

Un contaminant des fruits de mer, la saxitoxine, une protéine inhabituelle capable de la détecter, la saxiphiline.

Cédric Robillot

Chercheur à l'Institut Australien de Science Marine

Les proliférations massives d'algues neurotoxiques ont lieu de façon périodique dans de nombreuses régions du monde. Elles peuvent conduire à une accumulation de toxines par les coquillages, ces neurotoxines s'avérant extrêmement dangereuses pour l'homme. De nombreux pays contrôlent la toxicité de ces produits à l'aide d'un bioessai sur souris. Le développement d'une méthode biologique alternative pourrait être facilité par la découverte d'une protéine hydrosoluble capable de piéger les neurotoxines paralysantes avec une forte affinité. Cette protéine appelée saxiphiline est produite par des animaux d'origine marine, mais également de façon étonnante par des animaux terrestres.

De nombreux mollusques se nourrissent par filtration et ingestion de plancton. Certaines espèces d'algues planctoniques produisent des toxines qui sont donc consommées par les coquillages. Ces molécules semblent inoffensives pour les bivalves qui les accumulent alors qu'elles s'avèrent toxiques pour les organismes situés à des niveaux trophiques supérieurs (1).

Les fruits de mer contaminés ne présentent aucun signe extérieur qui permette de les différencier des produits sains. Il existe principalement quatre syndromes différents d'intoxication par les fruits de mer liés à l'accumulation de toxines : amnésique, neurotoxique, diarrhéique et paralytique.

La saxitoxine, sujet de cet article, est l'agent responsable du syndrome d'intoxication paralysante par les fruits de mer (IPFM), ayant eu des répercussions à travers le monde entier (figure 1).

On sait désormais qu'en plus de la saxitoxine, appelée ainsi en raison de sa première observation dans l'organisme *Saxidomus giganteus*, il existe une vingtaine d'analogues regroupés sous l'appellation toxines paralysantes (figure 2). Tous ces analogues ne présentent pas la

même toxicité mais peuvent subir des phénomènes de conversion à haute température et en milieu acide. On considère généralement que la préparation alimentaire des coquillages contaminés ne réduit pas la toxicité et peut dans certains cas l'augmenter.

rer importante. Par exemple lors d'un incident au Guatemala en 1987, dans la ville de Champerico, 21 personnes sont mortes sur 145 intoxiquées. La moitié des enfants âgés de moins de 6 ans victimes d'IPFM sont morts (2,4).



Figure 1. Régions du monde où les toxines paralysantes ont été détectées dans des coquillages (2,3).

Le syndrome d'intoxication paralysante

Les toxines paralysantes bloquent le canal sodique voltage-dépendant, empêchant par conséquent la propagation de l'influx nerveux et provoquant la paralysie dont le syndrome tire son nom. Dans les premières phases de l'intoxication, les victimes présentent des picotements et un engourdissement au niveau de la bouche, de la langue et du visage ainsi que des extrémités, et occasionnellement des nausées et vomissements. Si l'empoisonnement est plus sévère, les victimes présentent des symptômes d'ataxie, de faiblesse, et des vertiges avant une paralysie complète. Dans les cas fatals, le diaphragme cesse de fonctionner et on aboutit à la mort par défaillance cardiorespiratoire. Les traitements sont symptomatiques, avec par exemple une assistance respiratoire des victimes paralysées jusqu'à ce que leur organisme ait éliminé les toxines. La mortalité durant un épisode d'IPFM peut s'avé-

L'industrie des fruits de mer est très concernée par les problèmes de santé publique associés à ces toxines. Un épisode d'empoisonnement par les coquillages a des répercussions durables sur le secteur des fruits de mer dans son ensemble, la confiance des consommateurs étant généralement difficile à rétablir.

La surveillance des toxines paralysantes par des méthodes biologiques

Le premier niveau de contrôle se caractérise par le suivi des populations d'algues toxiques dans les zones de production. Le second niveau concerne le contrôle systématique des coquillages avant leur mise sur la marché, consistant à déterminer la toxicité éventuelle des produits ainsi que le type de contaminants. En ce qui concerne les toxines paralysantes, la méthode officielle de l'administration américaine adoptée par de nombreuses agences de régulation à travers le monde, consiste à extraire 100g de

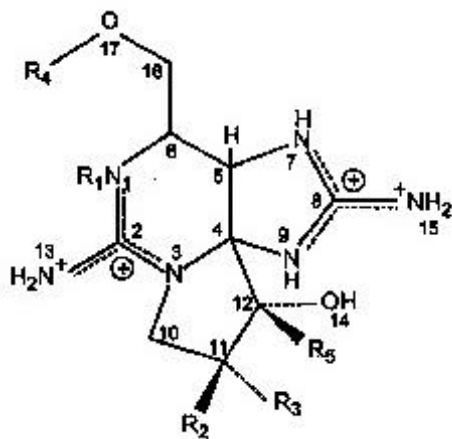


Figure 2. Structure générale des toxines paralysantes

Toxines	Groupements variables				
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
STX	H	H	H	CONH ₂	O
GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂	OH
GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂	OH
GTX5	H	H	H	CONHSO ₃ ⁻	OH
C1	H	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻	OH
C2	H	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻	OH
NEO	OH	H	H	CONH ₂	OH
GTX 1	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂	OH
GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂	OH
GTX6	OH	H	H	CONHSO ₃ ⁻	OH
dcSTX	H	H	H	H	OH
dcGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	H	OH
dcGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	H	OH
LWTX1	H	OSO ₃ ⁻	H	COCH ₃	H
LWTX2	H	OSO ₃ ⁻	H	COCH ₃	OH
LWTX3	H	H	OSO ₃ ⁻	COCH ₃	OH
LWTX4	H	H	H	H	H
LWTX5	H	H	H	COCH ₃	OH
LWTX6	H	H	H	COCH ₃	H

chair de coquillage à l'aide d'une solution acide à haute température, et à injecter un aliquot de l'extrait dans des souris par voie intrapéritonéale. Cette méthode est coûteuse, imprécise et peu sensible, et suscite des réactions très négatives au niveau de l'opinion publique de plus en plus sensibilisée aux problèmes d'éthique animale. De nombreux efforts ont donc été consacrés au développement de méthodes alternatives n'impliquant pas d'expérimentation animale.

Jusqu'à présent, les recherches ont abouti à la mise au point de tests *in vitro* basés sur l'activité biologique des toxines paralysantes, mais également à la production d'anticorps dirigés contre ces toxines. Les tests cellulaires détectent ces toxines par leur capacité à empêcher la mort cellulaire provoquée par un excès de sodium intracellulaire. Cet excès est généré artificiellement par l'action simultanée de toxines activatrices du canal sodique et de composés bloquant les pompes permettant le rejet du sodium en excès.

Le blocage du canal sodique par les toxines paralysantes empêchent cette cascade toxique et le nombre de cellules viables, corrélé positivement à la concentration en toxines paralysantes, est déterminé par les techniques classiques (5).

Un autre test *in vitro* consiste à utiliser le canal sodique recombinant ou isolé à partir de tissus, et à mesurer le déplacement de saxitoxine radioactive par les toxines de l'échantillon (6). Ces deux tests se prêtent

difficilement à l'automatisation et au criblage d'un grand nombre d'échantillons. L'approche basée sur les anticorps anti-saxitoxine souffre de l'incapacité intrinsèque des anticorps à détecter l'ensemble des dérivés toxiques mais a cependant donné lieu à la commercialisation d'un test ELISA (7)

La saxiphiline, un nouvel outil pour détecter les toxines paralysantes

Il y a quelques années, un nouveau récepteur de la saxitoxine a été découvert chez la grenouille d'Amérique du Nord *Rana catesbeiana*. Cette protéine a été nommée saxiphiline en raison de son affinité pour cette classe de toxines (8). Avant cette découverte, plusieurs indices de l'existence de ce récepteur soluble (non membranaire) avaient été rapportés dans la littérature. Néanmoins, la connaissance de l'activité biologique de la saxitoxine sur la canal sodique a détourné les scientifiques de cette protéine inhabituelle, l'associant au canal sodique, la considérant parfois même comme un fragment de ce canal. Au début des années 1990, il a été démontré que ce récepteur des toxines paralysantes appartenait à la famille des transférines (9), protéines circulatoires connues pour leur capacité à fixer le fer et à le distribuer aux cellules. Il semblerait que dans le cas de cette transférine inhabituelle, un des sites de fixation du fer ait subi des mutations pour ne plus fixer désormais le fer, mais bien les toxines

paralysantes (10,11).

De plus, la saxiphiline de *Rana catesbeiana*, dont la séquence primaire est parfaitement connue, possède un insert présentant une homologie évidente avec le domaine de type 1 de la thyroglobuline. Cette partie de la protéine lui confère une seconde activité biologique caractérisée par l'inhibition des cystéines protéinases telles que la papaine et les cathepsines (12).

Un fait surprenant concernant la saxiphiline réside dans la diversité des organismes qui la possèdent. Découverte initialement chez des amphibiens, on sait désormais qu'elle est également présente chez les reptiles, les poissons et chez une variété d'arthropodes. Elle n'a cependant été observée chez aucun oiseau ou mammifère (12). La saxiphiline est présente chez de nombreux animaux terrestres, ce qui est extrêmement curieux puisque les organismes producteurs de toxines paralysantes sont connus seulement en milieu aquatique.

Une des isoformes de saxiphiline d'origine terrestre, découverte chez le cent-pieds tropical *Ethmostigmus rubripes*, lie certaines toxines avec une affinité sub-picomolaire, ce qui représente une des plus fortes interactions connues entre une protéine et une molécule organique, surpassée par l'interaction biotine-avidine. Cette isoforme de saxiphiline de cent-pieds a permis la mise au point d'un test en microplaque 96 puits basé sur le déplacement de saxitoxine tritiée. Le test s'est avéré très

robuste, peu sensible aux acides et sels contenus dans les échantillons de coquillages (13). Les résultats obtenus à partir d'une série d'échantillons standards présentent une forte corrélation avec les méthodes officielles telles que le test souris et l'analyse par chromatographie en phase liquide, mais également avec l'activité biologique mesurée à l'aide du canal sodique. De plus, la saxiphiline est capable de lier l'ensemble des toxines paralysantes, y compris les variants moins toxiques tels que les toxines de type C. Néanmoins, ce test n'est pas applicable aux études sur le terrain puisqu'il implique la manipulation de produits radioactifs.

Les propriétés de cette protéine en font un candidat idéal pour le développement d'un biocapteur à toxines paralysantes, qui puisse être mis en œuvre directement sur le terrain, c'est-à-dire dans les zones de production et de récolte. A l'heure actuelle, les coquillages sont testés après récolte et lorsqu'une toxicité est mise en évidence, l'ensemble de la récolte est détruite. Si les exploitants étaient capables d'identifier la toxicité avant récolte, ils auraient alors la possibilité de retarder cette dernière afin de laisser aux coquillages le temps de détoxifier. Un biocapteur faciliterait grandement le travail de surveillance et limiterait les risques d'intoxication, en particulier dans les régions du monde où le contrôle des fruits de mer souffre d'un manque de moyens et de ressources.

Les seules techniques existantes adaptables au terrain reposent sur une reconnaissance antigène/anticorps dont les limites ont été discutées précédemment. Il est extrêmement difficile de produire des anticorps capables de reconnaître l'ensemble des variants de toxines paralysantes, et la saxiphiline présente l'avantage majeur d'être un récepteur pour l'ensemble de ces toxines.

Quelle est la fonction de la saxiphiline?

La fonction de la saxiphiline reste un mystère. Une hypothèse évidente est qu'elle participerait à un système de défense contre les toxines paralysantes. Toutefois, ce récepteur n'a jamais été mis en évidence dans les coquillages capables d'accumuler

ces toxines. Le seul groupe chez lequel cette hypothèse pourrait être vérifiée est la famille des crabes xanthidés (14). Certaines espèces présentent dans leur chair des toxines paralysantes à des concentrations extrêmement élevées (figure 3), un seul crabe pouvant parfois contenir suffisamment de toxines pour tuer plusieurs centaines d'individus en théorie.

L'origine de ces toxines n'est pas évidente puisque les crabes ne sont pas des filtreurs tels que les bivalves, et une origine phytoplanctonique est peu vraisemblable. Les crabes qui accumulent les toxines paralysantes possèdent un système neuro-musculaire résistant à ces toxines mais ne semblent pas produire de saxiphiline. En revanche, ceux qui n'accumulent pas les toxines et leur sont sensibles expriment parfois la saxiphiline. On pourrait alors imaginer que cette famille de crabes ait développé deux systèmes de défense distincts : le premier dans l'haémolymphe avec la saxiphiline entrant directement en contact avec la toxine exogène, le second au sein des tissus à travers le développement d'une résistance aux toxines paralysantes autorisant leur accumulation. Dans ce cas, quels pourraient être les avantages sélectifs respectifs de ces différentes espèces?

Enfin l'on peut s'interroger sur d'autres fonctions possibles de la saxiphiline. Pourquoi des créatures terrestres auraient-elles besoin de produire la saxiphiline?

Les toxines paralysantes sont-elles plus répandues dans l'environnement que les études actuelles ne le laissent entrevoir? Ou bien existe-t-il une classe de molécules proches de la saxitoxine et agissant en tant que régulateurs physiologiques, peut-être au niveau du canal sodique? Toutes ces questions sont encore aujourd'hui sans réponse mais la saxiphiline représente d'ores et déjà un point de départ exceptionnel pour le développement de méthodes alternatives de détection des toxines paralysantes au plus proche du terrain.

Références

- (1) Kvitek RG and Beitler MK (1991) *Mar Ecol Prog Ser* 69 :47
- (2) Llewellyn LE (2000) *Food Borne Diseases*, Marcel Dekker, New York, Vol 4 Seafood and Environmental Toxins, pp 78-108
- (3) Harmful Algal Blooms Database of the Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO www.ices.dk/status/decadal/dec8998.htm
- (4) Rodrigue DC et al. (1990) *Am J Trop Med Hyg* 42 :267
- (5) Jellett JF et al. (1992) *Toxicon* 30 :1143
- (6) Doucette GJ et al. (1997) *Toxicon* 35 :625
- (7) Usleber E et al. (1997) *Food Addit Contam* 14:193
- (8) Mahar J et al. (1991) *Toxicon* 29:653
- (9) Li Y and Moczydlowski E (1991) *J Biol Chem* 266:15481
- (10) Llewellyn LE and Moczydlowski E (1994) *Biochemistry* 33:12312
- (11) Li Y et al. (1993) *Mol Pharmacol* 44 :742
- (12) Lenarcic B et al. (2000) *J Biol Chem* 275 :15572
- (13) Llewellyn LE and Doyle J (2001) *Toxicon* 39:217
- (14) Llewellyn LE (1997) *Mar Biol* 128:599

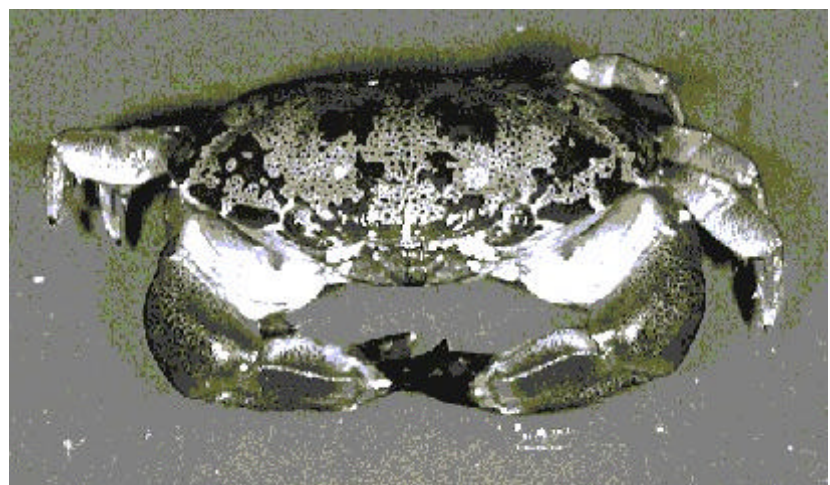


Figure 3 . *Atergatis floridus*, crabe de récif capable de contenir de grandes quantités de toxines paralysantes, ayant déjà provoqué plusieurs intoxications mortelles. (photographie Le Llewellyn)