques des CTXs (Inoue et al, 2001 ; Hirama, 2005).

Des travaux récents ont démontré que la P-CTX-3C pouvait être effectivement neutralisée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* par une combinaison de deux anticorps monoclonaux

10C9 et 3D11 orientés spécifiquement contre cette toxine (Inoue et al, 2009). Le potentiel anti-CTX de ces anticorps fut d'abord mis en évidence *in vitro* par un test de cytotoxicité sur les cellules Neuro-2a comme décrit précédemment (sous-chapitre I.2.2.2). Il est apparu que la combinaison des deux anticorps est plus efficace à inhiber la cytotoxicité induite par la P-CTX-3C de 24 à 158 fois respectivement par rapport l'anticorps 10C9 ou 3D11 seul. Par la suite, la combinaison des deux anticorps a été évaluée sur un test de toxicité aigue sur souris injectées en i.p. avec une dose de 15 fois la  $DL_{50}$  de la P-CTX-3C et les résultats ont mis en évidence leur capacité à réduire la mortalité liée à cette toxine (Figure I.3.3.2.a).



**Figure I.3.3.2.a : Neutralisation *in vivo* de la P-CTX-3C par des anticorps monoclonaux**

Le nombre de souris contrôles injectées avec de la P-CTX-3C en i. p. à la concentration de 20  $\mu\text{g/Kg}$  est comparé au nombre de souris prétraitées avec le mélange équimolaire d'anticorps 10C9 et 3D11 (10 ou 30 équivalent) 1 h avant l'injection de toxine ou traitées 10 min (30 équivalent) après l'administration de P-CTX-3C. D'après Inoue et al, 2009.

#### **I.4. Cadre et objectifs du projet de thèse**

##### *I.4.1. Objectif 1 : étude de la modulation des facteurs de l'inflammation par les ciguatoxines*

L'induction du NO observé *in vitro* sur les cellules de macrophages murins RAW 264.7 (Kumar-Roiné et al, 2008) pourrait tendre à prouver l'implication de la voie du NO dans la physiopathologie de la ciguatera. C'est dans la continuité de cette étude que notre équipe a entrepris d'explorer le rôle, négligé jusqu'à présent, du système immunitaire dans cette pathologie et notamment la modulation des médiateurs de l'inflammation que sont les cytokines. Une étude approfondie a été entreprise par l'analyse de la régulation des cytokines dans le même modèle *in vitro* sous l'effet des CTXs notamment la P-CTX-1B. La distinction entre les cytokines pro- *versus* anti-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-11 *versus* IL-10) a été réalisée et nous nous sommes attachés à suivre leur modulation par la quantification de leur ARNm au moyen des techniques de qPCR. Ce type d'investigation basée sur l'étude de la modulation de l'expression génique sous l'effet de CTXs rejoint d'autres analyses réalisées *in vivo* sur modèle souris (Ryan et al, 2007 ; Morey et al, 2008).

##### *I.4.2. Objectif 2 : caractérisation du potentiel anti-inflammatoire de remèdes traditionnellement utilisés dans le Pacifique*

La modulation du NO par la P-CTX-1B dans un modèle *in vitro* ouvre de nouvelles voies tant du point de vue fondamental que pour la recherche thérapeutique et ainsi le sujet de thèse de Mme Shilpa KUMAR-ROINE (2009) a porté sur l'isolement et la purification de principes actifs issus de remèdes traditionnels et possédant une activité anti-oxydante en inhibant la production de NO dépendante du LPS (Kumar-Roiné et al, 2009). Plusieurs plantes, révélant un potentiel antioxydant intéressant, ont ainsi été sélectionnées pour des

études complémentaires et la caractérisation de leur potentiel anti-inflammatoire a été entreprise par la visualisation de leur faculté à inhiber l'induction des cytokines sur le même modèle d'induction cellulaire. Lors de cette seconde partie, la technique d'ELISA pour *Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay* permettant le dosage des protéines cytokiniques a également complété les résultats obtenus lors d'expériences de qPCR.

#### *1.4.3. Développement de la technique de PCR quantitative*

Apparue dans les « années 90 » (Higuchi et al, 1993), la qPCR est devenue durant la dernière décennie une des méthodes les plus répandues pour visualiser et quantifier l'expression génique notamment pour l'étude de l'implication des cytokines ou de l'iNOS dans divers mécanismes inflammatoires (Stordeur et al, 2002 ; Overberg et al, 2003). Dans le cadre de ce projet de thèse, la technique de qPCR fut principalement utilisée pour réaliser la quantification des ARNm cytokiniques et de l'iNOS régulées par la toxine ciguatérique P-CTX-1B. Le chapitre suivant est ainsi consacré aux études menées pour la validation des paramètres de cette technique.

### **I.5. Références de la partie I**

- Abermhel, G. G., Krebs, H. C., Rasoanaivo, P., Ramaliharisoa, A., 1994. Severe ciguatera poisoning in Madagascar: a case report. *Toxicon*, 32(12)<sup>o</sup>: 1539-1542.
- Adachi, R., Fukuyo, Y., 1979. The thecal structure of a marine toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* gen. and sp. nov. collected in a ciguatera endemic area. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 45<sup>o</sup>:67-71.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowles, R. G., 2001. Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition. *Biochemistry Journal*, 357<sup>o</sup>: 593-615.
- Aligizaki, K., Nikolaidis, G., 2008. Is *Gambierdiscus* expanding to new areas? *Harmful Algae News*, 36<sup>o</sup>: 6-7.
- Allsop, J. L., Martini, L., Lebris, H., Pollar, J., Walsh, J., Hodgkinson, S., 1986. Les manifestations neurologiques de la ciguatéra. *Revue Neurologique*, 142<sup>o</sup>: 590-597.
- Amade, P., Laurent, D. 1992a. Ciguatéra et remèdes traditionnels. Dans : Debitus Cécile (ED.), Amade Philipe (ED.), Laurent Dominique (ED.), Cosson J. P., Actes dans le Troisième symposium sur les substances naturelles d'intérêt biologique de la région Pacifique-Asie, Nouméa, ORSTOM, 1992, p. 329-333.
- Amade, P., Laurent, D., 1992b. Screening of traditional remedies used in ciguatera fish poisoning treatment. *Recent Advances in Toxinology Research*; eds Gopalakrishnakone P. and Tan C.K., 2<sup>o</sup>: 503-508.
- Amoureux, M.-C., 2004. Rôle pathophysiologique des endotoxines, un dénominateur commun dans différentes maladies. *Pathologie Biologie*, 52 : 415-422.
- Anderson, D. M., Lobel, P. S., 1987. The continuing enigma of ciguatera. *Biological Bulletin*, 172<sup>o</sup>: 89-107.



- Anderson, D. M., Hoagland, P., Kaoru, Y., White, A. W., 2000. Estimated annual economic impacts from harmful algal blooms (HABs) in the United States. Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, MA: Technical report, September 2000.
- Angibaud, G., Rambaud, S., 1998. Serious neurological manifestations of ciguatera: is the delay unusually long? *Journal of Neurological Neurosurgery and Psychiatry* 64(5) : 688–689.
- Arena, P., Levin, B., Fleming, L. E., Friedman, M. A., Blythe, D., 2004. A pilot study of the cognitive and psychological correlates of chronic ciguatera poisoning. *Harmful Algae*, 3°: 51–60.
- Baggiolini, M., Loetscher, P., Moser, B., 1995. Interleukin-8 and the chemokine family. *International Journal of Immunopharmacology*, 17(2)°: 103-108.
- Bagnis, R., 1968. Clinical aspects of ciguatera (fish poisoning) in French Polynesia. *Hawaii Medical Journal*, 28(1)°: 25-28.
- Bagnis, R., 1979a. Agressions naturelles sur les édifices coralliens des Iles Marquises et ciguatéra. *Médecine Océanienne*, 12 :42-50.
- Bagnis, R., 1979b. Clinical observations on 3,009 cases of ciguatera (fish poisoning) in the South Pacific. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 28(6)°: 1067-1073.
- Bagnis R., Chanteau S., Chungue E., Hurtel J.M., Yasumoto T. & Inoue A., 1980. Origins of ciguatera fish poisoning: a new dinoflagellate, *Gambierdiscus toxicus* Adachi and Fukuyo, definitively involved as a causal agent. *Toxicon*, 18°: 199-208.
- Balkwill, F., 2002. Les cytokines et leurs récepteurs. Dans : Roitt, I., Brostoff, J., Male, D., *Immunologie*, 3<sup>ème</sup> Edition, de Boeck & Larcier, Bruxelles.
- Banner, A. H., Shaw, S. W., Alender, C. B., Helfrich, P., 1963. Intoxication par le poisson, Notes sur la ciguatéra et son mode d'action et quelques suggestions thérapeutiques. Commission du Pacifique Sud, document technique N° 141.

- Barnes, S., Hille, B., 1988. Veratridine modifies open sodium channels. *Journal of General Physiology* 91°: 421-443.
- Barton, E. D., Tanner, P., Steven, R., Turchen, S. G., Tunget, C. L., Manoguerra, A., Clark, R. F., 1995. Ciguatera fish poisoning - a Southern California epidemic. *Western Journal of Medicine*; 163 :31-35.
- Baud, V., Karin, M., 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *TRENDS in Cell Biology*, 11(9) : 372-377.
- Bechtold, D. A., Smith, K. J., 2005. Sodium-related axonal degeneration in inflammatory demyelinating disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 233 : 27-35.
- Benoit, E., Legrand, A. M., Dubois, J. M., 1986. Effects of ciguatoxin on current and voltage clamped frog myelinated nerve fibre. *Toxicon*, 24 : 357-364.
- Benoit, E., Legrand, A.-M., 1994. Gambiertoxin-induced modifications of the membrane potential of myelinated nerve fibres. *Memoirs of the Queensland Museum*, 34 (3) : 461-464.
- Benoit, E., Juzans, P., Legrand, A.-M., Molgó, J., 1996. Nodal swelling produced by ciguatoxin-induced selective activation of nerve sodium channels in myelinated nerve fibers. *Neuroscience*, 71 : 1121-1131.
- Benoit, E., Laurent, D., Mattei, C., Legrand, A.-M., Molgó, J., 2000. Reversal of Pacific-ciguatoxin-1B effects on myelinated axons by agents used in ciguatera treatment. *Cybum*, 24(3) suppl. : 33-40.
- Benoit, E., Boydrón-La Grrec, R., Sauviat, M.-P., 2005. Implication de la nociception cutanée dans l'intoxication de type ciguatéra. *Rencontre en Toxinologie 2005*, 123-132.
- Bidard, J.-N., Vijverberg, H. P. M., Frelin, C., Chungue, E., Legrand, A.-M., Bagnis, R., Lazdunski, M., 1984. Ciguatoxin is a novel type of Na<sup>+</sup> channel toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 259 :8353-8357.

- Bodgan, C., Vodovotz, Y., Paik, J., Xi, Q.-X., Nathan, C., 1994. Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophage. *Journal of Leukocyte and Biology*, 55 : 227-233.
- Bogdan, C., 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*, 2 : 907-916.
- Bourdelaïs, A. J., Campbell, S., Jacocks, H., Naar, J., Wright, J. L. C., Carsi, J., Baden, D. G., 2004. Brevenal is a natural inhibitor of brevetoxin action in sodium channel receptor binding assays. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 24 : 553–563.
- Bourdelaïs, A. J., Jacocks, H. M., Wright, J. L. C., Bigwarfe, P. M., Baden, D. G., 2005. A new polyether ladder compound produced by dinoflagellate *Karenia brevis*. *Journal of Natural Products*, 68(1): 2-6.
- Bourdy, G., Cabalion, P., Amade, P., Laurent, D., 1992. Traditional remedies used in the Western Pacific for the treatment of ciguatera poisoning. *Journal of Ethnopharmacology*, 36 : 163-174.
- Bourée, P., Quod, J.-P., Turquet, J., 2002. L'ichtyosarcotisme de type ciguatera. *Revue Française des Laboratoires*, 342 : 65-70.
- Boydron-Le Garrec, R., 2005. Evaluation du potentiel thérapeutique de plantes traditionnellement utilisées dans le Pacifique pour traiter l'intoxication ciguatérique. Thèse de Doctorat soutenue le 22 avril 2005, Université de la Nouvelle-Calédonie.
- Boydron-Le Garrec, R., Benoit, E., Sauviat, M.-P., Lewis, R. J., Molgó, J., Laurent, D., 2005. Ability of some plant extracts, traditionally used to treat ciguatera fish poisoning, to prevent the *in vitro* neurotoxicity produced by sodium channel activators. *Toxicon*, 46°:625-634.
- Billiau, A., Matthys, P., 2009. Interferon- $\gamma$ : a historical perspective. *Cytokines & Growth Factor Reviews*, 20 : 97-113.

- Birinyi-Strachan, L. C., Gunning, S. J., Lewis, R. J., Nicholson, G. N., 2005a. Block of voltage-gated potassium channels by Pacific ciguatoxin-1 contributes to increased neuronal excitability in rat sensory neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204°: 175– 186.
- Birinyi-Strachan, L. C., Gunning, S. J., Lewis, R. J., Nicholson, G. N., 2005b. Neuroprotectant effects of iso-osmolar D-mannitol to prevent Pacific ciguatoxin-1 induced alterations in neuronal excitability: A comparison with other osmotic agents and free radical scavengers. *Neuropharmacology*, 49°: 669-686.
- Blythe, D. G., Fleming, L. E., Ayyar, D. R., Sylvia (de) D., Baden, D., Schrank, K., 1994. Mannitol therapy for acute and chronic ciguatera fish poisoning. *Memoirs of Queensland Museum*, 34(3)°: 465-470.
- Bottein Dechraoui, M.-Y., Tiedeken, J. A., Persad, R., Wang, Z., Granade, H. R., Dickey, R. W., Ramsdell, J. S., 2005. Use of two detection methods to discriminate ciguatoxins. *Toxicon*, 46°: 261–270.
- Buchwald, D., Wener, M. H., Pearlman, T., Kith, P., 1997. Markers of inflammation and immune activation in chronic fatigue and chronic fatigue syndrome. *Journal of Rheumatology*, 24°: 372-376.
- Cameron, J., Flowers, A. E., Capra, A. E., 1991. Electrophysiological studies on ciguatera poisoning in man. II. *Journal of the Neurological Sciences*, 101(11)°: 93-97.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell J. B., 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay. *Cancer Research*, 47°: 943-946.
- Cannon, J. G., Angel, J. B., Ball, R. W., Abad, L., W., Fagioli, L., Komaroff, A., L., 1999. Acute phase responses and cytokine secretion in chronic fatigue syndrome. *Journal of Clinical Immunology*, 19(6)°: 414-420.

- Cannon, J. G., 2000. Inflammatory cytokines in nonpathological states. *News in Physiological Sciences*, 15°: 298- 303.
- Cavaillon, J.-M., 1995. L'inflammation°: un équilibre précaire entre cytokines pro- et anti-inflammatoire. *Revue Française des Laboratoires*, n°276.
- Cestèle, S., Catterall, W. A., 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochemistry*, 82°: 883-892.
- Chai, Z., Gatti, S., Toniatti, C., Poli, V., Bartfai, T., 1996. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*, 183°: 311-31.
- Chan, T. Y. K., Kwok, T. C. Y., 2001. Chronicity of neurological features in ciguatera fish poisoning. *Human & Experimental Toxicology*, 20(8)°: 426-428.
- Chateau-Degat, M.-L., Chinain, M., Cerf, N., Gingras, S., Hubert, B., Dewailly, E., 2005. Seawater temperature, *Gambierdiscus* spp. variability and incidence of ciguatera poisoning in French Polynesia. *Harmful Algae*, 4°: 1053-1062.
- Château-Degat, M.-L., Huin-Blondey, M.-O., Chinain, M., Darius, T., Legrand, A.-M., Nguyen, N. G., Laudon, F., Chansin, R., Dewailly, E., 2007a. Prevalence of chronic symptoms of ciguatera disease in French Polynesian adults. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(5) : 842–846.
- Chateau-Degat, M.-L., Beuter, A., Vauterin, G., Nguyen, N. L., Chinain, M., Darius, T., Legrand, A.-M., Chansin, R., Dewailly, E., 2007b. Neurologic signs of ciguatera disease: evidence of their persistence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(6) :1170–1175.

- Chaudhuri, A., Watson, W. S., Pearn, J., Behan, P. O., 2000. The symptoms of chronic fatigue syndrome are related to abnormal ion channel function. *Medical Hypothesis*, 54(1) : 59–63.
- Chinain, M., Germain, M., Deparis, X., Pauillac, S., Legrand, A.-M., 1999a. Seasonal abundance and toxicity of the dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae), the causative agent of ciguatera in Tahiti, French Polynesia. *Marine Biology*, 135 : 259–267.
- Chinain, M.; Faust, M. A.; Pauillac, S., 1999b. Morphology and molecular analyses of three toxic species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae): *G. pacificus* sp. nov., *G. australes*, sp. nov. and *G. polynesiensis*, sp. nov.. *Journal of Phycology*, 35 : 1282-1296.
- Chinain, M., Darius, H. T., Ung, A., Tchou Fouc, M., Revel, T., Cruchet, P., Pauillac, S., Laurent, D. 2009. Ciguatera Risk Management in French Polynesia: the case study of Raivavae Island (Australes Archipelago). *Toxicon*, doi: 10.1016/j.toxicon.2009.05.032.
- Conner, E.M., Grisham, M.B., 1995. Nitric oxide: biochemistry, physiology and pathophysiology. *Methods: a Companion to Methods in Enzymology*, 7 :3-13.
- Crump, J.A., McLay, C.L., Chambers, S.T., 1999. Ciguatera fish poisoning. *Postgraduate Medicine Journal*, 75 : 678-679.
- Dalakas, M. C., Hohlfeld, R., 2003. *The Lancet*, 262 : 971–982.
- Davis, R. T.; Villar, L. A. 1986. Symptomatic improvement with amitriptyline in ciguatera fish poisoning. *New England Journal of Medicine*, 315 : 65.
- 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.
- Dinareello, C. A., Cannon, J. G., Wolff, S. M., Bernehim, H. A., Beutler, B., Cerami, A., Figari, I. S., Palladino, M. A., O'Connor, J. V., 1986. Tumor necrosis factor (cachecine) is

- an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1. *Journal of Experimental Medicine*, 163 : 1433-1450.
- Dinarello, C. A., 1988. Biology of interleukin 1. *FASEB Journal*, 2°: 108-115.
- Dinnarello, C. A., 2000. Proinflammatory cytokines. *CHEST*, 118(2)°: 503-508.
- Doherty, M. J., 2005. Captain Cook on poison fish. *Neurology*, 65 : 1788-1791.
- Dor, M., 1937. Explication zoologique des prescriptions alimentaires de la Bible et du Talmud. *Bulletins et Mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris*, 8(1) : 63 – 70.
- Eastaugh, J. A., 1996. Delayed use of intravenous mannitol ciguatera (fish poisoning). *Annals of Emergency Medicine*, 28(1) : 105-106.
- Endean, R., Griffith, J. K., Llewellyn, L. E., Monks, S. A., 1993. Apparent relationships between toxins elaborated by the cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* and those present in the flesh of the narrow-barred Spanish mackerel *Scomberomorus commersoni*. *Toxicon*, 31 : 1155-1165.
- Exley, A. R., Smith, N., Winer, J. B., 1994. Tumour necrosis factor- $\alpha$  and other cytokines in Guillain-Barre syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 57 : 1118-1120.
- Faust, M. A., 1995. Observation of sand-dwelling toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from widely differing sites, including two new species, *Journal of Phycology*, 31 : 996–1003.
- Fenner, P., Lewis, R., 2001. Ciguatera (fish poisoning). *Channelopathies of the Nervous System*, Butterworth Heinemann, Rose M.G. and Griggs R.C. Ed., pp 295-307.
- Figarella-Branger, D., Civatte, M., Bartolli, C., Pellissier, J.-F., 2003. Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. *Muscle Nerve*, 28 : 659-682.
- Fleming, L. E., Broad, K., Clement, A., Dewailly, E., Elmir, S., Knap, K., Pomponi, S. A., Smith, S., Gabriele, H. S., Walsh, P., 2006. Oceans and human health: Emerging public health risks in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 53 : 545–560.

- Friedman, M. A., Arena, P., Levin, B., Fleming, L., Fernandez, M., Weisman, R., Bernstein, J., Schrank, K., Blythe, D., Backer, L., Reich, A., 2007. Neuropsychological study of ciguatera fish poisoning: a longitudinal case-control study. *Archives of Clinical Neuropsychology*, 22 : 545–553.
- Friedman, M. A., Fleming, L. F., Fernandez, M., Bienfang, P., Schrank, K., Dickey, R., Bottein, M.-Y., Backer, L., Ayyar, R., Weisman, R., Watkins, S., Granade, R., Reich, A., 2008. Ciguatera fish poisoning: treatment, prevention and management. *Marine Drugs*, 6 : 456-479.
- Gatti, C., Oelher, E., Legrand, A.-M., 2008. Severe seafood poisoning in French Polynesia: a retrospective analysis of 129 medical files. *Toxicon*, 51 : 746–753.
- Geller, R. J., Olson, K. R., Senécal, P. E., 1991: Ciguatera fish poisoning in San Francisco, California, caused by imported barracuda. *Western Journal of Medicine*, 155 :639-642.
- Geller, D. A., Lowenstein, C. J., Shapiro, R. A., Nussler, A. K., Di Silvio, M., Wang, S. C., Nakayama, D. K., Simmons, R. L., Snyder, S. H., Billiar, T. R., 1993. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proceedings of National Academic Science USA*, 90 : 3491-3495.
- Ghiaroni, V., Sasaki, M., Fuwa, H., Rossini, G. P., Scalera, G., Yasumoto, T., Pietra, P., Bigiani, A., 2005. Inhibition of voltage-gated potassium currents by gambierol in mouse taste cells. *Toxicological Sciences*, 85 : 657-665.
- Gillespie, N. C., Lewis, R. J., Pearn, J. H., Bourke, A. T.C., Holmes, M. J., Bourke, J. B., Shields, W. J., 1986. Ciguatera in Australia - Occurrence, clinical features, pathophysiology and management. *Medical Journal of Australia*, 145 (15) : 584-50.
- Glaziou, S., Martin, P. M. V., 1993. Study of factors that influence the clinical response to ciguatera fish poisoning. *Toxicon*, 31(9) : 1151-1154.



- Glaziou, P., Legrand, A.-M., 1994. The epidemiology of ciguatera fish poisoning. *Toxicon*, 32 (8) : 863-876.
- Gollubic, S., Abed, R. M. M., Palińska, K., Pauillac, S., Chinain, M., Laurent, D., 2009. Marine toxic cyanobacteria: Diversity, environmental responses and hazards. *Toxicon*, sous presse, doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.023.
- Gollop, J. H., Pon, E. W., 1992. Ciguatera: a review. *Hawaii Medical Journal*, 51(4) : 91-99.
- Gupta, S., Aggarwal, S., See, D., Starr, A., 1997. Cytokine production by adherent and non-adherent mononuclear cells in chronic fatigue syndrome. *Journal of Psychiatric Research*, 31(1): 149-156.
- Guzik, T. J., Korb, R., Adamek-Guzik, T., 2003. Nitric oxide & superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54:469-487.
- Hamilton, B., Hurlburt, M., Vernoux, J.-P., Jones, A., Lewis, R. J., 2002. Isolation and characterisation of Indian ocean Ciguatoxin. *Toxicon*, 40:685-693.
- Hanson, S. J., Gause, W., Natelson, B., 2001. Detection of immunologically significant factors for chronic fatigue syndrome using neural-network classifiers. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(3): 658-662.
- Hart, P. H., Vitti, G. F., Burgess, D. R., Whitty, G. A., Piccoli, D. S., 1989. Potential antiinflammatory effects of interleukin-4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1, and prostaglandin E2. *Proceedings of National Academic of Science USA*, 86: 3803-3807.
- Haro (de), L., Pommier, P., Valli, M., 2003. Emergence of imported ciguatera in Europe: report of 18 cases at the Poison Control Centre of Marseille. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 41 (7): 927-930.
- Helfrich, P., Banner, A. H., 1963. Experimental induction of ciguatera toxicity in fish through diet. *Nature*, 197: 1025-1026.

- Hidalgo, J., Liberona, J. L., Molgó, J., Jaimovich, E., 2002. Pacific ciguatoxin-1b effect over  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  currents, inositol 1,4,5-triphosphate content and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals in cultured rat myotubes. *British Journal of Pharmacology*, 137°: 1055-1062.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *BioTechnology*, 11°:1026-1030.
- Hirama, M., 2005. Total synthesis of ciguatoxin CTX3C: a venture into the problems of ciguatera seafood poisoning. *The Chemical Record*, 5°: 240–250.
- Holdsworth, D.K., 1977. Medicinal plants of Papua New Guinea. South Pacific Commission Technical Paper, Noumea, New Caledonia, n°175, p. 65.
- Holmes, M. J., 1998. *Gambierdiscus yasumotoi* sp. Nov. (Dinophyceae), a toxic benthic dinoflagellate from Southeastern Asia. *Journal of Phycology*, 34°: 661–668.
- Hughes, R. A. C., Hadden, R. D. M., Gregson, N. A., Smith, K. J., 1999. Pathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *Journal of Immunology*, 100°: 74-97.
- Inoue, M., Hirama, M., Satake, M., Sugiyama, K., Yasumoto, T., 2003. Inhibition of brevetoxin binding to the voltage-gated sodium channel by gambierol and gambieric acid-A. *Toxicon* 41°: 469–474.
- Inoue, M., Miyazaki, K., Uehara, H., Maruyama, M., Hirama, M., 2004. First- and second-generation total synthesis of ciguatoxin CTX3C. *PNAS U.S.A.*, 101°: 12013–12018.
- Inoue, M., Lee, N., Tsumuraya, T., Fujii, I., Hirama, M., 2009. Use of monoclonal antibodies as an effective strategy for treatment of ciguatera poisoning. *Toxicon*, doi:10.1016/j.toxicon.2009.02.017.
- Isaacs, A., Lindenmann, J., 1957. Virus interference. I. Interferons. *Proceeding of the Royal Society of London Serie B: Biological Sciences*, 147°: 258-267.
- Isbister, G. K., Kiernan, M. C., 2005. Neurotoxic marine poisoning. *Lancet Neurology*; 4°: 219–28.

- Jame, M., Crabbe, C., 2008. Climate change, global warming and coral reefs: Modelling the effects of temperature. *Computational Biology and Chemistry*, 32 : 311–314.
- Jong, L. A. A., Uges, D. R. A., Franke, J. P., Bischoff, R., 2005. Receptor-ligand binding assays: technologies and applications. *Journal of Chromatography B*, 829 : 1-25.
- Kim, Y.-M., Talanian, R. V., Li, J., Billiar, T. R., 1998. Nitric oxide prevents IL-1b and IFN- $\gamma$ -inducing factor (IL-18) release from macrophages by inhibiting caspase-1 (IL-1b-Converting Enzyme). *The Journal of Immunology*, 161 : 4122–4128.
- Klimas, N. G., Salvato, F. R., Morgan, R., Fletcher, M. A., 1990. Immunologic abnormalities in chronic fatigue syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(6) : 1403-1410.
- Kunkel, S. L., Spengler, M., May, M. A., Spengler, R., Larrick, J., Remick, D., 1988. *Journal of Biological Chemistry*, 263 : 5380-5384.
- Kogure, K., Tamplin, M. L., Simidu, U., Colwell, R. R., 1988. A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. *Toxicon*, 26(2): 191-197.
- Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S., Appel, L. J., 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *AHA Scientific Statement, Circulation* 106: 2747-2757.
- Larsson, S. C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., Wolk, A., 2004. Dietary long-chain n $\omega$ -3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 935– 45.
- Laurent, D., Joannot, P., Amade, P., Maesse, P., Colmet-Daage, B., 1992. Knowledges on ciguatera in Noumea (New Caledonia). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 85 : 520.
- Laurent, D., 1993. La ciguatera : une intoxication liée à la consommation de poisons tropicaux. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 73: 6-19.

- Laurent, D., Bourdy, G., Amade, P., Cabalion, P., Bourret, D., 1993. La gratte ou ciguatéra : ses remèdes traditionnels dans le Pacifique Sud. ORSTOM Editions, Paris, pp. 51-116.
- Laurent, D., Yeeting, B., Labrosse, P., Gaudechoux, J.-P., 2005. Ciguatera: a field reference guide. Editions IRD, Secretariat of the Pacific Community (SPC), ISBN°: 2-7099-1556-1, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
- Laurent, D., Kerbrat, A.-S., Darius, H. T., Girard, E., Golubic, S., Benoit, E., Sauviat, M.-P., Chinain, M., Molgo, J., Pauillac, S., 2008. Are cyanobacteria involved in Ciguatera Fish Poisoning-like outbreaks in New Caledonia? Harmful Algae, 7(6) °: 827-838.
- Lechuga-Devéze, C. H., Sierra-Beltran, A. P., 1995. Documented case of ciguatera on the Mexican Pacific Coast. Natural Toxins, 3°: 415-418.
- Legrand, A.-M., Bagnis, R., 1991. La ciguatéra : un phénomène d'écotoxicologie des récifs coralliens. Annales de l'Institut Pasteur, 4 : 253-266.
- Lehane, L., Lewis, R.J., 2000. Ciguatera: recent advances but the risk remains. International Journal of Food Microbiology, 61 (2-3) : 91-125.
- LePage, K. T., Rainier, J. D., Johnson, H. W. B., Baden, D. G., Murray, T. F., 2007. Gambierol acts as a functional antagonist of neurotoxin site 5 on voltage-gated sodium channels in cerebellar granule neurons. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 323(1): 174–179.
- Lepidi, H., Frances, V., Figarella-Branger, Bartolli, C., Machado-Baeta, A., Pellissier, J.-F., 1998. Local expression of cytokines in idiopathic inflammatory myopathies. Neuropathology and Applied Neurobiology, 24: 73-79.
- Lewis, R. J., Sellin, M., Poli, M. A., Norton, R. S., MacLeod, J. K., Sheil, M. M., 1991. Purification and characterization from moray eel (*Lycodontis javanicus*, Muraenidae). Toxicon, 29(9) : 1115-1127.

- Lewis, R. J., Holmes, M. J., 1993. Origin and transfer of toxins involved in ciguatera. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 106 (3) : 615-28.
- Lewis, R. J., Ruff, T. A., 1993. Ciguatera: ecological, clinical, and socioeconomic perspectives. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 23(2) : 137-156.
- Lewis, R. J., Hoy, A. W., Sellin, M., 1993. Ciguatera and mannitol: *in vivo* and *in vitro* assessment in mice. *Toxicon*, 31(8): 1039-1050.
- Lewis, R. J., Jones, A., 1997. Characterization of ciguatoxins and ciguatoxin congeners present in ciguateric fish by gradient reverse-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Toxicon*, 35 : 159-168.
- Lewis, R. J., 2001a. The changing face of ciguatera. *Toxicon*, 39 : 97-106.
- Lewis, R. J., 2001b. La lutte contre la ciguatera. *Ressources marines et commercialisation*, *Bulletin de la Commission du Pacifique Sud*, 7 : 11-13.
- Limousin, P., Bessières, E., 2006. *Oceania Planta Medica : flore de Kanaky*, Tome I, Au bord de mer. Bibliothèque de Nouméa, Poindimié, Nouvelle-Calédonie, pp. 102-104.
- Litaker, R. W., Vandersea, M. W., Kibler, S. R., Faust, M. A., Chinain, M., Holmes, M. J., Holland, C., Tester, P. A. 2009. Taxonomy of *Gambierdiscus* including four new species, *Gambierdiscus caribaeus*, *Gambierdiscus carolinianus*, *Gambierdiscus carpenteri* and *Gambierdiscus ruetzleri* (Gonyaulacales, Dinophyceae). *Phycologia* 48(5) : 344-390.
- Lombet, A., Bidard, J.-N., Lazdunski, M., 1987. Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na<sup>+</sup> channel. *FEBS Letters*, 219 : 355-359.

- Louzao, M. C., Cagide, E., Vieytes, M. R., Sasaki, M., Fuwa, H., Yasumoto, T., Botana, L. M., 2006. The sodium channel of human excitable cells is a target of gambierol. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 17 : 257-268.
- Lundberg, I., Ulfgren, A. K., Nyberg, P., Andersson, U., Klaresberg, L., 1997. Cytokine production in muscle tissue of patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis rheumatology*, 40(5): 865-874.
- Malinowsky, D., Chai, Z., Bristulf, J., Simoncsits, A., Bartfai, T., 1995. The type 1 interleukin-1 receptor mediates fever in the rat as shown by interleukin-1 receptor subtype selective ligands. *Neuroscience Letters*, 201(1): 33-36.
- Manger, R. L., Leja, L. S., Lee, S. Y., Hungerford, J. M., Wekell, M. M., 1993. Tetrazolium-based cell bioassays for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: semiautomated assay for saxitoxins, brevéttoxines, and ciguatoxins. *Analytical Biochemistry*, 214: 190-194.
- Manger, R. L., Leja, L. S., Lee, S. Y., Hungerford, J. M., Wekell, M. M., 1994a. Cell bioassay for the detection of ciguatoxins, brevetoxins, and saxitoxins. *Memoirs of the Queensland Museum* 34: 571-575.
- Manger, R. L., Lee, S. Y., Leja, L. S., Hungerford, J. M., Hokama, Y., Dickey, R. W., Granade, H. R., Lewis, R., Yasumoto, T., Wekell, M. M., 1994b. *In vitro* analysis of Ciguatoxin, Brevetoxin, and Saxitoxin. *International Symposium on Ciguatera and Marine Natural Products South Kohala, Hawaii*, 1994.
- 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 of purified ciguatoxins, brevetoxins, saxitoxins, and seafood extracts. *Journal of AOAC International*, 78: 521-527.

- Manger, R. L., Leja, L. S., Lee, S. Y., Hungerford, J. M., Kirkpatrick, M. A., Yasumoto, T., Wekell, M. M., 2003. Detection of paralytic shellfish poison by rapid cell bioassay: antagonism of voltage-gated sodium channel active toxins *in vitro*. Journal of AOAC International 86°: 540-543.
- Manner, H. I., Elevitch, C. R., 2006. *Tournefortia argentea* (tree heliotrope), ver. 3.1. Dans : Elevitch, C.R. (ed.). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. Permanent Agriculture Resources (PAR), Hōlualoa, Hawaii, <http://www.traditionaltree.org>.
- Mattei, C., Benoit, E., Juzans, P., Legrand, A.-M., Molgó, J., 1997. Gambiertoxin (CTX-4B), purified from wild *Gambierdiscus toxicus* dinoflagellates, induces Na<sup>+</sup>-dependent swelling of single frog myelinated axons and motor nerve terminals in situ. Neuroscience Letters, 234 : 75-78.
- Mattei, C., Dechraoui, M.-Y., Molgó, J., Meunier, F. A., Legrand A.-M., Benoit, E., 1999a. Neurotoxins targeting receptor site 5 of voltage-dependent sodium channels increase the nodal volume of myelinated. Journal of Neuroscience Research, 55 : 666-673.
- Mattei, C., Molgó, J., Marquais, M., Vernoux, J.-P., Benoit, E., 1999b. Hyperosmolar D-mannitol reverses the increased membrane excitability and the nodal swelling caused by Caribbean ciguatoxin-1 in single frog myelinated axons. Brain Research, 847 : 50-58.
- Mattei, C., Wen, P. J., Nguyen-Huu, T. D., Alvarez, M., Benoit, E., Bourdelais, A. J., Lewis, R. J., Baden, D. G., Molgó, J., Meunier, F. A., 2008. Brevenal inhibits Pacific Ciguatoxin-1B-induced neurosecretion from bovine chromaffin cells. PLoS ONE, 3(10) : e3448.
- Meché (van der), F. G., Doorn (van), P. A., 1995. Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory polyneuropathy: immune mechanisms and update on current therapies. Annals of Neurology, 37 (suppl. 1) : S14-31.

- Miranda, K. M., Espey, M. G., Wink, D. A., 2001. A rapid spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 5 :62-71.
- Molgó, J., Juzans, P., Legrand, A.-M., 1994. Confocal laser scanning microscopy: a new tool for studying the effects of ciguatoxin (CTX-1B) and D-mannitol at motor nerve terminals of the neuromuscular junction *in situ*. *Memoirs of the Queensland Museum*, 34 (3) : 577-585.
- Moncada, S., Higgs, A., 1993. The L-Arginine-Nitric oxide pathway. *The New England Journal of Medicine*, 329 :2002-2012.
- Morey, J. S., Ryan, J. C., Bottein Dechraoui, M.-Y., Rezvani, A. H., Levin, E. D., Gordon, C. J., Ramsdell, J. S., Van Dolah, F. M., 2008. Liver Genomic Responses to Ciguatoxin: Evidence for Activation of Phase I and Phase II Detoxification Pathways following an Acute Hypothermic Response in Mice. *Toxicological Sciences*, 103(2) : 298–310.
- Morohashi, A., Satake, M., Nagai, H., Oshima, Y., Yasumoto, T., 2000. The absolute configuration of gambieric acids A–D, potent antifungal polyethers, isolated from the marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Tetrahedron* 56 : 8995-9001.
- Morrison, J., 1935. *Journal of James Morrison, boats wain's mate of the Bounty*. Published in 1935 by Golden Cockrell Press. London, pp. 129-130.
- Morrison, K., Prieto, P., A., Domínguez, D., C., Waltner-Toews, D., FitzGibbon, J., 2008. Ciguatera fish poisoning in La Habana, Cuba: A study of local social–ecological resilience. *EcoHealth* 5 : 346–359.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 : 55-63.
- Moullignier, A., Binet, D., Frottier, J., 1995. Ciguatera fish poisoning: also in Europe. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 59 : 192-199.



- Murata, M., Legrand, A.-M., Ishibashi, Y., Fukui, M., Yasumoto, T., 1990. Structures and configurations of ciguatoxin from the Moray Eel *Gymnothorax javanicus* and its likely precursor from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. Journal of American Chemical Society, 112 : 4380-4386.
- Miyahara, J. T., Akau, C. K., Yasumoto, T., 1979. Effects of ciguatoxins and maitotoxin on the isolated guinea pig atria. Research Communication of Chemical and Pathological Pharmacology, 25 :177-179.
- Narayan, Y., 1980. Fish poisoning in Fiji. Fiji Medicine Journal, 8 : 567.
- Natelson, B. H., Haghighi, M. H., Ponzio, N. M., 2002. Evidence for the presence of immune dysfunction in chronic fatigue syndrome. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 9(4)<sup>o</sup>: 747-752.
- National Oceanic and Atmosphere Administration (NOAA), 2004. Fisheries of the United States, 2003. Silver Spring, MD: National Marine Fisheries Service.
- Nicholson, G. M., Lewis, R. J., 2006. Ciguatoxins: cyclic polyether modulators of voltage-gated ion channel function. Marine Drugs, 4 : 82-118.
- Nouvelles (Les) de Tahiti, 2009. L'obésité, la maladie du Pacifique. Pacific News PAD, 28 août 2009, <http://www.lesnouvelles.pf/monde/oceanie/3852-lobesite-la-maladie-du-pacifique.html>
- Opal, S. M., DePalo, V. A., 2000. Anti-inflammatory cytokines. CHEST, 117 : 1162-1172.
- Overbergh, L., Giulietti, A., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. Mathieu, C., 2003. The use of Real-Time Reverse Transcriptase PCR for the quantification of Cytokine gene expression. Journal of Biomolecular Technology, 14 : 33-43.
- Palafox, N. A., Jain, L. G., Pinano, A. Z., Gulick, T. M., Williams, R. K., 1988. Successful treatment of ciguatera fish poisoning with intravenous mannitol. JAMA, 259 : 2740-2742.

- Pauillac, S., Sasaki, M., Inoue, M., Naar, J., Branaa, P., Chinain, M., Tachibana, K., Legrand, A.-M., 2000. Characterization of mice antisera elicited with a ciguatoxin tetracyclic synthetic ring fragment (JKLM) conjugated to carrier proteins. *Toxicon*, 38 : 669-685.
- Pearn, J. H., 1979. Chronic fatigue syndrome: chronic ciguatera poisoning as a differential diagnosis. *Medicine Journal of Australia*, 166 : 309–310.
- Pearn, J. H., Lewis, R. J., Ruff, T., Tait, M., Quinn, J., Murtha, W., King, G., Mallett, A., Gillespie, N. C., 1989. Ciguatera and mannitol: experience with a new treatment regimen. *Medical Journal of Australia*, 151 : 77-80.
- Pearn, J., 1996. Chronic ciguatera: one organic cause of the chronic fatigue syndrome. *Journal of Chronic Fatigue Syndrome*, 2(2/3) : 29-34.
- Pearn, J., 2001. Neurology of ciguatera. *Journal of Neurological Neurosurgery and Psychiatry*, 70 : 4-8.
- Perez, C. M., Vasquez, P. A., Perret, C. F., 2001. Treatment of ciguatera poisoning with gabapentin. *New England Journal of Medicine*, 344 : 692-693.
- Poli, M. A., Mende, T. J., Baden, D. G., 1986. Brevetoxins, unique activators of voltage sensitive sodium channels, bind to specific sites in rat brain synaptosomes, *Molecular Pharmacology*, 30 : 129–135.
- Poli, M. A., Lewis, R. J., Dickey, R. W., Musser, S. M., Buckner, C. A., Carpenter, L. G., 1997. Identification of Caribbean ciguatoxins as the cause of an outbreak of fish poisoning among U.S. soldiers in Haiti. *Toxicon*, 35 : 733-741.
- Pottier, I., Vernoux, J.-P., Lewis, R. J., 2001. Ciguatera fish poisoning in the Caribbean islands and Western Atlantic. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 168: 99-141.
- Pottier, I., Vernoux, J.-P., 2003. Evaluation de la ciguatoxicité de poissons des Antilles par les bioessais souris et poussin. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 96(1) : 24-28.

- Pottier, I., Vernoux, J.-P., Jones, A., Lewis, R. J., 2003a. Characterisation of multiple aribbean ciguatoxins and congeners in individual specimens of horse-eye jack (*Caranx latus*) by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Toxicon*, 40 : 929-939.
- Pottier, I., Hamilton, B., Jones, A., Lewis, R. J., Vernoux, J.-P., 2003b. Identification of slow and fast-acting toxins in a highly ciguatoxic barracuda (*Sphyraena barracuda*) by HPLC/MS and radiolabelled ligand binding. *Toxicon*, 42°: 663-672.
- Purcell, C. E., Capra, M. F., Cameron, J., 1999. Action of mannitol in ciguatoxin-intoxicated rats. *Toxicicon*, 37: 67-76.
- Quod, J. P., Turquet, J., 1996. Ciguatera in Réunion Island (SW Indian Ocean): epidemiology and clinical patterns. *Toxicon*, 34(7)°: 779-785.
- Randall, J. E., 1958. A review of ciguatera, tropical fish poisoning, with a tentative explanation of its cause. *Bulletin of Marine Science of Gulf and Caribbean*, 8(3)°: 236-267.
- Rageau, J., 1973. Les plantes médicinales de la Nouvelle-Calédonie. Travaux et documents de l'ORSTOM, ORSTOM Edition n° 23, Noumea, Nouvelle-Calédonie, pp. 104-105.
- Revillard, J. P., 2001. Dans : Immunologie, Association des enseignants d'immunologie des universités de langue française, 4<sup>ème</sup> Édition, De Boeck Université, Bruxelles.
- Ryan, J. C., Bottein Dechraoui, M.-Y., Morey, J. S., Rezvani, A., Levin, E. D., Gordon, C. J., Ramsdell, J. S., Van Dolah., F. M., 2007. Transcriptional profiling of whole blood and serum protein analysis of mice exposed to the neurotoxin Pacific Ciguatoxin-1. *NeuroToxicology*, 28°: 1099–1109.
- Ruff, T. A., Lewis, R. J., 1994. Clinical aspects of ciguatera: an overview. *Memoirs of the Queensland Museum*, 34°: 609-619.

- Satake, M., Murata, M., Yasumoto, T., 1992. Gambierol: a new toxic polyether compound isolated from the marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. Journal of American Chemical Society, 115°: 361-362.
- Satake, M., Fukui, M., Legrand, A.-M; Cruchet, P., Yasumoto, T., 1998. Isolation and structures of new ciguatoxin Analogs, 2,3-DihydroxyCTX3C and 51-HydroxyCTX3C, accumulated in tropical reef fish. Tetrahedron Letters, 39°: 1197-1198.
- Sauviat, M.-P., Boydron-Le Garrec, R., Masson, J.-B., Lewis, R. J., Vernoux, J.-P., Molgo, J., Laurent, D., Benoit, E., 2006. Mecanisms involved in the swelling of erythrocytes caused by Pacific and Caribbean ciguatoxins. Blood Cells, Molecules and Diseases, 36°:1-9.
- Sayer, A., Hu, Q., Bourdelais, A. J., Baden, D. G., Gibson, J. E., 2005. The effect of brevenal on brevetoxin-induced DNA damage in human lymphocytes. Archives of Toxicology, 79(11)°: 683-688.
- Scheuer, P. J., Takahashi, W., Tsutsumi, J., Yoshida, T., 1967. Ciguatoxin: isolation and chemical nature. Science, 155°: 1267-1268.
- Schnorf, H., Taurarii, M., Cundy, T., 2002. Ciguatera fish poisoning: a double-blind randomized trial of mannitol therapy. Neurology, 58°: 873-880.
- Schwarz, E. S., Mullins, M. E., Brooks, C. B., 2008. Annals of Emergency Medicine, 52(4)°: 476-477.
- Sheremata, W. A., Ross E. Rocklin, David, J., 1974. Cellular hypersensitivity in Guillain-Barré Syndrome. CMA Journal, 110: 1245-1247.
- Shimizu, Y., Chou, H.-N., Bando, H., 1986. Structure of Brevetoxin A (GB-1 Toxin), the most potent toxin in the Florida red tide organism *Gymnodinium breve* (*Ptychodiscus brevis*). Journal of American Chemistry Society, 108°: 514-5 15.

- Slater, T.F., Sawyer, B., Straeuli, U., 1963. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems III. Points coupling of four different tetrazolium salts. *Biochemical and Biophysical Acta* 77°: 383-93.
- Solomona, D. M., Tuatai1, T., Vuki, V., Koroa1, M., 2009. Decadal changes in subsistence fishing and seafood consumption patterns on Rarotonga, Cook Islands. *SPC Women in Fisheries Information Bulletin* #19 – février 2009.
- Stewart, M. P., 1991. Ciguatera fish poisoning: treatment with intravenous mannitol. *Tropical Doctor*, 21(2)°: 54-55.
- Stommel, E.W., Parsonnet, J., Jenkyn, L.R., 1991. Polymyositis after ciguatoxin toxin exposure. *Archives of Neurology*, 48 : 874–877.
- Stommel, E.W., Jenkyn, L.R., Parsonnet, J., 1993. Another case of polymyositis after ciguatera toxin exposure. *Archives of Neurology*, 50(6) : 571.
- Stordeur, P., Poulin, L. F., Cracium, L., Zhou, L., Schandéné, L., de Lavareille, A., Goriely, S., Goldman, M., 2002. Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. *Journal of Immunological Methods* : 259:55-64.
- Strachan, L. C., Lewis, R. J., Nicholson, G. M., 1999. Differential actions of Pacific ciguatoxin-1 on sodium channel subtypes in mammalian sensory neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288°: 379-388.
- Stuehr, D. J., 1999. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1411 : 217-230.
- Tahiti Presse, 2009. Obésité et maladies non transmissibles, deux grands problèmes de santé dans le Pacifique. Agence Tahitienne de Presse, 20 août 2009, <http://www.tahitipresse.pf/2009/08/obesite-et-maladies-non-transmissibles-deux-grands-problemes-de-sante-dans-le-pacifique/> .

- Ting, J. Y. S., Brown, A. F. T., 2001. Ciguatera poisoning: a global issue with common management problems. *European Journal of Emergency Medicine*, 8°: 295-300.
- Tournadre, A., Miossec, P., 2007. Cytokines response in inflammatory myopathies. *Current Rheumatology Report*, 9(4)°: 286-290.
- Trainer, V. L., Baden, D. G., Catterall, W. A., 1994. Identification of peptide components of the brevetoxin receptor site of rat brain sodium channels. *Journal of Biological Chemistry* 269°: 19904-19909.
- Ulbricht, W., Flacke, W., 1965. After-potentials and large depolarizations of single nodes of Ranvier treated with veratridine. *Journal of General Physiology* 48°: 1035-1048.
- Velde (te), A. A., Huijibens, R. J. F., Heije, K., Vreis (de), J. E., Figdor, C. G., 1990. Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ , and IL-6 by human monocytes. *Blood*, 76(7)°: 1392-1397.
- Vernoux, J.-P., Lewis, R. J., 1997. Isolation and characterisation of Caribbean ciguatoxins from the horse-eye jack (*Caranx latus*). *Toxicon*, 35(6)°: 889-900.
- Villareal, T. A., Moore, C., Stribling, P., Van Dolah, F., Luber, C. G., Wenck, M. A., 2006. Ciguatera fish poisoning – Texas, 1998 and South Carolina, 2004. *JAMA*, 296°: 1581-1582.
- Villareal, T. A., Hanson, S., Qualia, S., Jester, E. L. E., Granade, H. R., 2007. Petroleum production platforms as sites for the expansion of ciguatera in the northwestern Gulf of Mexico. *Harmful Algae*, 6°: 253-259.
- Waal Malefyt (de), R., Abrams, J., Bennet, B., Figdor, C. G., Vries, J. E., 1991; Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. 174°: 1209-1220.
- Weinberg, J. B., Misukonis, M. A., Shami, P. J., Mason, S. N., Sauls, D. L., Dittman, W. A., Wood, E. R., Smith, G. K., McDonald, B., Bachus, K. E., Haney, A. F., Granger, D. L.,

1995. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide Synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood*, 86(3): 1184-1195.
- Whittle and Gallacher, 2000. Marine toxins. *British Medical Bulletin*, 56: 236-253.
- Wong, C., Hung, P., Lee, K.L.H., Kam, K., 2005. Study of an outbreak of ciguatera fish poisoning in Hong Kong. *Toxicon*, 46 : 563-571.
- World Health Organisation Regional Publications, 1998. Medicinal plant in the South Pacific, information on 102 commonly used plants in the South Pacific. Western Pacific Series n° 19, ISSN: 92 9061 1189.
- Yasumoto, T., Seino, N., Murakami, Y., Murata, M., 1987. Toxins produced by benthic dinoflagellates. *Biological Bulletin*, 72 : 128-131.
- Yasumoto, T., 2001. The chemistry and biological function of natural marine toxins. *Chemical Research*, 1 : 228-242.
- Yasumoto, T., 2005. Chemistry, etiology, and food chain dynamics of marine toxins. *Proceedings of the Japan Academy*, 81 (B) : 43-51.
- Yokohama, A., Murata, M., Oshima, T., Iwashita, T., Yasumoto, T., 1988. Some chemical properties of maitotoxin, a putative calcium channel agonist isolated from a marine dinoflagellate. *Journal of Biochemistry*, 104(2) :184–187.
- Zhang, Q., Zhou, X.-D., Denny, T., Ottenweller, J. E., Lange, G., Lamanca, J. J., Lavietes, M. H., Pollet, C., Gause, W. C., Natelson, B. H., 1999. Changes in immune parameters seen in Gulf War veterans but not in civilians with chronic fatigue syndrome. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(1): 6-13.





## **II. DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE LA TECHNIQUE DE PCR QUANTITATIVE**

*« Science sans conscience n'est que ruine de l'âme »*

Rabelais, *Pantagruel*



### **II.1. Introduction**

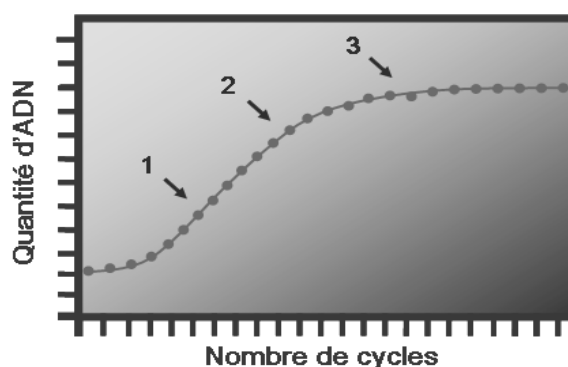
#### *II.1.1. Définition de la PCR conventionnelle*

##### II.1.1.1. Historique

Depuis la découverte de la structure en double hélice de l'ADN par James Watson et Francis Crick (1953), la recherche dans la compréhension de la régulation de l'expression génique n'a cessé de progresser. L'avènement de la PCR dans les « années 80 » a profondément bouleversé le monde de la biologie moléculaire (Mullis et al, 1986 ; Saiki et al, 1985 ; 1986), devenant par la suite une technique incontournable aussi bien pour le séquençage (Kretz et al, 1994), la détection d'organismes pathogènes en diagnostic clinique (McPherson, 1995 ; Collot et al, 2001 ; Verbeeck et al, 2008) que l'étude de l'expression génique (Norton et Batt, 1999 ; Liu et al, 2001). Le terme PCR correspond à l'acronyme anglophone de *Polymerase Chain Reaction* désignant en français la réaction de polymérisation en chaîne. Cette technique permet l'amplification de l'ADN à partir d'une faible quantité de matériel (Ferre, 1992 ; Overberg et al, 1999) et se base sur la capacité d'hybridation et de déshybridation des brins d'ADN complémentaires en fonction de la température. L'utilisation de couples d'amorces sens et anti-sens (également appelés *primers* en anglais) qui correspondent à deux séquences nucléotidiques d'une vingtaine de bases à partir desquels l'ADN est synthétisé, est combinée à l'activité enzymatique d'ADN polymérases thermostables telles que la *Taq* polymérase purifiée à partir de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* (Saiki et al, 1988 ; Eckert et Kunkel, 1991 ; Lawyer et al, 1993) ou encore la *Pfu* polymérase de l'archéobactérie *Pyrococcus furiosus* (Lundberg et al, 1991 ; Mathur, 1996). Cependant, les enzymes utilisées de nos jours sont modifiées afin de faciliter leur purification et augmenter leur efficacité de polymérisation (Comb et al, 1998).

### II.1.1.2. Phases de la PCR classique

La forme classique de la PCR consiste en plusieurs cycles de variation de température effectués dans un thermocycleur permettant l'amplification de l'ADN cible. La première étape s'effectuant à 95°C permet la séparation des deux brins d'ADN à amplifier puis les amorces viennent ensuite s'apparier sur chaque séquence d'ADN cible lors de la phase d'hybridation à une température proche de 60°C. L'ADN polymérase intervient alors à 72°C pendant la phase dite d'élongation en synthétisant les nouveaux segments d'ADN à partir des extrémités 3' des amorces (Hyndman et Mitsuhashi, 2003).



**Figure II.1.1.2.a°: Phases de la PCR conventionnelle**

*En début de PCR, les constituants sont en quantité suffisante et l'amplification de l'ADN s'effectue de manière à obtenir un doublement des amplicons à chaque cycle (1 ; phase exponentielle). Puis la cinétique de réaction diminue avec l'épuisement des composants du mix de PCR et la quantité d'ADN synthétisée diminue au cours du temps (2 ; phase linéaire) avant de s'arrêter en atteignant un plateau (3 ; phase de saturation).*

Il s'en suit théoriquement qu'à chaque cycle d'amplification de la PCR, la quantité d'ADN double selon une relation linéaire existant entre la quantité d'ADN synthétisée et le nombre de cycles d'amplification et définie selon l'équation  $N_t = N_0 (E + 1)^C$  où  $N_0$  et  $N_t$  correspondent respectivement à la quantité d'ADN initiale et à la quantité synthétisée au temps  $t$ ,  $C$  étant le nombre de cycles d'amplification, et  $E$ , l'efficacité d'amplification

## ***Partie II. Développement de la PCR quantitative***

---

(Rutledge et Côté, 2003). La valeur E est cependant variable selon l'évolution de la PCR qui peut être définie en 3 phases distinctes (Figure II.1.1.2.a) : 1) la phase exponentielle durant laquelle le doublement de la quantité de produits PCR se fait avec une efficacité E théoriquement maximale, la réaction étant hautement spécifique ; 2) la phase linéaire durant laquelle les composants étant épuisés, la réaction de polymérisation ralentie, l'efficacité diminuant alors ; 3) la phase de saturation où la réaction est arrêtée en atteignant un plateau d'amplification avec une efficacité quasi-nulle.

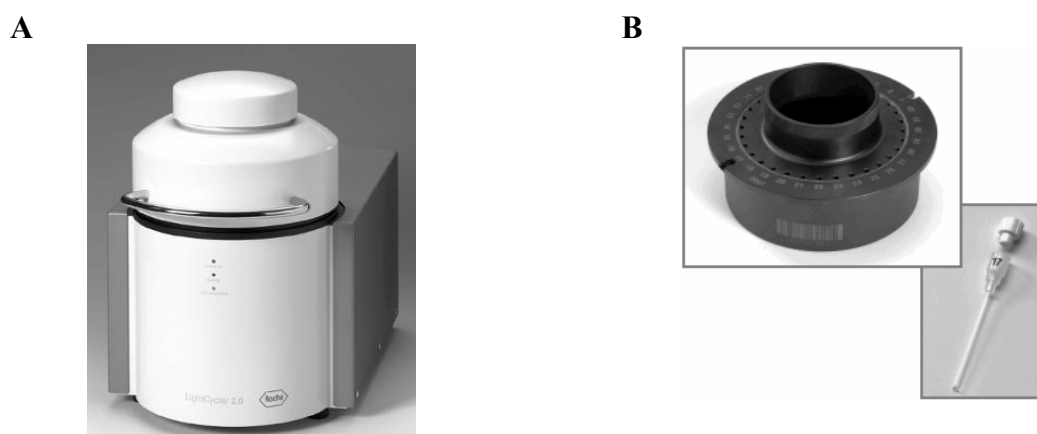
### II.1.1.3. De la PCR conventionnelle à la PCR quantitative

Lors du déroulement d'une PCR conventionnelle, la détection et l'analyse des produits obtenus, appelés amplicons, sont réalisées en fin de réaction, définissant ainsi la PCR en point final ou *end-point PCR* (Hamprecht et al, 1997 ; Al-Khatib et Carr, 2002). Mais il est très difficile d'obtenir un résultat autre que qualitatif ou semi-quantitatif par cette technique car la PCR classique fait appel à des méthodes de détection post-PCR pouvant se révéler peu sensibles ou peu reproductibles tels que l'électrophorèse des amplicons sur gel d'agarose avec marquage au bromure d'éthidium (BET ; McCarrey et al, 1992 ; Rimbach et al, 2000). Par ailleurs, en plus du risque sanitaire non négligeable que cela représente (effet cancérogène), les manipulations post-PCR exigent également un temps additionnel d'expérimentation pouvant être également une source supplémentaire de contamination. La PCR quantitative, ou *qPCR* de l'anglais *quantitative PCR*, est alors devenue durant les dix dernières années une technologie prenant de plus en plus d'ampleur dans le monde scientifique. En effet, cette technique détecte l'accumulation des amplicons directement au cours de la polymérisation de l'ADN cible lors de la phase exponentielle garantissant une meilleure fiabilité de la quantification et évitant également les manipulations post-PCR des échantillons. Cela explique par là même pourquoi la qPCR est aussi qualifiée de PCR en temps réel ou *real-time PCR*. Pour mieux illustrer la substitution de la PCR classique par la qPCR, le nombre

## ***Partie II. Développement de la PCR quantitative***

d'articles par année répondant aux mots clés (1) "polymerase chain reaction" et (2) "real-time polymerase chain reaction" sur le moteur de recherche PubMed donne une assez bonne idée de leur importance dans le monde scientifique. La différence (1-2) est représentative du poids de la PCR en point final cédant progressivement la place à la qPCR.

Russel Higuchi fut le pionnier de la qPCR en proposant le suivi simultané de l'ADN en cours d'amplification par l'association de l'utilisation du bromure d'éthidium (BET), fluorophore s'intercalant à l'ADN double brin, et la mesure de la fluorescence émise par le BET grâce à l'utilisation d'une caméra vidéo (Higuchi et al, 1992 ; 1993). D'autres équipes ont ensuite repris ce principe de quantification de l'ADN directement au cours de son amplification conduisant au développement de patentes américaines (Uhlen, 1998).



**Figure II.1.1.3.a°: Système LightCycler basé sur un carrousel à 32 capillaires**

*Le système proposé par la firme Roche est basé sur l'utilisation de l'appareil LightCycler 2.0 Instrument (A) associé à l'emploi d'un carrousel incluant les 32 capillaires contenant les échantillons à amplifier (B).*

Les grandes firmes de biologie moléculaire ont dès lors investi dans cette nouvelle technologie, contribuant à perfectionner le mode de détection de la fluorescence du fait de l'amélioration de l'appareillage d'amplification avec l'élaboration de thermocycleur intégrant un fluorimètre. Parmi les systèmes d'instrumentation les plus utilisés, l'appareil ABI Prism

## ***Partie II. Développement de la PCR quantitative***

---

7700 Sequence Detector basé sur une qPCR réalisée en microplaque de 96 puits (Applied Biosystems ; Overbergh et al, 1999), les appareils LightCycler dont le LightCycler 2.0 Instrument à 32 capillaires présenté dans la Figure II.1.1.3.a (Roche Applied Science ; Wittwer et al, 1997a ; Vernel-Pauillac et Merrien, 2006) et les instruments iCycler (Bio-Rad ; Talbot et al, 2004) peuvent être cités.

### *II.1.2. Technique de PCR quantitative*

#### *II.1.2.1. Chimie de détection*

La chimie de détection a également évolué afin de mieux répondre au besoin d'une quantification hautement fiable et sensible. En plus des agents se liant à l'ADN double brin tel que le BET, s'est également développé la technologie des sondes fluorescentes dont la première fut la méthode *TaqMan* basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase (Bassler et al, 1995 ; Livak et al, 1995). Il existe ainsi deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents intercalants et les sondes fluorescentes.

En plus du BET précédemment mentionné, le SYBR Green I compte parmi les molécules intercalantes les plus couramment employées en qPCR (Morrison et al, 1998 ; Yin et al, 2001). D'autres agents existent également tels que le YO-PRO-1 (Tseng et al, 1997 ; Aldriouch et al, 2009), le Hoechst 33258 (Searle et Embrey, 1990 ; Embrey et al, 1993) ou les molécules de la famille SYTO (Monis et al, 2005 ; Gudnason et al, 2007) mais le SYBR Green I, marque déposée par Molecular Probes (Bio-Rad), reste l'agent le plus fréquemment utilisé. Ses avantages sont qu'il est économique, facile d'emploi et qu'il présente une meilleure sensibilité comparativement à celle du BET. Lors de la réaction d'amplification, le SYBR Green I non lié émet peu de fluorescence. Durant l'étape d'élongation, le fluorophore s'intercale à l'ADN double brin en cours de polymérisation et l'intensité de la fluorescence augmente proportionnellement à la quantité d'amplicons synthétisés (Figure II.1.2.1.a). La technologie du SYBR Green I ne nécessite aucune sonde fluorescente mais sa spécificité

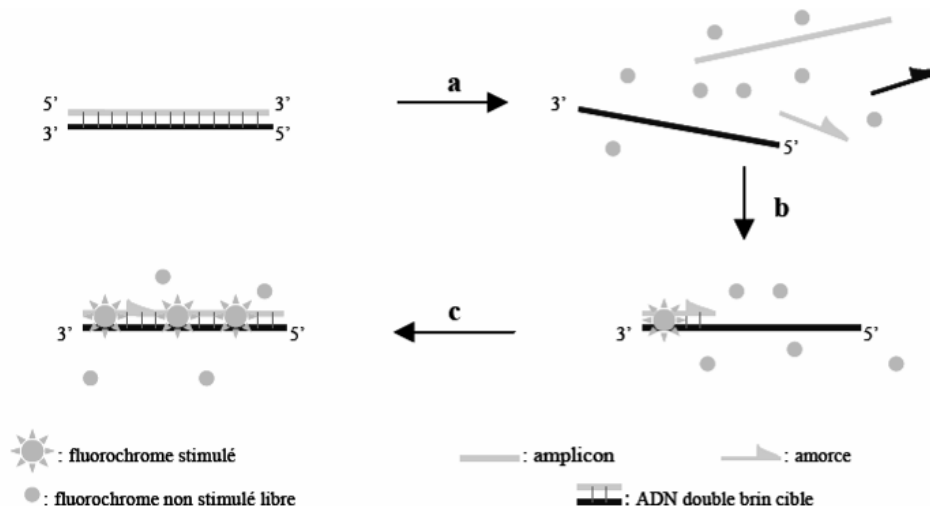
## **Partie II. Développement de la PCR quantitative**

repose entièrement sur les amorces employées. Cependant, le mauvais appariement des amorces peut générer des séquences nucléotidiques pouvant conduire à des faux positifs accompagné d'une fluorescence accrue et une surestimation du nombre d'amplicons (Wittwer et al, 1997b ; Bustin, 2000). Ces produits d'amplification parasites peuvent alors être discriminés par visualisation des bandes d'ADN superflues sur gel d'électrophorèse ou vérification de la température de fusion spécifiques des amplicons correspondant aux gènes cibles (Ririe et al, 1997). Cette partie concernant la spécificité de l'amplification sera traitée dans le paragraphe suivant. Le SYBR Green I apparaît également comme étant une molécule capable d'inhiber la PCR dépendamment de la concentration employée mais ce problème peut être résolu par l'utilisation d'une concentration croissante de  $MgCl_2$  (Wittwer et al, 1997b ; Nath et al, 2000).

La technologie des agents intercalants, dont la spécificité est basée sur l'utilisation d'amorces propres au gène cible, fait que cette méthode ne peut pas être employée en multiplexage pour l'étude simultanée de plusieurs gènes au cours d'une même amplification. La chimie des sondes fluorescentes, basée sur l'emploi de sondes couplées à des fluorophores utilisant le principe du transfert d'énergie (FRET pour *Fluorescence Resonance Energy Transfer* ; Ota et al, 1998) permet alors de répondre à ce point. Quand le spectre d'émission d'un fluorophore donneur (ou *reporter*) chevauche le spectre d'excitation du fluorophore accepteur (ou *quencher*), l'émission de fluorescence du premier est piégé par le second fluorophore. Ce phénomène est extrêmement sensible à la distance entre le donneur et l'accepteur. Plusieurs méthodes sont décrites dont la technologie *TaqMan* associée à l'hydrolyse des sondes fluorescentes (*Hydrolysis probes* en anglais ; Dooley et al, 2004), la méthode *HybProbes* ou hybridation des sondes (*Hybridization probes* ; Martinez-Lopez et al, 2009) ainsi que la méthode dite de balises moléculaires (*Molecular Beacons* ; Hadjinicolaou et al, 2009) ou encore celle basée sur les amorces Scorpion (*Scorpion primer* ; Stroup et al,



2006). La technologie TaqMan reste la chimie des sondes fluorescentes la plus employée et associe l'activité 5'-exonucléasique de l'enzyme Taq polymérase à l'utilisation de sondes fluorescentes particulières (voir Annexe VII).



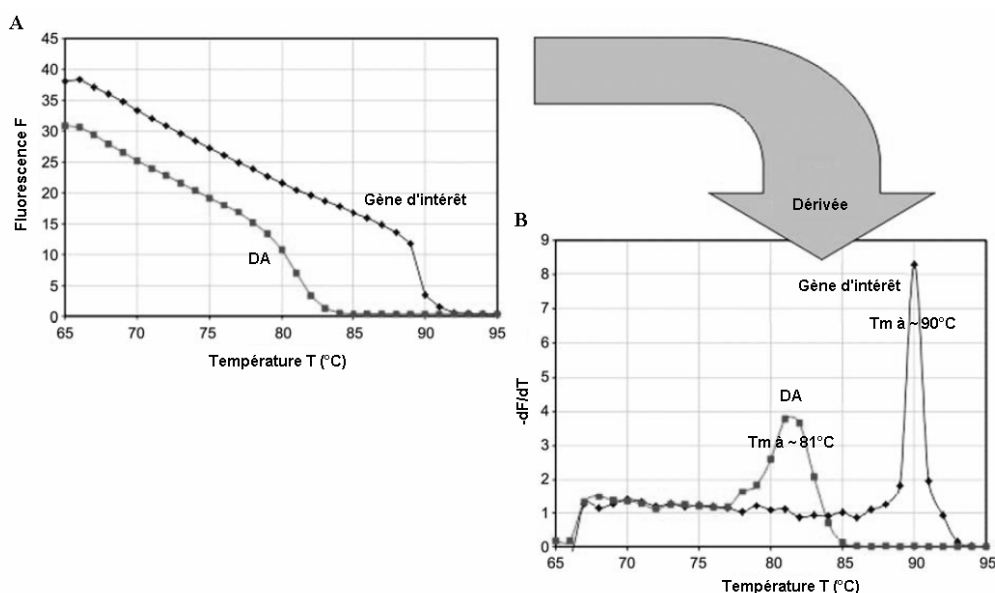
**Figure II.1.2.1.a°: Agent intercalant de l'ADN double brin, exemple du SYBR Green I**

Durant la phase de dénaturation (a), le fluorophore SYBR Green I non lié émet peu de fluorescence déterminant ainsi la fluorescence basale ou bruit de fond. Lors de la phase d'hybridation (b), l'appariement des amorces conduit à la fixation du SYBR Green I sur le double brin d'ADN et lors de la phase d'élongation (c), le nombre de molécules s'intercalant à l'ADN s'accroît. La fluorescence augmente alors proportionnellement à la quantité d'ADN synthétisé. Schéma reproduit de Poitras et Houde, 2002.

### II.1.2.2. Spécificité de la qPCR

La spécificité d'amplification des PCR est habituellement vérifiée par l'étude des caractéristiques des amplicons générés et lors d'une PCR conventionnelle, la taille en paires de bases (pb) des amplicons est classiquement visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose à la fin de la réaction de polymérisation. Cependant, l'utilisation de la qPCR a permis l'apport d'un second moyen de caractérisation des amplicons par l'analyse de leur température de fusion ou  $T_m$  pour *melting temperature*. Kirk Ririe et ces associés (1997) ont été les premiers

à avoir décrit ce système en utilisant la stratégie des agents intercalants par l'emploi du SYBR Green I.



**Figure II.1.2.2.a : Analyse des courbes de fusion établies lors des qPCR**

La fluorescence diminue rapidement lors de la séparation des brins d'ADN qui survient avec l'augmentation progressive de la température (A). La température de fusion ( $T_m$ ) de l'ADN est alors définie comme étant le point d'inflexion de la courbe de fusion déterminée en réalisant la dérivée négative première de la fluorescence sur la température (B). L'amplicon généré à partir de l'ADN cible est alors distingué des dimères d'amorces non spécifiques (DA) de  $T_m$  généralement inférieure. Schéma modifié de Kubista et al, 2006.

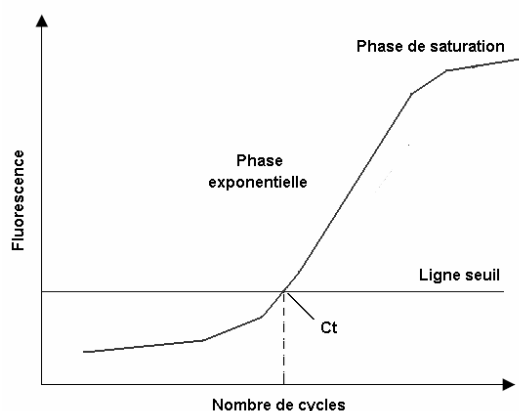
Chaque ADN double brin possède un  $T_m$  qui lui est spécifique et qui est fonction de sa composition en acides nucléiques notamment en bases GC qui favorisent leur stabilité. Après les cycles d'amplification, une étape supplémentaire appelée « étape de fusion » va permettre d'établir automatiquement ce  $T_m$ . Pour cela, la température est graduellement augmentée de 60°C à 95°C tout en mesurant la fluorescence de façon continue et, lorsque 50 % de l'ADN est sous forme double brin et 50 % sous forme simple brin, une chute brutale de cette fluorescence est observée. Le  $T_m$  est ensuite déterminé en calculant la dérivée première

négative ( $-dF/dT$ ) de la fluorescence à ce point en fonction de la température (Figure II.1.2.2.a).

En plus de la caractérisation des produits d'amplification, il est intéressant de noter que l'analyse des courbes de fusion associée à la technologie des sondes fluorescentes permet également de détecter des mutations génétiques (Lyon, 2001). La mutation chromosomique impliquée dans la résistance de bactéries *Neisseria gonorrhoeae* face à la pénicilline a ainsi pu être identifiée (Vernel-Pauillac et al, 2006).

### II.1.2.3. Définition du cycle seuil

Lors de la qPCR, la mesure et la visualisation de l'amplification de l'ADN se fait en temps réel et sont liées à l'émission de fluorescence à chaque cycle. Le cycle seuil ( $C_t$  pour *threshold cycle*) correspond au nombre de cycles à partir duquel cette fluorescence est significativement différente du bruit de fond visualisée par la ligne seuil qui déterminée mathématiquement par le logiciel (Figure II.1.2.3.a).



**Figure II.1.2.3.a°: Modèle graphique d'amplification de la qPCR**

*L'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles d'amplification et le cycle seuil ( $C_t$ ) correspond au nombre de cycles à partir duquel le signal d'émission de la fluorescence est statistiquement différent du bruit de fond représenté par la ligne de base.*

## ***Partie II. Développement de la PCR quantitative***

L'équation reflétant la relation linéaire existant entre la quantité d'ADN synthétisée et le nombre de cycles d'amplification lors d'une PCR conventionnelle peut être adaptée à la qPCR par la relation :

$$N_t = N_0 \times (E + 1)^{Ct} \quad (1)$$

pouvant aussi s'écrire comme suit :

$$N_0 = N_t / (E + 1)^{Ct} \quad (2)$$

où Ct est le nombre de cycles seuil comme décrit précédemment,  $N_0$  et  $N_t$  correspondant respectivement à la quantité d'ADN initiale et à la quantité synthétisée au Ct, et E, l'efficacité d'amplification (Rutledge et Côté, 2003). L'équation (2) peut alors être convertie en logarithme donnant la relation  $\text{Log}(N_0) = \text{Log}(N_t) - \text{Log}[(E + 1)^{Ct}]$  soit :

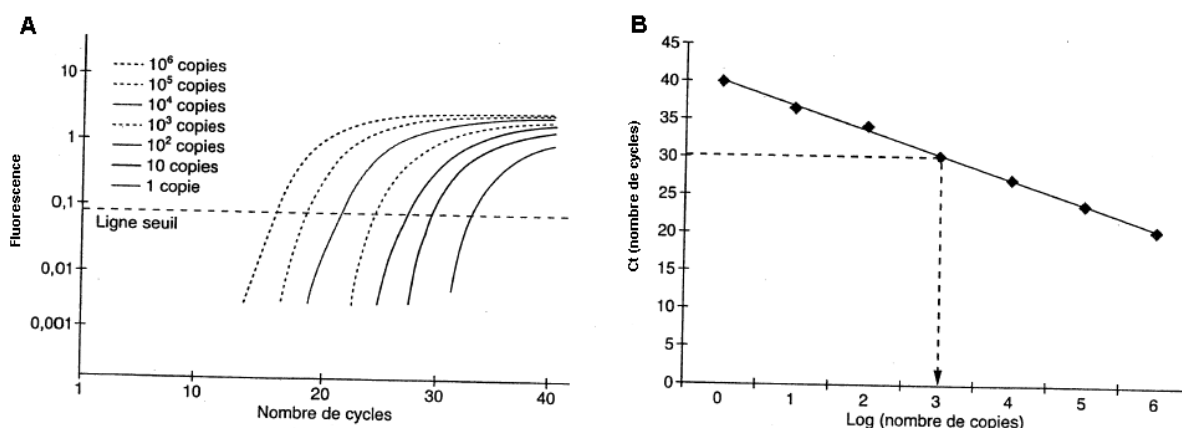
$$\text{Log}(N_0) = - \text{Log}(E + 1) \times Ct + \text{Log}(N_t) \quad (3)$$

Il en résulte une relation linéaire inverse entre le Ct et le logarithme de la quantité initiale d'ADN  $N_0$  qui est le reflet des quantités d'ARNm présentes au départ. Si on considère que E et  $N_t$  sont des valeurs constantes, l'équation (3) présente la structure générale d'une droite selon l'équation du type  $Y = m X + n$  et la valeur de E peut alors être calculée d'après la pente  $m$  de la droite  $Ct = f(\text{Log}[N_0])$  suivant la formule suivante :

$$E = 10^{-1/\text{pente}} - 1 \quad (4)$$

La réalisation de la gamme standard du gène d'intérêt permet alors de calculer la valeur de E en effectuant l'amplification d'une série de dilutions d'ADN cible de concentrations connues (Figure II.1.2.3.a). L'utilisation des courbes standard ou courbe de référence permet aussi de déterminer les quantités d'ADNc, amplifiés au cours de la qPCR, en termes de concentration

absolue ; mais une autre technique de calculs basés notamment sur l'utilisation directe des Ct, existe pour réaliser la quantification des ARNm liée à l'expression des gènes d'intérêt.



**Figure II.1.2.3.a : Représentation graphique de la courbe standard de qPCR**

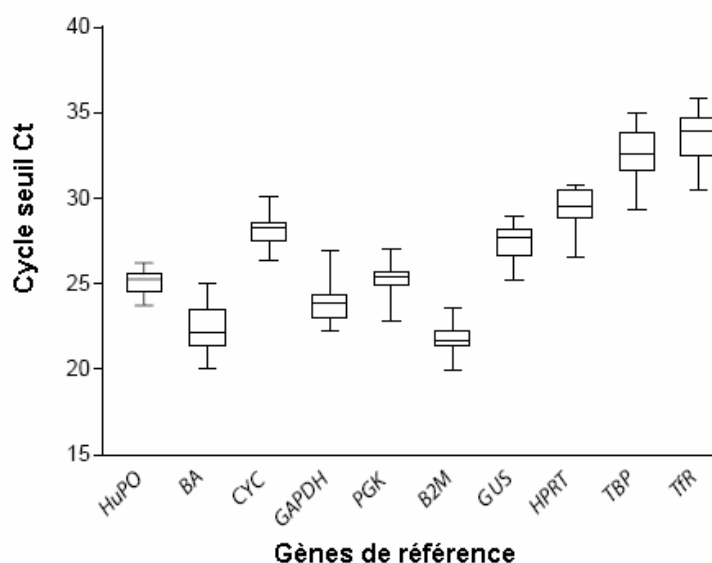
L'amplification d'une série de dilutions de concentrations connues d'ADN cible est effectuée et la détermination des Ct est réalisée grâce aux courbes d'amplification (A). Ces Ct sont ensuite utilisés pour tracer la courbe standard en fonction du logarithme (Log) de la concentration d'ADN en nombre de copies (B). Une relation linéaire existant entre ces deux valeurs, la quantité d'ADN cible pour un échantillon donné peut alors être déduite de son Ct. Schéma d'après Collot et al, 2001.

### II.1.3. Calcul de quantification

#### II.1.3.1. Normalisation

Avant de réaliser la quantification à proprement parler des transcrits d'ARNm, une première étape dite de « normalisation » est effectuée afin d'éliminer les variations pouvant survenir entre échantillons et la méthode la plus employée afin de corriger ces erreurs est de réaliser la polymérisation simultanée d'un second gène, alors appelé gène de référence à partir duquel les valeurs des ARNm cibles sont normalisées. Ce gène de référence aussi qualifié de « gène de ménage » ou *Housekeeping Gene* (HKG), doit être exprimé de façon constitutive dans les modèles étudiés sans subir de variation sous l'effet des conditions expérimentales

(Thellin et al, 1999). Trois gènes de ménage sont communément employés, la glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase (GAPDH), la  $\beta$ -actine et les ARN ribosomiaux (ARNr) bien que d'autres gènes soient également utilisés tels que l'histone H3 (Kelley et al, 1993), l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase HPRT (Foss et al, 1998) ou la cyclophiline (Haendler et al, 1987).



**Figure II.1.3.1.a : Valeurs de Ct de plusieurs gènes de référence d'échantillons de sang**

*L'expression de plusieurs gènes est exprimée en valeur médiane (ligne), 25<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> percentile (boîte) et gamme (barres) à partir de 16 échantillons de sang humain (4 sujets sains versus 4 sujets tuberculeux à 2 temps différents). HuPO : protéine ribosomique acide humaine ; BA :  $\beta$ -actine ; CYC : cyclophiline ; GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ; PGK : phosphoglycérokinase ; B2M :  $\beta$ 2-microglobuline ; GUS :  $\beta$ -glucuronidase ; HPRT : hypoxanthine phosphoribosyltransférase ; TBP : protéine de fixation du facteur de transcription du site TATA ; TfR : récepteur de la transferrine. D'après Dheda et al, 2004.*

Cependant, de récentes études ont montré que ces gènes n'étaient pas forcément les plus adaptés selon les modèles biologiques employés. Treize gènes de référence ont ainsi été

## ***Partie II. Développement de la PCR quantitative***

---

évalués dans le sang humain parmi un échantillonnage de plusieurs personnes atteintes ou non de tuberculose (Dheda et al, 2004) et les résultats ont mis en évidence qu'il existait une variabilité non négligeable des Ct GAPDH et  $\beta$ -actine au sein de cette population (Figure II.1.3.1.a). De plus, le niveau d'expression de l'ARNr 18s s'est révélé être plus stable que ces deux premiers gènes dans des lymphocytes activés isolés d'intestins de patients humains atteints de cancer (Bas et al, 2004). Ces observations sont aussi constatées sur fibroblastes de souris dans lesquels l'expression des gènes GAPDH et  $\beta$ -actine varie de façon croissante, respectivement de 9 et 3 fois en fonction des temps d'incubation (Schmittgen et Zakrajsek, 2000). La variabilité des niveaux d'expression des gènes de référence usuellement employés font qu'il est impératif d'évaluer leur stabilité comme recommandé par certaines revues (Bustin, 2002 ; Huggett et al, 2005 ; Kubista et al, 2006) avant de réaliser l'étape de normalisation préalable aux calculs de quantification.

### II.1.3.2. Quantifications absolue et relative

La qPCR est une des méthodes principalement employées pour l'étude de l'expression génique et plusieurs techniques de quantification sont disponibles en fonction des appareillages et des logiciels utilisés. La quantification absolue fut la première technique de calcul proposée et passe par l'utilisation de courbes de référence des gènes d'intérêt comme décrit précédemment (paragraphe II.1.2.3). Cependant, il est plus souvent préféré les techniques de quantification relative qui permettent la comparaison des niveaux d'expression des échantillons par rapport à l'expression d'un échantillon unique qualifié alors de calibrateur (Overberg et al, 1999 ; Bustin, 2000). Deux techniques de quantification relative sont généralement envisagées, la première étant basée sur la quantification absolue de l'ADN à partir des gammes standard tandis que la seconde repose sur la comparaison directe des Ct par la méthode dite du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001 ; Pfaffl, 2001).

## Partie II. Développement de la PCR quantitative

Concernant la première technique, après avoir réalisé la quantification en nombre de copie de chaque gène étudié pour l'ensemble des échantillons, une première étape de normalisation des valeurs est réalisée en effectuant le ratio des concentrations de l'ADN cible sur celles du gène de référence puis chaque ratio est ensuite comparé à celui du calibrateur comme suit :

$$\text{Ratio X} = \frac{\left( \frac{[\text{ADN cible}]}{[\text{ADN référence}]} \right) \text{Echantillon X}}{\left( \frac{[\text{ADN cible}]}{[\text{ADN référence}]} \right) \text{Calibrateur}}$$

où le Ratio X représente l'expression relative du gène cible pour l'échantillon X. Ainsi l'expression du gène cible se trouve exprimée sous forme d'un ratio par rapport à l'échantillon calibrateur (témoin sans traitement ou point zéro) d'où l'appellation « expression relative » (Stodeur et al, 2002), dont l'avantage principal est de permettre la comparaison entre différents gènes cibles.

La seconde technique de quantification, quant à elle, est basée sur la comparaison directe des Ct des échantillons selon la technique du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  qui dérive de la démonstration mathématique suivante (Livak et Schmittgen, 2001). L'équation d'amplification de l'ADN dans les conditions de la qPCR est :

$$N_t = N_0 \times (E + 1)^{C_t} \quad (1)$$

où Ct est le nombre de cycles seuil comme décrit précédemment,  $N_0$  et  $N_t$  correspondant respectivement à la quantité d'ADN initiale et à la quantité synthétisée au cycle seuil Ct, et E, l'efficacité d'amplification (Rutledge et Côté, 2003). Il s'en suit que pour le gène cible X :

$$X_t = X_0 \times (E_X + 1)^{C_t(X)} \quad (5)$$



## Partie II. Développement de la PCR quantitative

où  $Ct(X)$  est le nombre de cycle seuil pour le gène d'intérêt  $X$ ,  $X_t$  est la quantité d'ADN cible au cycle seuil,  $X_0$  est la quantité initiale d'ADN cible, et  $E_X$  est l'efficacité d'amplification du gène cible. Il en est de même pour le gène de référence :

$$R_t = R_0 \times (E_R + 1)^{Ct(R)} \quad (6)$$

où  $Ct(R)$  est le nombre de cycle seuil pour le gène de ménage  $R$ ,  $R_t$  est la quantité d'ADN au cycle seuil,  $R_0$  est la quantité initiale du gène de référence, et  $E_R$  est l'efficacité d'amplification du même gène. Le ratio des équations (5) et (6) donne alors la relation :

$$\frac{X_t}{R_t} = \frac{X_0 \times (E_X + 1)^{Ct(X)}}{R_0 \times (E_R + 1)^{Ct(R)}} = K \quad (7)$$

La constante  $K$  est différente de 1. Si on considère  $E_X = E_R = E$ , alors :

$$X_0 / R_0 = (E + 1)^{Ct(X) - Ct(R)} = K \quad (8)$$

pouvant aussi s'écrire :

$$X_N \times (E + 1)^{\Delta Ct} = K \quad (9)$$

où  $X_N$  est égal à la quantité d'ADN cible normalisé  $X_0 / R_0$  et  $\Delta Ct$  est égal à la différence de cycle seuil entre le gène d'intérêt et le gène de référence soit  $Ct(X) - Ct(R)$ . Un réarrangement de l'équation donne la relation :

$$X_N = K \times (E + 1)^{\Delta Ct} \quad (10)$$

L'étape finale consiste alors en la division de la valeur  $X_N$  pour un échantillon  $q$  par le  $X_N$  du calibrateur d'après la relation :

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,c}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta Ct(q)}}{K \times (1 + E)^{-\Delta Ct(c)}} = (1 + E)^{-\Delta\Delta Ct} \quad (11)$$

où  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(q) - \Delta Ct(c)$ . Considérant que dans les conditions idéales d'amplification,  $E = 1$ , l'expression relative du gène cible normalisée par rapport à un gène de référence et relativisée à un calibrateur est donnée par la relation suivante :

$$\text{Ratio d'expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (12)$$

Bien que cette méthode de calcul ait été validée sur plusieurs modèles d'études différents tels que le suivi des transcrits BCR-ABL P210 de patients leucémiques (Arocho et al, 2006) ou du gène c-myc de cerveau ou de reins humain (Lovak et Schmittgen, 2001). elle nécessite que l'efficacité d'amplification des gènes cibles et des gènes de référence soit identique et égale à 2. Cette dernière valeur peut être alors déterminée d'après la pente des courbes standards de chaque gène, comme précédemment détaillé par l'équation (4) :  $E = 10^{-1/\text{pente}} - 1$ .

### *II.1.4. Objectif du chapitre*

Avant d'effectuer l'étude de l'expression génique des cytokines dans le cadre de ce projet de thèse, plusieurs paramètres ont été validés pour l'utilisation de la technique de qPCR. Pour cela, l'ADNc utilisé est synthétisé à partir de l'ARN total extrait et purifié de cellules RAW 264.7 incubées de 0 à 48 h avec ou sans LPS à raison de 0,5 µg / ml finale. La transcription inverse et la PCR sont conduites distinctement en deux étapes et les qPCR sont réalisées sur l'appareil LightCycler 2.0 en faisant appel à la stratégie des agents intercalants par l'emploi du SYBR Green I. Les conditions de stringence (notamment la concentration optimale de MgCl<sub>2</sub> et les temps d'hybridation des amorces à 60°C et d'élongation de l'ADN à 72°C) sont d'abord évaluées et les résultats concernant le gène iNOS sont exposés. La spécificité d'amplification des qPCR est aussi vérifiée en validant l'utilisation des couples

## ***Partie II. Développement de la PCR quantitative***

d'amorces définis pour chaque gène cible (cytokines, iNOS et gènes de référence) et l'exemple du GAPDH est présenté ici. Les couples d'amorces sont ensuite validés par vérification du  $T_m$  et de la taille de l'amplicon généré sur gel d'électrophorèse. Le gène de référence est choisi selon la stabilité du  $C_t$  en fonction des conditions expérimentales et le calcul de l'efficacité d'amplification est effectué afin de valider l'utilisation de la technique de quantification du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

### **II.2. Matériel et Méthodes**

#### *II.2.1. Matériel*

Les cellules RAW 264.7 (ATCC #TIB-71) forment une lignée immortalisée de macrophages murins couramment sélectionnée dans le but d'étudier les mécanismes inflammatoires et l'induction des cytokines *in vitro*. Elles ont été généreusement fournies par le Dr M. Adib-Conquy (Institut Pasteur, Paris, France). Le lipopolysaccharide (*Escherichia coli*, 0111 :B4, LPS), les réactifs employés pour la culture cellulaire et ceux utilisés pour l'électrophorèse sur gel d'agarose proviennent de chez Sigma-Aldrich (Lyon, France) alors que les kits utilisés en biologie moléculaire ont été obtenus de Roche Applied Science (Auckland, Nouvelle-Zélande) sauf quand explicités autrement.

#### *II.2.2. Culture et traitement cellulaire*

Les cellules RAW 264.7 sont cultivées en flasque en milieu Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) complété avec du sérum de veau fœtal (SVF), à 37°C en atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture contient également 25 mM de tampon HEPES, 4,5 g / l de D-glucose, 0,2 % de bicarbonate de sodium, 2 mM de L-glutamine, et 1 % d'un mélange d'antibiotiques et d'antifongique contenant de la pénicilline (10 000 U), de la streptomycine (10 µg / ml) et de l'amphotéricine B (25 µg / ml). Les cellules sont entretenues par passages successifs à 90 % de confluence avec décollement des cellules à l'aide d'un râteau, la suspension cellulaire obtenue étant centrifugée 10 min à 1400 g puis resuspendue dans 5 ml de DMEM complet frais afin d'être réensemencée au 1/10<sup>ème</sup> en flasque. Dans les conditions expérimentales, les cellules RAW 264.7 sont ensemencées en

## ***Partie II. Développement de la PCR quantitative***

---

plaque de culture de 24 puits à une concentration minimum de  $2,5 \times 10^5$  cellules/puits. Elles sont mises en présence de LPS à la concentration finale de 0,5 µg / ml pendant 1 à 48 h.

### *II.2.3. Extraction d'ARN total et synthèse d'ADNc*

Pour effectuer l'étude de l'expression génique, le matériel transcrit est récupéré par addition de 400 µl de réactif du tube PAXgene (PAXgene Blood RNA Tube, PreAnalytiX, Qiagen, Doncaster, Australie) qui induit la lyse cellulaire et la stabilisation des séquences nucléotidiques (Stordeur et al, 2003). Puis chaque puits est lavé 2 fois avec 400 µl de tampon phosphate isotonique (*Phosphate Buffer Saline*, PBS), les échantillons étant alors maintenus à température ambiante durant 2 h pour permettre l'action du réactif avant d'être conservés à -20°C. Les ARN totaux sont ensuite extraits et purifiés à partir de ce lysat cellulaire en employant le kit *High Pure RNA Isolation kit* selon les recommandations du fournisseur, les ARN obtenus étant conservés à -80°C. L'ADNc simple brin est synthétisé par transcription inverse à partir de ce matériel grâce au kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* en utilisant des amorces aléatoires hexamériques sur un thermocycleur PerkinElmer (GeneAmp PCR System 9600) selon le programme d'amplification suivant : hybridation des amorces à 25°C pendant 10 min ; transcription inverse à 55°C pendant 30 min ; inactivation de l'enzyme par chauffage à 85°C pendant 5 min. Cette stratégie de synthèse permet d'obtenir un maximum de séquences nucléotidiques à analyser en qPCR.

### *II.2.4. Détermination des séquences nucléotidiques des couples d'amorces*

Les séquences nucléotidiques des gènes de références et des gènes cibles murins ont été extraites de la base de données GenBank de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Les couples d'amorces utilisés en qPCR ont été déterminés à partir de ces séquences soit grâce au logiciel LightCycler Probe Design Software 2.0 de chez Roche Applied Science soit en utilisant le logiciel en ligne Primer3 v.0.4.0 (Rozen et Skaletsky,

## ***Partie II. Développement de la PCR quantitative***

2000), et sont listées dans le Tableau II.2.4.I. La détermination des séquences des amorces est effectuée selon les paramètres suivants (Hyndman et Mitsuhashi, 2003) : la taille des amplicons est fixée entre 150 - 350 pb et celle des amorces entre 18 - 20 pb ; la température de fusion des amorces est établie à 60°C et ne doit pas être différente de plus de 0,5°C entre amorces. Le pourcentage de GC doit être supérieur à 45 % et le début des séquences des amorces ne doit pas comporter de répétition. Après vérification de la spécificité des amorces par BLAST (Basic Local Alignment and Search), les séquences nucléotidiques ont été commandées chez Sigma-Proligo (Proligo Singapore Pty Ltd., Biopolis, Singapour).

**Tableau II.2.4.I : Séquences des couples d'amorce des gènes étudiés par qPCR**

<b>Gènes cibles murins</b>	<b>Séquence nucléotidique (5' → 3')<sup>a</sup></b>	<b>Taille des amplicons (pb)<sup>b</sup></b>	<b>Tm des amplicons (°C)<sup>c</sup></b>
β-actine	(S) AAGAGAAGCTGTGCTATGTT (A) GTTGGCATAGGTCTTTACG	251	88,0
GAPDH	(S) TCATCCCAGAGCTGAACG (A) GGGAGTTGCTGTTGAAGTC	213	88,3
IL-1β	(S) GTGTGGATCCCAAGCAATAC (A) GTTGTTTCCCAGGAAGACAG	161	84,4
IL-6	(S) CAATTCCAGAAACCGCT (A) GCAAGTGCATCATCGT	268	86,0
IL-10	(S) ATTCCCTGGGTGAGAAG (A) CTCTGTCTAGGTCCTGG	259	84,9
IL-11	(S) GCTGTTCTCCTAACCCG (A) CTGGCTCCAGAGTCTT	250	88,9
iNOS	(S) CCTCATGCCATTGAGTTC (A) AGTCATGTTTGCCGTC	349	88,5
TNF-α	(S) CAACGGCATGGATCTCA (A) GGACTCCGCAAAGTCT	325	88,8

<sup>a</sup> (S) et (A) désignent respectivement les séquences sens et anti-sens des amorces ; <sup>b</sup> la taille des amplicons est donnée en paires de bases (pb) ; <sup>c</sup> la température de fusion des produits PCR (T<sub>m</sub>) est donnée en °C.

## ***Partie II. Développement de la PCR quantitative***

---

### *II.2.5. qPCR et programme d'amplification*

La qPCR est réalisée grâce au système LightCycler basé sur l'emploi de carrousel incorporant 32 capillaires sur appareil LightCycler 2.0 Instrument en utilisant le kit *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I* selon les recommandations du fournisseur et les couples d'amorces spécifiques des gènes de référence et des gènes d'intérêt. Plus précisément, chaque réaction a été menée dans un volume final de 20 µl par capillaire avec 2,4 µl de MgCl<sub>2</sub> à 2 mM finale après optimisation (paragraphe II.3.1.), les amorces spécifiques sens et anti-sens à 0,5 mM finale, 2 µl de mix PCR à 1X finale; 2 µl d'ADNc précédemment synthétisé et de l'eau PCR-grade qsp 20 µl. Le logiciel LightCycler® Software 4.05 intégré à l'appareil permet de suivre les résultats en temps réel et le programme d'amplification de la qPCR est composé de 4 étapes fixées après validation des temps d'hybridation et d'élongation (paragraphe II.3.1.) comme-suit : 1) l'activation de la polymérase à 95°C pendant 10 min ; 2) l'amplification durant 45 cycles étant constituée de 3 phases : a) la dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 8 sec, b) l'hybridation des amorces à 60°C pendant 5 secondes et c) l'élongation de la chaîne nucléotidique à 72°C pendant 12 secondes qui se fait parallèlement à la détection de la fluorescence ; 3) le processus de fusion au cours duquel le T<sub>m</sub> est calculé, la température augmentant progressivement de 60°C à 95°C à la vitesse de 0,1°C par seconde avec détection de la fluorescence en continue ; 4) la stabilisation du système par abaissement de la température à 40°C.

### *II.2.6. Electrophorèse sur gel d'agarose*

Les amplicons sont déposés pour migration sur gel d'agarose à 1,8 % dans du tampon TRIS borate-EDTA (TBE 1X) contenant 0,5 µg / ml de bromure d'éthidium (BET). Le TBE 1X est obtenu par dilution au 1/10<sup>ème</sup> du TBE 10X composé de 108 g de Tris (Trizma hydrochloride), 55 g d'acide borique et 7,4 g d'EDTA pour 1 L d'eau distillée. L'électrophorèse est conduite à 130 V pendant 35 min dans du tampon de migration TBE 1X

## ***Partie II. Développement de la PCR quantitative***

---

avec 4 µl de tampon de charge par puits (bleu de bromophénol, xylème, cyanol, glycérol 30 %) et le marqueur de poids moléculaire VIII (0,25 µg / µl ; Roche Diagnostics, Allemagne).

### *II.2.7. Réalisation des courbes standards*

Les courbes standard de gènes murins étudiés sont générées et construites grâce au logiciel LightCycler Software 4.05 ou grâce au logiciel Excel 2003 à partir des Ct obtenus suite à l'amplification de 5 µl d'une gamme de 10 concentrations connue d'ADNc des gènes cibles diluées de 10 en 10 s'étalant de 1 ng / µl ( $2,5 \times 10^9$  copies / µl) à 1 ag / µl ( $2,5 \times 10^0$  copies / µl). Ces concentrations d'ADNc ont été obtenues après électrophorèse de l'ADNc murin sur gel d'agarose comme précédemment décrite et extraction au niveau des bandes correspondantes aux séquences nucléotidiques d'intérêt avec le kit *MinElute Gel Extraction Kit* selon les recommandations du fournisseur (Qiagen, Australie). Les concentrations d'acides nucléiques sont déterminées par mesure de l'absorbance à 260 nm au moyen d'un spectrophotomètre (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany) et l'efficacité d'amplification E est calculée grâce au logiciel LightCycler Software 4.05 à partir de la pente de ces courbes standards selon la relation  $E = 10^{-1/\text{pente}} - 1$ .



### **II.3. Mise au point de la qPCR**

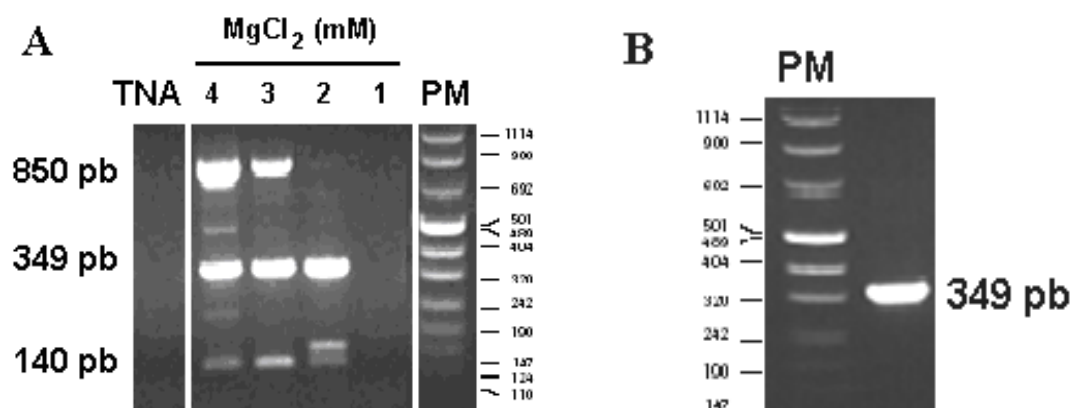
#### *II.3.1. Optimisation des conditions de qPCR*

Conformément aux recommandations du fournisseur, les conditions de stringence de la technique de qPCR ont été optimisées en effectuant plusieurs amplifications durant lesquelles plusieurs paramètres sont testés. La concentration en  $\text{MgCl}_2$  utilisée dans les expériences de qPCR ainsi que les temps nécessaires aux étapes d'hybridation à  $60^\circ\text{C}$  et d'élongation à  $72^\circ\text{C}$  effectués au cours des cycles de polymérisation sont évalués et l'exemple de l'iNOS est présenté ici pour illustrer la recherche des conditions de stringence de la qPCR.

Dans un premier temps, la concentration de  $\text{MgCl}_2$  est diminuée de 4 à 1 mM finale et les amplicons obtenus sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les conditions appliquées de 2, 3 et 4 mM de  $\text{MgCl}_2$  conduisent à l'observation sur gel d'électrophorèse d'un produit d'amplification de 349 pb correspondant au gène iNOS (Figure II.a.A). A l'inverse et tout comme le témoin négatif d'amplification (TNA), aucune bande n'est observée pour 1 mM finale de  $\text{MgCl}_2$ , cette concentration étant donc trop faible pour permettre l'hybridation des amorces de l'ADNc iNOS et une quelconque amplification. Une bande non spécifique de 850 pb est également observée pour des concentrations de 3 et 4 mM finale de  $\text{MgCl}_2$ , le signal diminuant d'intensité jusqu'à disparaître totalement à 2 mM finale. La réduction de la concentration en ion  $\text{Mg}^{2+}$  conduit à diminuer la force ionique du mix, tout en augmentant la stringence, permettant ainsi de sélectionner seulement les amorces fortement liées à l'ADN matrice ce qui aura pour effet d'augmenter la spécificité de l'amplification. Cependant, une bande non spécifique à 140 pb est toujours présente pour la concentration de 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , susceptible de correspondre alors à la dimérisation des amorces iNOS.

## Partie II. Développement de la PCR quantitative

Cela nous a conduit à modifier le programme d'amplification en conservant une concentration fixe de  $MgCl_2$  à 2 mM finale mais en diminuant les temps d'hybridation de 8 à 5 s et d'élongation de 16 à 12 sec (Figure II.b.B). Le produit PCR unique visualisé sur gel d'électrophorèse présente une taille de 349 pb spécifique de l'iNOS et la bande fantôme non spécifique à 140 pb observée précédemment a disparu.



**Figure II.c : Recherche des conditions optimales de qPCR, exemple de l'ADN iNOS**

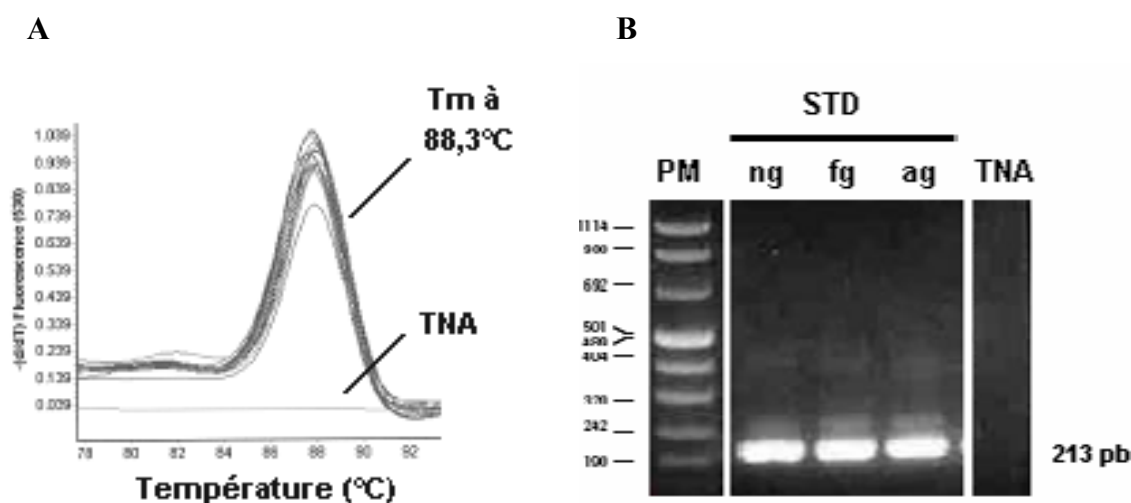
*L'effet de la variation de concentration en  $MgCl_2$  (A) et celui des temps d'hybridation et d'élongation employés lors de la polymérisation de l'ADN iNOS (B) sont évalués sur la stringence de la qPCR. A : la concentration de  $MgCl_2$  est variable de 1 à 4 mM finale avec les temps d'hybridation et d'élongation respectivement de 8 et 16 s ; B : la concentration de  $MgCl_2$  est fixée à 2 mM finale avec des temps d'hybridation et d'élongation respectivement de 5 et 12 s. L'électrophorèse des amplicons est réalisée sur gel d'agarose selon les conditions présentées dans la section Matériel et Méthodes. La taille (en paires de bases, pb) correspondant au gène iNOS est de 349 pb. Le témoin négatif d'amplification (TNA) ne présente pas de signal. PM : marqueurs de poids moléculaires.*

La concentration en  $MgCl_2$  fixée à 2 mM et le programme d'amplification notamment les temps d'hybridation à 5 s et d'élongation à 12 s ont également été testés pour les autres

gènes d'intérêt et ont paru les plus adéquates pour l'amplification de ces gènes. Nous avons donc validé ces conditions d'expériences pour la réalisation des qPCR suivantes.

### ***II.3.2. Spécificité et validation des couples d'amorces***

La spécificité des couples d'amorces pour chaque gène cible a été vérifiée, dans un second temps, en réalisant l'amplification des ADNc en étudiant les caractéristiques des amplicons obtenus. Pour cela, le  $T_m$  des produits PCR est calculé par le logiciel LightCycler 4.05 directement lors de la dernière étape du programme de qPCR et la taille des amplicons est évaluée par migration sur gel d'agarose.



**Figure II.3.2.a : Evaluation de la spécificité des qPCR, exemple de l'ADN GAPDH**

Plusieurs concentrations d'ADNc sont amplifiées à raison de 1 ng, 1 fg ou 1 ag /  $\mu$ l (ng, fg, ag). La température de fusion ( $T_m$ ) des produits PCR est calculée par le logiciel LightCycler 4.05 lors de la dernière étape du programme de la qPCR (A). Le  $T_m$  attendu pour l'amplicon spécifique du gène GAPDH est de 88,3°C. La taille (en paire de base, pb) des amplicons est analysée par électrophorèse sur gel d'agarose comme décrit dans le Matériel et Méthodes (B) et la bande correspondant au gène GAPDH est de 213 pb. Selon les deux techniques, aucun signal n'est retrouvé pour le témoin négatif d'amplification (TNA). PM : marqueurs de poids moléculaire.

## ***Partie II. Développement de la PCR quantitative***

---

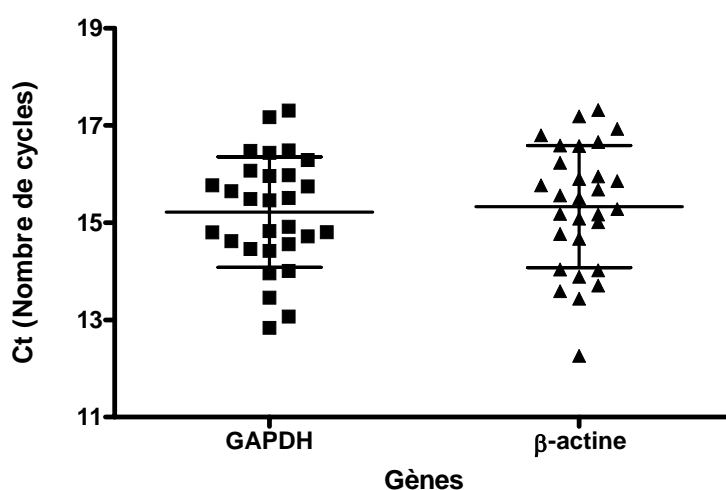
Prenant l'exemple du GAPDH (Figure II.3.2.a), les résultats montrent que les amplicons obtenus possèdent un  $T_m$  de 88,3°C (Figure II.3.2.a.A) correspondant à celui attendu pour l'amplicon spécifique du GAPDH comme précisé dans le Tableau II.3.2.I. Leur taille est parallèlement vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose et concorde également avec la taille prospectée pour ce gène (Figure II.3.2.a.B). Par ailleurs, le témoin négatif d'amplification (TNA) ne présente pas de  $T_m$  ni ne présente de signal sur gel d'électrophorèse confirmant le fait qu'il n'y a pas d'amplification non spécifique. Ces résultats permettent de vérifier la spécificité d'amplification du couple d'amorces dessinés pour GAPDH et, suivant la même logique d'évaluation, les couples d'amorce de l'ensemble des gènes étudiés ont ainsi été validés.

### *II.3.3. Stabilité des gènes de référence*

La mise en place des paramètres de qPCR et la validation des couples d'amorces ont permis de vérifier par la suite la stabilité des gènes de référence en fonction des conditions expérimentales variables selon le temps d'incubation des cellules RAW 264.7 (0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24 et 48 h) et la présence ou non de LPS à 0,5 µg / ml à chaque temps. Deux gènes constitutifs des cellules de mammifère parmi les plus utilisés en tant que gènes de ménage ont été testés : la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), enzyme de la glycolyse et la  $\beta$ -actine, protéine filamenteuse participant à la contraction musculaire (Weil, 2001).

L'expression constitutive des gènes GAPDH et  $\beta$ -actine sur l'ensemble des conditions reste similaire avec des  $C_t$  moyens respectivement de  $15,22 \pm 1,136$  et de  $15,33 \pm 1,258$  cycles (Figure II.3.3.a). La  $\beta$ -actine présente cependant un coefficient de variation de 8,21 % sensiblement supérieur à celui de la GAPDH qui est de 7,46 %. Sachant que la  $\beta$ -actine est influencée par la concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire qui peut être affectée par les CTXs et qu'elle varie de façon plus prononcée que l'expression de la GAPDH dans les cellules RAW

264.7 traitées avec le LPS comme présentée ici, nous décidons de choisir le second gène pour effectuer les calculs de normalisation des ARNm des gènes d'intérêt.



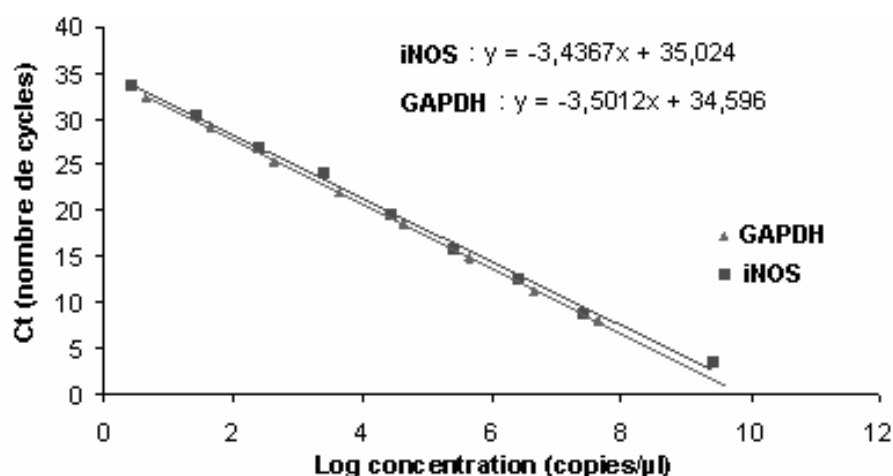
**Figure II.3.3.a : Variabilité de l'expression des gènes GAPDH et β-actine selon les conditions expérimentales appliquées aux cellules RAW 264.7**

La variabilité de l'expression des gènes GAPDH et β-actine est étudiée sur le modèle des cellules RAW 264.7 incubées pendant des temps variables (de 0 à 48 h) avec ou sans LPS à la concentration finale de 0,5 µg / ml constituant ainsi 15 conditions différentes testées. L'ADNc est synthétisé à partir de l'ARN total extrait et purifié de ces cellules et les expériences de qPCR sont menées comme décrit dans le Matériel et Méthodes. Le Ct moyen représenté par la barre horizontale ± SD est calculé d'après le logiciel GraphPad Prism v4 (n=30).

### II.3.4. Evaluation de l'efficacité d'amplification

Les courbes standard des gènes cibles ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité de leur amplification et ainsi valider l'utilisation de la technique de quantification basée sur la formule  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Pour chaque gène d'intérêt, une gamme de 10 concentrations connues d'ADNc correspondant à des dilutions de 10 en 10, s'étalant de 1 ng / µl ( $2,5 \times 10^9$  copies / µl) à 1 ag /

$\mu\text{l}$  ( $2,5 \times 10^0$  copies /  $\mu\text{l}$ ) est amplifiée en duplicata par qPCR et les courbes standards sont générées automatiquement par le logiciel LightCycler® Software 4.05.



**Figure II.3.4.a : Courbes standard des gènes murins iNOS et GAPDH**

*Les gammes standards des gènes murins iNOS et GAPDH sont réalisées suite à l'amplification de 10 concentrations connues d'ADNc comme précisé dans le Matériel et Méthodes. Les courbes et les calculs d'équation de droite sont réalisés ici grâce au logiciel Excel v2003.*

Comme présenté pour les gènes iNOS et GAPDH (Figure II.3.4.a), les gammes standards présentent une linéarité entre le Ct et le logarithme de la concentration d'ADN amplifiés et possèdent également les critères essentiels à leur validation (Overberg et al, 1999 ; Khüne et Oschmann, 2002 ; Rutledge et Côté, 2003) dont la première est la spécificité des amplifications vérifiée par les  $T_m$  et taille des amplicons correspondant à ceux attendus comme précédemment précisé (paragraphe II.3.2.). De plus, un intervalle constant et régulier de 3 cycles d'amplification est observé entre chaque concentration d'ADN cible ce qui correspond à un log de différence de concentration. La quantité d'ADN doublant à chaque cycle d'amplification, E est calculée par la relation  $E = 10^{-1/\text{pente}} - 1$  et par conséquent, la pente des équations de droite doit être proche de -3,3. Ainsi, les courbes standard de l'iNOS et de la

## ***Partie II. Développement de la PCR quantitative***

GAPDH présentent respectivement une pente de -3,4367 et -3,5012 (Figure II.3.4.a) et une efficacité E égale à 0,944 et à 0,922 (Tableau II.3.4.I). De même, l'efficacité d'amplification E est proche de la valeur théorique 2 pour l'ensemble des gènes étudiés (Tableau II.3.4.I). Cela permet de valider l'utilisation de la technique du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  pour la quantification relative des ARNm.

**Tableau II.3.4.I : Efficacité d'amplification des gènes d'intérêt**

<b>Gènes cibles murins</b>	<b>Efficacité d'amplification E <sup>a</sup></b>	<b>Ct max - min <sup>b</sup></b>
GAPDH	0,922	32,22 – 7,94
IL-1 $\beta$	0,999	34,77 – 8,15
IL-6	1,139	26,08 – 4,66
IL-10	1,000	26,57 – 6,79
IL-11	0,956	29,89 – 6,70
iNOS	0,944	33,50 – 3,54
TNF- $\alpha$	0,955	27,75 – 7,09

<sup>a</sup> Les courbes standards des gènes murins étudiés sont réalisées suite à l'amplification de 10 concentrations connues d'ADNc comme précisée dans le Matériel et Méthodes. L'efficacité d'amplification E est calculée par le logiciel LightCycler 4.05 d'après la pente des courbes standard ; <sup>b</sup> le Ct maximal (max) et minimal (min) sont exprimés en nombre de cycles pour évaluer l'étendue de la gamme de détection.

### **II.4. Conclusions**

Bien que la technique de qPCR fasse partie des techniques les plus utilisées aujourd'hui afin de réaliser l'étude de la régulation de l'expression génique, la validation de plusieurs paramètres est préalablement requise. L'ADNc utilisé lors de cette étape fut transcrit de l'ARN total purifié de cellules RAW 264.7 traitées au LPS (0,5 µg / ml) et les qPCR ont été réalisées en employant le SYBR Green I sur le système LightCycler 2.0 de chez Roche. La concentration de MgCl<sub>2</sub> ainsi que l'établissement du programme d'amplification furent d'abord testés sur l'ensemble des ARNm cible de l'iNOS, des cytokines et des gènes de référence. Après avoir vérifié la spécificité d'amplification de chaque gène étudié par la caractérisation de leur amplicons spécifiques (T<sub>m</sub> et taille), la stabilité des gènes de ménage GAPDH et β-actine fut évaluée selon les conditions expérimentales et la GAPDH fut sélectionnée comme gène de référence pour mener nos études. L'efficacité d'amplification des gènes d'intérêt et de la GAPDH fut ensuite calculée à partir des courbes standard de ces ADNc et le système s'est révélé être très sensible, rendant possible l'amplification d'une quantité infime d'ADNc de l'ordre de la copie d'après ces mêmes gammes standard. L'efficacité s'est révélée être proche de 1 pour l'ensemble des gènes autorisant alors l'utilisation de la méthode de quantification du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  qui est utilisée par la suite pour l'étude de la modulation des cytokines sur un modèle *in vitro* sous l'influence des toxines ciguatériques.



## **II.5. Références de la partie II**

- Al-Khatib, K., Carr, D. J. J., 2002. Relative quantification of mRNA: real-time PCR vs. end-point PCR, Amplification, Bio-Rad technical note # 2915.
- Aldriouch, S., Scheuplein, F., Bähring, R., Seman, M., Boyer, O., Koch-Nolte, F., Haag, F., 2009. Characterisation of the R276A gain-of-function mutation in the ectodomain of murine P2X7. *Purinergic Signalling*, 5°:151-161.
- Arocho, A., Chen, B., Ladanyi, M., Pan, Q., 2006. Validation of the 2-delta-deltaCt calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts. *Diagnostic and Molecular Pathology*, 15(1)°: 56-61.
- Bas, A., Forsberg, F., Hammarström, S., Hammarström, M.-L., 2004. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA,  $\beta$ -actine and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 59°: 566-573.
- Bassler, H. A., Flood, S. J. A., Livak, K. J., Marmaro, J., Knorr, R., Batt, C. A., 1995. Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61°: 3724-3728.
- Bustin, S. A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25°: 169–193.
- Bustin, S. A., 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29°: 23-39.
- Collot, S., Alain, S., Denis, F., Ranger-Rogez, S., 2001. Quantification par PCR en temps réel, technologie TaqMan et applications en virologie. *Virologie*, 5°: 439-448.

- Comb, D. G., Perler, F., Kucera, R., Jack, W. E., 1998. Recombinant thermostable DNA polymerase from archaeobacteria. United States Patent # 5 834 285, 10 novembre 1998.
- Dheda, K., Huggett, J. F., Bustin, S. A., Johnson, M. A., Rook, G., Zumla, A., 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques*, 37°:112-119.
- Dooley, J. J., Paine, K. E., Garrett, S. D., Brown, H. M., 2004. Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science*, 68°: 431-438.
- Eckert, K. A., Kunkel, T. A., 1991. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *Genome Research*, 1°: 17-24.
- Embrey, K. J., Searle, M. S., Craik, D. J., 1993. Interaction of Hoechst 33258 with the minor groove of the A+ T-rich DNA duplex d(GGTAATTACC)<sub>2</sub> studied in solution by NMR spectroscopy. *European Journal of Biochemistry*, 211°: 437-447.
- Ferre, F., 1992. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR methods and Application*, 2°: 1-9.
- Foss, D. L., Baarsch, M. J., Murtaugh, M. P., 1998. Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Animal. Biotechnololy*, 9°: 67-78.
- Gibson, U. E., Heid, C. A., Williams, P. M., 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6°: 995-1001.
- Gudnason, H., Dufva, M., Bang, D. D., Wolff, A., 2007. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Research*, 35(19)°: e127.
- Hadjinicolaou, A. V., Demetriou, V. L., Emmanuel, M. E., Kakoyiannis, C. K., Kostrikis, L. G., 2009. Molecular beacon-based real-time PCR detection of primary isolates of

- Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Enteritidis* in environmental and clinical samples. BMC Microbiology, 9°:97, doi:10.1186/1471-2180-9-97.
- Haendler, B., Hofer-Warbinek, R., Hofer, E., 1987. Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. EMBO Journal, 6 :947-950.
- Hamprecht, K., Mikeler, E., Jahn, G., 1997. Semi-quantitative detection of cytomegalovirus DNA from native serum and plasma by nested PCR: influence of DNA extraction procedures, Journal of Virological Methods, 69°: 125-135.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. W., 1996. Real time quantitative PCR. Genome Research, 6°: 986-994.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., Griffith, R., 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. BioTechnology, 10°: 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring DNA amplification reactions. BioTechnology, 11°: 1026-1030.
- Hugget, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A., 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes and Immunity, 1-6.
- Hyndman, D. L., Mitsunashi, L., 2003. PCR primer design. Dans Methods in Molecular Biology, PCR Protocols, Second Edition, Editions John M. S. Bartlett & David Stirling, Humana Press Inc., volume 226°: pp81-88.
- Kelley, M. R., Jurgens, J. K., Tentler, J., Emanuele, N. V., Blutt, S. E., Emanuele, M. A., 1993. Coupled reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique is comparative, quantitative, and rapid: uses in alcohol research involving low abundance mRNA species such as hypothalamic LHRH and GRF. Alcohol, 10°: 185-189.
- Khüne, B. S., Oschmann, P., 2002. Quantitative Real-Time RT-PCR using hybridization probes and imported standard curves for cytokine gene expression analysis. BioTechniques, 33°:1078-1089

- Kretz, K., Callen, W., Hedden, V., 1994. Cycle sequencing. *Genome Research*, 3: S107-S112.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27°: 95-125.
- Larionov, A., Krause, A., Miller, W., 2005. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics*, 6°: 62.
- Lawyer, F., Stoffer, S., Saiki, R., Chang, S., Landre, P., Abramson, R. and Gelfand, D., 1993. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *Genome Research*, 2°: 275-287.
- Liu, F., Abiko, Y., Nishimura, M., Kusano, K., Shi, S., Kaku, T., 2001. Expression of inflammatory cytokines and beta-defensin 1 mRNAs in porcine epithelial rests of Malassez in vitro. *Medical Electron Microscopy*, 34°: 174-178.
- Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications*, 4°: 357-362.
- Livak, L. J., Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Methods*, 25°: 402-408.
- Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W., Short, J.M., Sorge, J.A., Mathur, E. J., 1991. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*, 108(1) °: 1-6.
- Lyon, E., 2001. Mutation detection using fluorescent hybridization probes and melting curve analysis. *Experimental Review in Molecular Diagnostic*, 1(1)°: 92-1001.

- Martinez-Lopez, J., Crooke, A., Grande, A., Grande, S., Ayala, R., Jimenez-Velasco, A., Gamarra, S., Meneu, J.-C., Gilsanz, F., Real-time PCR quantification of haematopoietic chimerism after transplantation: a comparison between TaqMan and hybridization probes technologies. *International Journal of Laboratory Hematology*, doi:10.1111/j.1751-553X.2009.01166.x.
- Mathur, E. J., Exonuclease-deficient thermostable *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase I, 1996. United States Patent 5 489 523, 6 février 1996.
- McCarrey, J. R., Dilworth, D. D., Sharp, R. M., 1992. Semiquantitative analysis of X-linked gene expression during spermatogenesis in the mouse: ethidium-bromide staining of RT-PCR products. *Genetic Analysis, Techniques and Applications*, 9(4)<sup>o</sup>: 117-123.
- McPherson, R. A., 1995. Evolution of polymerase chain reaction to a quantitative laboratory tool. *Clinical Chemistry*, 41<sup>o</sup>: 1065-1067.
- Monis, P. T., Giglio, S., Saint, C. P., 2005. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Analytical Biochemistry*, 340(1)<sup>o</sup>: 24-34.
- Morrison, T. B., Weis, J. J., Wittwer, C. T., 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques*, 24<sup>o</sup>: 954-958, 960, 962.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology*, 51 Pt 1<sup>o</sup>: 263-273.
- Nath, K., Sarosy, J. W., Hahn, J., Di Como, C. J., 2000. Effects of ethidium bromide and SYBR Green I on different polymerase chain reaction systems. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 42<sup>o</sup>: 15-29.

- Norton, D.-M., Batt, C. A., 1999. Detection of viable *Listeria monocytogenes* with a 59 nuclease PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 65°: 2122-2127.
- Ota, N., Hirano, K., Warashima, M., Andrus, A., Mullah, B., Hatanaka, K., Taira, K., 1998. Determination of interaction between structured nucleic acid by fluorescence resonance energy transfer (FRET): selection of target sites for functional nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, 26°: 735-743.
- Overbergh, L., Valckx, D., Waer, M., Mathieu, C., 1999. Quantification of murine cytokine mRNAs using real-time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine*, 11°: 305-312.
- Overbergh, L., Giulietti, A., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C., 2003. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *Journal of Biomolecular Techniques*, 14°: 33-43.
- Pfaffl, M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): 2002-2007.
- Poitras, E., Houde, A., 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2°: 2-11.
- Rasmussen, J. P., Saint, C. P., Monis, P. T., 2007. Use of DNA melting simulation software for *in silico* diagnostic assay design: targeting regions with complex melting curves and confirmation by real-time PCR using intercalating dyes. *BMC Bioinformatics*, 8°:107.
- Rimbach, G., Park, Y. C., Guo, Q., Moini, H., Qureshi, N., Saliou, C., Takayama, K., Virgili, F., Packer, L., 2000. Nitric oxide synthesis and TNF $\alpha$  secretion in RAW 264.7 macrophages modulated by a fermented papaya preparation. *Life Sciences*, 67°: 679-694.
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., Wittwer, C. T., 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245°: 154-160.

## ***Partie II. Développement de la PCR quantitative***

---

- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, 132°: 365–386.
- Rutledge, R. G., Côté, C., 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acid Research*, 31 (16)°: e93.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230°: 1350-1354.
- Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A., 1986. Analysis of enzymatically amplified  $\beta$ -globin and HLA-DQ $\alpha$  DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, 324°: 163-166.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239°: 487-491.
- Searle, M. S., Embrey, K. J., 1990. Sequence-specific interaction of Hoescht 33258 with the minor groove of an adenine-tract DNA duplex studied in solution by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, 18°: 3753-3762.
- Schmittgen, T. D., Zakrajsek, B. A., 2000. Effect of experimental treatment on house-keeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemistry and Biophysical Methods*, 46°: 69-81.
- Stordeur, P., Poulin, L. F., Craciun, L., Zhou, L., Schandene, L., de Lavareille, A., Goriely, S., Goldman, M., 2002. Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*, 259°: 55-64.
- Stordeur, P., Zhoua, L., Byl, B., Brohet, F., Burny, W., de Groote, D., van der Poll, T., Goldman, M., 2003. Immune monitoring in whole blood using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*, 276°: 69-77.

- Stroup, E. S., Roy, S., Mchele, J., Maro, V., Ntabaguzi, S., Siddique, A., Kang, G., Guerrant, R. L., Kirkpatrick, B. D., Fayer, R., Herbein, J., Ward, H., Haque, R., Houpt, E. R., 2006. Real-time PCR detection and speciation of *Cryptosporidium* infection using Scorpion probes. *Journal of Medical Microbiology*, 55°: 1217–1222.
- Talbot, S.G., O-Charoenrat, P., Sarkaria, I. S., Ghossein, R., Reddy, P., Ngai, I., Cordeiro, C. N., Wong, R. J., Kris, M. G., Rusch, V. W., Singh, B., 2004. Squamous cell carcinoma related oncogene regulates angiogenesis through vascular endothelial growth factor-A. *Annals of Surgical Oncology*, 11(5)°: 530–534.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E., 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*, 75°: 291-295.
- Tseng, S. Y., Macool, D., Elliott, V., Tice, G., Jackson, R., Barbour, M., Amorese, D., 1997. An homogeneous fluorescence Polymerase Chain Reaction assay to identify *Salmonella*. *Analytical Biochemistry*, 245(2)°: 207-12.
- Uhlen, M., 1998. Competitive PCR for quantitation of DNA, United States Patent # 5 712 125, 27 janvier 1998.
- Verbeeck, J., Van Kerschaver, E., Wollants, E., Beuselinck, K., Stappaerts, L., Van Ranst, M., 2008. Detection of Perinatal Cytomegalovirus Infection and Sensorineural Hearing Loss in Belgian Infants by Measurement of Automated Auditory Brainstem Response. *Journal of Clinical Microbiology*, 46°: 3564–3568.
- Vernel-Pauillac, F., Merrien, F., 2006. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. *Infection and Immunity*, 74°: 4172-4179.



## ***Partie II. Développement de la PCR quantitative***

---

- Vernel-Pauillac, F., Falcot, V., Whiley, D., Merien, F., 2006. Rapid detection of a chromosomally mediated penicillin resistance-associated *ponA* mutation in *Neisseria gonorrhoeae* using a real-time PCR assay. *FEMS Microbiology Letters*, 255°: 66-74.
- Watson, J. D., Crick, F. H. C., 1953. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171°: 737-738.
- Weil, J.-H., 2001. Métabolisme des glucides. Dans : *Biochimie Générale*, Dunod, Paris, pp 215-262.
- Wittwer, C. T., Ririe, K. M., Andrew, R. V., David, D. A. Gundry, R. A., Balis, U. J., 1997a. The LightCycler: a microvolume fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*, 22(1)°: 176-181.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., Rasmussen, R. P., 1997b. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22(1)°: 130-131, 134-138.
- Yin, J. L., Shackel, N. A., Zekry, A., McGuinness, P. H., Richards, C., Putten, K. V., McCaughan, G. W., Eris, J. M., Bishop, G. A., 2001. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunology and Cell Biology*, 79(3)°: 213-21.



**III. MODULATION DES FACTEURS  
INFLAMMATOIRES PAR LA  
CIGUATOXINE P-CTX-1B**



## **Introduction**

Jusqu'à récemment, seule l'action neuropharmacologique des CTXs avait été investie par l'étude de leur fixation directe sur le CSSP et de leurs conséquences électrophysiologiques notamment sur les cellules neuronales. Cependant les derniers travaux effectués conjointement par les équipes de l'IRD, l'IPNC et l'ILM ont mis en évidence l'action des CTXs sur la production du NO *via* la régulation de la forme inducible de son enzyme de synthèse, l'iNOS (Kumar-Roiné et al, 2008 ; Annexe VI A) et ces résultats nous ont alors conduit à envisager le rôle, négligé jusqu'à présent, des cytokines dans l'intoxication ciguatérique. L'étude cinétique de la production cytokinique par les macrophages murins traités à la P-CTX-1B (3 nM) a été réalisée comparativement à l'effet du LPS (0,5 µg / ml), un inducteur connue des médiateurs de l'inflammation (Publication 1). Les expériences de qPCR ont révélé que les ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6, et TNF- $\alpha$  tout comme celui de l'IL-10 anti-inflammatoire étaient surexprimées par la P-CTX-1B selon des profils d'expression différents de ceux observés avec le LPS. A l'inverse, l'IL-11 n'est pas affecté par la toxine ciguatérique alors qu'elle est induite par le LPS.

**Evaluation de la modulation des médiateurs de l'inflammation par les CTXs *in vitro***

*Publication 1 : Mariko MATSUI, Shilpa KUMAR-ROINE, H. Taiana DARIUS, Mireille CHINAIN, Dominique LAURENT, Serge PAUILLAC (2009) Pacific ciguatoxin 1B-induced modulation of inflammatory mediators in a murine macrophage cell line, Toxicon, doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.039.*

ARTICLE IN PRESS

Toxicon xxx (2009) 1–9



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)



## Pacific ciguatoxin 1B-induced modulation of inflammatory mediators in a murine macrophage cell line

Mariko Matsui<sup>a,b,c</sup>, Shilpa Kumar-Roine<sup>a,b,c</sup>, H. Taiana Darius<sup>d</sup>, Mireille Chinain<sup>d</sup>, Dominique Laurent<sup>b,c</sup>, Serge Pauillac<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire des Biotoxines, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, 9-11 Avenue Paul Doumer, BP61, 98845 Noumea, New Caledonia

<sup>b</sup>Université de Toulouse, UPS, UMR 152 (Laboratoire de pharmacochimie des substances naturelles et pharmacophores redox), 118, rte de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex 9, France

<sup>c</sup>IRD, UMR-152, BP45, 98848 Noumea, New Caledonia

<sup>d</sup>Laboratoire des Microalgues Toxiques, Institut Louis Malardé, BP30, 98713 Papeete, Tahiti, French Polynesia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 March 2009

Received in revised form 14 May 2009

Accepted 14 May 2009

Available online xxxx

#### Keywords:

Ciguatera Fish Poisoning

Cytokines

Nitric oxide

Neurotoxins

Inflammatory system

Quantitative PCR

### ABSTRACT

Ciguatoxins, potent marine neurotoxins responsible for ciguatera, exert their numerous damaging effects through primary binding to the voltage-sensitive sodium channels of excitable cells. Using RAW 264.7 murine macrophages, we report the first experimental study presenting evidence that P-CTX-1B (the most potent congener from the Pacific) could modulate mRNA expression of pro- and anti-inflammatory cytokines as well as of inducible nitric oxide synthase (iNOS). P-CTX-1B, unlike other less potent marine polyether toxins, P-CTX-3C and PbTx-3, induced the overexpression of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, tumor necrosis factor- $\alpha$  and iNOS with different magnitude and kinetic profiles, as compared to bacterial lipopolysaccharide (LPS). Unlike LPS, P-CTX-1B did not modulate IL-11 expression. In this report, we provide new evidence of the P-CTX-1B iNOS- and cytokines-inducing ability and shed new light on host response to potent neurotoxins.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Among the worldwide existing seafood poisonings, Ciguatera Fish Poisoning (CFP) is one of the most common forms of ichthyosarcotoxism in the tropical areas especially in the Pacific, Indian and Caribbean regions (Glaziou and Legrand, 1994; Lewis, 2001). Nevertheless, CFP is no longer restricted to these areas due to the development of international tourism (Crump et al., 1999; de Haro et al., 2003), the increase of worldwide exports of coral fishes (Wong et al., 2005) and the global warming favouring its extent (Chateau-Degat et al., 2005). As a consequence, its prevalence is nowadays estimated to exceed 50,000 cases per year (Van Dolah, 2000; Lehané and Lewis, 2000). Even if its mortality rate is low, CFP results in variable combinations

of gastrointestinal, neurological and cardiovascular manifestations leading to an elevated morbidity and important social and economic impacts (Lehané and Lewis, 2000).

The marine neurotoxins named ciguatoxins (CTXs) are responsible for CFP and belong to a class of lipophilic thermolabile polyether compounds produced by certain strains of benthic dinoflagellates of the genus *Gambierdiscus* (Bagnis et al., 1980). These toxins are transferred up the marine food chain from these microalgae to herbivorous and to carnivorous coral fishes, and undergo an oxidation process concomitant with an increase in toxicity up the chain (Lewis and Holmes, 1993). Among the Pacific CTXs, P-CTX-1B is the most potent congener extracted from carnivorous specimens (Murata et al., 1989) and causes CFP at level as low as 0.1  $\mu$ g/kg of fish flesh (Lewis, 1994). On the other hand, P-CTX-3C, the only congener found throughout the trophic chain, i.e. from the dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. to carnivorous fish (Legrand et al., 1992; Yasumoto et al., 2000) exerts less damaging effects (Dechraoui et al.,

\* Corresponding author. Tel.: +687 27 75 30; fax: +687 27 33 90.  
E-mail address: [spauillac@pasteur.nc](mailto:spauillac@pasteur.nc) (S. Pauillac).

## ARTICLE IN PRESS

2

M. Matsui et al. / Toxicon xxx (2009) 1–9

1999; Darius et al., 2007). All CTXs possess a ladder-shaped polyether framework reminiscent of the brevetoxins (PbTx), another family of marine neurotoxins produced by the dinoflagellate *Karenia brevis* (formerly *Gymnodinium breve*).

Due to their high affinity binding to receptor site 5 of voltage-sensitive sodium channels (VSSC), both PbTx and CTXs have been extensively used in the past as neuropharmacological tools (Bidard et al., 1984; Lombet et al., 1987). The consequent increase of intracellular Na<sup>+</sup> leads to several phenomena, most notably the enhancement of nerve membrane excitability and the cell swelling process which can be both inhibited by tetrodotoxin (Benoit et al., 1996; Mattei et al., 1999). In addition, CTXs induce the selective activation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels and blockade of voltage-gated K<sup>+</sup> channels (Sauviat et al., 2006; Nicholson and Lewis, 2006). However, the multifaceted pathophysiology of CFP cannot be solely explained by the blockade of VSSC or the indirect action of CTXs on ion channels.

Patients suffering from CFP display a complex combination of a few to more than 30 symptoms with gastrointestinal manifestations such as diarrhoea, abdominal pain, vomiting and nausea which develop within the few hours of ingestion of contaminated fishes and usually resolve within few days. Though rarely fatal, cardiovascular symptoms are observed in acute cases with severe bradycardia, hypotension, respiratory difficulties and arrhythmias (Bagnis et al., 1979; Gillespie et al., 1986). The neurological disturbances include paresthesia, ataxia, dysesthesia, arthralgia, myalgia and pruritus, which become prominent after the gastrointestinal disorders. Some of these manifestations, especially pruritus, paresthesia in the extremities and arthralgia, in addition to neuropsychiatric signs such as generalized fatigue, malaise, depression or irritability have been reported to last for weeks or months (Friedman et al., 2008). The chronicity of these symptoms evokes the chronic fatigue syndrome (CFS) which occurs as a secondary state of CFP (Gillespie et al., 1986; Racciatti et al., 2001; Chateau-Degat et al., 2007).

It is noteworthy that some reports have suggested that CFS results from immunologic abnormalities (Klimas et al., 1990; Natelson et al., 2002) and that this illness is mediated by overproduction of inflammatory messengers such as nitric oxide (NO), circulating cytokines, C-reactive protein and  $\beta$ -microglobulin (Buchwald et al., 1997; Gupta et al., 1997; Cannon et al., 1999). Also well documented is the phenomenon of sensitization, recalling an allergy which is observed in previously intoxicated persons who suffer a recurrence of typical CFP symptoms after eating fish which do not produce symptoms in other persons or after consumption of non CFP-associated food like alcohol or nuts (Gillespie et al., 1986; Ruff and Lewis, 1994; Lewis, 2001; Friedman et al., 2008). In parallel, few cases of polymyositis have also been reported after CTXs exposure (Stommel et al., 1991, 1993), demonstrating inflammatory demyelinating diseases. Further observations concern extremely severe cases of CFP in which physicians have suspected an inflammatory neuropathy called the Guillain-Barré syndrome (GBS) (Angibaud and Rambaud, 1998; Gatti et al., 2008).

Based on the inflammatory nature of CFP symptoms collated from the literature, we have previously demonstrated the implication of nitric oxide (NO) in CFP through the dose- and time-dependant modulation of inducible NO synthase (iNOS) mRNA expression in RAW 264.7 murine macrophages treated with P-CTX-1B (Kumar-Roiné et al., 2008). In the present report, we have further explored the involvement of the inflammatory system in CFP by studying the modulation of cytokines expression upon P-CTX-1B treatment in the RAW 264.7 cell line. mRNA expression levels of cytokines and iNOS were measured by quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) and the effects of P-CTX-1B were compared to a well-known inflammatory inducer, the bacterial lipopolysaccharide (LPS). The effects of less potent toxins, P-CTX-3C and PbTx-3, on selected cytokines and iNOS expression were also assessed to provide a potential link between toxins potency and inflammatory response.

Although CFP is the most frequently reported seafood poisoning in the world, until now few studies have investigated its immunological aspects. In this report, we provide new evidence of the possible implication of the inflammatory system in its complex pathophysiology.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

The murine macrophage RAW 264.7 cell line (TIB-71) was generously provided by Dr. M. Adib-Conquy (Institut Pasteur, Paris, France). P-CTX-1B and P-CTX-3C were purified at the Institut Louis Malardé (Tahiti, French Polynesia) from *Gymnothorax javanicus* liver and from cultures of the dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis*, respectively, as previously described by Legrand et al. (1989). PbTx-3 was obtained from Latoxan (Valence, France). LPS (*Escherichia coli*, 0111:B4), thiazolyl blue tetrazolium bromide (3-(4',5'-dimethylthiazol-2'-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MTT) and reagents used for cell culture were obtained from Sigma Aldrich (Lyon, France), while those used for qPCR were purchased from Roche Applied Science (Auckland, New Zealand), unless otherwise stated.

### 2.2. Cell cultures

RAW 264.7 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 25 mM HEPES buffer, 4.5 g/l D-glucose, 0.2% sodium bicarbonate, 1 mM sodium pyruvate and 2 mM L-glutamine, and supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% of antibiotic and antifungal solution (penicillin, 10,000 U; streptomycin, 10  $\mu$ g/ml; amphotericin B, 25  $\mu$ g/ml). Cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. RAW 264.7 cells were seeded at 5.0  $\times$  10<sup>4</sup> cells/well in 96-well plates and at 2.5  $\times$  10<sup>5</sup> cells/well in 24-well plates, respectively, for cytotoxicity and mRNA quantification assays.

### 2.3. Cytotoxicity assay

The effect of LPS and P-CTX-1B on cell viability was determined by MTT assay according to previous methods

Please cite this article in press as: Matsui, M., et al., Pacific ciguatoxin 1B-induced modulation of inflammatory mediators in a murine macrophage cell line, Toxicon (2009), doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.039



## ARTICLE IN PRESS

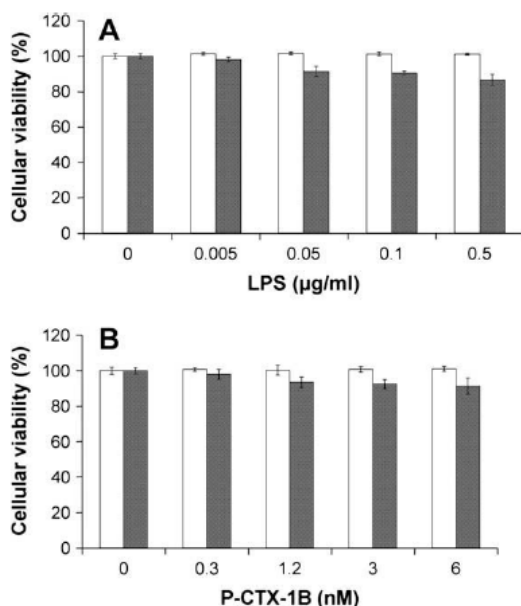
M. Matsui et al. / *Toxicon xxx (2009) 1–9*

3

(Manger et al., 1995; Bottein-Dechraoui et al., 2005; Boydron-Le Garrec et al., 2005). Briefly, cells were incubated with LPS or P-CTX-1B ( $n = 6$ ) at variable concentrations as indicated in the figure legend (Fig. 1). Controls with non-treated cells were run in parallel ( $n = 10$ ). Following a 24 or 48 h incubation period, the medium was removed and the cells further incubated for 1 h in the presence of 50  $\mu$ l of MTT (0.7 mg/ml in phosphate buffered solution). The resulting crystal formazan was then dissolved by adding 150  $\mu$ l of dimethyl sulfoxide during 1 h. The absorbance (A) was measured at 490 nm using an automated microplate reader (ELX 800, Bio-Tek Instruments, Inc., Fisher Scientific, France) and cell viability was estimated as the percentage of absorbance of sample relative to control.

#### 2.4. Total RNA isolation and cDNA synthesis

RAW 264.7 cells were incubated with LPS as a well-known potent inducer of inflammation or with P-CTX-1B, P-CTX-3C or PbTx-3 ( $n = 3$ ) as putative inflammatory mediators, at the final concentration indicated in the figure legends (Figs. 2–4). Control cells were incubated in parallel without toxins. Cells from each well were then harvested with 400  $\mu$ l of the PAXgene tube reagent (Pre-AnalytiX, Qiagen, Doncaster, Australia), which induces total cell lysis and nucleic acid stabilization (Stordeur et al., 2003). Total RNA was extracted with the commercial High Pure RNA Isolation kit as recommended by the manufacturer. cDNA was synthesized using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit with the supplied random hexamers. Nucleic acid concentrations were measured at  $A_{260}$  nm with a spectrophotometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany).



**Fig. 1.** Effect of LPS and P-CTX-1B on the viability of RAW 264.7 cells. Cells were incubated with increasing concentrations of LPS (A) or P-CTX-1B (B), as described in Materials and methods, during 24 h (open columns) and 48 h (filled columns). Values are means  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ).

#### 2.5. Quantitative PCR

Sequence of primers (Table 1) were designed with the LightCycler® Primer Probe Design Software 2.0 (Roche Applied Science) or the Primer3 v0.4.0 software on line (Rozen and Skaletsky, 2000) according to gene sequences retrieved from the GenBank® database. Primers were synthesized by Proligo Singapore Pty Ltd. (Biopolis, Singapore). PCR amplification and analysis were achieved using the LightCycler® 2.0 instrument (software v4.0; Roche Applied Science). All reactions were performed with the commercial LightCycler® FastStart DNA Master SYBR green I kit. Each PCR reaction was carried out using a final volume of 20  $\mu$ l containing: 2.4  $\mu$ l of 25 mM of  $MgCl_2$ ; 1  $\mu$ l of 1  $\mu$ M of each coupled primers; 2  $\mu$ l of 10X SYBR Green I reaction mix, 2  $\mu$ l of cDNA and  $H_2O$  up to 20  $\mu$ l. Amplification conditions consisted of an initial preincubation at 95 °C for 10 min (FastStart Taq DNA polymerase activation), followed by amplification of the target DNA for 45 cycles. Each cycle consisted of the 3 following steps: 95 °C for 8 s, 60 °C for 5 s (iNOS) or 8 s (cytokines), and 72 °C for 12 s (iNOS) or 16 s (cytokines), the fluorescence being read during this last step of elongation. Melting curve analysis was performed after amplification at a linear temperature transition rate of 0.1 °C/s from 65 to 95 °C with continuous fluorescence acquisition.

#### 2.6. Quantification of cytokines mRNA

During the qPCR, fluorescent signal of each cycle was plotted against cycle number by the LightCycler software. The threshold cycle ( $C_t$ ) is defined as the number of cycles at which the fluorescence is significantly different from that of the background defined by the software, usually ten times the standard deviation of the baseline (Overbergh et al., 1999). Based on previous experiments (Kumar-Roiné et al., 2008), glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) was selected as reference gene and the relative quantification of iNOS and cytokine mRNA was calculated via the "delta-delta  $C_t$  method", based on  $C_t$  difference using the following equation: expression ratio =  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , where  $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{target}} - C_{t_{reference}})_{Time\ x} - (C_{t_{target}} - C_{t_{reference}})_{Time\ 0}$ . Therefore, the expression level of each target gene was normalized to the expression level of the reference gene (Livak and Schmittgen, 2001).

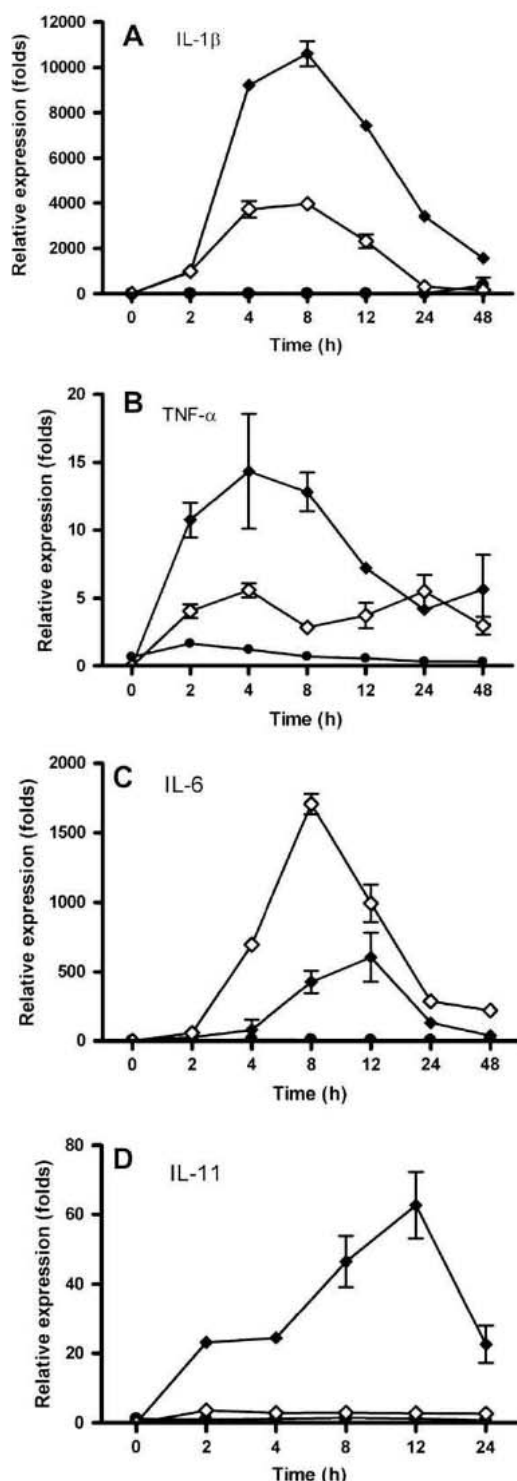
#### 2.7. Statistical analysis

Two-way ANOVA followed by a Bonferroni's post test for multiple comparisons was used to study the association of mRNA expression levels between toxin stimulation and time points using GraphPad Prism v4 (GraphPad Software Inc., USA). Only  $P$  values  $< 0.05$  were considered significant.

### 3. Results

#### 3.1. Effect of LPS and P-CTX-1B on RAW 264.7 cell line viability

In the first experiment, the potential cytotoxicity of LPS and P-CTX-1B on RAW 264.7 cells was investigated. Cell



viability was quantified using the MTT assay with increasing concentrations of LPS (0–0.5  $\mu$ g/ml) or P-CTX-1B (0–6 nM) during 24 h and 48 h (Fig. 1). Neither LPS (Fig. 1A) nor P-CTX-1B (Fig. 1B) seemed to affect the viability of cells at 24 h. However, combining long incubation period (48 h) and maximal LPS or P-CTX-1B concentrations resulted in a slight decrease in cell viability (87% and 91%, respectively). Consequently, the working concentrations and the time ranges for both toxins were chosen to ensure little to no impact on cell viability throughout the successive experiments.

### 3.2. Time-course production of pro-inflammatory cytokines elicited by LPS or P-CTX-1B

To investigate P-CTX-1B effects on the inflammatory mediators, the mRNA expression levels of 4 important pro-inflammatory cytokines were studied in RAW 264.7 cells during a 24 or 48 h kinetic experiment (Fig. 2). First, as can be shown from a representative experiment, we confirmed the overexpression of interleukin (IL)-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , IL-6 and IL-11 following treatment with LPS (0.5  $\mu$ g/ml). As expected, mRNAs for IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were already strongly induced by LPS at 2 h and exhibited a maximum expression ratio of 10,600 and 14.3 folds, respectively, after 4–8 h of exposure (Fig. 2A and B). This is followed by the overexpression of IL-6 (600 folds) and IL-11 (62.7 folds) which both peaked at 12 h (Fig. 2C and D). In contrast, P-CTX-1B (3 nM) led to overexpression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 but did not affect IL-11 expression. IL-1 $\beta$  was highly responsive to P-CTX-1B stimulation with kinetic profile similar to that of LPS-induced production (Fig. 2A) but with a lower peak (4000 folds at 4–8 h). Concerning TNF- $\alpha$  and IL-6, their time-course expression upon P-CTX-1B stimulation completely differed from that of LPS-treated cells. Indeed, P-CTX-1B demonstrated a more salient effect on TNF- $\alpha$  mRNA production, which remained fairly constant throughout the 48 h incubation period (mean expression ratio of around 6 folds; Fig. 2B). IL-6 mRNA production showed a maximum of 1710 folds at 8 h under P-CTX-1B condition (Fig. 2C), which was much higher and faster than the response observed under LPS stimulation.

### 3.3. Induction of iNOS and anti-inflammatory cytokine IL-10 upon LPS or P-CTX-1B treatment

We further explored and compared the time-course effects of P-CTX-1B (3 nM) and of LPS-treated (0.5  $\mu$ g/ml) cells on the mRNA expression of IL-10, and of iNOS (Fig. 3).

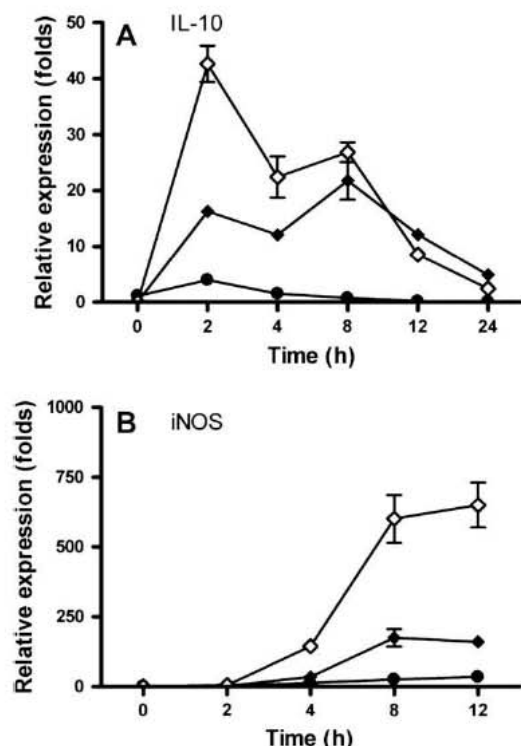
**Fig. 2.** mRNA expression of pro-inflammatory cytokines upon LPS and P-CTX-1B stimulation in RAW 264.7 cells. The effect of LPS (0.5  $\mu$ g/ml;  $\blacklozenge$ ) and P-CTX-1B (3 nM;  $\diamond$ ) on cytokines IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-6 (C) and IL-11 (D) mRNA expression in RAW 264.7 cells was compared to control mRNA expression (without toxin;  $\bullet$ ). Kinetics and quantitative PCR were carried out as described in Materials and methods. Results are expressed in folds expression ratio of mRNA relative to control without toxin at time 0. Values are means  $\pm$  SEM for LPS (typical experiment representative of five other experiments) and for P-CTX-1B ( $n=3$ ). Compared with control expression, LPS-induced cytokines expression lead to a  $P$  value  $<0.05$  and P-CTX-1B-induced IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 expression lead to a  $P$  value  $<0.05$ .



## ARTICLE IN PRESS

M. Matsui et al. / Toxicon xxx (2009) 1–9

5



**Fig. 3.** mRNA expression of anti-inflammatory IL-10 and iNOS enzyme upon LPS and P-CTX-1B stimulation in RAW 264.7 cells. The effect of LPS (0.5 µg/ml; ●) and P-CTX-1B (3 nM; ◇) on anti-inflammatory cytokine IL-10 (A) and iNOS (B) mRNA expression in RAW 264.7 cells was compared to control mRNA expression (without toxin; ●). Kinetics and quantitative PCR were carried out as described in Materials and methods. Results are expressed in folds expression ratio of mRNA relative to control without toxin at time 0. Values are means ± SEM for LPS (typical experiment representative of five other experiments) and for P-CTX-1B ( $n=3$ ). For both LPS- and P-CTX-1B-induced expression, comparison with control leads to a  $P$  value  $<0.05$ .

In both cases typical results from a representative experiment with LPS are shown. IL-10 mRNA was over-expressed by LPS treatment with a maximum expression ratio of 21 folds at 8 h (Fig. 3A). In contrast, P-CTX-1B induced a sharp production of IL-10 mRNA with a maximum expression ratio of 43 folds reached within 2 h (Fig. 3A). Thereafter, expression profiles of both toxins declined (Fig. 3A). iNOS mRNA expression profiles (Fig. 3B) were quite similar, except for the intensity of response which was higher under P-CTX-1B incubation as compared to LPS stimulation after 4 h (145 and 35 folds respectively). Thereafter, both expression patterns showed an increase during the first 12 h of incubation, however, further incubation led to a dramatic increase in response to P-CTX-1B as compared to LPS (Fig. 3B).

#### 3.4. Effect of less potent toxins on cytokines and iNOS mRNA expression

In an attempt to find a correlation between toxin potency and inflammatory inductive properties, the effects

of two less potent toxins, P-CTX-3C (1000 nM) and PbTx-3 (1000 nM) on cytokines and iNOS expression were compared to that of P-CTX-1B (3 nM) in RAW 264.7 cell line model (Fig. 4). As previously shown P-CTX-1B induced a marked overexpression of IL-1 $\beta$ , IL-10 and iNOS at 12 h compared to control expression (Fig. 4A–C). These levels remained high at 24 h except for IL-10 which dropped dramatically, but to values still significantly different from control (Fig. 4B). In contrast, even a high concentration of P-CTX-3C or PbTx-3 was ineffective at triggering significant cytokines or iNOS mRNA expression during the 24 h incubation.

#### 4. Discussion

CTXs have long been demonstrated to bind to receptor site 5 of the VSSC (Bidard et al., 1984; Lombet et al., 1987), however, their overall physiological effects still need to be clarified. Following the first experimental demonstration of the implication of iNOS in CFP (Kumar-Roiné et al., 2008), in this *in vitro* study, we provide the first evidence of the modulation of inflammatory mediators in P-CTX-1B-treated murine macrophages. By determining their mRNA levels using qPCR techniques, we have examined the cytokine and iNOS responses in RAW 264.7 murine macrophages following stimulation with P-CTX-1B. The expression profiles were compared with that of LPS, a major cell wall component of Gram-negative bacteria, endowed with potent *in vitro* and *in vivo* inflammation-promoting activity (Triantafyllou and Triantafyllou, 2005).

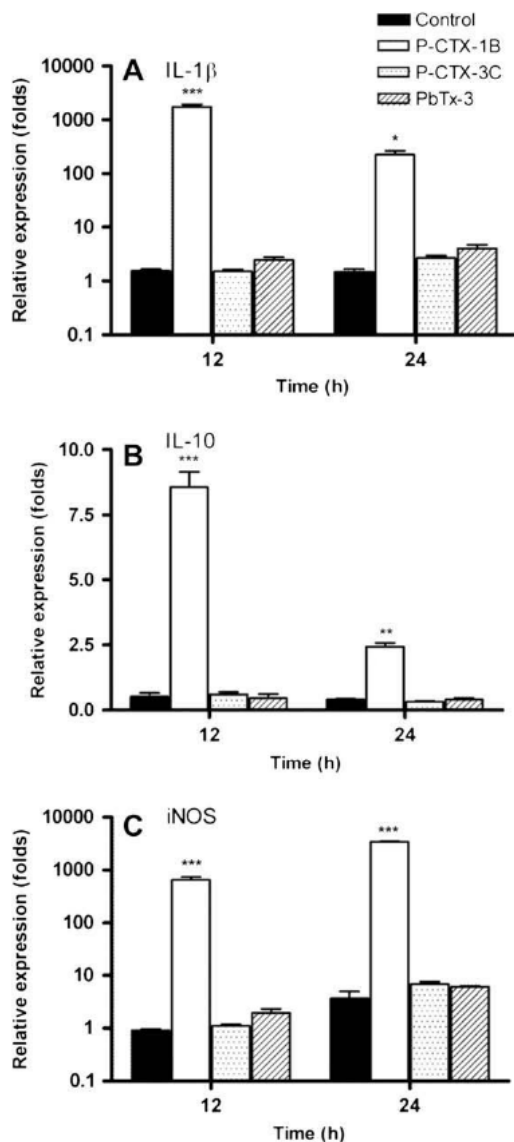
##### 4.1. Modulation of cytokines and iNOS expression in CFP

In our studies we found that P-CTX-1B at 3 nM led to overexpression of three pro-inflammatory (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6) and one anti-inflammatory (IL-10) cytokines whose expression profiles differed significantly from that observed following LPS stimulation at 0.5 µg/ml. In contrast, mRNA expression of IL-11 (a cytokine endowed with a dual effect) was not influenced by P-CTX-1B, as opposed to LPS. The iNOS mRNA expression on the other hand, was found to be more strongly up-regulated by treatment with P-CTX-1B than with LPS (6-fold difference in their relative expression ratio at 8–12 h).

This new evidence of the implication of the inflammatory system in CFP is in good agreement with a recent DNA microarray study conducted on mice exposed to a sublethal dose of P-CTX-1B showing peripheral blood gene expression profiles that were consistent with a Th2 immune response (Ryan et al., 2007). In this study, the authors also reported a decrease in IL-1 $\beta$  expression in the whole blood, confirmed later on in the liver of mice (Morey et al., 2008). These observations are in contrast with our present findings, but such discrepancies can be explained by the difference inherent to *in vivo* and to *in vitro* biological models.

Although the innate immune response to non-protein toxins is still poorly understood, some marine biotoxins have been found to induce *in vitro* pro-inflammatory cytokines expression in various cells of monocyte/macrophage lineage. For example, exposure to maitotoxins,

Please cite this article in press as: Matsui, M., et al., Pacific ciguatoxin 1B-induced modulation of inflammatory mediators in a murine macrophage cell line, Toxicon (2009), doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.039



**Fig. 4.** Effect of some polyether marine neurotoxins on the mRNA expression of inflammatory cytokines and iNOS in RAW 264.7 cells. Cells were stimulated with P-CTX-1B (3 nM), P-CTX-3C (1000 nM) or PbTx-3 (1000 nM) and assayed for their mRNA expression of pro-inflammatory IL-1 $\beta$  (A), anti-inflammatory IL-10 (B) and iNOS (C), compared to control (unstimulated cells). Kinetics and quantitative PCR were carried out as described in Materials and methods. Values are means  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). \* $P$  value  $< 0.05$ ; \*\* $P$  value  $< 0.01$ ; \*\*\* $P$  value  $< 0.001$ .

a highly potent water-soluble polyether toxin also produced by *Gambierdiscus* spp, rapidly induced IL-1 $\beta$  synthesis (Verhoef et al., 2004). Similarly, okadaic acid, a major polyether toxin involved in diarrhetic shellfish poisoning, also proved to be a potent inducer of TNF- $\alpha$  mRNA (Sung et al., 1992). In contrast, the causative agent of amnesic shellfish poisoning, domoic acid, which is an

**Table 1**

Primer sequences for PCR amplification of murine iNOS, cytokines and reference genes.

Target gene	Sequence (5' $\rightarrow$ 3') <sup>a</sup>	Product size (bp) <sup>b</sup>	Product Tm (°C) <sup>c</sup>
GAPDH	(F) TCATCCCAGAGCTGAACG (R) GGGAGTTGCTGTTGAAGTC	213	88.3
IL-1 $\beta$	(F) GTGTGGATCCCAAGCAATAC (R) GTTGTTTCCCAGGAAGACAG	161	84.4
IL-6	(F) CAATTCCAGAAACCGCT (R) GCAAGTCATCATCGT	268	86.0
IL-10	(F) ATTCCTGGGTGAGAAG (R) CTCTGTCTAGGTCCTGG	259	84.9
IL-11	(F) GCTGTTCTCTAACCCTG (R) CTGGCTCCAGAGTCTT	250	88.9
iNOS	(F) CCTCATGCCATTGAGTTC (R) AGTCATGTTTGCCGTC	349	88.5
TNF- $\alpha$	(F) CAACGGCATGGATCTCA (R) GGACTCCGAAAGTCT	325	88.8

<sup>a</sup> (F) and (R) indicate forward and reverse primer sequences, respectively.

<sup>b</sup> PCR products size in base pairs (bp).

<sup>c</sup> PCR products melting temperature (Tm) in °C.

excitatory amino acid, failed to induce significant TNF- $\alpha$  release (Mayer et al., 2007).

It should be stressed that at the whole organism level, inflammatory mediators are implicated in various functions including cell–cell regulations in the immunological and the hematopoietic system. In addition, IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  produced by antigen-presenting cells play a major role in the central nervous system in regulating growth-promoting activity, neuromodulatory action, fever induction, sleep, decreased food intake and in the pathogenesis of various others diseases (Elenkov et al., 2005). The early production of the pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6) observed in this study could be consistent with the fever, and the neurological and neuropsychiatric disorders experienced by CFP patients (Friedman et al., 2008). Therefore, a complete understanding of the potential neurotoxic and/or neuroprotective effects of the balance of pro- versus anti-inflammatory cytokines will lead to a better understanding of toxins-induced pathophysiological effects in animal models, and ultimately in humans.

#### 4.2. CFP-associated neuroinflammatory symptoms and their possible relationship to metabolic and regulation pathways

CFP results in complex and variable combinations of gastrointestinal, neurological and cardiovascular symptoms but represents an intoxication with a low mortality rate of 0.1% (Bagnis et al., 1979). Yet, some severe CFP cases associated with the appearance of inflammatory demyelinating neuropathies like GBS (Angibaud and Rambaud, 1998; Gatti et al., 2008) and/or myopathies like polymyositis have been reported (Stommel et al., 1991, 1993). GBS is commonly known to involve inflammatory injuries notably after exposure to infectious diseases associated with *Campylobacter jejuni*, cytomegalovirus or Epstein–Barr virus (Huges et al., 1999) and polymyositis is referred to as a secondary autoimmune process probably resulting in muscle injury (Figarella-Branger et al., 2003).



## ARTICLE IN PRESS

M. Matsui et al. / *Toxicon xxx* (2009) 1–9

7

**Table 2**Differential activity of various polyether toxins: affinity for Na<sup>+</sup> channel, cytotoxicity, acute toxicity and effect on IL-1 $\beta$ , IL-10 and iNOS mRNA production.

Toxins	Affinity to Na <sup>+</sup> channel	Na <sup>+</sup> dependent cytotoxicity	Acute toxicity	mRNA production (concentration of toxin) <sup>b</sup>		
	$K_i$ (nM) <sup>a</sup>	ED <sub>50</sub> (M) <sup>a</sup>	LD <sub>50</sub> ( $\mu$ g/kg) <sup>a</sup>	IL-1 $\beta$	IL-10	iNOS
P-CTX-1B	0.041	$1.13 \times 10^{-11}$	0.33	1730.0 $\pm$ 217.4 (3 nM)	8.6 $\pm$ 0.6 (3 nM)	649.4 $\pm$ 80.8 (3 nM)
P-CTX-3C	0.49	$1.46 \times 10^{-10}$	2.5	NS <sup>c</sup> (1000 nM)	NS <sup>c</sup> (1000 nM)	NS <sup>c</sup> (1000 nM)
PbTx-3	2.24	$1.5 \times 10^{-8}$	>200	NS <sup>c</sup> (1000 nM)	NS <sup>c</sup> (1000 nM)	NS <sup>c</sup> (1000 nM)

<sup>a</sup> For a full description, see Dechraoui et al., 1999.  $K_i$  were calculated at 1 nM [<sup>3</sup>H]PbTx-3 using the Ligand program (Munson and Rodbard, 1980). The effective dose at 50% (ED<sub>50</sub>) was determined using the Allfit program (DeLean et al., 1978). Acute toxicity was determined by LD<sub>50</sub> on intraperitoneally injected mice.

<sup>b</sup> mRNA production is expressed in folds change relative to control at time 0 after an incubation of 12 h with toxins. Values are means  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ).

<sup>c</sup> Not significantly different from the control.

In CFP intoxication, such clinical cases could result from the neurobiological effects of CTXs-induced swelling of nodes of Ranvier. This ability is known to be mediated through increased and sustained Na<sup>+</sup> entry via VSSC followed by osmotic disturbances due to an influx of water (Benoit et al., 1996). The increase of intracellular Na<sup>+</sup> has been proposed to be implicated in the induction of neuroinflammatory diseases (Bechtold and Smith, 2005). Thus, such ionic misbalance effects could lead to neuronal degeneration, as observed in severe human CFP intoxications, especially during a massive exposure to CTXs.

Moreover, P-CTX-1B at 10 nM have been shown to cause a transient increase of the intracellular inositol-1,4,5-phosphate (IP3) and the intracellular Ca<sup>2+</sup> in myotubes originated from rat skeletal muscle cells in primary culture (Hidalgo et al., 2002). As IP3 and Ca<sup>2+</sup> regulate the expression of numerous genes (Cahill et al., 1996; Carrasco et al., 2004), it is likely that an acute phase of CFP might trigger the activation of secondary mediators which could lead to genes over- and/or down-regulation with the possible modulation of the inflammatory process in CFP.

The major health impact of CFP is attributed to its morbidity associated with the long-lived neurological and general features including chronic fatigue syndrome, resurgence of pruritus, and peripheral neuropathy (Pearn, 2001). These persisting symptoms observed in human ciguatera poisoning have been suggested to result from either persistence of CTXs in tissues and/or from immunological process (Ruff and Lewis, 1994). However, it has been recently reported that CTXs concentrations in blood of P-CTX-1B-treated mice decrease rapidly over 4 h (Bottein-Dechraoui et al., 2008). These observations strongly suggest that the persistence of neurological signs must be related to the toxin concentration over the first hours rather than to the persistence of toxin in tissues, involving a possible cell signalisation pathway.

#### 4.3. Comparison with toxins sharing a similar pharmacological activity

CTXs and PbTx share the same binding site on VSSC (Lombet et al., 1987; Dechraoui et al., 1999); however, CTXs show higher cytotoxic effects on neuroblastoma cells which correlate to their very low LD<sub>50</sub> in mice. In contrast, although PbTx bind with high affinity to VSSC and give rise to significant cytotoxic effects, they are poorly toxic to mice (Dechraoui et al., 1999). For example, the following intraperitoneal toxicity in mice and affinity

to VSSC were recorded for P-CTX-1B and PbTx-3: LD<sub>50</sub> = 0.33  $\mu$ g/kg versus >200  $\mu$ g/kg, whereas  $K_i$  = 0.04 nM versus 2 nM for VSSC, respectively (Table 2). In other words, a ~600-fold increase in toxicity of P-CTX-1B over PbTx-3 is only related to a 50-fold increase in the affinity to VSSC.

In this study, we highlighted the potential link between the response intensity observed in known biological activities (affinity to VSSC, Na<sup>+</sup> dependant cytotoxicity and acute toxicity in mice) and the capacity to modulate IL-1 $\beta$ , IL-10 and iNOS mRNAs overexpression of two other potent toxins (P-CTX-3C and PbTx-3), as compared to P-CTX-1B (Table 2). In contrast to P-CTX-1B, P-CTX-3C and PbTx-3 were both ineffective in the induction of cytokines or iNOS mRNA expression even at high concentration. The results suggest that the hyperactivation of pro-inflammatory cytokine secretion may be a significant component of the human response against highly potent CTXs, as P-CTX-1B. Taken together, these observations would provide a better understanding of the pathophysiology of CFP and could explain its particular multifaceted symptoms depending on toxin profiles of individual fish. These results could provide an additional insight to the structure–activity relationship which has been tentatively established previously (Van Dolah, 2000).

However, the implication of inflammatory systems has been shown in severe brevetoxicosis of mammals. Indeed, immunohistochemical staining of tissues from affected manatees revealed PbTx immunoreactivity in lymphocytes and macrophages associated with inflammatory lesions of the respiratory tract and with lymphoid tissues (Bossart et al., 1998). A recent report also demonstrated that PbTx-6-injected mice produce genomic-wide changes in liver expression attributable to an acute-phase inflammatory response (Walsh et al., 2003).

CTXs have been widely studied in pharmacology as they exert their damaging electrophysiological effects by direct binding on VSSC. However, this study has helped enlighten the multifaceted biological activities of CTXs, with particular emphasis on the neuroinflammatory aspect of CFP. It should be stressed that to present, no specific therapy for this disease has been identified (Bagnis et al., 1979; Lehane and Lewis, 2000; Nicholson and Lewis, 2006; Friedman et al., 2008). In this context, the CTXs-induced modulation of cytokines and iNOS gene expression open the way for the development of new target-specific therapeutic drugs through the screening of medicinal plants traditionally used in the Pacific to treat CFP.

Please cite this article in press as: Matsui, M., et al., Pacific ciguatoxin 1B-induced modulation of inflammatory mediators in a murine macrophage cell line, *Toxicon* (2009), doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.039

## Acknowledgements

This work was partly funded by a grant from the French Overseas Ministry. M. M. and S. K.-R. were supported by a doctoral fellowship from the Southern Province of New Caledonia and IRD (Paris, France), respectively.

## Conflict of interest

There is no conflict of interest in the reported work.

## References

- Angibaud, G., Rambaud, S., 1998. Serious neurological manifestations of ciguatera: is the delay unusually long? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 64, 688–694.
- Bagnis, R., Kuberski, T., Laugier, S., 1979. Clinical observations on 3009 cases of Ciguatera (fish poisoning) in the South Pacific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28 (6), 1067–1073.
- Bagnis, R., Chanteau, S., Chungue, E., Hurtel, J.M., Yasumoto, T., Inoue, A., 1980. Origins of ciguatera poisoning: a new dinoflagellate, *Gambierdiscus toxicus* Adachi and Fukuyo, definitively involved as causal agent. *Toxicon* 18 (2), 199–208.
- Bechtold, D.A., Smith, K.J., 2005. Sodium-mediated axonal degeneration in inflammatory demyelinating disease. *J. Neurol. Sci.* 233 (1–2), 27–35.
- Benoit, E., Juzans, P., Legrand, A.-M., Molgo, J., 1996. Nodal swelling produced by ciguatera-induced selective activation of sodium channels in myelinated nerve fibers. *Neuroscience* 71 (4), 1121–1131.
- Bidard, J., Vijverberg, H.P.M., Frelin, C., Chungue, E., Legrand, A.-M., Bagnis, R., Lazdunski, M., 1984. Ciguatoxin is a novel type of Na<sup>+</sup> channel toxin. *J. Biol. Chem.* 259 (13), 8353–8357.
- Bossart, G.D., Baden, D.G., Ewing, R.Y., Roberts, B., Wright, S.D., 1998. Brevetoxicosis in Manatees (*Trichechus manatus latirostris*) from the 1996 epizootic: gross, histologic and immunohistochemical features. *Toxicol. Pathol.* 26 (2), 276–282.
- Bottein-Dechraoui, M.-Y., Tiedeken, J.A., Persad, R., Wang, Z., Granade, H.R., Dickey, R.W., Ramsdell, J.S., 2005. Use of two detection methods to discriminate ciguatoxins from brevetoxins: application to great barracuda from Florida Keys. *Toxicon* 46 (3), 261–270.
- Bottein-Dechraoui, M.-Y., Rezvani, A.H., Gordon, C.J., Levin, E.D., Ramsdell, J.S., 2008. Repeat exposure to ciguatoxin leads to enhanced and sustained thermoregulatory, pain threshold and motor activity responses in mice: relationship to blood ciguatoxin concentrations. *Toxicology* 246, 55–62.
- Boydron-Le Garrec, R., Benoit, E., Sauviat, M.-P., Lewis, R.J., Molgò, J., Laurent, D., 2005. Ability of some plant extracts, traditionally used to treat ciguatera fish poisoning, to prevent the in vitro neurotoxicity produced by sodium channel activators. *Toxicon* 46 (6), 625–634.
- Buchwald, D., Wener, M.H., Pearlman, T., Kith, P., 1997. Markers of inflammation and immune activation in chronic fatigue and chronic fatigue syndrome. *J. Rheumatol.* 24, 372–376.
- Cahill, M.A., Janknecht, R., Nordheim, A., 1996. Signalling pathways: jack of all cascades. *Curr. Biol.* 6 (1), 16–19.
- Cannon, J.G., Angel, J.B., Ball, R.W., Abad, L.W., Fagioli, L., Komaroff, A.L., 1999. Acute phase responses and cytokine secretion in chronic fatigue syndrome. *J. Clin. Immunol.* 19 (6), 414–421.
- Carrasco, M.A., Jaimovich, E., Kemmerling, U., Hidalgo, C., 2004. Signal transduction and gene expression regulated by calcium release from internal stores in excitable cells. *Biol. Res.* 37 (4), 701–712.
- Chateau-Degat, M.-L., Chinain, M., Cerf, N., Gingras, S., Hubert, B., Dewailly, E., 2005. Seawater temperature, *Gambierdiscus* spp. variability and incidence of ciguatera poisoning in French Polynesia. *Harmful Algae* 4, 1053–1062.
- Chateau-Degat, M.-L., Huin-Blondy, M., Chinain, M., Darius, T., Legrand, A.-M., Nguyen, N.L., Laudon, F., Chansin, R., Dewailly, E., 2007. Prevalence of chronic symptoms of ciguatera disease in French Polynesian adults. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77 (5), 842–846.
- Crump, J.A., McLay, C.L., Chambers, S.T., 1999. Ciguatera fish poisoning. *Postgrad. Med. J.* 75, 678–679.
- Darius, H.T., Ponton, D., Revel, T., Cruchet, P., Ung, A., Tchou Fouc, M., Chinain, M., 2007. Ciguatera risk assessment in two toxic sites of French Polynesia using the receptor-binding assay. *Toxicon* 50, 612–626.
- 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.
- DeLean, A., Munson, P.J., Guardabasso, V., Rodbard, D., 1978. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am. J. Physiol.* 2, 97–102.
- Elenkov, I.J., Iezzoni, D.G., Daly, A., Harris, A.G., Chrousos, G.P., 2005. Cytokine dysregulation, inflammation and well-being. *Neuro-immunomodulation* 12, 255–269.
- Figarella-Branger, D., Civatte, M., Bartolli, C., Pellissier, J.-F., 2003. Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. *Muscle Nerve* 28, 659–682.
- Friedman, M.A., Fleming, L.E., Fernandez, M., Biefang, P., Schrank, K., Dickey, R., Bottein, M.-Y., Backer, L., Ayyar, R., Weisman, R., Watkins, S., Granade, R., Reich, A., 2008. Ciguatera fish poisoning: treatment, prevention and management. *Mar. Drugs* 6, 456–479.
- Gatti, C., Oelher, E., Legrand, A.-M., 2008. Severe seafood poisoning in French Polynesia: a retrospective analysis of 129 medical files. *Toxicon* 51, 746–753.
- Gillespie, N.C., Lewis, R.J., Pearn, J.H., Bourke, A.T.C., Holmes, M.J., Bourke, J.B., Shields, W.J., 1986. Ciguatera in Australia – occurrence, clinical features, pathophysiology and management. *Med. J. Aust.* 145, 584–590.
- Glaziou, P., Legrand, A.-M., 1994. The epidemiology of ciguatera fish poisoning. *Toxicon* 32 (8), 863–873.
- Gupta, S., Aggarwal, S., See, D., Starr, A., 1997. Cytokine production by adherent and non-adherent mononuclear cells in chronic fatigue syndrome. *J. Psychiatr. Res.* 31 (1), 149–156.
- de Haro, L., Pommier, P., Valli, M., 2003. Emergence of imported ciguatera in Europe: report of 18 cases at the Poison Control Centre of Marseille. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 41 (7), 927–930.
- Hidalgo, J., Libersona, J.L., Molgò, J., Jaimovich, E., 2002. Pacific ciguatoxin-1b effect over Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> currents, inositol 1,4,5-triphosphate content and intracellular Ca<sup>2+</sup> signals in cultured rat myotubes. *Br. J. Pharmacol.* 137 (7), 1055–1062.
- Huges, R.A.C., Hadden, R.D.M., Gregson, N.A., Smith, K.J., 1999. Pathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *J. Neuroimmunol.* 100, 74–97.
- Klimas, N.G., Salvato, F.R., Morgan, R., Fletcher, M.A., 1990. Immunologic abnormalities in chronic fatigue syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 28 (6), 1403–1410.
- Kumar-Roiné, S., Matsui, M., Chinain, M., Laurent, D., Pauillac, S., 2008. Modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in RAW 264.7 murine macrophages by Pacific ciguatoxin. *Nitric Oxide* 19 (1), 21–28.
- Legrand, A.-M., Litaudon, M., Genthon, J.N., Bagnis, R., Yasumoto, T., 1989. Isolation and some properties of ciguatoxin. *J. Appl. Physiol.* 1, 1183–1188.
- Legrand, A.-M., Fukui, M., Cruchet, P., Ishibashi, Y., Yasumoto, T., 1992. Characterization of ciguatoxins from different fish species and wild *Gambierdiscus toxicus*. In: Tosteson, T.R. (Ed.), *Proceedings of the Third International Conference on Ciguatera Fish Poisoning*, April 30–May 5, 1990, Puerto Rico, pp. 25–32.
- Lehane, L., Lewis, R.J., 2000. Ciguatera: recent advances but the risk remains. *Int. J. Food Microbiol.* 61 (2–3), 91–125.
- Lewis, R.J., 1994. Immunological, biochemical and chemical features of ciguatoxins: implications for the detection of ciguateric fish. *Memoir. Queensl. Mus.* 34 (3), 541–548.
- Lewis, R.J., 2001. The changing face of ciguatera. *Toxicon* 39, 97–196.
- Lewis, R.J., Holmes, M.J., 1993. Origin and transfer of toxins involved in ciguatera. *Comp. Biochem. Physiol. C* 106 (3), 615–628.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods* 25, 402–408.
- Lombet, A., Bidard, J., Lazdunski, M., 1987. Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na<sup>+</sup> channel. *FEBS Lett.* 219 (2), 355–359.
- Manger, R.L., Leja, L.S., Lee, S.Y., Hungerford, J.M., Hokama, Y., Dikey, R.W., Granade, H.R., Lewis, R.J., Yasumoto, T., Wekell, M., 1995. Detection of sodium channel toxins: directed cytotoxicity assays of purified ciguatoxins, brevetoxins, saxitoxins, and seafood extracts. *J. AOAC Int.* 78, 521–527.
- Mattei, C., Dechraoui, M.-Y., Molgò, J., Meunier, F.A., Legrand, A.-M., Benoit, E., 1999. Neurotoxins targeting receptor site 5 of voltage-dependent sodium channels increase the nodal volume of myelinated axons. *J. Neurosci. Res.* 55, 666–673.
- Mayer, M.S., Guzman, M., Peksa, R., Hall, M., Fay, M.J., Jacobson, P.B., Romanic, A.M., Gunasekera, S.P., 2007. Differential effects of domoic

Please cite this article in press as: Matsui, M., et al., Pacific ciguatoxin 1B-induced modulation of inflammatory mediators in a murine macrophage cell line, *Toxicon* (2009), doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.039

## ARTICLE IN PRESS

M. Matsui et al. / *Toxicon xxx* (2009) 1–9

9

- acid and *E. coli* lipopolysaccharide on tumor necrosis factor- $\alpha$ , transforming growth factor- $\beta$ 1 and matrix metalloproteinase-9 release by rat neonatal microglia: evaluation of the direct activation hypothesis. *Mar. Drugs* 5, 113–135.
- Morey, J.S., Ryan, J.C., Bottein-Dechraoui, M.-Y., Rezvani, A.H., Levin, E.D., Gordon, C.J., Ramsdell, J.S., Van Dolah, F.M., 2008. Liver genomic responses to ciguatera: evidence for activation of phase I and phase II detoxification pathways following an acute hypothermic response in mice. *Toxicol. Sci.* 103 (2), 298–310.
- Munson, P.J., Rodbard, D., 1980. Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal. Biochem.* 107, 220–239.
- Murata, M., Legrand, A.-M., Ishibashi, Y., Yasumoto, T., 1989. Structures of ciguatera toxin and its congener. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 8929–8931.
- Natelson, B.H., Haghighi, M.H., Ponzio, N.M., 2002. Evidence for the presence of immune dysfunction in chronic fatigue syndrome. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9 (4), 747–752.
- Nicholson, G.M., Lewis, R.J., 2006. Ciguateras: cyclic polyether modulators of voltage-gated ion channel function. *Mar. Drugs* 4, 82–118.
- Overbergh, L., Valckx, D., Waer, M., Mathieu, C., 1999. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 11 (4), 305–312.
- Pearn, J., 2001. Neurology of ciguatera. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 70, 4–8.
- Racciatti, D., Vecchiet, J., Ceccomancini, A., Ricci, F., Pizzigallo, E., 2001. Chronic fatigue syndrome following a toxic exposure. *Sci. Total Environ.* 270 (1–3), 27–31.
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Meth. Mol. Biol.* 132, 365–386.
- Ruff, T.A., Lewis, R.J., 1994. Clinical aspect of ciguatera: an overview. *Memoir. Queensl. Mus.* 34 (3), 609–619.
- Ryan, J.C., Bottein-Dechraoui, M.-Y., Morey, J.S., Rezvani, A., Levin, E.D., Gordon, C.J., Ramsdell, J.S., Van Dolah, F.M., 2007. Transcriptional profiling of whole blood and serum protein analysis of mice exposed to the neurotoxin Pacific Ciguatera toxin. *Neurotoxicology* 28, 1099–1109.
- Sauviat, M.-P., Boytron-Le Garrec, R., Masson, J.B., Lewis, R.L., Vernoux, J.P., Molgó, J., Laurent, D., Benoit, E., 2006. Mechanisms involved in the swelling of erythrocytes caused by Pacific and Caribbean ciguateras. *Blood Cells Mol. Dis.* 36 (1), 1–9.
- Stommel, E.W., Parsonnet, J., Jenkyn, L.R., 1991. Polymyositis after ciguatera toxin exposure. *Arch. Neurol.* 48, 874–877.
- Stommel, E.W., Jenkyn, L.R., Parsonnet, J., 1993. Another case of polymyositis after ciguatera toxin exposure. *Arch. Neurol.* 50 (6), 571.
- Stordeur, P., Zhou, L., Byl, B., Brohet, F., Burny, W., de Groote, D., van der Poll, T., Goldman, M., 2003. Immune monitoring in whole blood using real-time PCR. *J. Immunol. Methods* 276 (1–2), 69–77.
- Sung, S.-S.J., Walters, J.A., Fu, S.M., 1992. Stimulation of tumor necrosis factor  $\alpha$  production in human monocytes by inhibitors of protein phosphatase 1 and 2A. *J. Exp. Med.* 176 (3), 897–901.
- Triantafyllou, M., Triantafyllou, K., 2005. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J. Endotoxin Res.* 11 (1), 5–11.
- Van Dolah, F.M., 2000. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environ. Health Perspect.* 108, 133–141.
- Verhoef, P.A., Kertesz, S.B., Estacion, M., Schilling, W.P., Dubyak, G.R., 2004. Maitotoxin induces biphasic interleukin-1 $\beta$  secretion and membrane blebbing in murine macrophages. *Mol. Pharmacol.* 66, 909–920.
- Walsh, P.J., Bookman, R.J., Zaias, J., Mayer, G.D., Abraham, W., Bourdelais, A.J., Baden, D.G., 2003. Toxicogenomic effects of marine brevetoxins in liver and brain mouse. *Comp. Biochem. Physiol.* 136 (2), 173–182.
- Wong, C., Hung, P., Lee, K.L.H., Kam, K., 2005. Study of an outbreak of ciguatera fish poisoning in Hong Kong. *Toxicon* 46, 563–571.
- Yasumoto, T., Igarashi, T., Legrand, A.-M., Cruchet, P., Chinain, M., Fujita, T., Naoki, H., 2000. Structural elucidation of ciguatera congeners by fast-atom bombardment tandem mass spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 4988–4989.





**IV. CARACTERISATION DU POTENTIEL  
ANTI-INFLAMMATOIRE DE REMEDES  
TRADITIONNELLEMENT UTILISES  
DANS LE TRAITEMENT DE LA  
CIGUATERA**



## **Introduction**

La mise en évidence de la régulation des cytokines par la P-CTX-1B dans les cellules RAW 264.7 nous a conduit à utiliser ce modèle afin d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire de remèdes traditionnels employés par les populations autochtones du Pacifique pour soigner la ciguatera. Parmi les extraits de plantes, préalablement criblés pour leur action anti-CTXs et / ou leur potentiel inhibiteur sur la production de NO (Kumar-Roiné et al, 2009 ; Annexe VI B), 4 extraits végétales ont été sélectionnés dans un premier temps (Publication 2). Il s'agit des plantes suivantes : *Euphorbia hirta* (*E. hirta* ; Euphorbiaceae), *Cerbera manghas* (*C. manghas* ; Apocynaceae), *Heliotropium fortherianum* (*H. fortherianum* ; Boraginaceae) et *Vitex trifolia* (*V. trifolia* ; Lamiaceae). Ces espèces végétales ont été testées à la concentration finale de 0,25 mg / ml sur la cinétique de production des cytokines lors de l'incubation des cellules RAW 264.7 en présence de LPS à 0,5 µg / ml, l'expression des gènes IL-1β et iNOS étant quantifiée grâce à des expériences de qPCR et la production des protéines IL-6 et TNF-α étant mesurée par la technique d'ELISA. Les résultats obtenus ont montré que *E. hirta* et *V. trifolia* présentent un fort potentiel anti-inflammatoire régulant l'expression des cytokines IL-1β, IL-6 et TNF-α ainsi que celle de l'iNOS en contraste avec *H. foertherianum* dont l'action reste modeste et *C. manghas* qui n'a aucun effet à contrecarrer l'action du LPS sur la production des médiateurs de l'inflammation étudiés ici. Cela nous a alors mené à mieux caractériser le potentiel anti-inflammatoire de *V. trifolia* sur le même modèle d'étude *in vitro* (Publication 3).

**Etude du potentiel anti-inflammatoire de quatre plantes traditionnellement utilisées dans le traitement de la ciguatera**

*Publication 2 : Mariko MATSUI, Shilpa KUMAR-ROINE, Mireille CHINAIN, Dominique LAURENT, Serge PAUILLAC (2009) Evaluation of the anti-inflammatory potential of plant extracts traditionally used for the treatment of Ciguatera Fish Poisoning in the South Pacific, Actes des Doctoriales de Tahiti 2009, ISBN: 978-2-9534554-0-3.*

**Evaluation of the anti-inflammatory potential of plant  
extracts traditionally used for the treatment of Ciguatera  
Fish Poisoning in the South Pacific**

Mariko MATSUI<sup>a,b,c</sup>, Shilpa KUMAR-ROINE<sup>b,c</sup>, Mireille CHINAIN<sup>d</sup>, Dominique LAURENT<sup>b,c</sup>,  
Serge PAUILLAC<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Laboratoire des Biotoxines, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, BP61, 98845 Noumea, New Caledonia

<sup>b</sup> Université de Toulouse; UPS; UMR 152 (Laboratoire de pharmacochimie des substances naturelles et  
pharmacophores redox), 118, rte de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex 9, France

<sup>c</sup> UMR152, IRD centre de Nouméa, BPA5, 98848 Noumea, New Caledonia

<sup>d</sup> Laboratoire des Microalgues Toxiques, Institut Louis Malardé, BP30, 98713 Papeete, Tahiti, French Polynesia

**Contact:** matsui@noumea.ird.nc

**Abstract:** Ciguatera Fish Poisoning (CFP) is a common form of ichthyosarcotoxism principally met in the tropical areas and associated to the marine biotoxins named ciguatoxins. Since the classical medicine seems inappropriate to cure the patients suffering from CFP, the traditional remedies employed by the natives of the Pacific region are proposed as an alternative. For a better understanding of their activities, the anti-inflammatory potential of four plants commonly employed in the South Pacific to treat CFP was investigated. The modulation of iNOS and cytokines productions is analyzed using a murine macrophage model, the RAW 264.7 cell line stimulated with a bacterial lipopolysaccharide. The expressions of iNOS gene and inflammatory cytokines were measured by quantitative PCR (qPCR) and ELISA techniques. **Keywords:** ciguatera, traditional plants, anti-inflammatory potential, cytokines.

## **Introduction**

With a frequency estimated at over 50,000 cases per year<sup>1,2</sup>, Ciguatera Fish Poisoning (CFP) represents a complex form of ichthyosarcotoxism resulting in combination of gastrointestinal, neurological and cardiovascular manifestations. Regarded as the causative agent of CFP, the dinoflagellate of the genus *Gambierdiscus*<sup>3</sup> produces the incriminated marine biotoxins, the ciguatoxins (CTXs), which directly bind to voltage sensitive sodium channels<sup>4,5</sup>. However, this sole action cannot explain all the inflammatory-like symptoms observed in CFP, especially pruritus, phenomena of sensitisation, chronic fatigue syndrome, polymyositis and the Guillain-Barré syndrome<sup>6-8</sup>, all known to involve inflammatory processes.

Western medicine is poorly efficient to treat patients suffering from CFP and remains essentially symptomatic and supportive with prescriptions of antihistamines, antiemetics, mannitol or vitamins<sup>9</sup>. Alternatively, the traditional pharmacopoeia proposes the use of numerous plants<sup>9</sup>; among which some were shown to reduce CTXs effects *in vitro*<sup>10</sup> and *in vivo*<sup>11</sup>. The need for enriching the therapeutic arsenal to treat CFP combined to the likely implication of inflammatory mechanisms in this pathology, have led us to characterise the anti-inflammatory potential of aqueous extracts of four commonly employed plants: *Cerbera manghas* L. (Apocynaceae), *Euphorbia hirta* L. (Euphorbiaceae), *Heliotropium foertherianum* Diane & Hilger (Boraginaceae) syn. *Argusia argentea*, and *Vitex trifolia* L. (Lamiaceae). They were selected following ethnopharmacological studies and various *in vivo* and *in vitro* tests<sup>10-13</sup>.

The anti-inflammatory potential of these plants was evaluated by monitoring their effects regarding the modulation of cytokines, the mediators of inflammation, as well as the expression profiles of inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) which produces the free radical Nitric Oxide (NO). Bacterial lipopolysaccharide (LPS), an integral glycolipid component of the outer membrane of gram-negative bacteria, was used as cytokines and iNOS inducer in murine macrophage RAW

264.7 cell line. mRNA expression levels were measured by quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) and cytokines were quantified by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). A possible direct application of these results is the study of active compounds isolated from selected plants with the eventuality to propose new treatments for CFP.

## Material and methods

**Reagents.** LPS (*Escherichia coli*, 0111:B4) and cell culture reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Lyon, France). qPCR and ELISA were performed with commercial kits respectively from Roche Applied Science (Auckland, New Zealand) and R&D System Inc (Minneapolis, USA), unless otherwise stated. For preparation of plant extracts, the selected vegetal parts (leaves or latex) were collected in Noumea, New Caledonia. Aqueous extracts were obtained following the traditional recipes by ebullition or infusion<sup>11,12</sup> and resulting filtrates were then reduced to a dry powder by lyophilisation.

**Cell culture and treatment.** The macrophage RAW 264.7 cell line (TIB-71) was generously provided by Dr. M. Adib-Conquy (Institut Pasteur, Paris, France). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium containing 25 mM HEPES buffer, 4.5 g/L D-glucose, 0.2% sodium bicarbonate, 1 mM sodium pyruvate and 2 mM L-glutamine and supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% of antibiotic and antifungal solution (penicillin, 10,000 U; streptomycin, 10 µg/mL; amphotericin B, 25 µg/mL). Cultures were maintained in a humidified atmosphere, 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. For experiments, cells were seeded at  $2.5 \times 10^5$  cells/well in 24-well plates. After a 24 h recovering-time, cells were treated with LPS at 0.5 µg/mL and/or plant extracts at 0.25 mg/mL from 2 to 24 h. Control cells were incubated with or without plant extract.

**Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).** After incubation, the level of cytokines was measured from collected cell supernatants by sandwich ELISA to assess the effect of plant extracts on cytokine production. The assay and the standard curves were conducted following the manufacturer recommendations using the mouse IL-6 and TNF-α DuoSet ELISA kits. Absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader (PR 3100, Bio-Rad) and absolute concentration of cytokines were calculated from standard curves.

**Quantitative PCR and mRNA expression.** After supernatants collection, cells were harvested with the PAXgene tube reagent (PreAnalytiX, Qiagen) and cDNA was synthesised from the purified total RNA. For cytokines, iNOS and reference gene (glyceraldehyde-3 phosphate deshydrogenase; GAPDH), primers were synthesised by Proligo Singapore Pty Ltd. (Table 1). qPCR amplification and analysis were achieved using the LightCycler® 2.0 instrument (software v4.0) with the LightCycler® FastStart DNA Master SYBR green I kit. The relative quantification of target mRNA was performed via the “delta-delta Ct method”<sup>14</sup>, and results expressed as fold-change values relative to control unstimulated cells.

**Table 1: Primer sequences for PCR amplification of target and reference genes.**

Gene	Sequence (5' → 3') <sup>a</sup>	Size (bp) <sup>b</sup>	Tm (°C) <sup>c</sup>
GAPDH	(F) TCATCCCAGAGCTGAACG; (R) GGGAGTTGCTGTTGAAGTC	213	88.3
IL-1β	(F) GTGTGGATCCCAAGCAATAC; (R) GTTGTTTCCCAGGAAGACAG	161	84.4
IL-6	(F) CAATTCCAGAAACCGCT; (R) GCAAGTGCATCATCGT	268	86.0
IL-10	(F) ATTCCTGGGTGAGAAG; (R) CTCTGTCTAGGTCCTGG	259	84.9
iNOS	(F) CCTCATGCCATTGAGTTC; (R) AGTCATGTTTGCCGTC	349	88.5

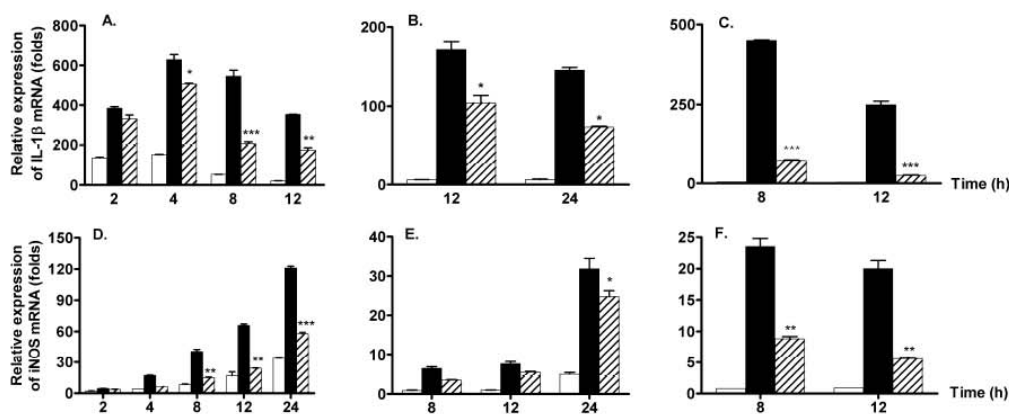
<sup>a</sup> (F) and (R) indicate forward and reverse primer sequences, respectively. <sup>b</sup> PCR products size in base pairs (bp). <sup>c</sup> PCR products melting temperature (Tm) in °C.

**Statistical analysis.** Two-Way ANOVA followed by a Bonferroni's post test for multiple comparisons (GraphPad Prism v4, GraphPad Software Inc., USA) were performed for statistical analysis. P < 0.05 was considered significant.

## Results and discussion

The anti-inflammatory potential of the four selected plants was evaluated by monitoring the modulation of cytokines and iNOS gene in murine RAW 264.7 cell line. The effect of LPS at 0.5  $\mu\text{g/mL}$  on the induction of target gene was first confirmed as shown on the mRNA expression profiles of IL-1 $\beta$  and iNOS (Fig. 1).

**High anti-inflammatory activity of *E. hirta*.** The decoction of *E. hirta* is well-known as a popular traditional remedy used in gastrointestinal disorders (diarrhea, dysentery) and in respiratory diseases (asthma, bronchitis). In the South Pacific, it is also recommended for treatment of CFP, at a maximum concentration range of 1 g of dried plant per day<sup>12</sup>. The present results show that *E. hirta* at 0.25 mg/mL significantly reduced the LPS-dependent induction of IL-1 $\beta$  and iNOS mRNA at 4 h and 8 h, respectively (Fig.1 A, D). It is noteworthy that the effect of *E. hirta* is long lasting until 24 h. Moreover, *E. hirta* regulates significantly the LPS-dependent IL-6 mRNA overproduction (data not shown). The plant extract also decreased the LPS-dependent overproduction of IL-6 and TNF- $\alpha$  in the cell culture supernatants after 24 and 12 h of incubation, respectively (Table 2). These results show that *E. hirta* has a high anti-inflammatory potential by significantly inhibiting LPS-dependent pro-inflammatory cytokines and iNOS gene induction. The inhibition of certain cytokines production is well-described but the exact biological pathway involved in this mode of action remains to be clarified<sup>15</sup>.



**Figure 1: mRNA expression of IL-1 $\beta$  (A-C) and iNOS (D-F) in RAW 264.7 cell line.** Quantification of mRNA production was assessed as described in Material and Methods from cells treated with plant extracts at 0.25 mg/mL (open bars), LPS at 0.5  $\mu\text{g/mL}$  (filled bars) or addition of both (striated bars). Shown are representative results. A, D: *E. hirta*; B, E: *H. foertherianum*; C, F: *V. trifolia*. P value compared to LPS: \*  $P < 0.5$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  (Bonferroni's post test).

**Anti-inflammatory potential of *V. trifolia*.** Also called three-leaved chaste tree, *V. trifolia* is widely used in the folk remedies against numerous illnesses. Several molecules have already been characterized from *V. trifolia* leaves and fruits, like flavonoids and diterpenoids<sup>16</sup>. For treatment of CFP, the leaves are used in maceration or decoction<sup>12</sup>. *V. trifolia* at 0.25 mg/mL significantly reduced the LPS-dependent induction of IL-1 $\beta$  and iNOS mRNA after an 8 h incubation time (Fig.1 C, F). It also decreased the overproduction of IL-6 protein after 24 h of incubation compared to LPS (Table 2).

**Modulation of IL-1 $\beta$  and iNOS expression by *H. foertherianum*.** Among the traditional remedies used in the treatment of CFP, *H. foertherianum* represents one of the most famous plants employed by the natives. The leaves can be used in infusion or decoction, either internally or externally in baths<sup>14</sup>. In our experiments, *H. foertherianum* at 0.25 mg/mL slightly reduced the LPS-dependent induction of IL-1 $\beta$  and iNOS mRNA in RAW 264.7 cell line (Fig.1 B, E). This plant extract exerts its inhibition effect after longer incubation time compared to *E. hirta* (12 h and

24 h, respectively for IL-1 $\beta$  and iNOS). These observations suggest that the main action of this plant regarding CFP is not associated only with its anti-inflammatory potential. Indeed, the aqueous extract of *H. foertherianum* has revealed some capacity to inhibit the electrophysiological effect of P-CTX-1B *in vitro*<sup>10</sup>.

**Table 2: Absolute quantification of IL-6 and TNF- $\alpha$  in cell culture supernatants.**

Treatment	IL-6 at 12 h <sup>a</sup>	IL-6 at 24 h <sup>a</sup>	TNF- $\alpha$ at 12 h <sup>a</sup>	TNF- $\alpha$ at 24 h <sup>a</sup>
LPS (0.5 $\mu$ g/mL)	15.1 $\pm$ 2.1	79.9 $\pm$ 2.4		
+ <i>V. trifolia</i> (0.25 mg/mL)	0 $\pm$ 5.9	39.4 $\pm$ 7.8**		
LPS (0.5 $\mu$ g/mL)	45.7 $\pm$ 0.5	283.0 $\pm$ 0.9	7653.0 $\pm$ 137.89	7438.0 $\pm$ 00
+ <i>E. hirta</i> (0.25 mg/mL)	16.8 $\pm$ 1.1	113.4 $\pm$ 17.9*	4278.0 $\pm$ 272.2**	4166.7 $\pm$ 136.2**

<sup>a</sup> Values are expressed in pg/mL. *P* value compared to LPS: \* *P* < 0.5; \*\**P* < 0.01 (Bonferroni's post test).

*Inefficacy of C. manghas to regulate inflammatory mediators.* Reputed for the toxicity of its fruits which contain cytotoxic cardenolides<sup>17</sup>, *C. manghas*, more precisely the latex of its bark, is traditionally used to cure patients suffering from CFP. In our experiments, *C. manghas* at 0.25 mg/mL did not inhibit the LPS-dependent induction of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and iNOS mRNA (data not shown). Indeed, the induction profiles obtained under LPS treatment did not change following the addition of *C. manghas* even after a 24 h incubation period.

*Perspectives.* The anti-inflammatory potential of four aqueous plant extracts traditionally used in the treatment of CFP was analysed by studying their effects on cytokines and iNOS gene expression. In correlation with previous studies, our results show that two of the four selected plants, *E. hirta* and *V. trifolia*, can efficiently act on the inflammatory mediators. Further studies of these plant extracts are currently underway for isolation of active compounds. That can lead to a better understanding of their parallel use with modern medicine and will allow the valorisation of traditional remedies employed against CFP in the South Pacific.

## Acknowledgments

MM and SKR were supported by a PhD fellowship from the Southern Province of New Caledonia and IRD (Paris, France), respectively. Particular thanks are addressed to Alain VIDEAULT and Antoine HOLUE for their skillful technical assistances.

## References

- 1 Van Dolah FM (2000) *Environ Health Perspect* 108:133-141.
- 2 Lehane L, Lewis RJ (2000) *Int J Food Microbiol* 61:91-125.
- 3 Bagnis R, Chanteau S, Chungue E, Hurtel JM, Yasumoto T, Inoue A (1980) *Toxicon* 18(2): 199-208.
- 4 Bidard J, Vijverberg HPM, Frelin C, Chungue E, Legrand A-M, Bagnis R, Lazdunski M (1984) *J Biol Chem* 259(13):8353-8357.
- 5 Lombet A, Bidard J, Lazdunski M (1987) *FEBS Lett* 219(2):355-359.
- 6 Bagnis R, Kuberski T, Laugier S (1979) *Am J Trop Med Hyg* 28(6):1067-1073.
- 7 Pearn J (2001) *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70:4-8.
- 8 Chateau-Degat M-L, Huin-Blondy M-O, Chinain M, Darius T, Legrand A-M, Nguyen NL, Laudon F, Chansin R, Dewailly E (2007) *Am J Trop Med Hyg* 77(5):842-846.
- 9 Laurent D, Bourdy G, Amade P, Cabalion P, Bourret D (1993) *La gratte ou ciguatéra : ses remèdes traditionnels dans le Pacifique Sud*. ORSTOM Editions, Paris, pp. 51-116.
- 10 Benoit E, Laurent D, Mattei C, Legrand A-M, Molgó J (2000) *Cybio* 24:33-40.
- 11 Amade P, Laurent D (1992) *Rec Adv Toxinol Res* 2:503-508.
- 12 Bourdy G, Cabalion P, Amade P, Laurent D (1992) *J Ethnopharmacol* 36:163-174.
- 13 Boydron-Le Garrec R, Benoit E, Sauviat M-P, Lewis RJ, Molgó J, Laurent D (2005) *Toxicon* 46:625-634.
- 14 Livak KJ, Schmittgen TD (2001) *Methods* 25:402-408.
- 15 Youssouf MS, Kaiser P, Tahir M, Singh GD, Singh S, Sharma VK, Satti NK, Haque SE, Johri RK (2007) *Fitoterapia* 78:535-539.
- 16 Li WX, Cui CB, Cai B, Yao XS (2005) *J Asian Nat Prod Res* 7(4):615-26.
- 17 Cheenpracha S, Karalai C, Rat-A-Pa Y, Ponglimanont C, Chantapromma K (2004) *Chem Pharm Bul* 52(8):1023-1025.



**Caractérisation du potentiel anti-inflammatoire de *Vitex trifolia* in vitro**

*Publication 3 : Mariko MATSUI, Shilpa KUMAR-ROINE, H. Taiana DARIUS, Mireille CHINAIN, Dominique LAURENT, Serge PAUILLAC (2009) Characterisation of the anti-inflammatory potential of Vitex trifolia L. (Labiatae), a multipurpose plant of the Pacific traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology 126 (2009) 427–433*



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)



## Characterisation of the anti-inflammatory potential of *Vitex trifolia* L. (Labiatae), a multipurpose plant of the Pacific traditional medicine

Mariko Matsui<sup>a,b,c</sup>, Shilpa Kumar-Roine<sup>b,c</sup>, H. Taiana Darius<sup>d</sup>, Mireille Chinain<sup>d</sup>, Dominique Laurent<sup>b,c</sup>, Serge Pauillac<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire des Biotoxines, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, BP61, 98845 Noumea, New Caledonia

<sup>b</sup> Université de Toulouse, UPS, UMR 152 (Laboratoire de Pharmacochimie des substances naturelles et pharmacophores redox), 118, rue de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex 9, France

<sup>c</sup> IRD, UMR-152, BPA5, 98848 Noumea, New Caledonia

<sup>d</sup> Laboratoire des Microalgues Toxiques, Institut Louis Malardé, BP30, 98713 Papeete, Tahiti, French Polynesia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 May 2009

Received in revised form 8 September 2009

Accepted 10 September 2009

Available online 22 September 2009

#### Keywords:

*Vitex trifolia*

Labiatae

Ciguatera Fish Poisoning

Lipopolysaccharide

Anti-inflammatory activity

Cytokines

### ABSTRACT

**Aim of the study:** *Vitex trifolia* L. (Labiatae) is a plant commonly employed against Ciguatera Fish Poisoning (CFP) in the Pacific region. Here, the anti-inflammatory potential of an aqueous extract of *Vitex trifolia* leaves was evaluated by monitoring its effects on the modulation of cytokines, the mediators of inflammation, as well as on the expression profiles of inducible nitric oxide synthase (iNOS) which produces the free radical nitric oxide (NO).

**Materials and methods:** We prepared an aqueous extract from *Vitex trifolia* leaves and evaluated its anti-inflammatory potency by monitoring its effect on the lipopolysaccharide (LPS)-induced cytokines and iNOS mRNA over-production in RAW 264.7 macrophages using quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) methods.

**Results:** Aqueous extract of *Vitex trifolia* leaves showed significant dose- and time-dependent inhibitory activity on interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 and iNOS mRNA synthesis, but slight effect on tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , all of which are involved in the inflammatory response. Moreover, the plant extract seemed to induce the LPS-dependant IL-10 anti-inflammatory cytokine. These results were further confirmed by ELISA using specific antibodies to mouse IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$ .

**Conclusion:** The anti-inflammatory effects of *Vitex trifolia* could validate its utilization as a traditional remedy against CFP and emphasises its potential therapeutic value against other inflammatory diseases. Therefore, this plant is a promising candidate for further screening of its active compounds through activity-guided fractionation.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Vitex trifolia* L. (Labiatae) is a tropical shrub widespread in Pacific-Asian countries such as India, Sri Lanka, China, Philippines, Indonesia, North Australia, New Caledonia and French Polynesia. It has also been reported from East Africa and introduced to many islands in the Central Pacific and Hawaii (Morat, 2004; de Kok, 2007). Among the genus *Vitex* which includes approximately 200 species in the tropical regions, *Vitex trifolia* is widely employed by Pacific islanders to cure numerous illnesses. The stems of *Vitex trifolia* are used for the treatment of dysentery in Papua New Guinea (Holdsworth, 1977). In New Caledonia, Rotuma

and Solomon Islands, the leaves are used as a remedy against severe headaches after heating and rubbing on forehead, or taken as an infusion (Rageau, 1973; McClatchey, 1996; de Kok, 2007). They are also used to relieve fever in Samoa (Whistler, 1992) and to alleviate pain derived from rheumatism and sprained joints when applied topically in New Caledonia (Rageau, 1973; Suprin, 2008). In Tonga, the plant is employed to treat mouth infections and inflammations (Whistler, 1992; Limousin and Bessières, 2006).

Previous studies have reported both insecticidal and medicinal activities of the *Vitex trifolia* extracts. Methanol extracts of *Vitex trifolia* leaves have shown larvicidal activities against the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Kannathasan et al., 2007). An important antifeeding activity of the dichloromethane leaf extract of *Vitex trifolia* against the Lepidoptera insect pest *Spodoptera frugiperda* was also recorded (Hernández et al., 1999). Concerning antimicrobial activities, the petroleum ether and ethanol extracts of

\* Corresponding author. Tel.: +687 27 75 30; fax: +687 27 33 90.  
E-mail address: [spauillac@pasteur.nc](mailto:spauillac@pasteur.nc) (S. Pauillac).

*Vitex trifolia* leaves exhibited moderate inhibiting activity against both gram-positive and gram-negative bacteria (Hossain et al., 2001). In contrast, aqueous extract of *Vitex trifolia* leaves has not shown inhibitory activity against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (Voravuthikunchai et al., 2004). Water extract of the aerial part of this plant exerts an *in vitro* HIV type 1 reverse transcriptase inhibitory activity (Woradulayapinij et al., 2005). Further biological assays have proved that hexane and dichloromethane extracts are highly cytotoxic against several cancer cell lines in culture (Hernández et al., 1999). Aqueous and ethanol extracts of leaves of this plant have also revealed significant hepatoprotective activity against carbon tetrachloride-induced liver damage in male Wistar rats (Manjunatha and Vidya, 2008). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity of Thai plants has revealed a slight inhibitory activity of the methanol extract of *Vitex trifolia* roots at the concentration of 0.1 mg/ml (Ingkaninan et al., 2003). While the hexane, chloroform and aqueous extracts of *Vitex trifolia* seeds exhibited some *in vivo* antipyretic activity even if it could not be termed significant (Ikram et al., 1987).

It is noteworthy that *Vitex trifolia* leaves are also employed in the treatment of Ciguatera Fish Poisoning (CFP), a complex seafood disease principally met in the tropical areas (Rageau, 1973; Bourdy et al., 1992) and associated with a family of potent polyether marine toxins named ciguatoxins (CTXs; Nicholson and Lewis, 2006). Taking into account the inflammatory-like symptoms observed in CFP (Bagnis et al., 1979; Chateau-Degat et al., 2007), we have recently highlighted the *in vitro* over-production of the free radical NO in RAW 264.7 murine macrophages upon exposure to Pacific CTX-1B (P-CTX-1B) condition, via the measurement of nitrite, a by-product of NO (Kumar-Roiné et al., 2008). Further studies have provided the first experimental evidence that P-CTX-1B also enhances the expression of cytokines, the mediators of inflammation (Matsui et al., in press). Since occidental medicine appears ineffective at completely curing CFP patients, the traditional herbal remedies employed by the natives of the Pacific region are often proposed as an alternative. Various *in vitro* bioassays have been developed to assess the therapeutic potency of these plant extracts. A first screening led to the selection of herbal remedies based on the inhibition of brevetoxin-3 (PbTx-3)-dependent cytotoxicity in murine neuroblastoma (N2a) cell line (Boydron-Le Garrec et al., 2005). PbTx-3 is a member of the brevetoxin family, a group of structurally and functionally CTX-related toxins (Dechraoui et al., 1999). Considering the recent advances made in the understanding of the complex pathophysiology of CFP, which involves neurological disturbances as well as inflammatory process, several plant extracts traditionally used to treat CFP were screened for their *in vitro* ability to inhibit NO production by activated macrophages. These results showed that the aqueous extract of *Vitex trifolia* leaves significantly inhibited lipopolysaccharide (LPS)-induced NO release from RAW 264.7 cells (Kumar-Roiné et al., 2009).

In this study, we have further explored the anti-inflammatory activity of aqueous extract of *Vitex trifolia* leaves by monitoring its dose- and time-dependent effects on the modulation of cytokines as well as on the expression profile of inducible NO synthase (iNOS) which is responsible for the high output generation of NO. LPS was used as inductor of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and iNOS in murine macrophage RAW 264.7 cell line. mRNA expression levels were measured by quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) and IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  cytokines release in the cell culture supernatant was quantified by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). A possible direct application of these results is the chemical and biological characterisation of compounds isolated from *Vitex trifolia* leaf extracts.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

The murine macrophage RAW 264.7 cell line (TIB-71) was generously provided by Dr. M. Adib-Conquy (Institut Pasteur, Paris, France). LPS (*Escherichia coli*, 0111:B4) and cell culture reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Lyon, France). qPCR and ELISA were performed with commercial kits, respectively from Roche Applied Science (Auckland, New Zealand) and R&D System Inc. (Minneapolis, USA), unless otherwise stated.

### 2.2. Preparation of plant extract

Leaves of *Vitex trifolia* were collected in the coastal region of Noumea, New Caledonia in December 2008. Each botanical sample was identified by comparison to fully registered specimens stored in the IRD herbarium (identification number: Holt 45). In keeping to the traditional recipe (Laurent et al., 1993) an aqueous extract was obtained by decoction in water and the resulting filtrate was then reduced to powder by lyophilisation.

### 2.3. Cell cultures and treatment

RAW 264.7 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 25 mM HEPES buffer, 4.5 g/l D-glucose, 0.2% sodium bicarbonate, 1 mM sodium pyruvate and 2 mM L-glutamine and supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% of antibiotic and antifungal solution (penicillin, 10,000 U; streptomycin, 10  $\mu$ g/ml; amphotericin B, 25  $\mu$ g/ml). Cultures were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. For cytotoxicity and qPCR/ELISA experiments, cells were seeded at  $5 \times 10^4$  and  $2.5 \times 10^5$  cells/well in 96-well plates and in 24-well plates, respectively. After a 24 h recovering-time, cells were treated with LPS at 0.5  $\mu$ g/ml and/or plant extract (PE) at the final concentration and during the incubation time as indicated in Figs. 1–4). Control cells were incubated under the same conditions without treatment.

### 2.4. Cytotoxicity assay

The effect of *Vitex trifolia* aqueous extract on cell viability was determined by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay according to a previous method (Boydron-Le Garrec et al., 2005). Briefly, cells were incu-

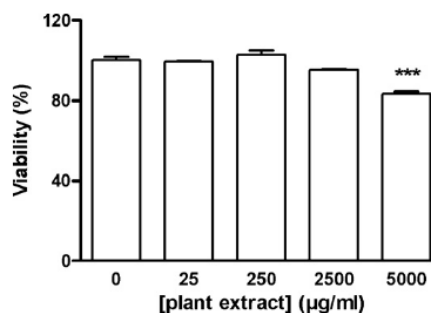
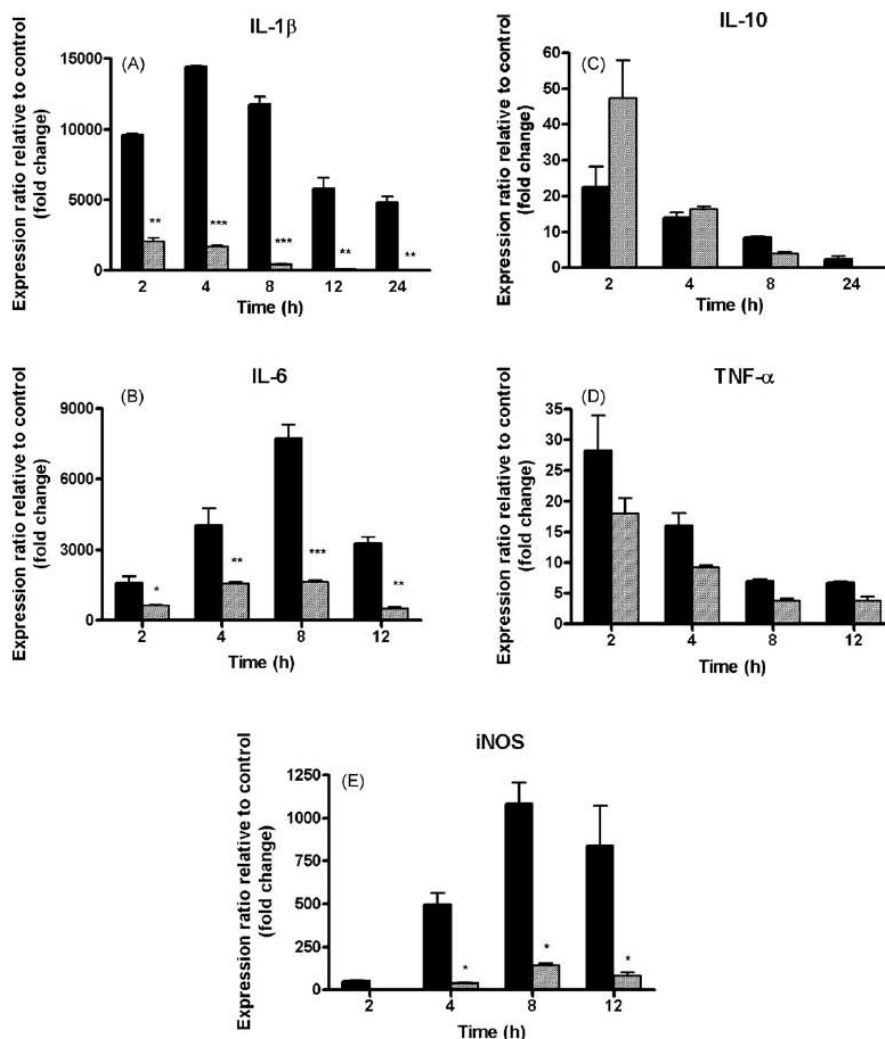


Fig. 1. Effect of aqueous extract of *Vitex trifolia* leaves on the viability of RAW 264.7 cells. Cells were incubated with increasing concentrations (0, 25, 250, 2500 and 5000  $\mu$ g/ml) of *Vitex trifolia* leaves extract as described in Section 2, during 24 h. Values are means  $\pm$  SEM ( $n = 12$ ). \*\*\* $P$  value  $< 0.001$ .



**Fig. 2.** Kinetic effect of *Vitex trifolia* leaves extract on LPS-dependant cytokine and iNOS mRNA over-expression in RAW 264.7 cells. The effect of *Vitex trifolia* leaves extract (2500 µg/ml; hatched bars) on IL-1β (A), IL-6 (B), IL-10 (C), TNF-α (D) and iNOS (E) mRNA expression was determined over 0–24 h incubation period in RAW 264.7 cells treated with LPS (0.5 µg/ml; filled bars). Kinetics and qPCR were carried out as described in Section 2. Results are expressed in fold expression ratio of mRNA relative to control without toxin at time 0. Values are means ± SEM ( $n = 2$ ). \* $P$  value < 0.05; \*\* $P$  value < 0.01; \*\*\* $P$  value < 0.001.

bated with PE ( $n = 12$ ) at variable concentrations as indicated in the figure legend (Fig. 1). Controls with non-treated cells were run in parallel ( $n = 12$ ). Following a 24 h incubation period, the medium was removed and the cells were further incubated for 1 h in the presence of 50 µl of MTT (0.7 mg/ml in phosphate buffered solution). After dissolution of the resulting crystal formazan by the addition of dimethyl sulfoxide (150 µl, 1 h incubation), the absorbance ( $A$ ) was measured at 490 nm using an automated microplate reader (ELX 800, Bio-Tek Instruments, Inc., Fisher Scientific, France). The percentage of cell viability was calculated as  $[(A_x - A_{bg}) / (A_c - A_{bg})] \times 100$ , where  $A_x$ ,  $A_{bg}$  and  $A_c$  are the mean absorbance values of the  $n$  wells containing cells under study ( $x$ ), devoid of cells (background,  $bg$ ) and control cells without treatment ( $c$ ), respectively.

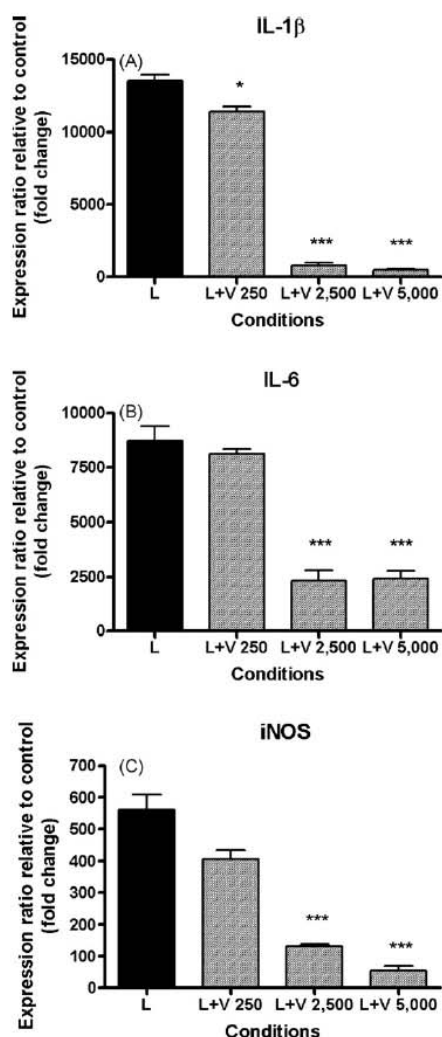
## 2.5. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

Following appropriate treatment (LPS and/or PE) of RAW 264.7 cells and incubation period (12 or 24 h), cell culture supernatants were collected and analyzed for their cytokines content using a two-site sandwich ELISA format. Assays and standard curves were achieved using the mouse IL-6, IL-10 and TNF-α DuoSet ELISA kits in accordance with the manufacturer's recommendations. The absorbance was measured at 450 nm on a microplate reader (PR 3100, Bio-Rad) and absolute concentration of cytokines was deduced from their respective standard curve. This procedure enabled a quantitative assessment of the modulation of LPS-induced cytokine production in RAW 264.7 cells by leaves extract of *Vitex trifolia* at the protein level.

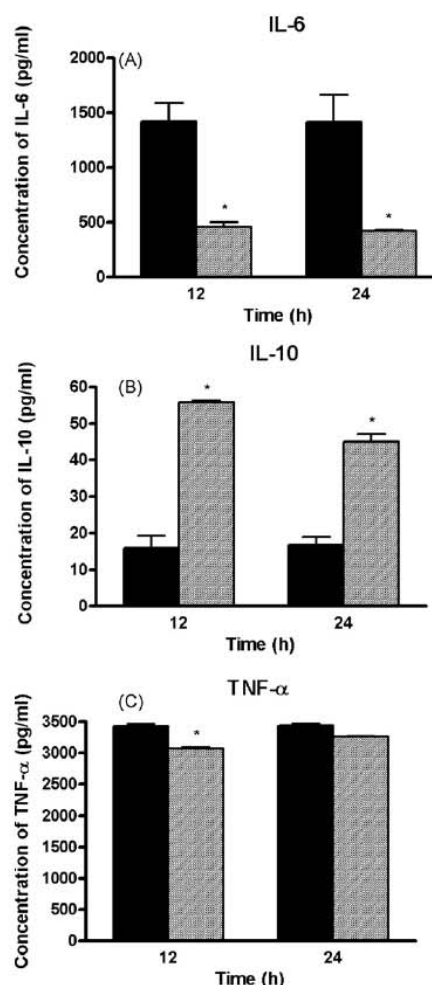


## 2.6. Quantitative Polymerase Chain Reaction

Cells were harvested with 400  $\mu$ l of the commercially available reagent PAXgene tube (PreAnalytiX, Qiagen, Doncaster, Australia), which induces total cell lysis and nucleic acid stabilization (Matsui et al., in press). Total RNA was isolated (High Pure RNA Isolation kit) and reverse transcribed into first strand cDNA (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit). For qPCR, the primers (Table 1) were purchased from Proligo Singapore Pty Ltd. (Biopolis, Singapore) after design of sequence using the LightCycler® Primer Probe Design Software 2.0 (Roche Applied Science) or the Primer3 v.0.4.0 software on line (Rozen and Skaletsky, 2000). The qPCR reaction was carried out on the LightCycler® 2.0 instrument (software



**Fig. 3.** Dose-effect of *Vitex trifolia* leaves extract on LPS-induced IL-1 $\beta$  and IL-6 cytokine and iNOS mRNA over-expression in RAW 264.7 cells. The effects of increasing concentrations of *Vitex trifolia* leaves extract (L+V; 250, 2500 and 5000  $\mu$ g/ml; hatched bars) on IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), iNOS (C) mRNA expression were assessed in RAW 264.7 cells treated with LPS (L; 0.5  $\mu$ g/ml; filled bars). Incubations and qPCR were carried out as described in Section 2. Results are expressed in fold expression ratio of mRNA relative to control without toxin at time 0. Values are means  $\pm$  SEM ( $n=2$ ). \* $P$  value < 0.05; \*\*\* $P$  value < 0.001.



**Fig. 4.** Evaluation of protein levels of LPS-induced IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  cytokines upon *Vitex trifolia* leaves extract treatment in RAW 264.7 cells. The effect of *Vitex trifolia* leaves extract (2500  $\mu$ g/ml; hatched bars) were assessed on the levels of IL-6 (A), IL-10 (B) and TNF- $\alpha$  (C) protein modulation in RAW 264.7 cells treated with LPS (0.5  $\mu$ g/ml; filled bars) over 12 and 24 h incubation period. Kinetics and ELISA were carried out as described in Section 2. Values are means  $\pm$  SEM ( $n=2$ ). \* $P$  value < 0.05; \*\* $P$  value < 0.01; \*\*\* $P$  value < 0.001.

v4.0; Roche Applied Science) using the double-stranded DNA dye SYBR Green I strategy (LightCycler® FastStart DNA Master SYBR green I kit). Each PCR cycle consisted of the 3 following steps: 95  $^{\circ}$ C for 8 s, 60  $^{\circ}$ C for 5 s and 72  $^{\circ}$ C for 12 s. Quantification was based on threshold cycle ( $C_t$ ) difference performed according to the “delta-delta  $C_t$  method” (Matsui et al., in press), using the following equation: expression ratio =  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , where  $\Delta\Delta C_t = (C_{t\text{target}} - C_{t\text{reference}})_{\text{time x}} - (C_{t\text{target}} - C_{t\text{reference}})_{\text{time 0}}$ . According to our previous report (Kumar-Roiné et al., 2008), the expression level of each target gene was normalized to that of glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) which fulfils the requirements for validation of reference genes.

## 2.7. Statistical analysis

Statistical studies were performed using GraphPad Prism v4 (GraphPad Software Inc., USA). For study of qPCR and ELISA kinetics

**Table 1**  
Primer sequences for PCR amplification of target and reference genes.

Gene	Sequence (5' → 3') <sup>a</sup>	Size (bp) <sup>b</sup>	Tm (°C) <sup>c</sup>
GAPDH	(F) TCATCCCAGAGCTGAACG (R) GGGAGTTGCTGTTGAAGTC	213	88.3
IL-1β	(F) GTGTGGATCCCAAGCAATAC (R) GTTGTTCCTCCAGGAAGACAG	161	84.4
IL-6	(F) CAATTCAGAAACCGCT (R) GCAAGTGCATCATCGT	268	86.0
IL-10	(F) ATTCCTGGGTGAGAAG (R) CTCTGCTAGGTCTGG	259	84.9
iNOS	(F) CCTCATGCCATTGAGTTC (R) AGTCATGTTTCCGCTC	349	88.5
TNF-α	(F) CAACGGCATGGATCTCA (R) GGACTCCGCAAGTCT	325	88.8

<sup>a</sup> (F) and (R) indicate forward and reverse primer sequences, respectively.

<sup>b</sup> PCR products size in base pairs (bp).

<sup>c</sup> PCR products melting temperature (Tm) in °C.

experiments, two-way ANOVA followed by a Bonferroni's post-test. For dose–effect study, one-way ANOVA followed by a Bonferroni's post-test for multiple comparisons was employed. Only *P* values <0.05 were considered significant.

### 3. Results

#### 3.1. Effect of *Vitex trifolia* leaves extract on RAW 264.7 cell line viability

The potential cytotoxicity of *Vitex trifolia* leaves extract on RAW 264.7 cells was investigated by measurement of the cell viability using the MTT assay with increasing concentrations of PE (0–5000 µg/ml) during 24 h (Fig. 1). No effect on cell viability was observed up to 2500 µg/ml. However, treatment with the highest PE concentration of 5000 µg/ml resulted in a slight decrease in cell viability (83%). Therefore, PE working concentration of 2500 µg/ml was chosen to ensure little to no impact on cell viability throughout the experiments for kinetic evaluation of *Vitex trifolia* effect on cytokine mRNA production.

#### 3.2. Kinetic effect of *Vitex trifolia* leaves extract on LPS-dependant cytokines and iNOS mRNA over-expression in RAW 264.7 cell line

We explored the time-course effects of *Vitex trifolia* leaves extract on the LPS-induced cytokines and iNOS mRNA over-production in RAW 264.7 cells (Fig. 2). The time-dependant induction of target genes by LPS was first confirmed, as revealed by the mRNA expression profiles obtained for IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α and iNOS (Fig. 2A–E; filled bars). IL-1β, IL-6 and iNOS mRNA synthesis gradually increased, peaked at 4–8 h then decreased more or less abruptly. By contrast, IL-10 and TNF-α mRNA production declined constantly from a maximal value at 2 h to a minimal value at 12 or 24 h. Incubation with *Vitex trifolia* leaves extract at 2500 µg/ml significantly reduced the LPS-dependant induction of IL-1β, IL-6 and iNOS mRNA as early as 2 h post-incubation (Fig. 2A, B and E; hatched bars). Although not significant, a slight inhibitory effect of *Vitex trifolia* extract was also observed on LPS-induced TNF-α mRNA synthesis (Fig. 2D; hatched bars). Indeed, the normalized expression ratio values obtained under LPS + PE treatment remained consistently lower throughout the whole incubation period compared to the values under LPS stimulation alone. It is noteworthy that LPS + PE treatment induced an early and transient stimulatory effect on IL-10 synthesis compared to incubation with LPS alone (Fig. 2C). This trend was clearly evident at 2 h,

although no significant difference was observed at longer incubation times.

#### 3.3. Dose–effect of *Vitex trifolia* leaves extract on LPS-induced cytokine and iNOS mRNA over-expression in RAW 264.7 cell line

To further investigate the anti-inflammatory properties of *Vitex trifolia* leaves, LPS-stimulated RAW 264.7 cells were incubated with increasing concentrations of PE (250, 2500 and 5000 µg/ml), and the synthesis of pro-inflammatory cytokines IL-1β and IL-6, and iNOS mRNA was evaluated at 8 h post-incubation (Fig. 3A–C). The relative expression ratio of IL-1β mRNA significantly decreased at 250 µg/ml of PE compared to LPS alone and this inhibitory effect became highly significant from 2500 to 5000 µg/ml (Fig. 3A). Concerning IL-6 and iNOS, although not significant, a slight inhibition effect of *Vitex trifolia* leaves extract was observed at 250 µg/ml. However, increasing the concentration of PE to 2500 µg/ml led to a marked dose-dependant inhibition of the LPS-induced IL-6 and iNOS mRNA over-production (Fig. 3B and C). For IL-1β and IL-6, the first higher significant effects of the PE action on cytokine modulation were observed at 2500 µg/ml, although lower concentrations down to 250 µg/ml would probably demonstrate some less prominent and shorter lasting inhibitory effect.

#### 3.4. Modulation of IL-6, IL-10 and TNF-α protein levels by *Vitex trifolia* leaves extract

Finally, in order to assess the anti-inflammatory properties of *Vitex trifolia* leaves extracts at the protein level, IL-6, IL-10 and TNF-α concentration in culture supernatants was determined by ELISA (Fig. 4). A final PE concentration of 2500 µg/ml significantly prevented both LPS-dependant IL-6 (67.5% inhibition) and TNF-α (10.4% inhibition) protein over-production normally observed at 12 h post-incubation (Fig. 4A and C). In contrast, compared to the LPS induction alone, the co-incubation with *Vitex trifolia* leaves extract evoked a 3.5-fold and 2.6-fold increase in IL-10 protein concentration at 12 and 24 h post-incubation, respectively (Fig. 4B).

### 4. Discussion

Among the various plants traditionally used to treat CFP, *Vitex trifolia* L. (Labiatae) appears as one of the popular herbal medicine in the Pacific region. The leaves are employed in maceration or decoction, internally or externally in baths to cure CFP-related pruritus (Rageau, 1973; Bourdy et al., 1992). First screening of 31 plant extracts traditionally used in the treatment of CFP was conducted through an *in vitro* cytotoxicity bioassay on mouse neuroblastoma cells (Boydron-Le Garrec et al., 2005). *Vitex trifolia* leaves extract was found to significantly exert a protective activity against PbTx-induced cytotoxic effects at the concentration of 5 g/l. Moreover, among 25 plants tested, *Vitex trifolia* also exhibited an inhibitory activity against NO over-production in LPS-activated RAW 264.7 murine macrophages (Kumar-Roiné et al., 2009). In this report, we have investigated the anti-inflammatory potential of the aqueous extract of *Vitex trifolia* leaves by monitoring the modulation of cytokines and iNOS gene and protein over-expression in RAW 264.7 cells. For this purpose, mRNA and protein levels of selected cytokines and iNOS in LPS-activated cells were assessed using qPCR and ELISA techniques, respectively. We found that *Vitex trifolia* leaves extract could modulate the LPS-dependant mRNA over-production of pro-inflammatory mediators IL-1β, IL-6 and iNOS both in a time- and dose-dependant manner (Figs. 2A, B, E and 3A–C). This extract also seemed to reduce TNF-α mRNA (Fig. 2D) and significantly inhibited the LPS-induced TNF-α protein over-production (Fig. 4C). Moreover, the anti-inflammatory cytokine IL-10 was also slightly influenced by



the PE. Indeed, after a 2 h incubation time, the LPS-induced IL-10 mRNA was up-regulated under *Vitex trifolia* treatment to finally decrease gradually until 24 h (Fig. 2C). These results were further confirmed at the protein level with a significant increase in LPS-dependant IL-10 over-production under PE conditions at 12 and 24 h post-incubation (Fig. 4B). Taken together, these observations suggest that *Vitex trifolia* leaves extract might enhance the LPS-dependant anti-inflammatory IL-10 over-expression in addition of inhibiting the production of pro-inflammatory mediators such as IL-1 $\beta$ , IL-6 and iNOS, thus highlighting the anti-inflammatory potency of the *Vitex trifolia* leaves extract.

Several studies have shown that *Vitex trifolia* exhibits interesting activities in relation to the modulation of the inflammatory process. Indeed, the antipyretic activity of *Vitex trifolia* seeds has been reported in rabbits (Ikram et al., 1987). This effect must be related to the presently demonstrated inhibitory effect of *Vitex trifolia* aqueous extract on the synthesis or release of IL-1 $\beta$  and IL-6 which are involved in the regulation of the body temperature and known as pyrogenic cytokines (Elenkov et al., 2005). *Vitex trifolia* is also used as a bath to help relieve pruritus caused during CFP. Although pruritus can be considered as the characteristic sign of the chronic stage of CFP (Chateau-Degat et al., 2007), this reaction appears as a non-IgE and non-histamine-mediated food allergy (Nicholson and Lewis, 2006). Nevertheless, it should be emphasised that alcoholic extract of *Vitex trifolia* leaves inhibits the IgE-dependant liberation of histamine in rat mast cell model (Ikawati et al., 2001). Among the plants of the same genus, *Vitex rotundifolia* L. has shown similar activity. Indeed, aqueous extract of *Vitex rotundifolia* fruit is active on the immediate-type allergic reaction *in vitro* and *in vivo* by reduction of histamine levels produced by rat peritoneal mast cells. Moreover, it also significantly inhibits the anti-dinitrophenyl IgE-induced TNF- $\alpha$  production (Shin et al., 2000). Concerning the antioxidant activity, previous studies have reported that both aqueous and methanol extract of *Vitex rotundifolia* fruit exhibited far stronger potency than the antioxidant Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) and this efficiency could be attributed to its high levels of phenolic compounds (Cai et al., 2004).

Considering the multiple biological activities of *Vitex trifolia* and its wide use in traditional medicine, numerous molecules have been isolated from its leaf and fruit extracts, and for some of them, chemical structures were been elucidated. Various flavonoids, diterpenes and lignans have been isolated from *Vitex trifolia* (Ramesh et al., 1986; Ono et al., 2000; Li et al., 2005). Some of them, including flavonoids such as persicogenin, artemetin, luteolin, penduletin, vitexicarpin and chrysosplenol-D and labdane-type diterpenes such as vitexilactone, rotundifuran, vitetrifolin D and vitetrifolin E have been identified as cell cycle inhibitors inducing apoptosis in mouse tsFT210 cancer cell line (Li et al., 2005). Vitexicarpin (also named casticin), which is the major compound isolated from both *Vitex trifolia* and *Vitex rotundifolia* fruit, has shown the ability to regulate apoptosis via the cleavage of caspase 3 in human tumor cell line (Wang et al., 2005). However, the caspase 3 is known to be related to TNF- $\alpha$  signalling as an indirect target via the activation of the caspase 8, leading to apoptosis of cells (Wajant et al., 2003). The involvement of TNF- $\alpha$  in the caspase 3 activation pathway under *Vitex trifolia* treatment seems to contrast with the inhibition of this cytokine by *Vitex trifolia* leaves extract. Vitexicarpin has also been reported to block spontaneous contraction of isolated male guinea pig trachea induced by histamine and was also active in sensitized guinea pig trachea stimulated by ovalbumin (Alam et al., 2002). These results suggest that this molecule could block the effects of histamine released from sensitized mast cells. Moreover, vitexicarpin was found to show potent inhibition against both T- and B-lymphocyte proliferation at 0.1  $\mu$ M (You et al., 1998) and significantly inhibits *in vivo* xylene-induced mouse ear oedema, egg

albumen-induced rat paw oedema and acetic-induced mouse vascular permeability (Lin et al., 2007). This molecule seems to have significant anti-inflammatory effects on acute inflammation and on immune cells proliferation, which can be related to the inhibition of the inflammatory mediators such as cytokines.

In view of its considerable anti-inflammatory activity, *Vitex trifolia* leaves extract can be validated as a potent remedy against chronic inflammatory symptoms, occurring notably in CFP pathology. Consequently, further chemical studies are currently underway to develop new target-specific therapeutic drugs through the fractionation of *Vitex trifolia* leaves extract.

## Acknowledgements

MM and SKR were supported by a PhD fellowship from the Southern Province of New Caledonia and IRD (Paris, France), respectively. Warm thanks are addressed to Alain VIDEAULT and Antoine HOLUE for their skilful technical assistances.

## References

- Alam, G., Wahyuno, S., Ganjar, I.G., Hakim, K., Timmerman, H., Verpoorte, R., 2002. Tracheospasmodic activity of vitexin-A and vitexicarpin isolated from *Vitex trifolia*. *Planta Medica* 68, 1047–1049.
- Bagnis, R., Kuberski, T., Laugier, S., 1979. Clinical observations on 3009 cases of Ciguatera (Fish Poisoning) in the South Pacific. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 28, 1067–1073.
- Bourdy, G., Cabalion, P., Amade, P., Laurent, D., 1992. Traditional remedies used in the Western Pacific for the treatment of ciguatera poisoning. *Journal of Ethnopharmacology* 36, 163–174.
- Boydron-Le Garrec, R., Benoit, E., Sauviat, M.-P., Lewis, R.J., Molgó, J., Laurent, D., 2005. Ability of some plant extracts, traditionally used to treat ciguatera fish poisoning, to prevent the *in vitro* neurotoxicity produced by sodium channel activators. *Toxicol* 46, 625–634.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H., 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* 74, 2157–2184.
- Chateau-Degat, M.-L., Huin-Blondy, M., Chinain, M., Darius, T., Legrand, A.-M., Nguyen, N.L., Laudon, F., Chansin, R., Dewailly, E., 2007. Prevalence of chronic symptoms of ciguatera disease in French Polynesian adults. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 842–846.
- Dechraoui, M.-Y., Naar, J., Pauillac, S., Legrand, A.-M., 1999. Ciguaterins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels. *Toxicol* 37, 125–143.
- Elenkov, I.J., Iezzoni, D.G., Daly, A., Harris, A.G., Chrousos, G.P., 2005. Cytokine dysregulation, inflammation and well-being. *Neuroimmunomodulation* 12, 255–269.
- Hernández, M.M., Heraso, C., Villarreal, M.L., Vargas-Arispuro, I., Aranda, E., 1999. Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 67, 37–44.
- Holdsworth, D.K., 1977. Medicinal plants of Papua New Guinea. South Pacific Commission Technical Paper, Noumea, New Caledonia, no. 175, p. 65.
- Hossain, M.M., Paula, N., Sohrab, M.H., Rahman, E., Rashid, M.A., 2001. Antibacterial activity of *Vitex trifolia*. *Fitoterapia* 72, 695–697.
- Ikawati, Z., Wahyuno, S., Maeyama, K., 2001. Screening of several Indonesian medicinal plants for their inhibitory effect on histamine release from RBL-2H3 cells. *Journal of Ethnopharmacology* 75, 249–256.
- Ikram, M., Khattak, S.G., Gilani, S.N., 1987. Antipyretic studies on some indigenous Pakistani medicinal plants: II. *Journal of Ethnopharmacology* 19, 185–192.
- Inganinan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., Thongnoi, W., 2003. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 89, 261–264.
- Kannathasan, K., Senthilkumar, A., Chandrasekaran, M., Venkatesalu, V., 2007. Differential larvicidal efficacy of four species of *Vitex* against *Culex quinquefasciatus* larvae. *Parasitology Research* 101, 1721–1723.
- Kok (de), R.P.J., 2007. The genus *Vitex* L. (Lamiaceae) in New Guinea and the South Pacific Islands. *Kew Bulletin* 62, 587–603.
- Kumar-Roiné, S., Matsui, M., Chinain, M., Laurent, D., Pauillac, S., 2008. Modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in RAW 264.7 murine macrophages by Pacific ciguatera toxin. *Nitric Oxide* 19, 21–28.
- Kumar-Roiné, S., Matsui, M., Reybier, K., Darius, H.T., Chinain, M., Laurent, D., Pauillac, S., 2009. Ability of certain plant extracts traditionally used to treat ciguatera fish poisoning to inhibit nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. doi:10.1016/j.jep.2009.03.039.
- Laurent, D., Bourdy, G., Amade, P., Cabalion, P., Bourret, D., 1993. La gratte ou ciguatera: ses remèdes traditionnels dans le Pacifique Sud. ORSTOM Editions, Paris, pp. 51–116.
- Li, W.X., Cui, C.B., Cai, B., Yao, X.S., 2005. Labdane-type diterpenes as new cell cycle inhibitors and apoptosis inducers from *Vitex trifolia* L. *Journal of Asian Natural Product Research* 7, 95–105.

- Limousin, P., Bessières, E., 2006. Oceania Planta Medica: flore de Kanaky, Tome I, Au bord de mer. Bibliothèque de Nouméa, Poindimié, Nouvelle-Calédonie, pp. 102–104.
- Lin, S., Zhang, H., Han, T., Wu, J.-H., Rahman, K., Qin, L.-P., 2007. *In vivo* effect of casticin on acute inflammation. Journal of Chinese Integrative Medicine 5, 573–577.
- Manjunatha, B.K., Vidya, S.M., 2008. Hepatoprotective activity of *Vitex trifolia* against carbon tetrachloride-induced hepatic damage. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 70, 241–245.
- Matsui, M., Kumar-Roiné, S., Darius, H.T., Chinain, M., Laurent, D., Pauillac, S., in press. Pacific ciguatoxin 1B-induced modulation of inflammatory mediators in a murine macrophage cell line. Toxicon, doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.039.
- McClatchey, W., 1996. The ethnopharmacopoeia of Rotuma. Journal of Ethnopharmacology 50, 147–156.
- Morat, P., 2004. Labiatae (Mabberley, D.J. and de Kok, R.P.J.) in Flore de la Nouvelle-Calédonie. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France, pp. 34–46.
- Nicholson, G.M., Lewis, R.J., 2006. Ciguatoxins: cyclic polyether modulators of voltage-gated ion channel function. Marine Drugs 4, 82–118.
- Ono, M., Sawamura, H., Ito, Y., Mizuki, K., Nohara, T., 2000. Diterpenoids from the fruits of *Vitex trifolia*. Phytochemistry 55, 873–877.
- Rageau, J., 1973. Les plantes médicinales de la Nouvelle-Calédonie. Travaux et documents de l'ORSTOM, ORSTOM edition no. 23. Nouvelle-Calédonie, Noumea, pp. 104–105.
- Ramesh, P., Ramachandran Nair, A.G., Subramanian, S.S., 1986. Flavone glycosides of *Vitex trifolia*. Fitoterapia 57, 282–283.
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods in Molecular Biology 132, 365–386.
- Shin, T.-Y., Kim, S.-H., Lim, J.-P., Suh, E.-S., Jeong, H.-J., Kim, B.-D., Park, E.-J., Hwang, W.-J., Rye, D.-G., Baek, S.-H., An, N.-H., Kim, H.-M., 2000. Effect of *Vitex rotundifolia* on immediate-type allergic reaction. Journal of Ethnopharmacology 72, 443–450.
- Suprin, B., 2008. Plantes du littoral en Nouvelle-Calédonie, Editions Photosynthèse. Nouvelle-Calédonie, Noumea, p. 157.
- Voravuthikunchai, S., Lortheeranuwat, A., Jeeju, W., Sririrak, T., Phongpaichit, S., Supawita, T., 2004. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Journal of Ethnopharmacology 94, 49–54.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., 2003. Tumor necrosis factor signaling. Cell Death and Differentiation 10, 45–65.
- Wang, H.Y., Cai, B., Cui, C.B., Zhang, D.Y., Yang, B.F., 2005. Vitexicarpin, a flavonoid from *Vitex trifolia* L., induces apoptosis in K562 cells via mitochondria-controlled apoptotic pathway. Yao Xue Xue Bao 40, 27–31.
- Whistler, W.A., 1992. Polynesian Herbal Medicine. National Tropical Botanical Garden, Lawai, Kauai, Hawaii, pp. 54–70.
- Woradulayapinij, W., Soonthornchareonnon, W., Wiwat, C., 2005. *In vitro* HIV type 1 reverse transcriptase inhibitory activities of Thai medicinal plants and *Canna indica* L. rhizomes. Journal of Ethnopharmacology 101, 84–89.
- You, K.M., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., Kim, H.P., 1998. Vitexicarpin, a flavonoid from the fruits of *Vitex rotundifolia*, inhibits mouse lymphocyte proliferation and growth of cell lines in vitro. Planta Medica 64, 546–550.



## **V. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

*« Les prairies et les vallons, les montagnes et les collines sont des pharmacies »*

Paracelse

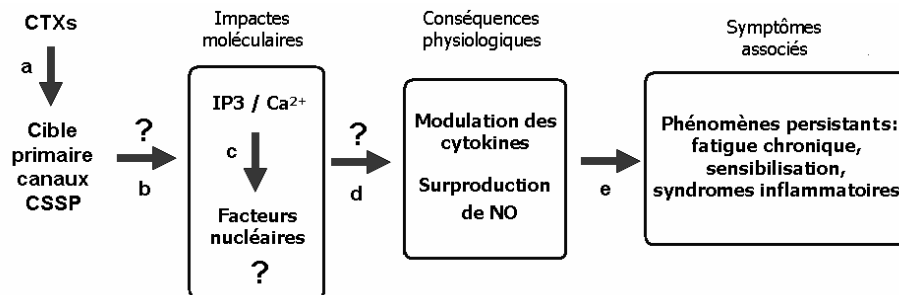


***Vers une meilleure compréhension de la physiopathologie de la ciguatera...***

La ciguatera représente une forme d'intoxication alimentaire complexe, constituée de symptômes ambigus à caractère inflammatoire et qui reste encore mal soigné de nos jours. L'étude présentée ici propose une explication quant à ces observations cliniques en mettant en cause l'implication des médiateurs de l'inflammation que sont les cytokines. Pour cela, la capacité de deux CTXs (P-CTX-1B et P-CTX-3C) et d'un congénère fonctionnel (PbTx-3) à induire l'expression génique de l'iNOS et des cytokines a été évaluée sur une lignée de macrophages murins (RAW 264.7) comparativement au LPS (Publication 1). Les résultats obtenus ont montré que la P-CTX-1B (3 nM) conduit à la surproduction des ARNm de l'iNOS et des cytokines pro- (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) et anti-inflammatoires (IL-10) tout comme observé pour le LPS (0,5  $\mu$ g / ml) mais avec des niveaux d'expression différents de la toxine bactérienne. A l'inverse, aucun effet des P-CTX-3C et PbTx-3 n'a été observé sur la régulation génique de ces médiateurs. Cela pourrait s'expliquer par la différence de toxicité de ces toxines qui sont moins actives que la P-CTX-1B aussi bien au niveau des évaluations *in vivo* sur souris que par rapport à leurs effets *in vitro* sur les tests de cytotoxicité sur Neuro-2a (Manger et al, 1994 ; Dechraoui et al, 1999). Ces résultats doivent être confirmés *in vivo* mais le rôle des cytokines dans la ciguatera pourrait expliquer la persistance du syndrome de fatigue chronique ainsi que les cas de polymyosites et de neuropathies signalés chez certaines personnes atteintes par cette intoxication (Angibaud et Rambaud, 1998 ; Pearn, 1979 ; 2001 ; Stommel et al, 1991 ; 1993).

Il est intéressant de souligner que la P-CTX-1B a été utilisée dans nos conditions expérimentales à la concentration finale de 3 nM afin d'induire les ARNm cytokiniques, ce qui représente une quantité élevée par rapport à celles employées habituellement lors des

études de cytotoxicité sur Neuro-2a ou des tests de RBA qui ont nécessité l'ajout de P-CTX-1B à des concentrations de l'ordre du pM (Dechraoui et al, 1999). Cependant les effets de la même toxine sur le gonflement du nœud de Ranvier et celui des érythrocytes de grenouilles a fait appel à l'utilisation de quantités aussi élevées que dans notre étude avec des concentrations de P-CTX-1B respectivement de 10 nM et de 1 nM (Benoit et al, 1996 ; Sauviat et al, 2006). Or le mode d'action des CTXs sur ces phénomènes de gonflement semble être attribué à sa fixation directe sur le CSSP conduisant à une augmentation de  $\text{Na}^+$  intracellulaire conduisant à des perturbations osmotiques compensées par l'entrée d'eau et le changement morphologique des cellules.



**Figure V.a : Explication possible quant à l'implication des médiateurs inflammatoire dans la ciguatera**

*La fixation des CTXs sur leur cible primaire, les canaux CSSP (a), conduit à des perturbations osmotiques qui semblent avoir des conséquences au niveau moléculaire notamment sur les concentrations intracellulaires des messagers secondaires IP3 et  $\text{Ca}^{2+}$  (b). Ces métabolites secondaires sont connus pour induire l'activation des facteurs de transcription (c) pouvant alors conduire à la surexpression des médiateurs de l'inflammation (d) qui peuvent expliquer l'apparition des symptômes de type inflammatoire observés dans certains cas d'intoxication ciguatérique (e).*

Ce mécanisme pourrait alors être attribué à la modification des concentrations intracellulaires d'autres composées ioniques comme l'ion  $\text{Ca}^{2+}$ , un messager secondaire

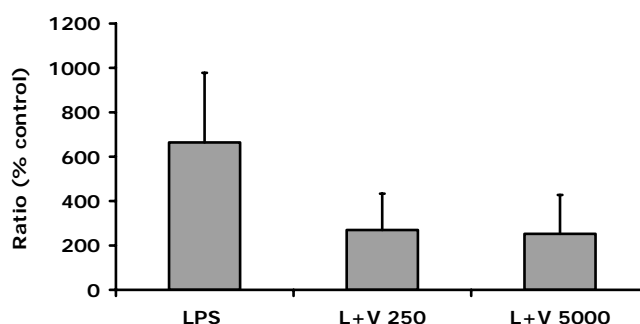
également modulé par l'IP3 et constituant un acteur majeure de la signalisation cellulaire (Berridge, 1993 ; Kostyuk et Verkhatsky, 1994). Or il a été démontré que cet ion s'accumule effectivement dans des myotubes de rat incubés avec de la P-CTX-1B à 10 nM *via* l'augmentation de la concentration d'IP3 intracellulaire (Hidalgo et al, 2002). De plus, parmi les toxines marines associées à la ciguatera, la MTX ne semble pas être en reste. En effet, cette molécule testée sur une gamme de concentrations allant de 0,01 nM à 10 nM, a présenté la faculté à induire le relargage de la cytokine IL-1 $\beta$  par des cellules de macrophages murins traitées au LPS *via* son action directe sur le canal calcique sensible au potentiel (Verhoef et al, 2004).

L'étude mécanistique de cette possible nouvelle implication des médiateurs inflammatoires dans la physiopathologie de la ciguatera reste à faire, afin d'élucider le mode d'action précis de la P-CTX-1B sur l'induction des cytokines mais une tentative d'explication est proposée dans cette étude et un premier schéma explicatif est envisagé par la Figure V.a.

### ***...pour la découverte de nouvelles thérapeutiques de l'intoxication***

L'établissement des profils d'expression cytokinique sous l'influence de la P-CTX-1B, pouvant présumer de l'implication des cytokines dans la ciguatera, nous a permis d'envisager ce modèle d'étude comme une application possible quant à l'évaluation de l'activité thérapeutique de remèdes traditionnels. Etant donné la difficulté d'obtention des CTXs, les études présentées ont été réalisées sur le modèle d'induction des cytokines par les cellules RAW 264.7 traitées avec du LPS (0,5  $\mu$ g / ml). Quatre plantes, *E. hirta*, *C. manghas*, *H. foertherianum* et *V. trifolia* ont été étudiées à 0,25 mg / ml dans un premier temps, révélant des degrés d'activités différents quant à leur faculté à inhiber la surproduction de l'iNOS et des cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  liée au LPS (Publication 2). Si *C. manghas* n'a pas montré d'effet et que *H. foertherianum* présente une efficacité faible sur la modulation des ARNm IL-

IL-1 $\beta$  et iNOS, *E. hirta* et *V. trifolia* ont révélé un potentiel anti-inflammatoire intéressant. Cela nous a conduit à mieux caractériser l'activité inhibitrice de *V. trifolia* sur le même modèle *in vitro* en réalisant des cinétiques d'incubation sur 24 h ainsi que des tests d'effet dose (250, 2500 et 5000  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) tout en mesurant les quantités d'ARNm et de protéines cytokiniques respectivement par des techniques de qPCR et d'ELISA (Publication 3). Cette plante a alors révélé la capacité à moduler l'expression des ARNm de l'iNOS et des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  ainsi que la production des protéines cytokiniques de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$  dépendante du LPS. A l'inverse, l'extrait aqueux de *V. trifolia* a montré la faculté à induire la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10.



**Figure V.b : Effet inhibiteur de *V. trifolia* sur la translocation de NFkB (p65)**

L'effet de l'extrait aqueux de *V. trifolia* à 250 et 5000  $\mu\text{g} / \text{ml}$  (respectivement L+V 250 et L+V 5000) a été évalué sur l'induction de la translocation du facteur de transcription NFkB induit par le LPS à 0,5  $\mu\text{g} / \text{ml}$  (LPS). La technique du TransAM a permis de quantifier la quantité de sous-unité p65 de NFkB fixée à l'ADN génomique à partir d'un extrait nucléaire de cellules RAW 264.7 traitées selon les conditions LPS ou L+V. Les résultats sont exprimés en % par rapport au control sans traitement.

Ces résultats peuvent alors confirmer l'activité anti-inflammatoire de cette plante et de plus amples études ont permis d'approfondir le mode d'action de *V. trifolia*. En effet, la production des cytokines et de l'iNOS implique la régulation de leur expression génique par les facteurs de transcription comme le facteur nucléaire NFkB (*Nuclear Factor kappa B*).

C'est ainsi qu'un extrait aqueux de *V. trifolia* a été testé très récemment pour évaluer sa capacité à activer le facteur NFkB sur le modèle des cellules RAW 264.7 traitées au LPS à 0,5 µg / ml (Figure V.b). Cette plante testée aux concentrations de 250 et 5000 µg / ml a alors montré la faculté à diminuer sensiblement l'effet du LPS sur l'activation de la sous-unité p65 du NFkB quantifiée grâce à l'utilisation de kit TransAM de chez Active Motif.

Parmi les autres plantes utilisées contre la ciguatéra, il est aussi à noter que certaines peuvent avoir, à l'inverse de *V. trifolia*, un effet inducteur sur l'expression des médiateurs de l'inflammation. C'est ainsi que *Carica papaya* (le papayer), utilisé à raison de 3 feuilles mises à décocter dans ½ litre d'eau dans le traitement de la ciguatéra (Bourdy et al, 1992), a révélé la capacité à induire la surproduction de NO et de TNF-α (Rimbach et al, 2000). Cela montre bien qu'il existe une diversité de mode d'action au sein des nombreuses plantes utilisée contre la ciguatéra.

Les résultats présentés dans cette étude concernant le potentiel thérapeutique des remèdes traditionnels demandent d'être plus amplement approfondis et des travaux sont actuellement en cours notamment sur le potentiel anti-CTX des extraits de plantes grâce à des expériences de RBA permettant de tester l'efficacité des ces substances à déplacer les toxines marines de leur récepteur primaire, le CSSP.

## **Références de la partie V**

- Angibaud, G., Rambaud, S., 1998. Serious neurological manifestations of ciguatera: is the delay unusually long? *Journal of Neurological Neurosurgery and Psychiatry*, 64(5) : 688–689.
- Benoit, E., Juzans, P., Legrand, A.-M., Molgó, J., 1996. Nodal swelling produced by ciguatoxin-induced selective activation of nerve sodium channels in myelinated nerve fibers. *Neuroscience*, 71 : 1121-1131. Berridge, M. J., 1993. *Nature*, 361 : 315–325.
- Bourdy, G., Cabalion, P., Amade, P., Laurent, D., 1992. Traditional remedies used in the Western Pacific for the treatment of ciguatera poisoning. *Journal of Ethnopharmacology*, 36 : 163-174.
- 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.
- Hidalgo, J., Liberona, J. L., Molgó, J., Jaimovich, E., 2002. Pacific ciguatoxin-1b effect over  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  currents, inositol 1,4,5-triphosphate content and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals in cultured rat myotubes. *British Journal of Pharmacology*, 137°: 1055-1062.
- Kostyuk, P., Verkhratsky, A., 1994. Calcium stores in neurons and glia. *Neuroscience*, 63 : 381-404.
- Manger, R. L., Lee, S. Y., Leja, L. S., Hungerford, J. M., Hokama, Y., Dickey, R. W., Granade, H. R., Lewis, R., Yasumoto, T., Wekell, M. M., 1994b. In vitro analysis of Ciguatoxin, Brevetoxin, and Saxitoxin. *International Symposium on Ciguatera and Marine Natural Products South Kohala, Hawaii*, 1994.
- Pearn, J. H., 1979. Chronic fatigue syndrome: chronic ciguatera poisoning as a differential diagnosis. *Medicine Journal of Australia*, 166 : 309–310.



- Pearn, J., 2001. Neurology of ciguatera. *Journal of Neurological Neurosurgery and Psychiatry*, 70 : 4-8.
- Rimbach, G., Chul Park, Y., Guo, Q., Moini, H., Qureshi, N., Saliou, C., Takayama, K., Virgili, F., Packer, L., 2000. Nitric oxide synthesis and TNF $\alpha$  secretion in RAW 264.7 macrophages, Mode of action of a fermented papaya preparation. *Life Sciences*, 67 : 679-694.
- Sauviat, M.-P., Boydron-Le Garrec, R., Masson, J.-B., Lewis, R. J., Vernoux, J.-P., Molgo, J., Laurent, D., Benoit, E., 2006. Mecanisms involved in the swelling of erythrocytes caused by Pacific and Caribbean ciguatoxins. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 36°:1-9.
- Stommel, E.W., Parsonnet, J., Jenkyn, L.R., 1991. Polymyositis after ciguatoxin toxin exposure. *Archives of Neurology*, 48 : 874–877.
- Stommel, E.W., Jenkyn, L.R., Parsonnet, J., 1993. Another case of polymyositis after ciguatera toxin exposure. *Archives of Neurololy*, 50(6) : 571.
- Verhoef, P. A., Kertesy, S. B., Estacion, M., Schilling, W. P., Dubyak, G., R., 2004. Maitotoxin induces biphasic interleukin-1 $\beta$  secretion and membrane blebbing in murine macrophages. *Molecular Pharmacology*, 66 : 909-920.
- Yasumoto, T., 2001. The chemistry and biological function of natural marine toxins. *Chemical Research*, 1 : 228-242.

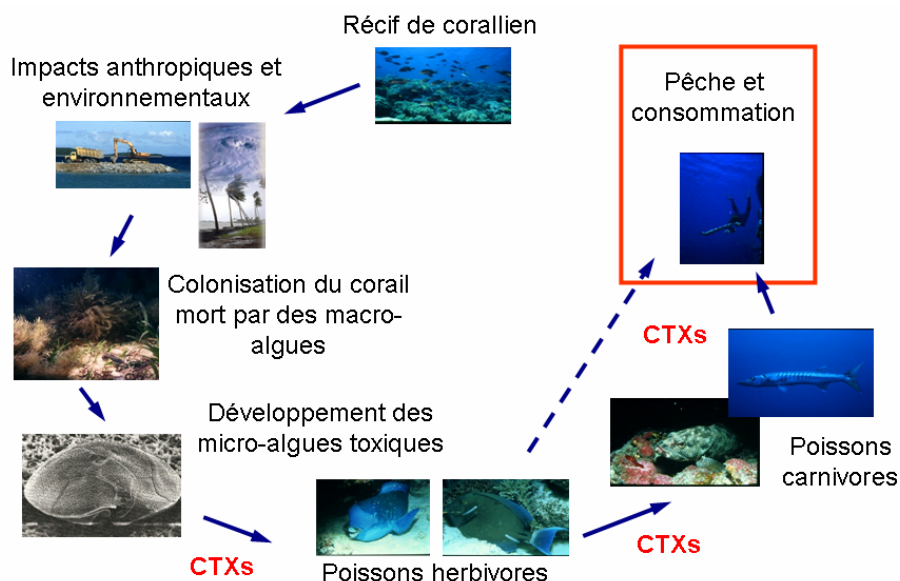
# Annexes

## Annexe I : La Nouvelle-Calédonie dans le Pacifique Sud



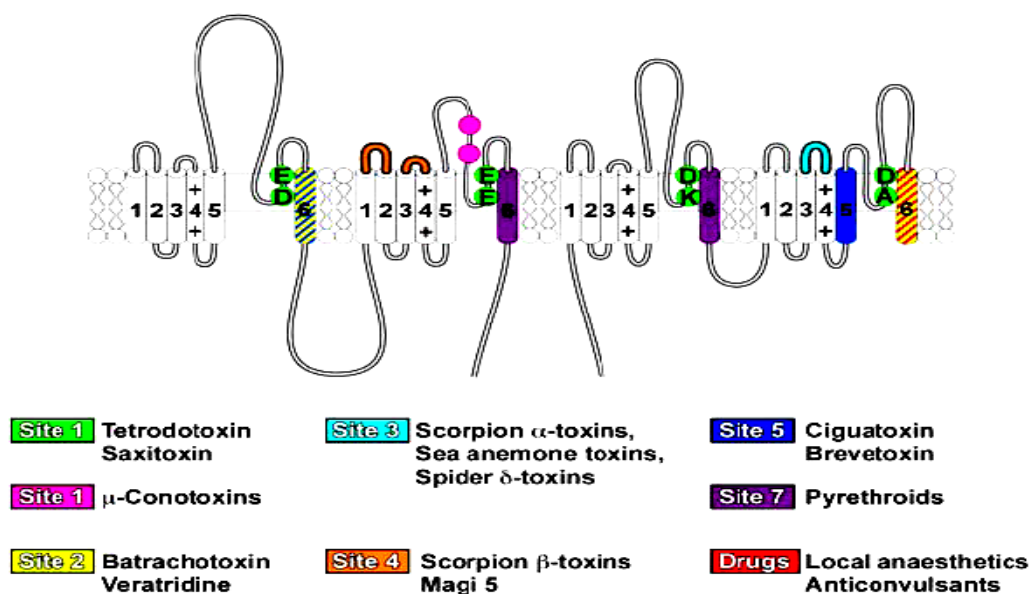
La Nouvelle-Calédonie est une collectivité française d'outre mer de 18 575 km<sup>2</sup> située dans le Pacifique Sud à 1500 km à l'est de l'Australie. Elle comprend la Grande Terre avec la ville de Nouméa, les Îles Loyautés, l'Île des Pins au sud, et l'archipel des Bélep au nord. A la différence de beaucoup d'îles du Pacifique, la Nouvelle-Calédonie n'est pas d'origine volcanique mais provient de l'ancien continent du Gondwana. Séparée de l'Australie et de la Nouvelle-Zélande il y a 65 millions d'années, cet isolement a conduit à l'évolution de nombreuses espèces, mais également de genres et de familles qui sont propres au territoire. Cela explique que le taux d'endémicité de la Nouvelle-Calédonie est l'un des plus élevés au monde. Ainsi, ce territoire représente un réservoir important de substances naturelles et donc un excellent site de recherche pour les scientifiques. Avec un taux d'incidence annuelle calédonien avoisinant les 1/1000 habitants, ce pays fait partie des régions concernées par le phénomène ciguatérique. Et sur ce territoire, la ciguatera est plus connue sous le terme familier de « gratte », surnom qui lui a été attribué d'après le prurit observé lors de l'intoxication.

## Annexe II : La chaîne trophique classique de la ciguatéra



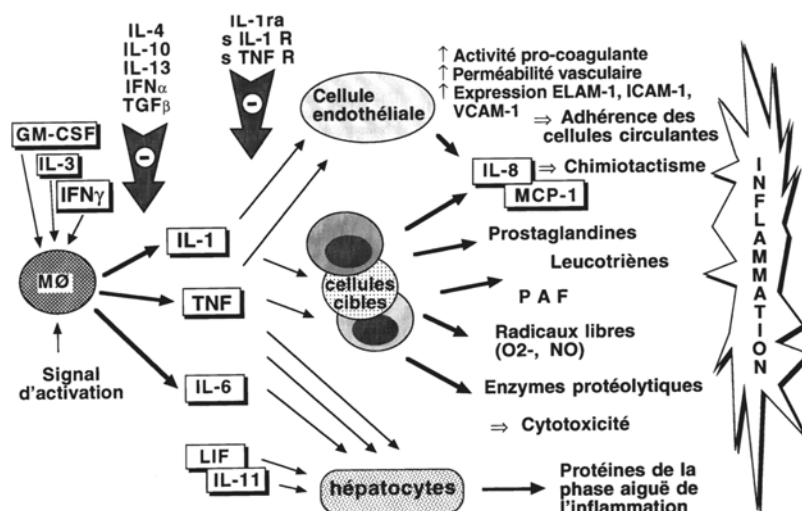
Plusieurs microorganismes sont impliqués dans la production de toxines ciguatériques dont des micro-algues unicellulaires benthiques du groupe des dinoflagellés, *Gambierdiscus sp.*. Ces micro-algues sont considérées comme le maillon initial principal de la chaîne trophique ciguatérigène. Ces microorganismes toxiques colonisent préférentiellement les coraux morts de façon naturelle ou anthropique. Les toxines produites sont ingérées par les poissons herbivores et détritivores se nourrissant de gazons algaux ou de macro-algues recouverts de *Gambierdiscus*. Ces toxines sont ensuite transférées *via* les espèces ichtyophages aux niveaux trophiques supérieurs. L'homme et les autres grands prédateurs terminent cette chaîne alimentaire. Lors de leur transfert dans la chaîne trophique, les toxines sont bio-accumulées du fait de leur grande stabilité chimique et ce processus s'accompagne également de leur biotransformation par des métabolismes oxydatifs dans le foie de poissons qui voient alors augmenter leur toxicité. Ces modifications structurales conduisent à l'élaboration de nombreuses toxines ciguatérigènes dont la majeure partie est constituée de ciguatoxines CTXs.

## Annexe III : Fixation des CTXs et autres toxines marines sur le CSSP



Le canal sodique sensible au potentiel (CSSP) est une cible privilégiée pour de nombreuses molécules comme les insecticides et les neurotoxines. Sept sites de liaison possibles de ces neurotoxines ont été identifiés conduisant alors soit à l'inhibition de la conduction, soit au contraire à son activation via la modulation de l'ouverture du CSSP. Le schéma ci-dessus, reproduit d'après Nicholson et Lewis, 2006 (référence de la partie I), met en évidence le site de fixation des ciguatoxins, CTXs et des brevéttoxines PbTx. Elles ont notamment un effet antagoniste à celui de la tétrodotoxine TTX qui se fixe sur le site 1. Les cercles en vert représentent les résidus d'acides aminés qui forment les anneaux internes (DEKA) et externes (EEDD) du filtre de sélectivité de l'ion.

## Annexe IV : Les cytokines, médiateurs de l'inflammation



L'activation des macrophages aboutit à la production de nombreuses cytokines dont l'interleukine (IL)-1 et le *tumor necrosis factor-α* (TNF-α) pouvant être modulée par d'autres cytokines soit de façon positive (interféron-γ IFN-γ ; IL-3 ; *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* GM-CSF), soit de façon négative (IL-4, IL-10, IL-13, *transforming growth factor* TGFβ, IFNα). L'IL-1 et le TNF agissent sur de nombreuses cellules cibles qui synthétisent alors des médiateurs lipidiques, des enzymes et des radicaux libres directement impliqués dans le processus inflammatoire. Les cellules endothéliales, cibles privilégiées de l'IL-1 et du TNF, favorise la coagulation, l'adhérence des cellules circulantes et leur marginalisation en réponse à des signaux chimiotactiques comme l'IL-8 ou le MCP-1 (*macrophage chemoattractant protein-I*). L'IL-1 et le TNF, tout comme de nombreuses autres cytokines (IL-6, IL-11, *leukemia inhibitory factor* LIF, TGFβ) induisent la production des protéines de la phase aiguë de l'inflammation par les hépatocytes. L'action de l'IL-1 et du TNF est respectivement contrecarrée par l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1 ra) et les formes solubles des récepteurs du TNF (s TNF R). Schéma reproduit d'après Cavaillon, 1995 (référence de la partie I).

**Annexe V : Plantes traditionnelles utilisées dans le traitement de la ciguatéra**

**A**  
*Heliotropium foertherianum* ou faux tabac



**B**  
*Schinus terebenthifolius* ou faux poivrier



**C**  
*Cerbera manghas* ou faux manguier



**D**  
*Euphorbia hirta* ou herbe à dysenterie



**E**  
*Davallia solida*



**F**  
*Vitex trifolia*



Ici sont présentées plusieurs plantes traditionnelles parmi celles employées dans la région du Pacifique Sud pour traitement de la ciguatéra.



## Annexe VI A : Publication, Kumar-Roiné et al, 2008, Nitric oxide

Nitric Oxide 19 (2008) 21–28



Contents lists available at ScienceDirect

## Nitric Oxide

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yniox](http://www.elsevier.com/locate/yniox)

## Modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in RAW 264.7 murine macrophages by Pacific ciguatoxin

Shilpa Kumar-Roiné<sup>a</sup>, Mariko Matsui<sup>a,b</sup>, Mireille Chinain<sup>c</sup>, Dominique Laurent<sup>a</sup>, Serge Pauillac<sup>b,\*</sup><sup>a</sup> Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox, UMR152 IRD, Université Paul Sabatier Toulouse III, centre IRD de Nouméa, BP A5, 98848 Noumea, New Caledonia<sup>b</sup> Laboratoire des Biotoxines, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, 9-11 Avenue Paul Doumer, BP 61, 98845 Noumea, New Caledonia<sup>c</sup> Laboratoire des Microalgues Toxiques, Institut Louis Malardé, BP 30, 98713 Papeete, Tahiti, French Polynesia

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 11 December 2007

Revised 22 February 2008

Available online 14 March 2008

## Keywords:

Ciguatoxin

Lipopolysaccharide

Macrophage

Inducible nitric oxide synthase

Ciguatera

Chronic fatigue syndrome

## ABSTRACT

To investigate the possible involvement of the nitric oxide radical (NO) in ciguatera fish poisoning (CFP), the *in vitro* effects of the main Pacific ciguatoxin (P-CTX-1B) and bacterial lipopolysaccharide (LPS) were comparatively studied on neuroblastoma Neuro-2a and on macrophage RAW 264.7 cell lines. NO accumulation was quantified by measuring nitrite levels in cellular supernatant using Griess reagent while the up-regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) at the mRNA level was quantified via Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). P-CTX-1B caused a concentration- and time-dependent induction of iNOS in RAW 264.7 cells but not in Neuro-2a cells. NO production was evidenced by increased nitrite levels in the 10  $\mu$ M range after 48 h of RAW 264.7 cells exposure to LPS and P-CTX-1B (0.05  $\mu$ g/ml and 6 nM, respectively). The expression of iNOS mRNA peaked at 8 h for LPS then gradually decreased to low level at 48 h. In contrast, a sustained level was recorded with P-CTX-1B in the 8–48 h time interval. The addition of *N*<sub>ω</sub>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a stereoselective NOS inhibitor, strongly diminished NO formation but had no effect on iNOS mRNA synthesis. The implication of NO in CFP paves the way for new therapies for both western and traditional medicines.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

Ciguatoxins (CTXs) are a class of structurally-related, lipid-soluble, heat stable marine toxins. Produced by certain benthic dinoflagellate strains of the genus *Gambierdiscus*, CTXs are transferred up the marine food chain from primary trophic level to herbivorous and to carnivorous coral fish. Endemic to tropical and sub-tropical regions (Pacific, Indian and Caribbean Ocean), these toxins are involved in a frequent complex human food ichthyosarcotoxism known as ciguatera fish poisoning (CFP) [1–4].

Approximately 20 Pacific CTXs (P-CTXs) and 2 Caribbean CTXs (C-CTXs) have been structurally determined to date, and an incomplete structure of Indian CTX (I-CTX) has been proposed [5–14]. Each of these congeners contains a backbone composed of several contiguous ether rings transfused in a ladder-like manner (Fig. 1). A major P-CTX extracted from carnivorous specimens, P-CTX-1B or P-CTX-1 causes CFP at as low as 0.1  $\mu$ g/kg of fish flesh and is thus the most potent CTX analogue reported [4,15,16].

Pharmacological studies have revealed that CTXs target directly the voltage-sensitive Na<sup>+</sup> channels (VSSC), exerting their damaging

effects (e.g. membrane hyper-excitability and cell swelling) on various excitable cells primarily by modifying the activation and inactivation processes of VSSC with a consequent elevation of cytoplasmic Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> concentrations [17]. The blockade of voltage-gated K<sup>+</sup> channels [18] and activation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels [19] have also been reported. Recently the role of nitric oxide radical (NO) in the swelling of frog red blood cells (RBC) challenged with P-CTX-1B and C-CTX-1 was demonstrated [19].

CFP presents primarily as an acute neurologic disease (paresis, dysesthesia, pruritus, ataxia) manifested by varying constellation of general disorders (profound weakness, cephalgia, myalgia, arthralgia, dizziness, tremors, severe perspiration, salivation) and gastrointestinal symptoms akin to gastroenteritis (severe diarrhoea, abdominal cramps, vomiting). Victims in severe cases suffer from paralysis, respiratory and cardiovascular difficulties (arrhythmias, hypotension, heart block, bradycardia, tachycardia) [4,16,20,21]. Severe diarrhoea, latency, dyspnoea, cyanosis, tremor, hypersalivation, paralysis, pilo- and penile erection, are some of similar signs observed in CTXs-injected mice [4,22,23]. Though rarely fatal, >25,000 cases of intoxication are estimated annually, with greater incidence in Pacific island countries, where fish is the main dietary protein source. Cold allodynia is almost pathognomonic sign of CFP. The variability, severity and duration of CFP symptoms reflect a combined influence of ingested dose, toxin

\* Corresponding author. Fax: +687 27 33 90.

E-mail addresses: [spauillac@pasteur.nc](mailto:spauillac@pasteur.nc), [pauillac\\_serge@hotmail.com](mailto:pauillac_serge@hotmail.com) (S. Pauillac).



## Annexe VI B : Publication, Kumar-Roiné et al, 2009, Journal of Ethnopharmacology

G Model

JEP-5495; No. of Pages 9

ARTICLE IN PRESS

Journal of Ethnopharmacology xxx (2009) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)

## Ability of certain plant extracts traditionally used to treat ciguatera fish poisoning to inhibit nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages

Shilpa Kumar-Roiné<sup>a,b,c</sup>, Mariko Matsui<sup>a,b,c</sup>, Karine Reybier<sup>a</sup>, Hélène Taiana Darius<sup>d</sup>, Mireille Chinain<sup>d</sup>, Serge Pauillac<sup>c</sup>, Dominique Laurent<sup>a,b,\*</sup><sup>a</sup> Université de Toulouse; UPS; UMR 152 (Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox), 118, rte de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex 9, France<sup>b</sup> Institut de Recherche pour le Développement (IRD); UMR-152; F-98 848 Nouméa, New Caledonia<sup>c</sup> Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Laboratoire des Biotoxines, F-98845 Nouméa, New Caledonia<sup>d</sup> Institut Louis Malardé, Laboratoire des Microalgues Toxiques, F-98713 Papeete, Tahiti, French Polynesia

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 25 November 2008

Received in revised form 24 March 2009

Accepted 25 March 2009

Available online xxx

## Keywords:

Nitric oxide

Folk remedies

Ciguatera fish poisoning

Lipopolysaccharide

RAW 264.7 macrophage

## ABSTRACT

**Aim of the study:** Ciguatera fish poisoning (CFP) is an intertropical ichthyosarcotoxism that manifests in complex assortment of symptoms in humans. Ciguatoxins (CTXs), issued from *Gambierdiscus* spp., are causative agents of this intoxication. We have recently demonstrated that a Pacific CTX (P-CTX-1B) strongly modulated iNOS expression, leading to overproduction of nitric oxide (NO) in RAW 264.7 murine macrophage cells. NO produced in large amounts is involved in a wide range of pathophysiological processes. Many traditional remedies are commonly used in the Pacific against CFP. In this context, bioassay-guided screening was carried out to study NO inhibiting capacity of 28 selected plant extracts.

**Materials and methods:** We prepared aqueous extracts of plants used in New Caledonia in the treatment of CFP and screened their NO inhibitory activity in lipopolysaccharide (LPS)-activated RAW 264.7 macrophages.

**Results:** Among 28 plants tested, *Euphorbia hirta* (Euphorbiaceae), *Syzygium malaccense* (Myrtaceae), *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), *Punica granatum* (Punicaceae), *Cerbera manghas* (Apocynaceae), *Vitex trifolia* (Labiatae) and *Ximenia americana* (Olacaceae) showed inhibitory activity, validating their use as traditional remedies in CFP, and the potential for use in the treatment of conditions accompanied by NO overproduction.

**Conclusion:** These plants are promising candidates for further screening of their active compounds through activity-guided fractionation.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Nitric oxide (NO) is an intracellular mediator produced in various mammalian cells by three quite distinct isoforms of nitric oxide synthase (NOS): neuronal NOS (nNOS or NOS1), inducible NOS (iNOS or NOS2) and endothelial NOS (eNOS or NOS3). These enzymes catalyse the oxidation of L-arginine to L-citrulline and NO. The isoforms are differentiated generally on the basis of their constitutive (eNOS and nNOS) versus inducible (iNOS) expression, and their Ca<sup>2+</sup>-dependence (eNOS and nNOS) or Ca<sup>2+</sup>-independence

(iNOS). The constitutive forms, whose activity is readily reversible, are generally responsible for biosynthesis of small but physiologically important amounts of NO. This is in marked contrast with the inducible isoform, which is responsible for prolonged, high-output production of NO, associated with deleterious effects (Conner and Grisham, 1995; Weisz et al., 1996; Alderton et al., 2001).

Recently, one of the ciguatoxins (CTXs), namely the Pacific CTX-1B (P-CTX-1B) was shown to up-regulate the mRNA expression of iNOS in murine macrophages RAW 264.7 cells (Kumar-Roiné et al., 2008). Produced by certain tropical benthic dinoflagellate strains of the genus *Gambierdiscus* (Chinain et al., 1999), CTXs are a class of extremely potent marine toxins, involved in a common ichthyosarcotoxism known as ciguatera fish poisoning (CFP). Though generally endemic to tropical and sub-tropical regions, CFP are now more and more reported in temperate countries due to seafood exportation, tourism and global warming incidence. CFP consists of complex and variable signs and symptoms often differing from person to person in intensity and duration (Lehane and Lewis, 2000; Farstad and Chow, 2001; Lewis, 2001; Pearn, 2001). The consequent NO

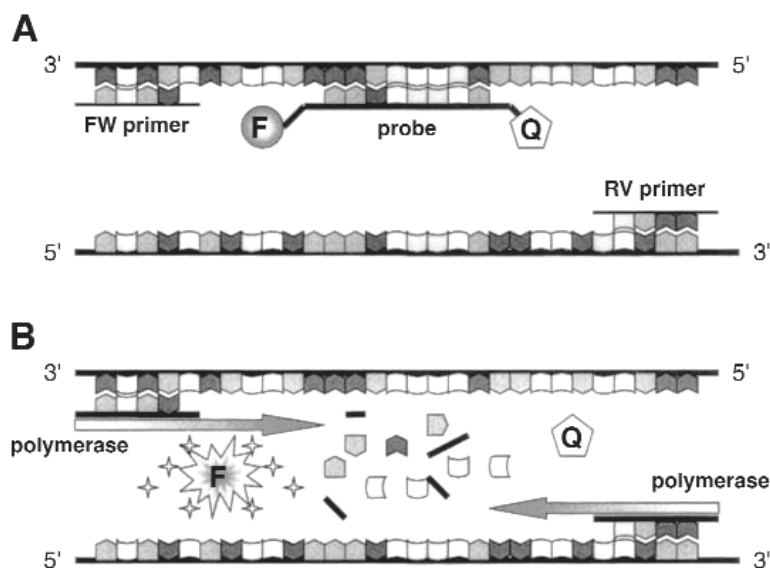
**Abbreviations:** iNOS, inducible nitric oxide synthase; NO, nitric oxide; LPS, lipopolysaccharide; CTXs, ciguatoxins; PbTx, brevetoxins; O, ouabain; V, veratridine; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical; SA, sulfanilic acid; NEDD, N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride; MTT, 3-(4',5'-dimethylthiazol-2'-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

\* Corresponding author. Tel.: +33 5 62 25 68 89; fax: +33 5 62 25 98 02.

E-mail address: dominique.laurent@ird.fr (D. Laurent).

0378-8741/\$ – see front matter © 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.jep.2009.03.039

Please cite this article in press as: Kumar-Roiné, S., et al., Ability of certain plant extracts traditionally used to treat ciguatera fish poisoning to inhibit nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. J. Ethnopharmacol. (2009), doi:10.1016/j.jep.2009.03.039

Annexe VII : Représentation schématique du principe de la technologie *TaqMan*

La technologie TaqMan reste la chimie des sondes fluorescentes la plus employée et associe l'activité 5'-exonucléasique de l'enzyme Taq polymérase à l'utilisation de sondes fluorescentes particulières. Ces dernières sont couplées à un fluorophore émetteur ou donneur tel que le FAM (6 carboxy-fluorescéine) en position 3' dont l'émission de fluorescence est captée par un marqueur également couplé à ces sondes mais en position 5' tel que le TAMRA. Durant la phase d'hybridation de la qPCR, les amorces (*primer*) et les sondes fluorescentes (*probe*) vont s'apparier à l'ADN dénaturé. Tant que la sonde reste intacte, le fluorophore accepteur ou *quencher* (Q) TAMRA placé en 3' absorbe la fluorescence émise par le fluorophore donneur FAM (F) localisé en 5' de la sonde (A). Lors de la phase d'extension, la sonde est clivée par l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase, séparant par la même occasion les fluorophores donneur et accepteur, ce qui résulte en la libération de la fluorescence émise par le FAM (B). FW primer : amorçe sens ; RV primer : amorçe anti-sens ; polymerase : enzyme Taq polymérase. Schéma reproduit d'Overbergh et al, 2003 (référence de la partie II).

## COMMUNICATIONS

### Publications

M. Matsui, S. Kumar-Roiné, H. T. Darius, M. Chinain, D. Laurent, S. Pauillac, Characterisation of the anti-inflammatory potential of *Vitex trifolia* L. (Labiatae), a multipurpose plant of the Pacific traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, **2009**, doi:10.1016/j.jep.2009.09.020.

M. Matsui, S. Kumar-Roiné, M. Chinain, D. Laurent, S. Pauillac. Pacific ciguatoxin 1B-induced modulation of inflammatory mediators in a murine macrophage cell line, *Toxicon*, **2009**, doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.039.

M. Matsui, S. Kumar-Roiné, M. Chinain, D. Laurent, S. Pauillac, Evaluation of the anti-inflammatory potential of plant extracts traditionally used for the treatment of Ciguatera Fish Poisoning in the South Pacific, *Actes des Doctoriales de Tahiti 2009*, Papeete, Tahiti, Polynésie Française, ISBN : 978-2-9534554-0-3.

S. Kumar-Roiné, M. Matsui, K. Reybier, T. H. Darius, M. Chinain, D. Laurent, S. Pauillac. Ability of certain plant extracts traditionally used to treat ciguatera fish poisoning to inhibit nitric oxide production in RAW264.7 macrophages, *Journal of Ethnopharmacology*, **2009**, 123: 369–377.

S. Kumar-Roiné, M. Matsui, M. Chinain, D. Laurent, S. Pauillac, Modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in RAW 264.7 murine macrophages by Pacific ciguatoxin; *Nitric Oxide*; **2008**; 19: 21-28.

## **Posters**

M. Matsui, S. Kumar-Roiné, M. Chinain, D. Laurent, S. Pauillac, Modulation of iNOS and cytokines expression by plants extracts traditionally used for the treatment of Ciguatera Fish Poisoning in the South Pacific: characterization of their anti-inflammatory activity, *11ème Pacific Science Inter-Congress conjointement aux 2ème Assises de la Recherche Française dans le Pacifique*, **mars 2009**, Papeete, Tahiti, Polynésie Française. Obtention d'une bourse de voyage « Young student award ».

S. Pauillac, S. Kumar-Roiné, M. Matsui, K. Reybier-Vuattoux, H.T. Darius, M. Chinain, D. Laurent, Nitric oxide production in Pacific ciguatoxin-1B-stimulated RAW 264.7 cells: evidence for the role of NO pathway in the pathophysiology of ciguatera fish poisoning in a mouse model. *11ème Pacific Science Inter-Congress conjointes aux 2ème Assises de la Recherche Française dans le Pacifique*, **mars 2009**, Papeete, Tahiti, Polynésie Française.

M. Matsui, S. Kumar-Roiné, M. Chinain, D. Laurent, S. Pauillac, Evaluation of the anti-inflammatory potential of plants extracts traditionally used for the treatment of Ciguatera in the South Pacific, *5ème Conférence Internationale des Plantes Aromatique et Médicinales*, **novembre 2008**, Nouméa, Nouvelle-Calédonie. Obtention du second prix de présentation des posters.

S. Kumar-Roiné, M. Matsui, K. Reybier-Vuattoux, H.T. Darius, M. Chinain, S. Pauillac, D. Laurent, Evaluation du potentiel anti-inflammatoire d'extraits de plantes traditionnellement utilisées dans le Pacifique pour le traitement de la Ciguatera, *5ème Conférence Internationale des Plantes Aromatique et Médicinales*, **novembre 2008**, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

M. Matsui, S. Kumar-Roiné, M. Chinain, D. Laurent, S. Pauillac; Novel Implication Of The Inflammatory System In Ciguatera Fish Poisoning, *27<sup>th</sup> annual symposium of Society of Toxicologic Pathology*, **juin 2008**, San Francisco, USA. Obtention d'une bourse « Young student award ».

### **Communications orales**

M. Matsui, Ciguatera therapy: modulation of inflammatory cytokines by traditional plant medicines assessed by mRNA quantification, *LightCycler Roche User Group*, **octobre 2009**, Taupo, Nouvelle-Zélande.

M. Matsui, S. Kumar-Roiné, H.T. Darius, M. Chinain, D. Laurent, S. Pauillac, First evidence for the implication of an inflammatory process in Ciguatera Fish Poisoning, *Ciguatera and related biotoxins workshop*, **octobre 2008**, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

S. Pauillac, S. Kumar-Roiné, M. Matsui, K. Reybier-Vuattoux, H. T. Darius, M. Chinain, D. Laurent, *In vitro* and *in vivo* modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in a mouse model for ciguatera, *Ciguatera and related biotoxins workshop*, **octobre 2008**, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

S. Kumar-Roiné, H.T. Darius, M. Matsui, K. Reybier-Vuattoux, M. Chinain, S. Pauillac, D. Laurent, Assessment of therapeutic efficacy of medicinal plants used against Ciguatera Fish Poisoning through inhibition of nitric oxide production and brevetoxin binding, *Ciguatera and related biotoxins workshop*, **octobre 2008**, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

### **Communications académiques**

M. Matsui, Rôle des cytokines dans la ciguatera: application à l'étude du potentiel thérapeutique des principes actifs de remèdes traditionnels du Pacifique; Présentations orales

lors des *Doctoriales*; **août 2007 et octobre 2008**; Université de Nouvelle-Calédonie, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

### **Travaux de vulgarisation et manifestations publiques**

Fête de la Science en Nouvelle-Calédonie, **édition octobre 2008** (CPS, Nouméa) et **édition octobre 2009** (Lycée A. Kéla, Poindimié ; Lycée Laperouse, Nouméa).

Magazine Santé +, « la gratte au centre des débats », **édition décembre 2008**, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

## RESUME : Rôle des cytokines dans la ciguatéra : application à l'étude de remèdes traditionnels du Pacifique

---

La ciguatéra, ichtyosarcotoxisme majoritairement rencontré dans la zone intertropicale, trouve son origine dans la consommation de poissons tropicaux contaminés par des neurotoxines marines, les ciguatoxines (CTXs). Ces polyéthers polycycliques synthétisés par les micro-algues du genre *Gambierdiscus*, se fixent de façon privilégiée aux canaux sodiques dépendant du potentiel. Cependant, ce seul mode d'action n'explique pas tous les symptômes observés dans la ciguatéra notamment les manifestations particulières de type inflammatoire. L'effet de deux toxines ciguatérigènes, la P-CTX-1B et la P-CTX-3C, ainsi que l'activité d'un analogue, la brévéttoxine PbTx-3, sur la modulation des médiateurs de l'inflammation que sont les cytokines, a été caractérisé sur un modèle d'étude *in vitro* de cellules de macrophages murins RAW 264.7. Le suivi de l'expression génique au moyen de techniques de PCR quantitative a révélé que la P-CTX-1B est capable d'induire les cytokines pro-inflammatoires interleukine (IL)-1 $\beta$ , IL-6 et le Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$ , et l'anti-inflammatoire IL-10. Par ailleurs, alors que les traitements proposés par la médecine occidentale sont essentiellement symptomatiques, la médecine traditionnelle propose l'utilisation de nombreuses plantes dont certaines sont capables de réduire les effets des CTXs *in vitro* et *in vivo*. La nécessité d'enrichir l'arsenal thérapeutique de la ciguatéra ainsi que l'implication probable des mécanismes inflammatoires dans cette pathologie nous ont conduits à caractériser le potentiel anti-inflammatoire de quatre plantes parmi celles traditionnellement employées dans le Pacifique. Les effets d'extraits aqueux de *Cerbera manghas*, *Euphorbia hirta*, *Heliotropium foertherianum* et *Vitex trifolia* sur la cinétique de synthèse des ARNm ainsi que sur la production des protéines cytokiniques, ont été étudiés sur le modèle d'induction de macrophages murins stimulés par un lipopolysaccharide bactérien (LPS). Les résultats montrent que *E. hirta* et *V. trifolia* possèdent les activités anti-inflammatoires les plus intéressantes et cette dernière a été sélectionnée pour de plus amples tests. L'extrait aqueux de *V. trifolia* montre la capacité à inhiber les cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  et à induire l'anti-inflammatoire IL-10 dépendant du LPS. La finalité du projet doit permettre l'étude de principes actifs isolés des plantes sélectionnées et les composés d'intérêt pourront être testés sur modèle animal avant d'être validés sur l'homme. Ainsi de nouveaux traitements thérapeutiques de la ciguatéra pourront-ils être proposés. **Mots clés** : ciguatéra, ciguatoxine, cytokine, PCR quantitative, ELISA, physiopathologie, remèdes traditionnels, *Vitex trifolia*, *Euphorbia hirta*, *Cerbera manghas*, *Heliotropium foertherianum*.