

Université de la Nouvelle-Calédonie
Ecole Doctoral : Milieux Insulaires Ultra-Marins

THÈSE

Présentée par

Shilpa KUMAR-ROINÉ

Pour obtenir le titre de
Docteur en Sciences de l'Université de la Nouvelle-Calédonie
Discipline : Sciences du Vivant
Spécialité : Pharmacologie Cellulaire et Pharmacognosie

VALORISATION DE REMÈDES TRADITIONNELS UTILISÉS DANS LE TRAITEMENT DE LA CIGUATERA DANS LE PACIFIQUE

Soutenue publiquement le 09 novembre 2009, à Nouméa, devant le jury composé de :

Ali AL-MOURABIT	DR1, CNRS (France)	Rapporteur
Christian MORETTI	DR2, IRD (Polynésie Française)	Rapporteur
Dominique LAURENT	CR1 IRD (France)	Directeur
Serge PAUILLAC	CR1 Institut Pasteur (France)	Co-Directeur
Hamid AMIR	Professeur, Université de la Nouvelle-Calédonie	Examineur
Jordi MOLGÓ	DR1, CNRS (France)	Examineur
Mireille CHINAIN	Chercheur ILM (Polynésie Française)	Examineur



Université de la Nouvelle-Calédonie
Ecole Doctoral : Milieux Insulaires Ultra-Marins

THÈSE

Présentée par

Shilpa KUMAR-ROINÉ

Pour obtenir le titre de
Docteur en Sciences de l'Université de la Nouvelle-Calédonie
Discipline : Sciences du Vivant
Spécialité : Pharmacologie Cellulaire et Pharmacognosie

VALORISATION DE REMÈDES TRADITIONNELS UTILISÉS DANS LE TRAITEMENT DE LA CIGUATERA DANS LE PACIFIQUE

Soutenue publiquement le 09 novembre 2009, à Nouméa, devant le jury composé de :

Ali AL-MOURABIT	DR1, CNRS (France)	Rapporteur
Christian MORETTI	DR2, IRD (Polynésie Française)	Rapporteur
Dominique LAURENT	CR1 IRD (France)	Directeur
Serge PAUILLAC	CR1 Institut Pasteur (France)	Co-Directeur
Hamid AMIR	Professeur, Université de la Nouvelle-Calédonie	Examineur
Jordi MOLGÓ	DR1, CNRS (France)	Examineur
Mireille CHINAIN	Chercheur ILM (Polynésie Française)	Examineur

REMERCIEMENTS

Mes plus profonds remerciements à mes directeurs de thèse, M. Dominique LAURENT et M. Serge PAUILLAC, pour m'avoir offert l'opportunité de cette thèse. Merci pour votre confiance et vos conseils tout au long du projet ainsi que pour votre soutien, tant par vos idées neuves et vos suggestions de nouvelles approches pour ce projet, que par vos efforts pour répondre à mes nombreuses demandes d'ordre logistique nécessaires à la réalisation du projet. Merci aussi pour votre travail de relecture, d'édition et de traduction de ma thèse.

Mes chaleureux remerciements vont aussi aux membres du jury, M. Hamid AMIR, M. Jordi MOLGÓ et Mme. Mireille CHINAIN pour l'intérêt qu'ils y ont porté. Je souhaiterais remercier particulièrement M. Christian MORETTI et M. Ali ALMOURABIT pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir été rapporteurs et pour leurs suggestions utiles à cette thèse.

Je voudrais également remercier M. Sylvain PETEK, qui en sa qualité de chef de laboratoire (UMR152) à Nouméa, a facilité beaucoup de mes démarches administratives. Merci à Mme. CHINAIN, responsable du Laboratoire des Micro-Algues à l'Institut Louis Malardé (ILM) pour m'avoir fourni les toxines et pour m'avoir permis d'effectuer un stage sur les propriétés détoxifiantes des plantes. Je voudrais également exprimer ma gratitude à Mme. Françoise NEPVEU, directrice de l'unité de recherche (UMR 152), qui a soutenu ma candidature pour la bourse et facilité mon déplacement en stage de 3 mois à Toulouse.

Je voudrais saisir ici l'opportunité pour remercier M. Fabrice COLIN et Mme. Suzanne CHANTEAU, respectivement directeur du Centre de Nouméa de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et de l'Institut Pasteur de la Nouvelle-Calédonie (IPNC) pour avoir rendu possible ma présence dans leurs locaux. Je souhaiterais remercier particulièrement M. Fabrice COLIN et M. Paul MARTIN, précédent directeur de l'IPNC, pour avoir appuyé ma demande pour une bourse d'étude.

Je suis particulièrement reconnaissante à Mariko MATSUI, une camarade étudiante, Taiana DARIUS de l'ILM et Nicolas FABRE de l'UMR 152 à Toulouse pour leur étroite collaboration sur, respectivement, la biologie moléculaire, la neuropharmacologie et sur l'analyse structurelle chimique. Les résultats obtenus ont permis l'achèvement de cette thèse.

Merci aux techniciens du laboratoire, Alain Videault et Antoine Holué de l'IRD, pour leur assistance dans la récolte et l'extraction des plantes, ainsi que pour tant d'autres tâches.

Milles mercis à Cyril POUILLAIN du CRNS qui m'a fait découvrir et laisser utiliser le Companion, ce qui a facilité mon travail de chromatographie, et à Karine REYBIER pour m'avoir pris sous son aile durant mon séjour à Toulouse et pour m'avoir appris, avec patience, la technique et l'utilisation de la Résonance Paramagnétique Electronique.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans une pensée pour notre regretté collègue M. Martin Pierre Sauviat.

Accomplir cette thèse n'aurait pas été possible sans le soutien financier accordé par l'IRD via une bourse de soutien de thèse de doctorat et par l'Ambassade de France à Fidji via une bourse d'étude.

Ces 4 dernières années ont été un voyage, parfois frustrant mais ô combien enrichissant. Lorsque j'ai suivi mon époux en 2003 pour m'installer en Nouvelle-Calédonie, l'éloignement de ma famille et de mes amis avaient laissé un grand vide. Réaliser cette thèse m'a certes apporté beaucoup sur le plan intellectuel mais a aussi comblé ce vide. J'ai appris tant de nouvelles choses, rencontré et travaillé avec tant de personnes formidables. Oui, ces 4 dernières années furent une véritable expérience humaine. J'aimerais surtout citer Anne-Sophie KERBRAT, ma collègue, camarade de thèse et amie. Merci d'avoir été là dans les bons et les mauvais moments. Merci enfin à tous, membres et étudiants de l'IRD et de l'UNC pour avoir pris le temps de partager une blague ou deux et ainsi me changer les idées.

Je n'oublie pas tous mes amis qui m'ont accompagné et soutenu tout au long de cette thèse. Merci à vous.

Enfin, mes plus chaleureux remerciements vont à tous les membres de ma famille. A mes parents qui ont depuis le début soutenu mes études et mes décisions même si parfois elles leur étaient difficiles. A mes beaux-parents pour leurs constants mots d'encouragement. Et à mon époux bien-aimé, Damien ROINE, à qui je dois tant. Pour la merveilleuse personne qu'il est, pour sa patience, son soutien et son amour, je lui dédis cette thèse.

Table des matières

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES ABRÉVIATIONS	8
FIGURES	9
TABLEAUX.....	11

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I.	INTRODUCTION SUR LA CIGUATERA	12
	<i>Article 1 : Ciguatera fish poisoning and other seafood intoxication syndromes. A revisit and a review of the existing treatment employed in ciguatera fish poisoning</i>	13
II.	HISTORIQUE : les études de criblage antérieures	51
II.1	Test souris	51
II.2	Tests d'électrophysiologie et de neurophysiologie	52
II.3	Tests sur érythrocytes de grenouilles et humain	53
II.4	Test sur neuroblastomes	54
III.	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	55

PARTIE 1 : MODULATION DE LA SYNTHÈSE D'OXYDE NITRIQUE (NO•) PAR LA P-CTX-1B

	ÉTUDE DU POTENTIEL INDUCTEUR D'OXYDE NITRIQUE (NO•) DE LA P-CTX-1B	58
I.	CADRE D'ÉTUDE	58
II.	INTRODUCTION SUR L'OXYDE NITRIQUE (NO•) ET L'OXYDE NITRIQUE SYNTHÉTASE INDUCTIBLE (iNOS)	60
II.1	BIOLOGIE DU NO•	61
II.2	LA QUANTIFICATION DU NO• ET DE L'iNOS	63
II.2.1	Méthodes d'évaluation de la production du NO•	63
II.2.2	Méthodes d'évaluation de l'expression de l'iNOS	65
III.	LA SÉLECTION ET LE PRINCIPE DES TESTS	66
III.1	RÉACTION DE GRIESS – TEST BIOCHIMIQUE	67
III.2	RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE QUANTITATIVE – TEST BIOMOLÉCULAIRE	67
IV.	MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS	69
	<i>Publication 1 : Modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in RAW 264.7 murine macrophages by Pacific ciguatoxins</i>	70
V.	DISCUSSION ET CONCLUSION	78

PARTIE 2 : LES ÉTUDES DE CRIBLAGE THÉRAPEUTIQUE

ÉTUDE DE CRIBLAGE THÉRAPEUTIQUE DES PLANTES UTILISÉES POUR TRAITER LA CIGUATERA	80
I. CADRE D'ÉTUDE	80
CHAPITRE 1: ÉVALUATION <i>IN VITRO</i> DU POTENTIEL INHIBITEUR DU NO• DES PHYTOTHÉRAPIES UTILISÉES CONTRE LA CIGUATERA	81
I. INTRODUCTION	81
II. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS	82
<i>Publication 2 : Ability of certain plant extracts traditionally used to treat ciguatera fish poisoning to inhibit nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages</i>	86
III. DISCUSSION	95
III.1 LES TESTS BIOCHIMIQUES	95
III.2 LES TESTS COMPLÉMENTAIRES	96
CHAPITRE 2: ÉTUDE <i>IN VITRO</i> DE L'INHIBITION DE LA LIAISON DE LA BRÉVÉTOXINE TRITIÉE A SON SITE DE HAUTE AFFINITÉ PAR LES PHYTOTHÉRAPIES UTILISÉES CONTRE LA CIGUATERA	99
I. INTRODUCTION	99
II. PRINCIPE DES ÉTUDES D'INTERACTION LIGAND-RÉCEPTEUR	100
III. MATÉRIEL ET MÉTHODES	102
III.1 MATÉRIEL	102
III.2 PRÉPARATION DES EXTRAITS DE PLANTES	102
III.3 TEST D'INTERACTION LIGAND-RÉCEPTEUR	104
III.3.1 Préparation des synaptosomes	104
III.3.2 Dosage des protéines totales par la méthode de Bradford.....	105
III.3.3 Évaluation de la qualité des synaptosomes pour le test d'interaction ligand-récepteur	105
III.3.4 Calibration du test d'interaction ligand-récepteur.....	106
III.3.5 Application du test d'interaction ligand-récepteur aux extraits de plantes	107
III.3.6 Analyse de données	107
IV. RÉSULTATS ET DISCUSSION	107
II. CONCLUSION DE LA PARTIE 2	111

PARTIE 3 : LES ÉTUDES DE FRACTIONNEMENT BIOGUIDÉ

FRACTIONNEMENT BIOGUIDÉ AVEC LES TESTS DE GRIESS ET D'INTERACTION LIGAND-RÉCEPTEUR DE TROIS PHYTOTHÉRAPIES UTILISÉES DANS LE TRAITEMENT DE LA CIGUATERA113

I. INTRODUCTION113

Article 2 : *Traditional Remedies Employed in the Treatment of Ciguatera Fish Poisoning: Examples of Use of Three Plants in the Pacific*115

II. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS132

II.1 MATÉRIEL132

II.2 PARTIE EXPÉRIENCE CHIMIQUE132

II.2.1 Extraction132

II.2.2 Fractionnement et isolement133

II.2.3 Analyse structurale133

II.3 PARTIE TESTS BIOLOGIQUES133

II.3.1 Bioguidage avec les tests colorimétriques134

II.3.2 Bioguidage avec le test d'interaction ligand-récepteur135

II.3.3 Analyses des données et statistiques135

II.4 FRACTIONNEMENT BIOGUIDÉ ET ISOLEMENT.....136

II.4.1 *Euphorbia hirta*136

II.4.2 *Heliotropium foertherianum*139

II.4.3 *Vitex trifolia*143

III. DISCUSSION ET CONCLUSION146

DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

I. DISCUSSION GÉNÉRALE149

II. CONCLUSION151

III. PERSPECTIVES152

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES159

ANNEXES

ANNEXE 1 : DIFFUSION DE L'INFORMATION SCIENTIFIQUE	165
ANNEXE 2 : RÉSULTATS DE CRIBLAGE (TESTS BIOCHIMIQUES)	172
ANNEXE 3 : PHOTO DES PLANTES SÉLECTIONNÉES	180
ANNEXE 4 : RÉSULTATS DE FRACTIONNEMENT BIOGUIDÉ (TESTS BIOCHIMIQUES)	181
ANNEXE 5 : SPECTRES DE RMN ET DE MASSE	190

Liste des abréviations et table des illustrations

Liste des abréviations et table des illustrations

Liste des abréviations

ARNm :	acide ribonucléique messenger
BSA :	albumine sérique bovine
Ca ²⁺ :	ion calcium
CCM :	chromatographie sur couche mince
CCE :	chromatographie sur couche épaisse
CSDP :	canaux sodiques dépendants du potentiel
CTXs :	ciguatoxines
DCM :	dichlorométhane
DMSO :	diméthylsulfoxyde
DPPH :	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
ELISA :	enzyme-linked immunosorbent assay
EtOAc :	acétate d'éthyle
[³ H]PbTx-3 :	brévétaxine-3 tritiée
IL :	interleukine (IL-1 beta, -6, -10)
L-NAME :	N ω -nitro-L-arginine methyl ester
LPS:	lipopolysaccharide
MeOH :	méthanol
MTT:	3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tétrazolium bromide
Na ⁺ :	ion sodium
NED :	N-naphtyl-éthylènediamine
NO• :	radical oxyde nitrique
NOS :	oxyde nitrique synthétase dont l'iNOS est la forme inductible
P-CTX-1B :	ciguatoxine -1B du Pacifique
PbTx _s :	brévétaxines
qPCR :	réaction de polymérisation en chaîne quantitative
RPE :	résonance paramagnétique électronique
TG :	test de Griess
TILR :	test d'interaction ligand-récepteur
TNF- α :	facteur de nécrose tumorale alpha

Figures

Figure 1 : Biosynthèse de l'oxyde nitrique (NO•) par la NOS	61
Figure 2 : Distribution des traitements dans des microplaques à 96 puits pour l'évaluation <i>in vitro</i> de l'inhibition du NO• avec les extraits aqueux de plantes utilisées pour soigner la ciguatera	84
Figure 3 : Courbes de compétition de la fixation de [³ H]-PbTx-3 par différents inhibiteurs, ciguatoxines et brévéttoxines sur les synaptosomes de cerveaux de rats	100
Figure 4 : Structure chimique du gambierol et du brevenal	101
Figure 5 : Procédure de purification des synaptosomes.....	104
Figure 6 : Courbe de compétition de la P-CTX-3C sur les synaptosomes de cerveaux de rats	106
Figure 7 : Courbes de compétition des extraits aqueux de plantes sur les synaptosomes de cerveaux de rats	107
Figure 8 : Courbe de compétition d'un mélange d'extrait d' <i>H. foertherianum</i> (feuilles) avec l'extrait de <i>G. polynesiensis</i>	108
Schéma 1 : Protocole de fractionnement bioguidé mené sur les extraits aqueux d' <i>E. hirta</i> (Eh), d' <i>H. foertherianum</i> (Hf) et de <i>V. trifolia</i> (Vt)	132
Figure 9 : Structure chimique de la quercitrine (1), de l'acide rosmarinique (2) et de l'agnuside (3)	133
Figure 10 : Distribution des traitements dans des microplaques à 96 puits pour l'évaluation <i>in vitro</i> de l'inhibition du NO• avec les fractions et les molécules pures d' <i>E. hirta</i> , d' <i>H. foertherianum</i> et de <i>V. trifolia</i>	134
Figure 11 : Distribution des traitements dans des microplaques à 96 puits pour l'évaluation <i>in vitro</i> de l'inhibition du NO• avec les sous-fractions d' <i>E. hirta</i> , d' <i>H. foertherianum</i> et de <i>V. trifolia</i>	135
Figure 12 : Effets de la quercitrine (1) sur l'accumulation de nitrite dans les surnageants cellulaires et sur la viabilité cellulaire de macrophages RAW 264.7	138
Figure 13 : Courbes de compétition de l'extrait, des fractions et des sous-fractions d' <i>Heliotropium foertherianum</i> (feuilles) sur les synaptosomes de cerveaux de rats	141
Figure 14 : Effets de l'acide rosmarinique (2) sur l'accumulation de nitrite dans les surnageants cellulaires et sur la viabilité cellulaire de macrophages RAW 264.7	142

- Figure 15 : Courbe de compétition de l'acide rosmarinique (**2**) sur les synaptosomes de cerveaux de rats143
- Figure 16 : Effets de l'agnuside (**3**) sur l'accumulation de nitrite dans les surnageants cellulaires et sur la viabilité cellulaire de macrophages RAW 264.7145

Tableaux

- Tableau 1 : Les espèces de plantes testées, leurs appellations communes en Nouvelle-Calédonie, les lieux de collecte, les parties de plantes récoltées83-84
- Tableau 2 : Les effets des extraits aqueux de *Cerbera manghas*, d'*Euphorbia hirta*, d'*Heliotropium foertherianum* et de *Vitex trifolia* sur l'accumulation de nitrite comparés à l'inhibition ou l'induction de l'expression de l'iNOS et de cytokines (ANRm et/ou protéine)97
- Tableau 3 : Activités inhibitrices des extraits aqueux de plantes utilisées dans le traitement de la ciguatera vis-à-vis de la fixation de la [³H]-PbTx-3 au site 5 de canaux sodique dépendants du potentiel de synaptosomes de cerveaux de rats103
- Tableau 4 : Fractionnement bioguidé de l'extrait aqueux de la plante entière d'*Euphorbia hirta* (Eh) avec le test d'inhibition du NO• (en comparaison de la cytotoxicité et de l'induction du NO•) dans des macrophages RAW 264.7137
- Tableau 5 : Fractionnement bioguidé de l'extrait aqueux de feuilles d'*Heliotropium foertherianum* (Hf) avec le test d'inhibition du NO• (en comparaison de la cytotoxicité et de l'induction du NO•) et le test d'inhibition de la liaison de la [³H]-PbTx-3140-141
- Tableau 6 : Fractionnement bioguidé de l'extrait aqueux de feuilles de *Vitex trifolia* (Vt) avec le test d'inhibition du NO• (en comparaison de la cytotoxicité et de l'induction du NO•) dans des macrophages RAW 264.7144

Introduction générale

I. Introduction sur la ciguatera

Les intoxications alimentaires font depuis toujours partie du quotidien de l'homme. Parmi elles, la ciguatera est une forme imprévisible d'ichtyosarcotisme, qui est due à l'ingestion de poissons tropicaux et dont les manifestations cliniques se caractérisent généralement par des troubles sensoriels. Cette maladie est occasionnée par des dinoflagellés benthiques du genre *Gambierdiscus*, présents essentiellement dans les zones tropicales et subtropicales (Chinain et al., 1999 ; 2009a ; Lehane et Lewis, 2000 ; Yasumoto et al., 1977).

Ces algues microscopiques synthétisent au moins deux familles de toxines polyétherées : les ciguatoxines (CTXs) et les maitotoxines (MTXs) (Bagnis et al., 1980 ; Yasumoto et al., 1977). Ces neurotoxines sont transmises aux poissons puis à l'homme par le biais de la chaîne alimentaire. Cette intoxication est un problème non négligeable de santé publique dans l'Océan Pacifique (Laurent et al., 2005).

Hormis la ciguatera, il existe d'autres intoxications liées aux produits de la mer, les intoxications paralysante (IPFM), diarrhéique (IDFM), neurotoxique (INFM) et amnésique (IAFM) dues aux fruits de mer, qui sont assez répandues (van Dolah, 2000 ; Zaccaroni et Scaravelli, 2008). Récemment, ont été relevés et caractérisés plusieurs syndromes d'intoxication inédits provoqués par des dinoflagellés toxiques émergents tels que les intoxications liées aux azaspiracides et aux palytoxines (Wang, 2008).

Soumis pour publication dans *South Pacific Journal of Natural Science*, l'article suivant présente une vue d'ensemble du phénomène de la ciguatera (Article 1). Ainsi, les domaines de l'étiologie, de la toxicologie, de l'écotoxicologie, de la pharmacologie, de la pathologie et les traitements de l'intoxication, y seront successivement abordés. Parallèlement, ces aspects seront étendus aux autres intoxications déjà citées (IPFM, IDFM, INFM, et IAFM) et à celles liées aux tétrodotoxine, azaspiracides et palytoxines.

Article 1

Kumar-Roiné, S., Matsui, M., Pauillac, S., Laurent, D. Ciguatera fish poisoning and other seafood intoxication syndromes. A revisit and a review of the existing treatment employed in ciguatera fish poisoning. *South Pacific Journal of Natural Science*, soumis.

Ciguatera fish poisoning and other seafood intoxication syndromes

A revisit and a review of the existing treatments employed in ciguatera fish poisoning

Shilpa Kumar-Roiné^{a,b,c}, Mariko Matsui^{a,b,c}, Serge Paullac,^c Dominique Laurent^{a,*}

^aUniversité de Toulouse ; UPS ; UMR 152 (Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox), 118, rte de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex 9, France

^bInstitut de Recherche pour le Développement ; UMR-152 ; F-98 848 Noumea, New Caledonia

^cInstitut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Laboratoire des Biotoxines, BP61, F-98845 Noumea, New Caledonia

* Corresponding author: Dr. Dominique LAURENT

Université de Toulouse, Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox (UMR 152), 118, rte de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex 9, France. Phone: +33 5 62 25 98 11; Fax: +33 5 62 25 98 02 Email address: dominique.laurent@ird.fr

ABSTRACT

Ciguatera fish poisoning (CFP) is acquired through consumption of tropical reef fishes, contaminated with potent neurotoxins, ciguatoxins (CTXs), produced by benthic dinoflagellate of the Gambierdiscus genus. Both spatially and temporally unpredictable, a tainted fish is impossible to differentiate from an untainted one by appearance, taste, texture or odour. Given the predominance of reef fish in the diet of insular countries, the risk of CFP is ever-present. In the Pacific where the incidence of CFP is the highest, the consequences on public health and socio-economy can be extremely severe. Multidisciplinary in nature, the present review revisits the phenomenon of CFP, covering certain of its aspects, notably the etiology, toxicology, ecotoxicology, pharmacology, pathology and the treatments administrated. These aspects of CFP have been reviewed in relation to other poisoning syndromes: tetrodotoxin poisoning and other dinoflagellates- or diatoms-associated intoxications such as paralytic (PSP), diarrhetic (DSP), neurotoxic (NSP), amnesic (ASP) and azaspiracid shellfish poisoning (AZP) and palytoxin poisoning.

Based on case reports and bibliographic accounts, a list inventorying the western medicines prescribed to patients suffering with CFP has been established. Within the last two decades, several of the herbal remedies have been evaluated for their efficiencies in in vivo and in a number of in vitro tests, which have also been reviewed herein.

Keywords: *Seafood poisoning, marine toxins, ciguatera fish poisoning (CFP), paralytic shellfish poisoning (PSP), diarrhetic shellfish poisoning (DSP), neurotoxic shellfish poisoning (NSP), amnesic shellfish poisoning (ASP), azaspiracid shellfish poisoning (AZP), tetrodotoxin (Fugu) poisoning, palytoxin poisoning, occidental medicine, traditional remedies*

1 INTRODUCTION

Mankind has always suffered from food-related poisoning. The accounts of one such intoxication, the ciguatera fish poisoning (CFP), also known as ciguatera, dates back to the beginning of the XVI century. Recorded in his writing, Pedro Martyr D'Anghera, a rapporteur working for the Spanish crown on board the ships of great explorers (Columbus, Cortez, Magellan and Vasco de Gama) attributed the cases of poisoning to

intoxication by poisonous fish (Bagnis 1981; Lewis 1986; Martyr d'Anghera 1555).

This fish-borne toxinological syndrome is prevalent in the tropical and subtropical areas, and is acquired by the consumption of marine fishes which have accumulated naturally occurring toxins through their diet. The origin of ciguatera is known to be benthic dinoflagellates belonging to the *Gambierdiscus* genus (Order Peridinales, Family Heteraulacaceae); the first species to be described being *Gambierdiscus toxicus* Adachi & Fukuyo (1979). These dinoflagellates are primarily found in subtropical and tropical areas. (Boydron-Le Garrec et al. 2005a; de Fouw et al. 2001; Friedman et al. 2008; Gillespie et al. 1986; Juranovic and Park, 1991; Laurent 1993; Laurent et al. 2005; Lehane and Lewis 2000; Lewis 2001; 2006).

Although, consistently under-appreciated and under-reported (Begier et al. 2006; McKee et al. 2001), available evidence indicates that ciguatera is responsible for more than 50 000 cases of intoxication worldwide (Fleming et al., 2006; Van Dolah, 2000a), and thus it represents the single largest cause of unpreventable fish poisoning (Isbister and Kiernan 2005; Nicholson and Lewis 2006).

1.1 SEAFOOD INTOXICATION

Food is essential both for growth and for the maintenance of life. However, food can also be responsible for ill-health. Seafood-borne diseases are an emerging subset of food-borne illness, which have been on the increase since last few decades (Clemence and Guerrant 2004; Fleming et al. 1998; Fleming and Easom 1998). The recent epoch of international seafood trade expansion, development of the tourism industry, increasing anthropogenic stress on the marine environment, and the growing trend of utilization of a greater variety of marine organisms has been marked with increasing marine seafood-related disease incidences, a geographic spread of certain seafood illnesses and the emergence of new marine toxin diseases observed in human population.

(Bagnis et al. 1970; Fleming et al. 2001; 2006; Hallegraef 1993; 2003; 2006; Knap et al. 2002; van Dolah 2000a).

An excellent source of high quality proteins, with low fat and high mineral content, the consumption of seafood has seen a steady rise over the recent decades to become an integral element of human diet globally (Pigott and Tucker 1990; Soccol and Oetterer 2003). Over 2.9 billion people worldwide rely on fish and fishery products for at least 15% of animal protein (FAO 2009). To meet the growing global demand for seafood, the world seafood industry has expanded over last four decades to play a preeminent role in the economic and social well-being of several nations (Bell et al. 2009; Pauly 2009). In the island countries, particularly in the Pacific, seafood is a staple nutritive and sometimes the only economic resource (Dalzell 1992; 1994; Dalzell and Adams 1997). Since the 1970s, the marine catches in tropical waters of Pacific and the Indian Oceans have shown a long-term gradual increase (FAO 2009). Unfortunately, most cases of seafood poisoning caused by eating fish have been reported to originate from waters around tropical islands (Isbister and Kiernan 2005).

Seafood intoxications are generally categorized as fish- or shellfish-associated, based on their primary transfectors, and are caused due to the presence of biological (bacterial spoilage related to improper handling or by contamination with viral or parasites) or chemical (contamination *via* chemical toxins through anthropogenic activities or *via* biotoxins issued from microorganisms like diatoms, cyanobacteria and dinoflagellates) hazards (Fleming et al. 2001; 2006; Huss et al. 2000; Knap et al. 2002). Though a natural phenomenon, harmful algal blooms (HABs) seem to have become more frequent, more intense and more widespread. Some of the contributing factors attributed to such observations include a greater scientific awareness and better surveillance systems. In addition, local, regional or global favorable conditions of growth and transportation of algal cyst *via* ship ballast water transport or

shellfish transplantation are also believed to contribute to the expansion of seafood intoxication (Hallegraeaf 2003; 2006; van Dolah 2000a).

Marine biotoxins are among the most potent naturally occurring toxins known to date (Wang 2008). They are responsible for extensive fish and shellfish die-offs and have been implicated in the episodic mortalities of marine mammals, birds and other animals at the top of marine food web (Burkholder et al. 1992; Geraci et al. 1989; Jessup et al. 2009; Landsberg et al. 2009; de la Riva et al. 2009; Scholin et al. 2000). Worldwide, these toxin-producing marine microorganisms cause more than 60 000 poisoning events annually with an associated mortality rate of 1.5% (van Dolah 2000a). Of these, human diseases associated with exposure to dinoflagellate biotoxins occupy the principal position (Camacho et al. 2007; Knap et al. 2002).

1.2 DINOFLAGELLATE-ASSOCIATED TOXICOSES

The dinoflagellates are important components of phytoplankton that provide vital nutrition support to filter-feeding bivalve shellfish and to the larvae of crustaceans and finfish, many of which are commercially important (Camacho et al. 2007; Hallegraeaf 2003). Of the 3400-5000 species of extant marine phytoplanktons, about 300 can proliferate in high numbers (Barber and Diaz 2003; Hallegraeaf 2003). A certain 80-90 of these species are known to have the capacity of producing phycotoxins (Camacho et al. 2007; Hallegraeaf 2003; van Dolah 2000a). Of these, 70 are dinoflagellates which make them the largest group of harmful species that impact humans (Camacho et al. 2007). Though mass proliferations of pelagic dinoflagellates are known to take part in HABs, several benthic species are also known to produce highly potent poisons.

The possible presence of natural toxins in fish and shellfish has been known since antiquity. However, it has been only in the past few decades, in view of current world food priorities, that extensive studies have

been devoted to the toxicology and pharmacology of marine seafood poisonings. As a result, four major seafood poisoning syndromes (Barbier and Diaz, 2003; van Dolah 2000b; Zaccaroni and Scaravelli, 2008) have been identified from the dinoflagellate toxins: paralytic shellfish poisoning (PSP), diarrhetic shellfish poisoning (DSP), neurotoxic shellfish poisoning (NSP) and ciguatera fish poisoning (CFP).

Besides these, there are emerging reports of several new poisoning syndromes (Wang 2008) resulting from newly appearing dinoflagellate toxins such as azaspiracid shellfish poisoning (AZP) and palytoxin (Table 1-3). Other well-described intoxications include amnesic shellfish poisoning (ASP) and tetrodotoxin poisoning from toxins issued from diatoms and from unknown sources, respectively (Table 1-3).

These various toxic syndromes have contributed to an increase in global public concerns on the importance of marine biotoxins, especially those associated with dinoflagellates and have been subject of many excellent reviews (Bricelj and Shumway 1998; de Fouw et al. 2001; Friedman et al. 2008; Katikou 2008; McNabb 2008; Mons et al. 1998; Munday 2008; Pulido 2008; Ryan et al. 2008; Tubaro et al. 2008; Twiner et al. 2008; Vale 2008; van Apeldoorn et al. 1999; van Apeldoorn et al. 2001; Watkins et al. 2008).

1.3 FISH -BORNE POISONINGS

Thousands of marine organisms have been listed as poisonous or venomous, some of which cause discomfort, illness or even death in man (Halstead 1959; 2001a; 2001b). However, in terms of incidence, given its popularity (Whittle and Gallacher 2000), the most recurrent forms of marine poisoning arise from consumption of fish, and particularly so in tropical and subtropical insular regions (Barceloux et al. 2008; Barnett and DiPalma 2004; Huss et al. 2004; Isblister and Kiernan 2005; Lehane and Lewis 2000; Pearn 2001). The intoxication, resulting after one has been in contact or

Table 1 Human intoxication syndromes caused by marine biotoxins, toxins implicated, causative agents, vectors and geographical distribution (Backer et al. 2003; Baden et al. 1995; Chateau-Degat 2003; Hallegraef 2003; Knap et al. 2002; Tosteson et al. 1995)

<i>Disease</i>	<i>Causative Organism(s)</i>	<i>Toxin(s) Implicated</i>	<i>Vectors (Known and Potential)</i>	<i>Geographical Distribution</i>	<i>First Recorded Incidence</i>
Paralytic shellfish poisoning (PSP)	Red tide dinoflagellate species: <i>Alexandrium</i> , <i>Gymnodinium catenatum</i> , <i>Pyrodinium bahamense</i> , <i>Gonyaulax</i>	Saxitoxins (STXs), gonyautoxins (GTXs), N-sulfocarbamoyl analogs	Clams, mussels, oysters, gastropods, cockles, fish, scallops, whelks, lobsters, copepods, crabs	Temperate to tropical worldwide	1927
Diarrhetic shellfish poisoning (DSP)	Red tide dinoflagellate species: <i>Dinophysis</i> , <i>Prorocentrum</i> , <i>Coolia</i> , <i>Protoperidinium oceanicum</i> , <i>Phalacroma rotundatum</i> <i>Protoceratium reticulatum</i> , <i>Lingulodinium polyedrum</i> , <i>Gonyaulax spinifera</i>	Okadaic acid (OA), dinophysistoxins (DTXs), pectenotoxins (PTXs) yessotoxins (YTXs)	Mussels, scallops, clams, gastropods	Temperate worldwide	1961
Amnesic shellfish poisoning (ASP)	Red tide diatom species: <i>Pseudo-nitzschia</i>	Domoic acid	Mussels, anchovies crabs,	Canada, NW, USA, Ireland	1987
Neurotoxic shellfish poisoning (NSP)	Red tide dinoflagellates species: <i>Karenia</i> , <i>Chatonella</i> , <i>Karenia brevis</i> (formerly <i>Gymnodinium breve</i> and <i>Ptychodiscus brevis</i>), <i>Fibrocapsa japonica</i> , <i>Heterosigma akashiwo</i> ,	Brevetoxins (PbTx)	Oysters, clams, mussels, cockles, whelks, fish	Gulf of Mexico, North Carolina, Japan, NZ	1844
Ciguatera fish poisoning (CFP)	Epibenthic dinoflagellates species: <i>Gambierdiscus</i>	Ciguatoxins (CTXs), scaritoxin, maitotoxins (MTXs)?, palytoxin?, gambierol	>400 coral reef fish, snail, shrimps, crabs	Subtropical to tropical worldwide, Mediterranean Sea	1500s
Tetrodotoxin (Fugu) poisoning	Bacteria species: <i>Vibrio pelagius</i> , <i>Alteromonas tetraodonis</i> , <i>Shewanella alga</i> ?	Tetrodotoxin (TTX)	>40 Pufferfish, porcupine fish, sun fish, toadfish, trumpet shell, horseshoe crab, xanthid crabs, starfish, octopus, marine worms	Japan, China, Mexico	2800 BC
Azspiracid shellfish poisoning (AZP)	Red tide-associated dinoflagellates <i>Protoperidinium crassipes</i>	Azspiracids (AZAs)	Mussels, oysters, scallops, clams, crabs	Europe	1995
Palytoxin poisoning	Epibenthic dinoflagellates <i>Ostreopsis</i> sp.	Palytoxin (PLX) ^a and ostreocins	Crabs, sea urchins, mackerel, triggerfish, sardines, fish	Europe, Phillipines, Brazil, Japan, Caribbean, Indian Ocean	1987

? Not confirmed

^a Also isolated from marine soft coral of the genus *Palythoa*

Table 2 Human intoxication syndromes caused by marine biotoxins, mode of action and chemistry (Backer et al. 2003; Katikou 2008; Knap et al. 2002; Twiner et al. 2008; van Dolah 2000; Wang 2008)

<i>Toxin</i>	<i>Congeners</i>	<i>Disease</i>	<i>Principle Action Target</i>	<i>Chemical Backbone</i>	<i>Nature</i>
Saxitoxins (STXs)	21	Paralytic shellfish poisoning (PSP)	Site 1 Na ⁺ channel blocker	Tetrahydropurine	Hydrophilic
Gonyautoxins (GTXs)			Site 1 Na ⁺ channel blocker	Tetrahydropurine	Hydrophilic
N-sulfocarbamoyl derivatives			Site 1 Na ⁺ channel blocker	Tetrahydropurine	Hydrophilic
Okadaic acid (OA)	≥8	Diarrhetic shellfish poisoning (DSP)	Phosphatase inhibitor	Polyether	Hydrophilic
Dinophysistoxins (DTXs)			Phosphatase inhibitor	Polyether	Hydrophilic
Pectenotoxins (PTXs)	14		ND	Polyether	Lipophilic
Yessotoxins (YTX)	36		ND	Polyether	Lipophilic
Domoic acid (DA)	17	Amnesic shellfish poisoning (ASP)	Glutamate receptor agonist	Tricarboxylic amino acid	Hydrophilic
Brevetoxins (PbTx _s)	9	Neurotoxic shellfish poisoning (NSP)	Site 5 Na ⁺ channel activator	Polyether	Lipophilic
Ciguatoxins (CTXs), scaritoxin	>20	Ciguatera fish poisoning (CFP)	Site 5 Na ⁺ channel activator	Polyether	Lipophilic
Maitotoxins (MTXs)	3		Ca ²⁺ channel activator	Polyether	Hydrophilic
Palytoxin	8 ?		Na ⁺ -K ⁺ ATPase inhibitor	Polyether	Lipophilic and hydrophilic
Gambierol	1		K ⁺ channel blocker	Polyether	Lipophilic
Tetrodotoxin (TTX)	>10	Tetrodotoxin (Fugu) poisoning	Site 1 Na ⁺ channel blocker	Densely functionalized cyclohexane ring with a cyclic guanidine moiety	Hydrophilic
Azaspiracids (AZAs)	>20	Azaspiracid shellfish poisoning (AZP)	ND	Polyether	Lipophilic
Palytoxin	8	Palytoxin poisoning	Na ⁺ -K ⁺ ATPase inhibitor	Polyether	Lipophilic and hydrophilic

? Assumed but not confirmed

ND Not determined

Table 3 Human intoxication syndromes caused by marine biotoxins, symptoms, prevention and treatment (Backer et al. 2003; Baden et al. 1995; Hallegraef 2003; Huss et al. 2004; Knap et al. 2002; Isbister and Kiernan 2005)

<i>Disease</i>	<i>Prevention</i>	<i>Onset</i>	<i>Duration</i>	<i>Acute Symptom</i>	<i>Chronic Symptom</i>	<i>Treatment</i>
Paralytic shellfish poisoning (PSP)	No antitoxin, avoid potentially toxic shellfish especially just after HABs, detection of toxin and closure of shellfish beds	0.5-2 h	Days	Primarily neurologic: descending paresthesia, muscular non-coordination, muscular paralysis, respiratory failure and death	None observed	Supportive
Diarrhetic shellfish poisoning (DSP)	No antitoxin, avoid potentially toxic shellfish especially just after HABs, detection of toxin and closure of shellfish beds	0.5- 3 h	Days	Entirely gastrointestinal: diarrhea*, nausea, vomiting, abdominal pain	None observed	Supportive
Amnesic shellfish poisoning (ASP)	No antitoxin, avoid potentially toxic shellfish, detection of toxin and closure of shellfish beds	<24 h	Years	Gastrointestinal and neurologic: amnesia*, coma and death	Amnesia	Supportive
Neurotoxic shellfish poisoning (NSP)	No antitoxin, avoid potentially toxic shellfish especially just after HABs, detection of toxin and closure of shellfish beds	0.5-3 h	Days	Neuromuscular and mild gastrointestinal: muscular pain, paresthesia, reversal of temperature sensation*and hypotension*	None observed	Supportive
Ciguatera fish poisoning (CFP)	Difficult, no commercially available detection methods, no antitoxin available, either avoid large predacious coral reef fish or eating the viscera of fish	5-24 h	Years	Gastrointestinal, neurological and cardiovascular: nausea, diarrhea, reversal of temperature sensation*, tachycardia, bradycardia	Paresthesia	Symptomatic and supportive: <i>i.v.</i> rehydration, antiemetics, antidiarrhoeal, atropine, anti-depressants, <i>i.v.</i> D-mannitol
Tetrodotoxin (Fugu) poisoning	Avoid inherently toxic fish species or have the fish specially prepared	5-30 min	Days	Acute descending paresthesia* and minor gastroenteritis that can lead to, muscular paralysis, cardiac dysfunction, respiratory paralysis* and death	None observed	Supportive: gastric lavage with sodium bicarbonate, activated charcoal, endotracheal intubation
Azaspiracid shellfish poisoning (AZP)	No antitoxin, avoid potentially toxic shellfish, detection of toxin and closure of shellfish beds	3-18 h	Days	Severe gastroenteritis	None observed	NR
Palytoxin poisoning	No antitoxin, may be distinguished by an unusual taste imparted to the fish	NR	NR	Gastrointestinal, neurological, and autonomic: respiratory distress and death	NR	NR

NR Not reported

* Generally accepted as pathognomonic signs of the intoxication syndrome

ingested a poisonous vertebrate fish, is categorized under *ichthyotoxism*.

Derived from Greek, the prefix *ichthyo* signifies pertaining to fishes, while *toxism* denotes poisoning. This denomination includes various piscine toxicities (Bagnis et al. 1970; Halstead 2001a; Zaccaroni and Scaravelli 2008), which are classed according to the distribution of ichthyotoxins in the biological compartments of the fish (Table 4).

Ichthyosarcotoxism, by far the most common form in terms of incidence, encompasses different types of intoxications which have been further delineated either on the basis of the species of causative fish or of the clinical picture produced (Table 5). The clinical manifestations of ichthyosarcotoxism are routinely characterized by sensory disturbances. Though lacking precise definition, due to the diversity in the fish species and in the nature of toxins implicated, there appears to be broad differentiation between characteristic illnesses which appear following ingestion of diverse species of toxic fish and illnesses which occur following ingestion of particular species (SPC 1968).

Thus categorized according to the taxonomy, the ichthyosarcotoxism groups include elasmobranch poisoning from ingestion of sharks, skates and rays, clupeoid poisoning from ingestion of sardines and herrings, scombroid poisoning from ingestion of tuna, mackerel, bonito, skipjack and mahi-mahi (Table 5), and tetrodotoxin poisoning from ingestion of puffers and puffer-like fish (Table 1-3). Ichthyosarcotoxism resulting from ingestion of diverse species of toxic fish includes the hallucinatory poisoning (Table 5) and CFP (Table 1-3), and are primarily diagnosed based on clinical manifestations (Bagnis et al. 1970; Halstead 2001a; SPC 1968; Zaccaroni and Scaravelli 2008).

2 CIGUATERA FISH POISONING

An unpreventable form of ichthyosarcotoxism, CFP is caused after consumption of tropical marine fish species

that seem without risk but are tainted with one or more naturally occurring neurotoxins from the family of ciguatoxins (CTXs). The disease, commonly afflicting the regions of Pacific and Indian Ocean and the Caribbean Sea, is both spatially and temporally unpredictable and impossible to detect by appearance, taste, texture or odor of fish caught (Friedman et al. 2008; Laurent et al. 2005; Lehane and Lewis, 2000; Lewis 2001; Lewis 2006; Lewis et al. 2000). More than 400 species of near-shore tropical fishes, ranging over a broad phylogenetic spectrum, have been incriminated as potential vectors of this intoxication (Halstead 1978). Despite the fact that this marine toxin illness is very often under-diagnosed and under-reported, it is nonetheless, the most common non-bacterial intoxication, estimated to between 50 000 to 100 000 cases per year (Begier et al. 2006; Fleming et al. 2006; McKee et al. 2001)

2.1 TOXINS SOURCE

The term ciguatera was coined in 1866 by a Cuban doctor Felipe Poey, after the vernacular name of a marine gastropod, *Turbo* (syn. *Livona*) *pica*, responsible for intoxications in Cuba (Poey 1866). Despite the long history, it was only three decades ago, that the scientists gained insight into the etiology of CFP. An exceedingly thorough examination of the feeding behavior of ciguatoxic fish in the Pacific by Randall (1958) led to the theory of food chain whereby the toxin was presumed to be produced by an unspecified benthic microorganism, which is first ingested by herbivorous fishes and then transferred to larger carnivores. Supposing the causative agent might be an alga, a fungus, a protozoan or a bacterium, Randall (1958), on the basis of circumstantial evidence, favored an unidentified benthic cyanobacterium as the likely precursors of the toxins.

A good part of this theory proved to be remarkably accurate, although nearly 20 years passed before its validity was proven by the identification of the source organisms.

Table 4 Classification of fish-borne intoxications according to the type and the origin of the toxic compounds (adapted from Bagnis et al. 1970)

<i>Class</i>	<i>Biological Compartment</i>	<i>Fish Species Implicated</i>
Ichthyohemotoxism	Injection, absorption or ingestion of fresh fish blood	Anguillidae, Congridae, Muraenidae and Ophichthidae
Ichthyohepatotoxism	Fish liver that probably contains excessive amounts of vitamin A	Scombridae, Serranidae, Sparidae and Trichodontidae
Ichthyootoxism	Eggs and gonads of mainly freshwater and a few marine fish species	Barbus, Schizothorax, Tinca and Stichaeus
Ichthyoalleinotoxism “hallucinogenic fish poisoning”	Upon ingestion of head or flesh of certain of reef fishes in the tropical Pacific and Indian oceans	ND
Ichthyoacanotoxism	From injuries sustained from stings, spines or teeth of venomous fish poisons that are secreted from venom apparatus	ND
Ichthyocrinotoxism	Venoms are produced by means of glandular structure, often in the skin, independent of a true venom apparatus	Myxinidae, Grammistes, Rypiticus and Ostraciidae
Ichthyosarcotoxism	Upon ingestion of flesh and other parts of the fish	Numerous coral reef-dwelling fishes

ND Not determined

The breakthrough occurred when Yasumoto et al. (1977a; 1977b) found considerable toxicity in a sample of algae and detritus collected from the surface of dead coral in the Gambier Islands of French Polynesia during an epidemic of ciguatera in 1976 that correlated with the stomach contents of fishes. The microalga in question was a benthic dinoflagellate. Tentatively identified as *Diplopsalis* sp. (Yasumoto et al. 1977), it was later placed under a new genus and named *G. toxicus* (Adachi and Fuyuko 1979).

Since this first milestone, five other species in this genera, *G. belizeanus* (Faust 1995), sp. nov. (Holmes 1998) and *G. australes*, *G. pacificus*, *G. polynesiensis* (Chinain et al. 1999; 2009) have been described. Though, the four former species have been reported to be toxic in culture (Chinain et al. 1999; Holmes 1998), their implication in CFP remains to be demonstrated. On the other hand, the toxicity of *G. belizeanus* is yet to be determined. In

addition, in many ciguatera-endemic regions, the co-occurrence of other toxic benthic dinoflagellates belonging to the genera *Ostreopsis*, *Coolia* and *Prorocentrum* with the *Gambierdiscus spp.* has lead to the presumption of their role as source of toxins in the ciguatera food-chain (Backer et al. 2003).

The origin of the toxins that cause CFP in the Caribbean Sea (Lewis et al. 1998; Poli et al. 1997; Pottier et al. 2002; Vernoux and Lewis 1997) and Indian Ocean (Hamilton et al. 2002a; 2002b) has yet to be determined (Lewis 2001; 2006). Recently, benthic cyanobacteria have also been suspected in this phenomenon (Endean et al. 1993; Laurent et al. 2008; Kerbrat et al. 2009; Hahn and Capra 1992). In New Caledonia, some recently reported cases of ciguatoxicosis have resulted after a meal of giant clams, which has led the authors to suggest the name, ciguatera shellfish poisoning (Laurent, personal communication).

Table 5 Classification and general characteristics of different types of ichthyosarcotoxism apart from ciguatera fish and tetrodotoxin poisonings (adapted from Zaccaroni and Scaravelli 2008; Bagnis et al. 1970)

<i>Name</i>	<i>Species</i>	<i>Clinical Characteristics</i>	<i>Toxin</i>
Clupeotoxism	Herrings, anchovies, sardines, tarpons, bonefishes, deep-sea bonefishes	Short incubation time digestive syndrome, pruritus, tachycardia, vertigos, cyanosis. Coma and death are not so rare	Palitoxin? Mixed toxins?
Hallucinatory Fish Poisoning	Sea chubs, mullets, goatfish, surmullets	Short incubation time Gastrointestinal and psychological disturbances, hallucination, vertigos, behavior alterations, motor incoordination	Various, unknown toxins
Carchatoxisms	Various sharks species	Both nervous and digestive signs	Mixed toxins Carchatoxins
Scombroidotoxism	Scombridae, tuna, bonitos, mackerel	Short incubation time Rapid evolution, nervous and digestive signs, regression within 8-12 h	Histamine and biogenic amines
Cyclostome Poisoning	Lampreys, hagfish	Nausea, vomiting, dysenteric diarrhea, tenesmus, abdominal pain and weakness	NK
Gempylotoxic Fish	<i>Gempylidae</i> (castor oil fish)	Diarrhea	Oil comprised mainly of oleic acid
Elasmobranch Poisoning	Sharks, skates, rays	Gastrointestinal, neurological and cardiovascular symptoms	NK
Chimaera Poisoning	Ratfishes	NR	NK

? Assumed but not confirmed

NR Not reported

NK Not known

2.2 TOXINS IMPLICATED

Ciguatoxins (CTXs) are the neurotoxins that are predominantly responsible for CFP. Other toxins isolated from *G. toxicus*, *Ostreopsis* spp., *Coolia* spp. and *Prorocentrum* spp., namely the maitotoxins (MTXs), okadaic acid (OA) and palytoxin (PTX), have also been implicated in CFP (Anderson and Lobel 1987; Holmes and Lewis 1994; Lewis 2001; 2006). Though, the implication of these different toxins in CFP could in the least explain the complex medical symptoms they produce in human consumers, it still needs to be formally demonstrated.

The CTXs form a family of chemical compounds, closely related in structures with a molecular weight of 941-1141 Da (Lewis 2006). These potent toxins consist of highly oxygenated long chain alkyl compounds, in which most of the oxygen atoms occur as cyclic ether linkage that form 13-14 rings, which are fused into a mostly rigid, ladder-like structure. (Fig. 1). Heat-resistant, fat-soluble, CTXs are polyheterocyclic toxins possessing structural framework reminiscent to that of the brevetoxins (PbTx) (Fig. 1). The PbTx belong to another family of potent lipid-soluble polyether toxins that are produced by the red-tide forming marine dinoflagellate *Karenia brevis* (formerly *Ptychodiscus brevis* then *Gymnodinium*

breve) which is implicated in NSP intoxications (Table 1-3) (Baden 1989; Dechraoui et al. 1999; Watkins et al. 2008).

Originally isolated in 1967 in a partially pure form from specimens of Javanese giant moray eels *Gymnothorax javanicus* (Scheuer et al. 1967), the structural formula of the first CTX was first elucidated in 1989 on the basis of 350 µg of poison obtained from 4 tons of *G. javanicus* (Legrand et al. 1989; Murata et al. 1989; Yasumoto 2005). At present, three

classes of CTXs are recognized and the prefixes P-, C- and I- signifying “Pacific ocean”, “Caribbean sea” and “Indian ocean” are denominated to distinguish the CTXs based on their geographic origin (Lewis et al. 1991; Hamilton et al. 2002a; 2002b; Murata et al. 1989; 1990; Satake et al. 1993; 1997; 1998; Vernoux and Lewis 1997). This being, for certain CTXs of the Pacific that were isolated prior to C-CTXs and I-CTXs, this prefixion is not used.

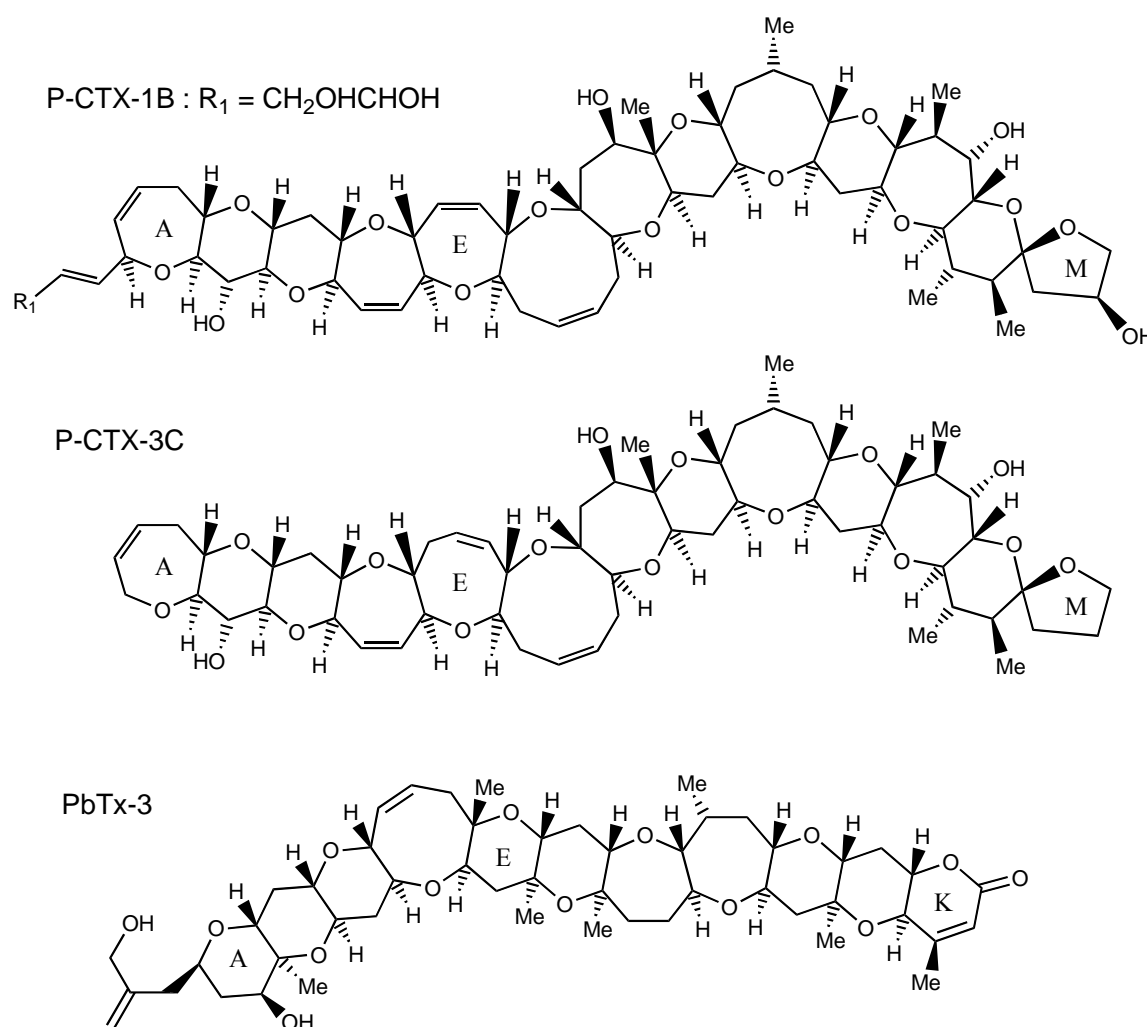


Fig. 1. Chemical structure of some polyether marine neurotoxins (P-CTXs : Pacific ciguatoxins; PbTxS : brevetoxins).

As a consequence, the first CTX to be purified and structurally elucidated was called CTX-1 but is now also known as

CTX-1B or P-CTX-1. To date, more than 23 structures of CTX congeners have been resolved (Dickey 2008; Yasumoto et al.

2000; 2005). All origins confounded, geographical and biological, in 2002, the analogues of CTXs tallied to 39; more precisely, 23 P-CTXs, 12 C-CTXs and 4 I-CTXs (Boydron-Le Garrec et al. 2005a). This includes those isolated from fish, both herbivores and carnivores, and from dinoflagellates, in wild and cultured. The CTXs isolated from extracts of dinoflagellates are generally grouped under the name “gambiertoxins” (GTXs).

2.2 ECOTOXICOLOGY OF CIGUATOXINS

Ciguatera fish poisoning is a complex ecotoxicological phenomenon that constitutes a serious threat to the development of industry of seafood fisheries and international tourism of sub-tropical and tropical island communities (Bagnis 1992; Glaziou and Legrand 1994; Laurent et al. 2005; Lewis 1979; Lewis 1992; Lewis and Ruff 1993; Olsen 1988; Epstein and Rapport 1996). As Randall (1958) foresaw, the odyssey of the incriminated toxins from the *G. toxicus* cells to the human consumer involves the food link.

This benthic dinoflagellate will frequently grow as an epiphyte on macroalgae colonizing the dead corals or other surfaces. Consequently, it is not part of the plankton community and hence takes no part in the appearance of red-tides. Where toxicity is an exception in planktonic dinoflagellates, in the benthic species like *Gambierdiscus* it is rather a norm (Anderson and Lobel 1987). The prevalence of potent toxins among these dinoflagellates is believed to provide a competitive advantage over co-occurring microalgal species.

The CTXs and/or their precursors are introduced into the marine food web *via* the herbivorous fishes grazing on coral or macroalgae harboring the dinoflagellates *G. toxicus*, which in turn once preyed on is transferred to carnivorous fishes and so on until they reach the human consumers who are the final link of the food chain (Bagnis et al. 1980; Banner 1974; Helfrich and Banner 1963; Juranovic and Park 1991; Lewis 2001;

Lewis and Holmes 1993; Lewis et al. 1994). As the toxins are passed up the trophic chain, they tend to concentrate or bio-accumulate (Gillespie et al. 1986; Johnson and Jong 1983). As the result of this process, the predators at the end of the food web harbor the highest concentrations of toxins. Large carnivorous fishes like, barracuda, snapper, grouper, jacks and moray eel are particularly notorious for causing severe CFP, arising from their capacity to have accumulated high toxins loads through their diet (Kuberski 1979; Pearn 2001; van Dolah 2000a).

Concurrently it is believed that GTXs and the less polar CTXs occurring in *G. toxicus* are precursors of more polar CTXs found in fishes after having undergone a series of oxidation in the liver of vector fishes (Lewis and Holmes 1993). Indeed, several CTX congeners been isolated from wild and cultured *G. toxicus* (Legrand et al. 1992, Holmes et al. 1991; Satake et al. 1993; 1997; 1998). However, none of these were consistent with P-CTX-1B, the toxin predominantly found in carnivorous fish (red snapper, shark and moray eels) in the region of Pacific (Babinchak et al. 1994; Holmes and Lewis 1994; Lewis 2006). Furthermore, P-CTX-1B has neither been isolated from herbivorous fish (Lehane and Lewis 2000; Lewis 2001; 2006). Instead, these toxin congeners are less polar forms of P-CTX-1B. The scaritoxin, later identified as P-CTX-4A, was first isolated in 1976 from herbivorous *Scarus gibbus*, a heavy beak parrotfish (Chungue et al. 1976; Bagnis 1981). Subsequent studies confirmed the occurrence of P-CTX-4A in both cultured and wild *G. toxicus* and in *S. gibbus* that provide the inevitable support to the theory of the food chain link (Legrand et al. 1992; Satake et al. 1997).

The resembling chemical structures of these toxins put in relation to the organisms from which they were issued indicates that the toxins found in fish flesh are more oxygenated and thus are more polar than the congeners isolated from *G. toxicus* (Legrand et al. 1992). It is believed that the fish metabolites, P-CTX-1B, -2, and -3 (Lewis et

al. 1991) are derived from oxidation of the parent gambiertoxins CTX-4A and CTX-4B produced by *Gambierdiscus* spp. from the Pacific region (Lewis and Holmes 1993; Murata et al. 1989; 1990; Yasumoto and Murata 1993). This oxidative conversion reminds us of the role of the cytochrome (P450), a family of 60 enzymes involved in the first step of the detoxification process in the liver. The lipophilic toxins, like aflatoxin are detoxified by these enzymes through oxidative biochemical reactions to hydrophilic metabolites, which are then eliminated into urine. Thus the oxidation of P-CTX-4B to P-CTX-1 could be regarded as a kind of detoxification process. But what actually happens is the opposite of detoxification, as the toxicity of CTXs increases with the oxidation. The toxicity of P-CTX-1 is in fact nine-fold superior than that of CTX-4B (Yasumoto 1993). This process of toxification is known as biotransformation.

2.3 CLINICAL MANIFESTATIONS

The clinical presentation of CFP (Table 6) has been addressed in substantial detail by various authors around the world (Arena et al. 2004; Bagnis et al. 1979; Cheng and Chung 2004; de Haro et al. 1997; 2003; Dickey 2008; Geller et al. 1991; Gillespie et al. 1986; Friedman et al. 2008; Farstad and Chow 2001; Goodman et al. 2003; Kipping et al. 2006; Laurent et al. 2005, Lehane and Lewis 2000; Katz et al. 1993; Ng and Gregory 2000; Nicholson and Lewis, 2006; Ruff and Lewis 1994). Globally more than 175 acute and chronic gastrointestinal, neurological and/or generalized disturbances, and to a lesser extent, cardiovascular symptoms have been described (Wang 2008). The symptoms of ciguatera vary in different oceans, attributable to regional (P-, C- and I-) suite of toxins. In the Pacific Ocean neurological symptoms predominate, while in the Caribbean Sea the gastrointestinal symptoms are dominant features. The toxins from Indian Ocean give rise to symptoms that are typical of CFP in the Pacific, in addition to neuropsychiatric alterations

(Friedman et al. 2008; Lehane and Lewis 2000; Lewis 2001; 2006). However, the nature, duration, and the severity of symptoms can also vary after a meal of fish captured within a restricted location. This is likely to stem from individual susceptibility, and from the quantity and type of CTXs consumed, influenced by the type (herbivorous, carnivorous) and part (head, liver, viscera, or flesh) of fish consumed (de Fouw et al. 2001; Glaziou and Martin 1993; Lewis 2001; Lewis et al. 2000).

Nevertheless, in its typical form, CFP announces with an acute but prodromal gastroenteritis, after which the chronic neurological symptoms comprising of neurocutaneous and musculoskeletal features progressively set in. The cardiovascular disorders generally also occur in the prodromal period but are more sustained than gastrointestinal symptoms. While the acute illness generally abates within a few days to a week, the neurological symptoms involving the peripheral sensory and motor systems can persevere for months and even years (Table 6) (Butera et al. 2000; Friedman et al. 2008; Gillespie et al. 1986; Isbister and Kiernan 2005; Lange et al. 1992; Morris et al. 1982a; 1982b; Ting and Brown, 2001; Farstad and Chow, 2001). The enduring neurological feature of CFP, that sets it apart from other seafood intoxications, is commonly associated with signs of polyneuropathy (Chateau-Degat et al. 2007; Deroiche et al. 2000; Isbister and Kiernan 2005; Schnorf et al. 2002; Sozzi et al. 1988). The persistent neurological pain and dysfunction lasting months to years associated with chronic CFP has been reported to yield a symptom presentation similar to chronic fatigue syndrome (Pearn 1996; 1997; 2001; Racciatti et al. 2001). The reversal of temperature discrimination or cold allodynia, also known as paradoxical dysesthesia, is considered as the telltale sign of CFP. However, it is not always present (Bagnis et al. 1979; Isbister and Kiernan 2005; Johnson and Jong 1983; Lewis et al. 1993; Perkins and Morgan, 2004) and is also documented in severe cases

Table 6 Symptoms and signs of ciguatera fish poisoning (adapted from Farstad and Chow 2001)

Gastrointestinal (common/early onset from 2 to 12 hours /lasts 1 to 2 days)

- Nausea
- Vomiting
- Diarrhea
- Abdominal pain
- Hypersalivation
- Painful defecation

Cardiovascular (uncommon/early onset/persists up to 1 week)

- Hypotension
- Bradycardia
- Tachycardia
- Chest pains
- T-wave abnormalities
- Pulmonary edema

General/Other (Variable occurrence and onset)

- Chills
- Perspiration
- Fever
- Loss of hair and nails
- Conjunctivitis
- Acne
- Skin rash
- Malaise
- Shortness of breath
- Oliguria
- Lacrimation
- Neck stiffness

Neurologic (common/late onset from 12-72 hours*/prolonged symptoms)

- Mental status
 - Delirium
 - Coma
 - Memory/concentration problems
 - Depression
 - Giddiness
 - Multitasking difficulties
 - Hallucinations

Motor

- Ataxia
- Respiratory arrest
- Ophthalmoplegia
- Seizures
- Paresis
- Diminished reflexes
- Weakness
- Tonic contractions

Coma

Sensory

- Paresthesia (lingual, extremities and circumoral)
- Dysesthesia (arms, legs and perioral region)
- Paradoxical dysesthesias
- Asthenia
- Headache
- Myalgia
- Dental pain
- Photophobia
- Blindness
- Vertigo
- Arthralgias
- Metallic taste
- Blurred vision
- Pruritus
- Dyspareunia
- Painful ejaculation
- Dysuria
- Mydriasis
- Strabismus
- Desquamation
- Polymyositis

*Neurological symptoms can occur early in the disease course, but they classically follow gastrointestinal and cardiovascular symptoms.

of NSP (Cuypers et al. 2007; Friedman et al. 2008; Knap et al. 2002) (Table 3).

Frequently observed in persons who have ingested larger predatory fish, the cardiac signs are indicative of severity of the disease and can be life-threatening (Chan and Wang 1993; Kodama and Hokama 1989; Lehane and Lewis 2000). In such cases, default of proper diagnostic and medical care, death can occur due to dehydration, cardiovascular shock, cardiac arrhythmias or respiratory failure (Bagnis et al. 1979; Bavastrelli et al. 2000; Lehane and Lewis 2000; Wasay et al. 2008). Most fatal cases were reported when the head, gonads, roe or other internal organs were consumed (Lehane and Lewis 2000). Due to its lipid solubility, CTXs tend to concentrate in these body parts. The fatality due to CFP is estimated to under 0.1% (Swift and Swift 1993). Nevertheless, the length of altered neurosensory (paresthesia in the extremities, myalgia, arthralgia and pruritus)

and neuropsychiatric (malaise, depression, generalized fatigue and headaches) symptoms, which may persist for months or years (Arena et al. 2004; Barton et al. 1995; Chan and Kwok 2001; Chateau-Degat et al. 2007; Gillespie et al. 1986; Kodama and Hokama 1989) make CFP an intensely distressing, and in certain cases, a long term debilitating malady. This may also be alleviated if the treatment is administrated early enough (Arena et al. 2004; Lange 1994; Pearn 1995). As no human biomarker exists to confirm CFP, the diagnosis is entirely based on the clinical scenario and the patient's recent fish-eating history (Blythe et al. 1994; Pearn 2001; Ting and Brown, 2001) which has often led to treatment delay or omission.

According to certain anecdotal reports, some individuals may occasionally experience recurrence of the main neurological disturbances during periods of

overwork, fatigue, stress or with sexual activities (Bagnis 1993; Lange et al. 1992). Such recurrence have also been reported upon consumption of non-ciguateric fish such as cold-water species and non-fish product such as chicken, pork, canned beef, eggs, nuts, caffeine and alcohol (Bagnis 1993; Fleming et al. 1997; Gillespie 1987; Gillespie et al. 1986; Gollop and Pon 1992; Lange et al. 1992; Lewis 2000; 2001). The basis of this recurrent attack is unknown but is generally presumed to be an immunologic reaction. The phenomenon of sensitization has also been observed whereby recurrence of symptoms typical of CFP is brought on by the consumption of potentially ciguateric fish that did not produce symptoms in other individuals (Gillespie et al. 1986; Narayan 1980; Ruff and Lewis 1994). There is evidence that second and subsequent attacks tend to be more severe than first attacks (Bagnis et al. 1979; Glaziou and Martin 1993). The basis of the sensitization is believed to be the storage of CTXs in the adipose tissue of victims. Any activity involving increased lipid metabolism may result in CTX re-entering the blood stream (Barton et al. 1995). Similarly, such storage could also lead to an accumulation of the toxins in the host to subclinical levels explaining the severity of subsequent intoxications episodes.

2.4 PHARMACOLOGY AND TREATMENT

2.5.1 Mode of Action

Pharmacological studies have revealed that CTXs act on voltage-sensitive sodium channels (VSSC) present on most excitable and some non-excitable cells (Al-Sabi et al. 2006; Lewis et al. 2000; Nicholson and Lewis 2006; Rayner 1972; Wang 2008). Like PbTx_s, CTXs bind directly to site 5 on the α -subunit of VSSC (Dechraoui et al. 1999; Lombet et al., 1987; Poli et al. 1986), causing them to open at normal cell resting membrane potential. One of the well-established consequences of this activation is the influx of sodium ions (Na^+), which induces membrane depolarization (Benoit et

al. 1986; Bidard et al. 1984) and causes spontaneous firing in a variety of nerve fibers (Bidard et al. 1984; Benoit and Legrand 1992; 1996; Brock et al. 1995; Hamblin et al. 1995; Hogg et al. 1998; Molgó et al. 1990). The Na^+ influx results in osmotic deregulation inducing water influx that leads to edema of Schwann cells (Allsop et al. 1986) and axons (Benoit et al. 1996; Mattei et al. 1997; 1999).

Activation of VSSC by P-CTX-1B has also been shown to lead to direct mobilisation of calcium ions (Ca^{2+}) from internal stores (Lewis and Edean 1986; Molgó et al. 1992; 1993a) and to an indirect activation of the Na^+ - Ca^{2+} exchanger allowing Ca^{2+} influx against Na^+ efflux (Molgó et al. 1993b; Gaudry-Talarmain et al. 1996). An elevation in cytosolic Ca^{2+} may promote neurosecretion believed to underpin certain CFP symptoms (Mattei et al. 2008; Nicholson and Lewis 2006). Recent studies suggest that CTXs may also modulate voltage-sensitive potassium channels that most likely contribute to membranes depolarization caused by CTX-activated VSSC (Hidalgo et al. 2002; Nicholson and Lewis 2006; Birinyi-Strachan et al. 2005). Yet another recent study demonstrated the action of CTXs on the L-type calcium channels resulting in the swelling of frog erythrocytes (Sauviat et al. 2006).

Though CTXs seldom accumulate in fish at levels that are lethal to humans, explaining the low mortality, they are extremely potent in that at nanomolar and picomolar concentrations they are able to activate the VSSC in cell membranes (Lewis et al. 2000). Therefore, as sodium channels are widely spread in nerve and muscle tissue, the depolarization of these cells is believed to be the cause of the array of sensorial polyneuropathies and myopathy associated with CFP (Friedmann et al. 2008; Nicholson and Lewis 2006).

2.5.2 Occidental Medicine

The treatment of CFP in the occidental medicine remains mainly symptomatic and supportive. Depending on the clinical

symptoms a patient may present; a number of medications are prescribed (Table 7). Intravenous (*i.v.*) D-mannitol infusion is the most studied and the only therapy for CFP evaluated by randomized blinded clinical trials. The therapeutic effect of D-mannitol was fortuitously discovered in Marshall Islands when two men who became unconscious from severe CFP spectacularly responded within minutes after D-mannitol was administered for presumed cerebral edema. Subsequently, administered to further 22 ciguatoxic patients, including one with circulatory failure, they found significant relief especially from neurological and muscular dysfunctions (Palafox et al. 1988). Since then, the utilisation of D-mannitol in treatment of CFP has been reported in numerous case reports and trial series from around the world (Blythe et al. 1992; 1994; Eastaugh 1996; Mitchell 2005; Palafox 1992; Pearn et al. 1989; Schwarz et al. 2008; Slobbe et al. 2008; Stewart 1991; Ting and Brown 2001; Williamson 1989).

Currently, accepted as the most effective method of abating the neurological symptoms, D-mannitol, nonetheless, has not been consistently beneficial to all patients. Despite this treatment, the management of the chronic neurological symptoms of CFP continues to be problematic, especially when D-mannitol has not been administered in the acute phase of the disease (Adams 1993; Butera et al. 2000; de Haro et al. 1997; 2003). None of the case reports or trial series cited above included a randomized placebo-controlled clinical study, until very recently, whereby the effects of D-mannitol to normal saline were compared in a double-blinded trial (Schnorf et al. 2002). The data obtained indicated that both treatments were associated with clinical improvement and to a similar degree, and that D-mannitol was not superior to saline. Though some clinicians are now beginning to question its efficacy, in the absence of an alternative, the *i.v.* infusion of D-mannitol is still considered the treatment of choice in severe ciguatera intoxications.

Over the years, a myriad of other treatments and medicines, mostly responding to CFP symptoms have been tried (Table 7). The claims of efficiency are again entirely based on small, uncontrolled trial series and case reports. Gastrointestinal symptoms, usually brief and self-limited, require little more than intravenous (*i.v.*) fluid and electrolyte replacement (Cheng and Chung 2004; Gillespie et al. 1986). In the acute phase of the intoxication activated charcoal, believed to bring some benefit through toxin elimination by absorption, may be administered. Likewise, gastric lavage (Nicholson and Lewis 2006), spontaneous vomiting and catharsis, thought to enhance removal of the unabsorbed toxin, are also encouraged (Farstad and Chow 2001). In the absence of these symptoms, emetics and cathartics are administered (Gillespie et al. 1986). On the other hand, in certain cases, antiemetic and anti-diarrhea medications may also be prescribed to contain severe gastrointestinal manifestations (Cheng and Chung 2004; de Haro et al. 2003). For the palliative wellbeing cold showers to relieve pruritus and bed rest during period of convalescence are also indicated. Some clinicians may even advocate a strict diet that avoids all seafood, fish by-products, nuts, nut oil and alcohol for at least 6 months after the intoxication to avoid reappearance of symptoms, and in some cases, patients are asked to abstain from sex (Friedman et al. 2008; Lindsay 1997; Ruff and Lewis 1994).

In cases of cardiovascular disorders, atropine is generally used to alleviate hypotension and bradycardia but it has no effect on the neurological or gastrointestinal disturbances. In severe cases, dopamine or adrenaline or calcium gluconate may be required (Baden et al. 1995; Cheng and Chung 2004; Nicholson and Lewis 2006). Rarely, critically ill CFP patients may require endotracheal intubation and mechanical ventilation for either airway protection if comatose or in the case of a respiratory failure. Occasionally, in order to manage the dysrhythmias, temporary cardiac pacing may also be inserted (Friedmann et al., 2008;

Juranovic and Park 1991; Ruff and Lewis, 1994). Phenytoin, phenobarbital or thiopental sodium given *i.v.* has been recommended for the treatment of convulsions (Calvert 1991).

When the activity of anticholinesterase was held responsible for the toxicity of CTXs (Li, 1965), oxime like pralidoxime was used to reactivate acetylcholine but proved ineffective (Morris et al. 1982a; Russell 1975). This assertion was later rejected (Rayner et al. 1968; Ogura et al. 1968). On the other hand, some clinicians have used the cholinesterase inhibitors such as neostigmine with a certain success in the severe cases (Banner et al. 1963; Bagnis 1968).

Other symptomatic treatment includes analgesics for musculoskeletal symptoms. Acetaminophen (paracetamol) has been recommended for relief of headache and indomethacin has been reported to relieve myalgias and arthralgias (Calvert 1991; Pearce et al. 1983). Their use in chronic CFP is also recommended (Sims 1987). For generalized pruritus the antihistamines such as diphenhydramine or cyproheptadine are usually prescribed (Calvert 1991; Gelb and Mildran 1979; Pearce et al. 1983). But these have been reported to be ineffective in the chronic phase. An *i.v.* use of the corticosteroid, methylprednisolone led to an amelioration of a heightened polymyositis in a case (Stommel *et al.*, 1993). On the other hand, the similarities between the symptoms of avitaminosis B and ciguatera (Boydron-Le Garrec et al. 2005a) have also led to the *i.v.* utilization of vitamin B complex (B1, B6 and B12) in association to *i.v.* calcium gluconate in the treatment of CFP, which reportedly shortened the duration of symptoms (Ruff and Lewis 1994; Glaziou and Legrand 1994; Russell 1975).

Fluoxetine has been used for chronic fatigue and was reported to be effective in two patients suffering from CFP-related chronic fatigue that persisted over nine months (Berlin et al. 1992; Ruff and Lewis 1994). Occasional diminution of chronic paresthesia and other neurological symptoms has been reported with amitriptyline (Bowman 1984; Davis and Villar 1986;

Calvert et al. 1987; Lange et al. 1992). However, prescription of these antidepressants with an addiction potential warrants caution (Pagliaro and Pagliaro 1993; Peles et al. 2008; Prahlow and Landrum 2005).

Gabapentin, with a known efficacy in neuropathic pain, has recently been reported to improve ongoing polyneuropathic symptoms, chronic dysesthesias and paresthesia, of CFP in two patients (Perez et al. 2001). However, upon discontinuation of this medication, the symptoms reappeared that necessitated a prolonged use. It is not uncommon for the prescription of gabapentin to occur in a mental health context (Berigan 2000; Carta et al. 2003). Indeed the chronic complaints of CFP (depression, fatigue, algia) can be confounded with psychiatric causes (Arena et al. 2004; Friedman et al. 2007; 2008). Moreover, the sudden discontinuation of gabapentin after long term use may provoke withdrawal symptoms (Tran et al. 2005). Given the persistence of certain symptoms of CFP (Chateau-Degat et al. 2007a; 2007b), prescriptions of this substance thus necessitate caution on the part of clinicians.

Tocainide, an analogue of lidocaine safely alleviated ciguatoxic symptoms in three adult males (Lange et al. 1988), while nifedipine has been noted for the resolution of headaches in a patient (Calvert et al. 1987).

These drugs, the lidocaine analogs (tocainide and mexiletine) as well as amitriptyline and fluoxetine, and nifedipine and gabapentin appear to alter the Na⁺ and Ca²⁺ channels, respectively, and hence are of theoretical appeal in CFP (Nicholson et al. 2002; Nicholson and Lewis 2006).

Nevertheless, like pyridoxine, diazepam, pralidoxime and protamide, the clinical use of all of these agents in CFP are very limited and have responded with variable success (Farstad and Chow 2001, Cheng and Chung 2004; Raikhlin-Eisenkraft and Bentur 2002). The efficacy of these agents like D-mannitol in humans as consequence still needs to be proven. As none of these palliative

Table 7 The occidental medicines prescribed in the treatment for CFP based on anamnesis and the clinical signs that a patient may present.

<i>CFP Symptom Treatment</i>	<i>^aDrugs Used</i>	<i>Class</i>	<i>^bPrescription/Description</i>
Neurologic	Vitamins B1	Thiamine	Nutrition supplement - Beriberi characterized by fatigue, depression and loss of appetite that develops to resting tachycardia, decreased deep tendon reflexes, peripheral neuropathy, mental confusion, memory loss, pain in limbs, reduced and involuntary movements.
	Vitamins B6	Pyridoxal	Nutrition supplement - Skin and hair problems, asthma, autism, and cardiac disease related to hyperhomocysteinemia, depression, migraines, kidney stones, muscle pains, epilepsy, multiple sclerosis, neuritis, anemia, and influenza.
	Vitamins B12	Cyanocobalamin	Nutrition supplement - Pernicious anemia characterized by bone marrow promegaloblastosis, gastrointestinal symptoms, neurological symptoms. The neurological complex, defined as myelosis funicularis, consists of impaired perception of deep touch, pressure and vibration, abolishment of sense of touch, very annoying and persistent paresthesia, ataxia of dorsal cord type, decrease or abolishment of deep muscle-tendon reflexes and pathological reflexes (Babinski, Rossolimo and others, also severe). Mental disorders, irritability, focus/concentration problems, depressive state with suicidal tendencies and paraphrenia complex can also occur.
	D-mannitol	Polyol	Diuretic, osmotic – Promotion of diuresis in acute renal failure and urinary excretion of toxic materials, reduction of intracranial pressure and brain mass and of high intraocular pressure.
	Tiapride (Tiapridal®)	benzamide	Antidopamine – relieves intense pain and intero- exteroceptive pains.
	Dexamethasone (Ciprodex®)	glucocorticoid	Antiinflammatory - rheumatoid arthritis, allergic anaphylactic shock, bacterial meningitis, counteract certain side-effects of their antitumor treatment, high altitude cerebral edema as well as pulmonary edema and congenital adrenal hyperplasia.
	Salicyclic acid	beta hydroxy acid	Antiinflammatory - anti-acne, psoriasis, calluses, corns, keratosis pilaris, and warts.
	Paracetamol (Acetaminophen)		Widely-used analgesic and antipyretic medication.
	Amitriptyline	Tricyclic amine	Serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor – migraines, vaginal swelling, treatment of depression, nocturnal enuresis, ankylosing spondylitis (a chronic, painful, degenerative inflammatory arthritis primarily affecting spine and sacroiliac joints, causing eventual fusion of the spine) and of certain neuropathic pain, insomnia, anxiety disorders, rebound headache, chronic cough, chronic pain, postherpetic neuralgia (persistent pain following a shingles attack), carpal tunnel syndrome, fibromyalgia, vulvodinia, interstitial cystitis, male chronic pelvic pain syndrome, irritable bowel syndrome, diabetic peripheral neuropathy, neurological pain, and painful paresthesia related to multiple sclerosis and as prophylaxis for frequent migraines.
	Tocainide (Tonocard®)	Lidocaine	Antiarrhythmic – used to correct irregular heartbeats to a normal rhythm by slowing nerve impulses in the heart.
Gabapentin (Neurontin®)		Antiepileptic – epilepsy, postherpetic neuralgia (neuropathic pain following shingles, other painful neuropathies, and nerve related pain), migraine, headaches, nystagmus and bipolar disorder. Its therapeutic action on neuropathic pain is thought to be brought about by its binding to the voltage-dependent calcium channel in the central nervous system.	
Diphenhydramine (Bendryl®)	Ethanolamine-derivative	Antihistamine - prevents nausea, antitussive, as sleep aid and relieves itching.	

Table 7 The occidental medicines prescribed in the treatment for CFP based on anamnesis and the clinical signs that a patient may present.

<i>CFP Symptom Treatment</i>	<i>^aDrugs Used</i>	<i>Class</i>	<i>^bPrescription/Description</i>
	Nifedipine	Dihydropyridine	Calcium channel blocker - its main uses are as an antianginal (especially in Prinzmetal's angina) and antihypertensive, although a large number of other uses have recently been found for this agent, such as Raynaud's phenomenon, premature labour, and painful spasms of the oesophagus in cancer and tetanus patients. It is also commonly used for the small subset of pulmonary hypertension patients whose symptoms respond to calcium channel blockers, Nifedipine rapidly lowers blood pressure.
	Indomethacin		Non-steroidal antiinflammatory drug commonly used to reduce fever, pain, stiffness, and swelling. It works by inhibiting the production of prostaglandins, molecules known to cause these symptoms. Since indomethacin inhibits both COX-1 and COX-2, it inhibits the production of prostaglandins in the stomach and intestines which maintain the mucous lining of the gastrointestinal tract.
	Cyproheptadine (Periactin®)		Antihistamine and antiserotonergic – treatment of seasonal and year-round allergies like hay fever, relieves itching and hives, migraine prophylaxis, anorexia nervosa, Equine Cushing's-like syndrome, carcinoid, selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI)-induced sexual dysfunction and hyperhidrosis and used in management of serotonin syndrome. This last condition consists of hyperactive bowel sounds, hypertension, hyperthermia, overactive reflexes, clonus, hypervigilance, agitation, severe hypertension and tachycardia that may lead to shock.
	Neostigmine (Prostigmine®)		Reversible cholinesterase inhibitor - improve muscle tone in people with myasthenia gravis, to reverse the effects of non-depolarizing muscle relaxants after operation, for urinary retention resulting from general anaesthesia, Ogilvie syndrome (a pseudo-obstruction of colon) and to treat curariform drug toxicity.
	Hydroxyzine	piperazine	Antihistamine and anxiolytic – treatment of itches and irritations, of allergic conditions, such as chronic urticaria, atopic or contact dermatoses and histamine-mediated pruritus, is an antiemetic for the reduction of nausea, as a weak analgesic and is also prescribed in general anxiety disorder or in psychoneurosis. A sedative and a mild tranquiliser, it is used in dentistry and in obstetrics.
	Physostigmine	Tertiary amine alkaloid	Reversible cholinesterase inhibitor - treats myasthenia gravis, glaucoma, improves memory in Alzheimer's disease and delayed gastric emptying. Also used to treat the central nervous system effects of atropine, scopolamine and other anticholinergic drug overdoses.
	Fluoxetine (Prozac®)		A SSRI antidepressant - treatment of major depression, obsessive-compulsive disorder, bulimia nervosa, anorexia nervosa, panic disorder and premenstrual dysphoric disorder.
	Lidocaine	Amino-amides	Local anaesthetic and antiarrhythmic – topically used to relieve itching, burning and pain from skin inflammations, also used in postherpetic neuralgia, injected as a dental anesthetic and in minor surgery. Lidocaine alters depolarization in neurons, by blocking the fast voltage gated sodium (Na ⁺) channels in the cell membrane. With sufficient blockade, the membrane of the presynaptic neuron will not depolarize and so fail to transmit an action potential, leading to its anaesthetic effects
Digestive	Colchicines	Phenylethyl-amine group of alkaloids	Antimitotic - treatment of rheumatic complaints, muscle spasm, weakness associated with disc disease, gout, also prescribed for its cathartic and emetic effects.
	Pralidoximes	Oximes	Anticholinesterase reactivators – used to combat poisoning by organophosphates or other acetylcholinesterase inhibitors nerve gases.
	Edrophonium		Reversible acetylcholinesterase inhibitor – used to evaluate muscle response and to diagnose and treat myasthenic crisis. Also employed to reverse the effects of certain muscle relaxants used during surgery.

Table 7 The occidental medicines prescribed in the treatment for CFP based on anamnesis and the clinical signs that a patient may present.

<i>CFP Symptom Treatment</i>	<i>^aDrugs Used</i>	<i>Class</i>	<i>^bPrescription/Description</i>
Cardio-vascular	Atropine		Anticholinesterase – antidote for nerve agent and organophosphate insecticides intoxication, treatment of bradycardia, asystole, pulseless electrical activity in cardiac arrest and hyperhydrosis, used as a cycloplegic and as a mydriatic, can prevent the death rattle of dying patients. Atropine acts by blocking the effects of excess concentrations of acetylcholine. Generally, atropine lowers the parasympathetic activity of all muscles and glands regulated by the parasympathetic nervous system. It is also used as adjunctive therapy in the management of hypermotility disorders of the lower urinary tract and gastrointestinal system.
	Dopamine	Catecholamines	Neurotransmitter - can be supplied as a medication that acts on the sympathetic nervous system, producing effects such as increased heart rate and blood pressure and in the management of Parkinson's disease dopa-responsive dystonia.
	Calcium gluconate		Mineral supplement - a form of calcium most widely used in the treatment of hypocalcemia. Calcium gluconate is also used as a cardioprotective agent in hyperkalemia. Though it does not have an effect on potassium levels in the blood, it reduces the excitability of cardiomyocytes thus lowering the likelihood of developing cardiac arrhythmias.
	Adrenaline	Catecholamine	Hormone and neurotransmitter - boosts the supply of oxygen and glucose to the brain and muscles. It is a drug of choice to treat cardiac arrest and other cardiac dysrhythmias resulting in diminished or absent cardiac output.

^a The information on the type of drugs used in the treatment of CFP can be found in various reviews and articles (Calvert 1991; Farstad and Chow 2001; Glaziou and Legrand 1994; Ruff and Lewis 1994; Ting and Brown 2001 and the articles cited within).

^b The information on the pharmaceutical drugs and the indication of use can be found on the online databases Medline Plus; Medscape and Merck Manual.

treatments are wholly remedial, Pacific Islanders resort regularly to traditional form of care (Banner et al. 1963; Bourdy et al. 1992; Laurent et al. 1993).

2.5.3. *Traditional Medicine*

Over the centuries the primeval people of the Pacific, where CFP has the highest occurrence, have elaborated, through trial and error, a variety of traditional herbal medicines and remedies. Today the insular population continues to employ this ancient pharmacopoeia in the treatment of CFP. In view of the growing socio-economical gravity of CFP in insular nations (Bagnis 1992; Dalzell 1992; Laurent et al. 2005) and the desistance of use of medical care due to frequent deceptions, poor financial resources and the geographical isolation of several Pacific islands, the use of alternative therapy is extremely popular (Barrau 1950; Bourdeau 1985; Bourdy et al. 1992; Bourret 1981; Cabalion 1984a; 1984b; 1984c; 1984d; 1984e; Dufva et al. 1976; Haddock 1973; Laurent et al. 1993; Lobel 1979; Pétard 1986; Rageau 1973; 1983; Vienne 1981; Weiner 1985). Similarly, the population of other regions touched by CFP, the Caribbean Sea and the Indian Ocean, also avails to such therapies (Kaplan 1999).

In the early 1990's, a 10-year long ethnopharmacological survey carried out on the various islands of New Caledonia and Vanuatu resulted in an inventory of at least 90 different plant species used in the preparation of folk remedy against CFP (Bourdy et al. 1992; Laurent et al. 1993). This study provided excellent accounts on the parts of the plants used and the mode of preparation and administration of these phytotherapies. However, despite the effort on the part of the authors, the information on the dosage and the duration of each treatment could not be clearly reported due to the large variations in the data collected from one traditional healer to another.

Nonetheless, this survey has provided precision on the nature of use of these phytotherapies, that is if the mode of practice is curative or preventive or both. As means of

prevention when a fish is suspected, certain plants based on believe to be capable of neutralizing the causative toxins are introduced in the culinary preparation or are consumed together with the fishmeal. However, the majority of these plants are used as therapeutics. Indeed, reputed for their general purgative, antidiarrhoeal, antirheumatic, antipruritic and analgesic effects, their utilization in the treatment of CFP is most probably symptomatic rather than by a specific detoxification process (Bourdy et al. 1992; Laurent et al. 1993). This may explain the important number of plants used in relation to the several symptoms that are provoked by this intoxication.

Among the plants administrated as symptomatic, *Heliotropium foertherianum* (formerly *Argusia argentea*), *Cocos nucifera*, *Erythrina variegata* var. *fastigiata*, *Punica granatum*, *Syzygium malaccense*, *Artocarpus altilis*, *Carica papaya*, *Pandanus tectorius*, *Terminalia catappa*, *Vitex rotundifolia* and *Scaevola sericea* are much more often used than others throughout Polynesia and/or Melanesia (Bourdy et al., 1992; Laurent et al., 1993). Believed to possess depurative activities, the use of the plant *H. foertherianum* in CFP, particularly popular in the Western Pacific Basin has been reported in island nations of French Polynesia, Tonga, Micronesia and Japan (Banner et al. 1963; Bagnis 1973; Bourdy et al. 1992, Halstead 1978; Hashimoto et al. 1969; Laurent et al. 1993; Noro et al. 2003). In order to evaluate the anti-ciguateric potential of these plants, several scientific experiments were pursued in various biological models. These are discussed in detail below.

Following the ethnobotanical survey, the very first evaluation of the phytotherapies was undertaken in a mouse bioassay (Amade and Laurent, 1992). Based on the popularity of use, facility of identification and collection and a probable action on the nervous system, *H. foertherianum* and twenty of other plants (*C. nucifera*, *T. catappa*, *C. papaya*, *S. malaccense*, *A. altilis*, *Vitex rotundifolia* var. *subtrisecta*, *P. granatum*, *E. variegata* var.

fastigiata, *Schinus terebenthifolius*, *P. tectorius*, *Morinda citrifolia*, *Acacia spirorbis*, *S. sericea*, *Ipomoea pes-caprae* and the less popular *Davallia solida*, *Plectranthus parviflorus*, *Polyscias scutellaria*, *Xylocarpus granatum*, *Ximenia americana* and *Euphorbia hirta*) were selected. The extracts from these plants were prepared according to the traditional method and their effects were evaluated in mice intoxicated *via* intraperitoneal (*i.p.*) injection with a sublethal dose of a liver extract obtained from *G. javanicus*. The toxic extract provokes a significant corporal weight loss in mice over 24 to 48 h, after which the growth curve normalizes, indicating a recovery. A significant reduction in the weight loss and amelioration in the recovery time was observed in mice co-treated with the leave extracts of *H. foertherianum* and *S. terebenthifolius*, in contrast to *i.v.* D-mannitol, tocainide and the other plant extracts tested, (Amade and Laurent, 1992; Laurent and Amade, 1992). Based on these results, the therapeutic potential of these two remedies in the cure of CFP were suggested.

However, this study only allows a semi-quantitative evaluation of the activity of the extracts, in that it provides no information as to how this beneficial effect is produced. In addition, though, mouse bioassay has been standardized and is widely used as a CTX detection method (Boydron-Le Garrec et al. 2005b; Vernoux, 1994), here as a biological test it poses certain limits. The authors stated that they were confronted with two major inconveniences with this study. First, the results were not reproducible, varying from an individual to other, which necessitated the use of an important number of animals and second, unlike human subjects, the mice did not present signs of intoxication after 24-48 h (Laurent and Amade, 1992). Indeed, based on pharmacokinetic observations with PbTx_s, rodents are believed to rapidly eliminate CTXs from their organism (Poli et al. 1990; Radwan et al. 2005). The relatively shorten convalescence and the refractoriness of mice to the effects of CTXs indicate that the end point of this bioassay may not represent a

classical response in humans (Higerd 1983). This is further substantiated by the fact that axonal edema reported on nerve biopsy in human with ciguatera intoxication is absent in the mice models (Lewis and Edean, 1983; Lewis et al. 1993). However, axonal edema due to CTXs has been observed in *in vitro* myelinated nerves of frog (Benoit et al. 1996, Mattei et al. 1997; 1999).

Consistent with the neurological alterations reported in patients suffering from CFP, the exposure of frog axon to CTXs results in high frequency action potential discharges and perturbations in osmotic balance causing water influx leading to a marked increase in cellular volume (Benoit et al. 1996). The fact that this edema was prevented by tetrodotoxin (TTX), a potent VSSC inhibitor, underlines the role of the continuous Na⁺ influx in the swellings observed in the nodes of Ranvier and motor nerve terminals. Inspired from experiments effectuated with D-mannitol, the positive effects of the leaves and root extract of *H. foertherianum* and *D. solida*, respectively, against the P-CTX-1B-induced electrophysiological and morphological alterations in frog myelinated axons were confirmed. Like D-mannitol, the spontaneous and repetitive action potential firing in the nodal membrane and the edema of node of Ranvier resolved upon co-treatment with these two plants. Remarkably, when the axons were washed, the inhibitory action of *D. solida* on the spontaneous repetitive action potentials as opposed to that of *H. foertherianum* proved to be irreversible (Benoit et al. 2000).

As these neurocellular tests require highly specialized material and hours of preparation, which is not compatible with bio-guided chemical fractionation evaluations, a simpler test was developed based on the morphological alteration of frog erythrocytes induced by the osmotic effect of P-CTX-1B. In this bioassay, the leave extract of *H. foertherianum* was able to suppress the swelling induced by the toxin, as observed by the reduction in apparent surface area of the treated erythrocytes.

As opposed to the CTXs-induced edema in frog axons, TTX was not able to reverse the CTXs-induced swelling in frog erythrocytes. In addition, an augmentation in the volume was observed when Ca^{2+} was added to the physiological medium, indicating an entry of Ca^{2+} rather than Na^+ (Boydron et al. 2001). Further molecular investigation on this model demonstrated that the entry of Ca^{2+} resulted from the activation of the L-type calcium channel and that the cascade of events leading to the swelling of erythrocytes may involve the activation of the enzyme nitric oxide synthase (Sauviat et al. 2006).

Eventually this test was further adapted and the frog erythrocytes were replaced with human red blood cells, in which similar results were obtained with *H. foertherianum* and TTX (Boydron et al. 2002).

However, as the event of hemolysis of the red blood cell does not seem to depend on the activation of VSSC and as the bioassay itself lacked in sensitivity, another biological test was elaborated using established nerve cells derived from a mouse brain cancer. This murine neuroblastoma (Neuro 2a) cell line is known to express the VSSC proteins, which when challenged with veratridine and ouabain induces cytotoxicity that is further potentiated by PbTx-3 or P-CTX-1 (Manger et al. 1993; 1994; 1995). Veratridine (site 2 VSSC activator) causes sodium channels in the cell membrane to open allowing a potentially lethal influx of sodium ions into the cells. Ouabain (Na^+/K^+ pump inhibitor) inhibits the action of a transporter that pumps sodium ion back out of the cell and so maximizes the effect of veratridine. The PbTx-3 and P-CTX-1, being sodium channel activators, enhances the effects of veratridine on sodium ion influx, causing cellular swelling and subsequent death (Nicholson et al. 2007). In this way, it was possible to study the counteractive effects of 31 and 7 plant extracts against the cytotoxicities induced by ouabain, veratridine and PbTx-3 or P-CTX-1, respectively.

Among the 24 plant extracts that exhibited by themselves no toxicity in Neuro 2a cells, 22

prevented the cytotoxicity due to one or more Na^+ channel modulators applied. Based on numerous controls, the anticytotoxicity activities of certain extracts (*S. malaccense*, *A. altilis*, *Stachytarpheta australis*, *Capsicum frutescens*, *X. americana*, *M. citrifolia*, *Dendrolobium umbellatum*, *P. tectorius*, *V. rotundifolia* var. *subtrisecta* and *I. pes-caprae*) against the toxicity of PbTx-3 were differentiated from those of the potentiating agents used. Subsequently, the plants *E. hirta*, *S. sericea*, *S. malaccense*, *S. cytherea*, *A. altilis* and *S. australis* were also shown to strongly counteract the cytotoxicity induced by P-CTX-1 and the two ionic modulators, ouabain and veratridine (Boydron-Le Garrec et al. 2005c).

3 DISCUSSION AND CONCLUSION

Marine algal toxins impact human health essentially through seafood consumption and in the case of NSP also *via* the respiratory routes. With the increasing use of marine organisms for human consumption, human at the top of the food chain is more likely to encounter these toxins. Among the six well-characterized seafood poisoning syndromes discussed in this review, CFP is by far the most common form of intoxication. Had it not been for this man's appetite for fish, the story of CFP might have remained a secret of coral reef ecology. As intuitively foreseen by Jacques Grevin (Grevin 1568), a French physician and poet, the research on ciguatera has been painstakingly slow. Though, a considerable progress has been made in the last few decades requiring concerted efforts from scientists from multidisciplinary fields, this has yet to be translated into the development of an effective therapy. This also holds true for the other seafood-associated syndromes described in this review.

With the highest incidence in the Pacific region, CFP is an exceedingly unpleasant illness that represents a serious socio-economic problem in these island nations that depend heavily on fish products for their livelihood and where the toxins involved are

the most potent. Though various medicines have been and are still used for the treatment of CFP, the efficacy of these agents remains uncertain. Thus at present, prevention appears to be the only solution. Yet in the absence of a reliable, cost-effective method of detection of CTXs in fishes, prevention has also proved to be difficult. In certain islands, the high incidence of CFP has driven the population to abstain completely from consuming fresh fishes from their lagoons (Fleming et al. 1998). This has also led to loss in economy due to imposed exportation embargos. (Laurent et al. 2005). Hence, it is evident that there was an urgent need to establish a therapeutic regime.

Given the popular use of traditional medicine in the Pacific, various studies reviewed herewith on certain of the plants used in the treatment of CFP gave evidence of their efficiencies against the noxious effects of CTXs in *in vitro* and *in vivo* models. However, target-based and quantitative pharmacological evaluation of potentially bioactive molecules in the plants having the specific effect against the action of CTXs in the human biological system has been hampered by the scarcity of CTXs and inappropriate and impractical bioassays. It is in this regard, that the bioassay with Neuro 2a cells was adapted in 2004 to evaluate the therapeutic potential of plants. Originally developed ten years earlier to detect CTXs, PbTXs and saxitoxins in fish and microalgal samples, this biological method at that time presented an ideal approach to perform high volume screening for the identification of potentially active plants and eventually compounds possessing therapeutic activities against CFP. Though rapid and replicable, this semi-automated biological assay for the purpose of therapeutic evaluation lacks in specificity and clinical consistency.

Indeed, without ouabain and veratridine co-treatment, the Neuro-2a cells were resistant to the effects of CTXs and PbTXs, exhibiting extremely low to insignificant cytotoxicities. The co-addition of these potentiating agents in detection bioassays though may serve as an indicator for the

presence of VSSC activator toxins in biological samples, in experiments evaluating therapeutic activity of plants; however, addition of these pharmacologically active agents is not a true reflection of the conditions of clinical CFP intoxications in humans. This raises questions on suitability and specificity of this biological assay for the tests with plants. Despite the discriminatory controls, the phenomenon of synergistic effects is complicated. Thus the extrapolation of the results obtained from this model to clinical situations may not be reliable.

Hence though this bioassay has provided valuable information of therapeutic potential of the plants, other biological approaches adapting more closely the pharmacological action of CTXs are necessary to provide further scientific-based evidence of the efficiency of plants with assurance of specific clinical efficiency in the treatment of CFP. Furthermore, given the extreme rarity of CTXs it is also important that these bioassays are miniaturized and/or permit the replacement of CTXs with other easily available functional agents like PbTXs. These bioassays should also be practicable, rapid and reproducible, allowing medium to large-scale screening and bio-fractionation studies with relative ease and which will subsequently allow the isolation of a number of new bioactive molecules from the plants.

REFERENCES

- Adachi, R. and Fukuyo, Y. 1979. The thecal structure of a marine toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* gen. et sp. nov. collected in a ciguatera-endemic area. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **45**, 67-71.
- Adams, M.J. 1993. An outbreak of ciguatera poisoning in a group of scuba divers. *Journal of Wilderness Medicine*, **4**, 304-311.
- Allsop, J.L., Martini, L., Lebris, H., Pollard, J., Walsh, J. and Hodgkinson, S. 1986. Neurologic manifestations of ciguatera. 3 cases with a neurophysiologic study and examination of one nerve biopsy. *Revue Neurologique*, **142**, 590-597.

- Al-Sabi, A., McArthur, J., Ostroumov, V. and French, R.J. 2006. Marine toxins that target voltage-gated sodium channels. *Marine Drugs*, **4**, 157-192.
- Amade, P. and Laurent, D., 1992. Screening of traditional remedies used in ciguatera fish poisoning treatment. In: *Recent Advances in Toxinology Research*. P.Gopalakrishnakone and C.K. Tan (Eds), National University of Singapore, Singapore, **2**, 503-508.
- Anderson, D.M. and Lobel, P.S. 1987. The continuing enigma of ciguatera. *Biological Bulletin*, **172**, 89-107.
- Arena, P., Levin, B., Fleming, L.E., Friedman, M.A. and Blythe, D. 2004. A pilot study of the cognitive and psychological correlates of chronic ciguatera poisoning. *Harmful Algae*, **3**, 51-60.
- Babinchak, J.A., Moeller, P.D.R., Van Dolah, F.M., Eyo, P.B. and Ramsdell, J.S. 1994. Production of ciguatoxins in cultured *Gambierdiscus toxicus*. *Memoirs of the Queensland Museum*, **34**, 447-453.
- Backer, L.C., Fleming, L.E., Rowan, A.D. and Baden, D.G. 2003. Epidemiology, public health and human diseases associated with harmful marine algae. In: *Manual on Harmful Marine Microalgae*. G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson and A.D. Cembella (Eds), UNESCO Publishing, Paris, France, 723-749.
- Baden, G.B. 1989. Brevetoxins: unique polyether dinoflagellate toxins. *FASEB Journal*, **3**, 1807-1817.
- Baden, D.G., Fleming, L.E. and Bean, J.B. 1995. Marine toxins. In: *Handbook of Clinical Neurology: Intoxications of the Nervous System Part II*. F.A. de Wolff (Ed), Natural Toxins and Drugs, Elsevier Press, Amsterdam, **21**, 141-175.
- Bagnis, R. 1968. Clinical forms of fish poisoning of the 'ciguatera' type in French Polynesia. In: *Seminar on Ichthyosarcotoxism*, 16th-22nd August, Rangiroa, French Polynesia, South Pacific Commission, Noumea, New Caledonia.
- Bagnis, R., Berglund, F., Elias, P.S., van Esch, G.J., Halstead, B.W. and Kojima, K. 1970. Problems of toxicants in marine food products: 1. Marine biotoxins. *Bulletin of World Health Organisation*, **42**, 69-88.
- Bagnis, R.A. 1973. L'ichtysarcotisme dans le Pacifique Sud. *Commission du Pacifique Sud*, Nouméa, Nouvelle-Calédonie, 112 p.
- Bagnis, R., Kuberski, T. and Laugier, S. 1979. Observation cliniques concernant 3009 cases de ciguatera. *Lettre d'Information de la Commission du Pacifique Sud sur les Pêches*, **19**, 20-22.
- Bagnis, R., Chanteau, S., Chungue, E., Hurtel, J.M., Yasumoto, T. and Inoue, A. 1980. Origins of ciguatera fish poisoning: a new dinoflagellate, *Gambierdiscus toxicus* Adachi and Fukuyo definitively involved as a causal agent. *Toxicon*, **18**, 199-208.
- Bagnis, R. 1981. L'ichtysarcotisme de type ciguatera : Phénomène complexe de biologie marine et humaine. *Oceanologica Acta*, **4**, 375-387.
- Bagnis, R. 1992. Public health, epidemiological and socio-economic patterns of Ciguatera in Tahiti. In: *Proceeding of the Third International Conference on Ciguatera Fish Poisoning*, 30 April-5 May, 1990, La Parguera, Puerto Rico, Polyscience Publications, Quebec, 157-168.
- Bagnis, R. 1992. Ciguatera in French Polynesian islands: of coral, fish and men. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **85**, 412-414.
- Bagnis, R. 1993. Ciguatera fish poisoning. In: *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. I.R. Falconer (Ed), Academic Press, London, 105-115.
- Banner, A.H., Shaw, S.W., Alender, C.B. and Helfrich, P. 1963. Intoxication par le poisson. Notes sur la ciguatera et son mode d'action et quelques suggestions thérapeutiques. *Commission du Pacifique Sud Document Technique* No. 141, CPS, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
- Banner, A. H. 1974. The biological origin and transmission of ciguatoxin. In: *Bioactive Products from the Sea*. H.J. Hum and C.E. Lance (Eds), Marcel Dekker, New York, 15-36.

- Banner, A.H. 1976. Ciguatera: a disease from coral reef fish. In: *Biology and Geology of Coral Reefs*. O.A. Jones and R. Endean (Eds), *Biology 2*, Academic Press, New York, **3**, 177-213.
- Barbier, H.M. and Diaz, J.H. 2003. Prevention and treatment of toxic seafoodborne diseases in travellers. *Journal of Travel Medicine* **10**, 29-37.
- Barceloux, D.G. 2008, *Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants, and Venomous Animals*, John Wiley & Sons, Inc, p. 238.
- Barnett, C.B., Di Palma, J.A. 2004. Foodborne illness: Seafood intoxication. *Practical Gastroenterology*, **28**, 54-62.
- Barrau, J., 1950. Une plante médicinale de la Nouvelle-Calédonie, *Duboisia myoporoides* R. Br. *Revue Agricole de Nouvelle-Calédonie* **1** (7-8), 13-14.
- Barton, E.D., Tanner, P., Turchen, S.G., Tunget, C.L., Manoguerra, A. and Clark, R.F. 1995. Ciguatera fish poisoning: a southern California epidemic. *Western Journal of Medicine*, **163**, 31-35.
- Bavastrelli, M., Bertucci, P., Midulla, M., Giardini, O. and Sanguigni, S. 2001. Ciguatera fish poisoning: an emerging syndrome in Italian travellers. *Journal of Travel Medicine*. **8**, 139-142.
- Begier, E.M., Backer, L.C., Weisman, R.S., Hammond, R.M., Fleming, L.E. and Blythe, D. 2006. Outbreak bias in illness reporting and case confirmation in ciguatera fish poisoning surveillance in South Florida. *Public Health Reports*, **121**, 658-665.
- Bell, J.D., Kronen, M., Vunisea, A., Nash, W.J., Keeble G., Demmke, A., Pontifex, S. and Andréfouët, S. 2009. Planning the use of fish for food security in the Pacific. *Marine Policy*, **33**, 64-76.
- Benoit, E., Legrand, A.M., and Dubois, J.M. 1986. Effects of ciguatoxins on current and voltage clamped frog myelinated nerve fibre. *Toxicon*, **24**, 357-364.
- Benoit, E. and Legrand, A.M., 1992. Purified ciguatoxin-induced modifications in excitability of myelinated nerve fibre. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **85**, 497-499.
- Benoit, E., Juzans, P., Legrand, A.M. and Molgó, J. 1996. Nodal swelling produced by ciguatoxin-induced selective activation of sodium channels in myelinated nerve fibers. *Neuroscience*, **71**, 1121-1131.
- Benoit, E., Laurent, D., Mattei, C., Legrand, A.M. and Molgó, J. 2000. Reversal of Pacific ciguatoxin-1B effects on myelinated axons by agent used in ciguatera treatment. *Cybiurn*, **24**, 33-40.
- Berigan, T.R. 2000. Gabapentin in the treatment of posttraumatic stress disorder. *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry*, **2**, 105.
- Berlin, R.M., King, S.L. and Blythe, D.G. 1992. Symptomatic improvement of chronic fatigue with fluoxetine in ciguatera fish poisoning. *Medical Journal of Australia*, **157**, 567.
- Bidard, J.N., Vijverberg, H.P., Frelin, C., Chungue, E., Legrand, A.M., Bagnis, R. and Lazdunski, M. 1984. Ciguatoxin is a novel type of Na⁺ channel toxin. *Journal of Biological Chemistry*, **259**, 8353-8357.
- Birinyi-Strachan, L.C., Gunning, S.J., Lewis, R.J. and Nicholson, G.M. 2005. 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.
- Blythe, D.G., De Sylva, D.P., Fleming, L.E., Ayyar, R.A., Baden, D.G. and Shrank, K. 1992. Clinical experience with *i.v.* mannitol in the treatment of ciguatera. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **85** (5 Pt 2), 425-426.
- Blythe, D.G., Fleming, L.E., Ayyar, D.R., De Sylva, D., Baden, D. and Schrank, K. 1994. Mannitol therapy for acute and chronic ciguatera fish poisoning. *Memoirs of the Queensland Museum*, **34**, 465-470.
- Bourdeau, P., 1985. Etude des poissons ciguatoxiques et de la ciguatera aux Antilles Françaises. Epidémiologie sur le plateau de St. Barthelemy, St. Martin, Anguilla. Thèse, Université de Paris Sud, Centre d'Orsay, 289 pp.
- Bourdy, G., Cabalion, P., Amade, P. and Laurent, D., 1992. Traditional remedies

- used in the Western Pacific for the treatment of ciguatera poisoning. *Journal of Ethnopharmacology* **36**, 163-174.
- Bourret, D., 1981. Bonnes plantes de Nouvelle-Calédonie et des Loyautés. Les éditions du lagon, 107 pp.
- Bowman, P.B., 1984. Amitriptyline and ciguatera. *Medical Journal of Australia* **140**, 802.
- Boydron, R., Laurent, D. and Sauviat, M.P. 2001. Un test biologique destiné à identifier les principes actifs des plantes utilisées comme remèdes traditionnels contre l'intoxication ciguatérique en Nouvelle-Calédonie. In: Rencontres en toxicologie : Explorer, exploiter les toxines et maîtriser les organismes producteurs. C. Bon, F. Goudey-Perrière, B. Poulain and S. Puiseux-Dao (Eds), Editions scientifiques et médicales Elsevier, Paris, 63-66.
- Boydron, R., Sauviat, M.P., Benoit, E. and Molgó, J., 2002. L'hémolyse des érythrocytes humains par la P-CTX-1 : une méthode pour évaluer le potentiel thérapeutique des remèdes traditionnels utilisés en Nouvelle-Calédonie pour traiter la ciguatera. In: Rencontres en toxicologie : Toxines et recherches biomédicales. F. Goudey-Perrière, C. Bon, S. Puiseux-Dao and M.P. Sauviat (Eds), Editions scientifiques et médicales Elsevier, Paris, 101-104.
- Boydron-Le Garrec, R., Benoit, E., Sauviat, M.P., Frostin, M. and Laurent, D. 2005a. Ciguatera: From the etiology of the phenomenon to the treatment of its symptoms. *Journal de la Société de Biologie*, **199**, 127-139.
- Boydron-Le Garrec, R., Benoit, E., Sauviat, M.P. and Laurent, D. 2005b. Détection des ciguatoxines : avantages et inconvénients des différentes méthodes biologiques utilisées. *Journal de la Société de Biologie*, **199**, 115-125.
- Boydron-Le Garrec, R., Benoit, E., Sauviat, M.P., Lewis, R.J., Molgó, J. and Laurent, D. 2005c. Ability of some plant extracts, traditionally used to treat ciguatera fish poisoning, to prevent in vitro neurotoxicity produced by sodium channel activators. *Toxicol*, **46**, 625-634.
- Bricelj, V.M. and Shumway, S.E. 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics and biotransformations. *Review in Fisheries Science*, 1064-1262, **6**, 315-383.
- Brock, J.A., McLachlan, E.M., Jobling, P. and Lewis, R.J. 1995. Electrical activity in rat tail artery during asynchronous activation of postganglionic nerve terminals by ciguatoxins-1. *British Journal of Pharmacology*, **116**, 2213-2220.
- Burkholder, J.M., Noga, E.J., Hobbs, C.H., Glasgow, H.B. Jr and Smith S.A. 1992. New 'phantom' dinoflagellate is the causative agent of major estuarine fish kills. *Nature*, **358**, 407-410.
- Butera, R., Prockop, L.D., Buonocore, M., Locatelli, C., Gandini, C. and Manzo, L. 2000. Mild ciguatera poisoning: case reports with neurophysiological evaluations. *Muscle & Nerve*, **23**, 1598-1603
- Cabalion, P., 1984a. Les plantes du Vanuatu. La 'gratte' et ses remèdes. 1ème partie : lescauses. *Vanuatu Weekly Hebdomadaire*, 12, 11.
- Cabalion, P., 1984b. Les plantes du Vanuatu. La 'gratte' et ses remèdes. 2ème partie : les médicaments traditionnelles bien connues. *Vanuatu Weekly Hebdomadaire*, 13, 10.
- Cabalion, P., 1984c. Les plantes du Vanuatu. La 'gratte' et ses remèdes. Les médicaments traditionnelles bien connues. *Vanuatu Weekly Hebdomadaire*, 14, 11.
- Cabalion, P., 1984d. Les plantes du Vanuatu. La 'gratte' et ses remèdes. les médicaments traditionnelles bien connues. *Vanuatu Weekly Hebdomadaire*, 15, 11.
- Cabalion, P., 1984e. Les plantes du Vanuatu. La 'gratte' et ses remèdes. 3ème partie : les médicaments traditionnelles bien connues. *Vanuatu Weekly Hebdomadaire*, 16, 10-11.
- Calvert, G.M., Hryhorczuk, D.O. and Leikin, J.B., 1987. Treatment of ciguatera fish poisoning with amitriptyline and nifedipine. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*, **25**, 423-428.

- Calvert G.M. 1991. The recognition and management of ciguatera fish poisoning. In: Ciguatera Seafood Toxins. D.M. Donald (Ed), CRC Press, Boca Raton, 1-11.
- Camacho, F.G., Rodríguez, J.G., Mirón, A.S., García, M.C.C., Belarbi, E.H., Chisti, Y. and Grima, E.M. 2007. Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnology Advances*, **25**, 176-194.
- Carta, M.G., Hardoy, M.C., Hardoy, M.J., Grunze, H. and Carpinello, B. 2003. The clinical use of gabapentin in bipolar spectrum disorders. *Journal of Affective Disorders*, **75**, 83-91.
- Chan, T.Y. and Wang, A.Y. 1993. Life-threatening bradycardia and hypotension in a patient with ciguatera fish poisoning. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **87**, 71.
- Chan, T.Y. and Kwok, T.C. 2001. Chronicity of neurological features in ciguatera fish poisoning. *Human & Experimental Toxicology*, **20**, 426-428.
- Chateau-Degat, M.L. 2003. Les toxines marines : problèmes de santé en émergence. *VertigO*, **4**, online.
- Chateau-Degat, M.L., Huin-Blondey, M.O., Chinain, M., Darius, T., Legrand, A.M., Nguyen, N.L., Laudon, F., Chansin, R. and Dewailly, E. 2007a. Prevalence of chronic symptoms of ciguatera disease in French Polynesian adults. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **77**, 842-846.
- Chateau-Degat, M.L., Beuter, A., Vauterin, G., Nguyen, N.L., Chinain, M., Darius, T., Legrand, A.M., Chansin, R. and Dewailly, E. 2007b. Neurologic signs of ciguatera disease: evidence of their persistence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **77**, 1170-1175.
- Cheng, C.C. and Chung, C.H. 2004. Ciguatera fish poisoning: a challenge to emergency physicians. *Hong Kong Journal of Emergency Medicine*, **11**, 173-177.
- Chinain, M., Faust, M.A. and Pauillac, S. 1999. 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., Cruchet, P., Wang, Z., Ponton, D., Laurent, D. and Pauillac, S. 2009. Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (Dinophyceae) in culture. *Toxicon*, doi:10.1016/j.toxicon.2009.06.013
- Chungue, E., Bagnis, R., Fusetani, N. and Hashimoto, Y. 1977. Isolation of two toxins from a parrotfish *Scarus gibbus*. *Toxicon*, **15**, 89-93.
- Clemence, M.A., and Guerrant, R.L. 2004. At the Shore. In: Infections of Leisure. D. Schlossberg (Ed), ASM Press, Washington, D.C., 1-80.
- Cuyppers, E., Yanagihara, A., Rainier, J.D. and Tytgat, J. 2007. TRPV1 as a key determinant in ciguatera and neurotoxic shellfish poisoning. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **361**, 214-217.
- Dalzell, P. 1992. Ciguatera fish poisoning and fisheries development in the South Pacific. *Bulletin de la Société Pathologique Exotique*, **85**, 435-444.
- Dalzell, P. 1994. Management of ciguatera fish poisoning in the South Pacific. *Memoirs of the Queensland Museum*, **34**, 471-479.
- Dalzell, P. and Adams, T.J.H. 1997. Sustainability and management of reef fisheries in the Pacific Islands. In: Proceeding of the Eighth International Coral Reef Symposium, Panama City, Panama, 24-29 June, 1996, 2, 2027-2032.
- Davis, R.T. and Villar, L.A., 1986. Symptomatic improvement with amitriptyline in ciguatera fish poisoning. *New England Journal of Medicine*, 315, 65.
- de Fouw, J.C., van Egmond, H.P. and Speijers, G.J.A. 2001. Ciguatera fish poisoning: A review. RIVM Report 388802 021, National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven.
- de Haro, L., Hayek-Lanthois, M., Joossen, F., Affaton, M.F. and Jouglard, J. 1997. Intoxication collective ciguatérique après ingestion d'un barracuda au Mexique :

- déductions pronostique et thérapeutique. *Médecine Tropicale*, **57**, 55-58.
- de Haro, L., Pommier, P. and 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**, 927-930.
- de la Riva, G.T., Johnson, C.K., Gulland, F.M., Langlois, G.W., Heyning, J.E., Rowles, T.K. and Mazet, J.A. 2009. Association of an unusual marine mammal mortality event with *Pseudo-nitzschia* spp. blooms along the Southern California coastline. *Journal of Wildlife Diseases*, **45**, 109-121.
- Dechraoui, M.Y., Naar, J., Pauillac, S. and Legrand, A.M. 1999. Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels. *Toxicon*, **37**, 125-143.
- Derouiche, F., Cohen, E., Rodier, G., Boulay, C. and Courtois, S. 2000. Ciguatera et neuropathie périphérique : un cas. *Revue Neurologique*, **156**, 514-516.
- Dickey, R.W. 2008. Ciguatera toxins: chemistry, toxicology and detection. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. L.M. Botana (Ed), Marcel Dekker, New York, 479-500.
- Dufva, E., Loison, G. and Holmstedt, B., 1976. *Duboisia myoporoides*, native antidote against ciguatera poisoning. *Toxicon*, **14**, 55-64.
- Eastaugh, J.A. 1996. Delayed use of intravenous mannitol in ciguatera (fish poisoning). *Annals of Emergency Medicine*, **28**, 105-106.
- Endean, R., Monks, S.A., Griffith, J.K. and Llewellyn, L.E. 1993. Apparent relationships between toxins elaborated by the cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* and those present in the flesh of the narrow-barred Spanish mackerel *Scomberomorus commersoni*. *Toxicon*, **31**, 1155-1165.
- Epstein, P. and Rapport, D.J. 1996. Changing coastal marine environments and human health. *Ecosystem Health*, **2**, 166-176.
- FAO 2009. The state of the world fisheries and Aquaculture 2008. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome, 196 p.
- Farstad, D. J. and Chow, T. 2001. A brief case report and review of ciguatera poisoning. *Wilderness & Environmental Medicine*, **12**, 263-269.
- 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.
- Fleming, L.E., Blythe, D.G. and Baden, D.G. 1997. Ciguatera fish poisoning. *Shoreman's Travel Medicine Monthly*, **1**, 1-5
- Fleming, L.E. and Easom, J. 1998. Seafood Poisoning. *Travel Medicine*, **2**, 1-8.
- Fleming, L.E., Bean, J.A., Katz, D. and Hammond, R. 2001. The epidemiology of seafood poisoning. In: *Foodborne Disease Handbook: Seafood and Environmental Toxins*, Edition 2. Y.H. Hui, D. Kitts and P.S. Stanfield (Eds), Marcel Dekker, New York, **4**, 287-310.
- Fleming, L.E., Broad, K., Clement, A., Dewailly, E., Elmir, S., Knap, A., Pomponi, S.A., Smith, S., Solo Gabriele, H. and 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. and 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.E., Fernandez, M., Bienfang, P., Shrank K., Dickey, R., Bottein, M.Y., Backer, L., Ayyar, R., Weisman, R., Watkins, S., Granade, R. and Reich, A. 2008. Ciguatera fish poisoning: Treatment, prevention and management. *Marine Drugs*, **6**, 456-479.
- Gaudry-Talarmain, Y.M., Molgó, J., Meunier, F.A., Moulian, N. Legrand, A.M. 1996. Reversed mode Na⁺-Ca²⁺ exchange activated by ciguatoxins (CTX-1b)

- enhances acetylcholine from *Torpedo* cholinergic synaptosomes. *Annals of New York Academic Sciences*, **779**, 404-406.
- Gelb, A.M. and Mildvan, D. 1979. Ciguatera fish poisoning. *New York State Journal of Medicine*, **79**, 1080-1081.
- Geller, R.J., Olson, K.R. and Senécal, P.E. 1991. Ciguatera fish poisoning in San Francisco, California, caused by imported barracuda. *Western Journal of Medicine*, **155**, 639-642.
- Geraci, J.R., Anderson, D.M., Timperi, R.J., St Aubin, D.J., Early, G.A., Prescott, J.H. and Mayo, C.A. 1989. Humpback whales *Megaptera novaeangliae* fatally poisoned by dinoflagellate toxin. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **46**, 1895-1898.
- Gillespie, N.C., Lewis, R.J., Pearn, J.H., Bourke, A.T., Holmes, M.J., Bourke, J.B. and Shields, W.J. 1986. Ciguatera in Australia: Occurrence, clinical features, pathophysiology and management. *Medical Journal of Australia*, **145**, 584-590.
- Gillespie, N. 1987. Ciguatera poisoning. In: Toxic plants and animals. A guide for Australia. J. Covacevich, P. Davie and J. Pearn (Ed), Queensland Museum, Brisbane, 160-169.
- Glaziou, P. and Martin, P.M. 1993. Study of factors that influence the clinical response to ciguatera fish poisoning. *Toxicon*, **31**, 1151-1154.
- Glaziou, P. and Legrand A.M. 1994. The epidemiology of ciguatera fish poisoning. *Toxicon* **32**, 863-873
- Gollop, J.H. and Pon, E.W. 1992. Ciguatera: a review. *Hawaii Medical Journal*, **51**, 91-99.
- Goodman, A., Williams, T.N. and Maitland, K. 2003. Ciguatera poisoning in Vanuatu. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **68**, 263-266.
- Grevin, J. 1568. Deux Livre des Venins. Christofle Plantin, Antwerp, Belgium.
- Haddock, L., 1973. Quelques plantes médicinales de Guam avec leurs noms vernaculaires. In : Conférence Technique Régionale sur les Plantes Médicinales, Commission du Pacifique Sud, Tahiti, 15 pp.
- Hahn, S.T. and Capra, M.F. 1992. The cyanobacterium *Oscillatoria erythraea* – a potential source of toxin in the ciguatera food chain. *Food Additives and Contaminants*, **9**, 351-355.
- Hallegraeff, G.M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, **32**, 79-99.
- Hallegraeff, G.M. 2003. Harmful algal blooms: a global overview. In: Manual on Harmful Marine Microalgae. G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson and A.D. Cembella (Eds), Monographs on oceanographic methodology 11, UNESCO Publishing, Paris, France, 25-50.
- Hallegraeff, G.M. 2006. The red tide. *A World of Science*, **4**, 2-7.
- Halstead, B.W. 1959. Dangerous Marine Animals. Cornell Maritime Press, Cambridge, Maryland, 146 p.
- Halstead, B.W. 1978. Poisonous and Venomous Marine Animals of the World, Revised Edition, Darwin Press, Princeton, 1168 p.
- Halstead, B.W. 2001a. Fish toxins. In: Foodborne Disease Handbook: Seafood and Environmental Toxins, Edition 2. Y.H. Hui, D. Kitts and P.S. Stanfield (Eds), Marcek Dekker, New York, **4**, 23-50.
- Halstead, B.W. 2001b. Other poisonous marine animals. In: Foodborne Disease Handbook: Seafood and Environmental Toxins, Edition 2. Y.H. Hui, D. Kitts and P.S. Stanfield (Eds), Marcek Dekker, New York, **4**, 51-76.
- Hamblin, P.A., McLachlan, E.M. and Lewis, R.J. 1995. Sub-nanomolar concentrations of ciguatoxins-1 excite preganglionic terminals in guinea pig sympathetic ganglia. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **352**, 236-246.
- Hamilton, B., Hurbungs, M., Vernoux, J.P., Jones, A. and Lewis, R.J. 2002a. Isolation and characterisation of Indian Ocean ciguatoxins. *Toxicon*, **40**, 685-693.
- Hamilton, B., Hurbungs, M., Jones, A. and Lewis, R.J. 2002b. Multiple ciguatoxins

- present in Indian Ocean reef fish. *Toxicon*, **40**, 1347-1353.
- Hashimoto, Y., Konosu, S., Yasumoto, T. and Kamiya, H. 1969. Ciguatera in the Ryukyu and Amami Islands. *Bulletin of the Japanese Society of the Scientific Fisheries*, **35**, 316-326.
- Helfrich, P. and Banner, A.H. 1963. Experimental induction of ciguatera toxicity in fish through diet. *Nature*, **197**, 1025-1026.
- Hidalgo, J., Liberona, J.L., Molgó, J. and Jaimovich, E. 2002. Pacific ciguatoxin-1b effect over Na⁺ and K⁺ currents, inositol 1,4,5-triphosphate content and intracellular Ca²⁺ signals in cultured rat myotubes. *British Journal of Pharmacology*, **137**, 1055-1062.
- Higerd, T. 1983. Ciguatera seafood poisoning: a circumtropical fisheries problem. In: *Natural and Human Pathogens in the Marine Environment*. R. R. Colwell (Ed), Maryland Sea Grant Publication, Maryland, 1-7.
- Hogg, R.C., Lewis, R.J. and Adams, D.J. 1998. Ciguatoxin (CTX-1) modulates single tetrodotoxin-sensitive sodium channels in rat parasympathetic neurones. *Neuroscience Letters*, **252**, 103-106.
- Holmes, M.J. 1998. *Gambierdiscus yasumotoi* sp. nov. (Dinophyceae), a toxic benthic dinoflagellate from southeastern Asia. *Journal of Phycology*, **34**, 661-668.
- Holmes, M.J., Lewis, R.J., Poli, M.A. and Gillespie, N.C. 1991. Strain dependent production of ciguatoxins precursors (Gambiertoxins) by *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae) in culture. *Toxicon*, **29**, 761-775.
- Holmes, M.J. and Lewis, R.J. 1994. The origin of ciguatera. *Memoirs of the Queensland Museum*, **34**, 497-504.
- Huss, H.H., Reilly, A. and Embarek, P.K.B. 2000. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control*, **11**, 149-156.
- Huss, H.H., Ababouch, L. and Gram, L. 2004. Assessment and management of seafood safety and quality. FAO Fisheries Technical Paper 444, FAO, Rome, p. 20.
- Isbister, G.K. and Kiernan, M.C. 2005. Neurotoxic marine poisoning. *Lancet Neurology*, **4**, 219-228.
- Jessup, D.A., Miller, M.A., Ryan, J.P., Nevins, H.M., Kerkering, H.A., Mekebri, A., Crane, D.B., Johnson, T.A. and Kudela, R.M. 2009. Mass stranding of marine birds caused by a surfactant-producing red tide. *PLoS ONE*, **4**, e4550.
- Johnson, R. and Jong, E.C. 1983. Ciguatera: Caribbean and Indo-Pacific fish poisoning. *Western Journal of Medicine*, **138**, 872-874.
- Juranovic, L.R. and Park, D.L. 1991. Foodborne toxins of marine origin: ciguatera. *Review of Environmental Contamination and Toxicology*, **117**, 51-94.
- Kaplan, E.H. Dangerous Marine Animals. 1999. In: *Coral Reefs: Caribbean and Florida. A field guide to fishes, sponges, mollusks, corals and more*, The Peterson Field Guide Series, Chapter 14, p 260.
- Katikou, P. 2008. Palytoxin and analogues: ecobiology and origin, chemistry, metabolism and chemical analysis. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. L.M. Botana (Ed), Marcek Dekker, New York, 631-663.
- Katz, A.R., Terrell-Perica, S. and Sasaki, D.M. 1993. Ciguatera on Kauai: investigation of factors associated with severity of illness. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **49**, 448-454.
- Kerbrat, A.S., Darius, H.T., Pauillac, S., Chinain, M. and Laurent, D. 2009. Detection of ciguatoxin-like and paralyzing toxins in *Trichodesmium* spp. from New Caledonian lagoon. *Marine Pollution Bulletin*, in press
- Kipping, R., Eastcott, H. and Sarangi, J. 2006. Tropical fish poisoning in temperate climates: food poisoning from ciguatera toxin presenting in Avonmouth. *Journal of Public Health*, **28**, 343-346.
- Knap, A., Dewailly, E., Furgal, C., Galvin, J., Baden, D., Bowen, R.E., Depledge, M., Duguay, L., Fleming, L.E., Ford, T., Moser, F., Owen, R., Suk, W.A. and

- Unluata, U. 2002. Indicators of ocean health and human health: developing a research and monitoring framework. *Environmental Health Perspective*, **110**, 839-845.
- Kodama, A.M. and Hokama, Y. 1989. Variations in symptomatology of ciguatera poisoning. *Toxicon*, **27**, 593-595.
- Kuberski, T. 1979. Origine de l'ichtyosarcotoxisme. *Lettre d'Information de la Commission du Pacifique Sud sur les Pêches*, **19**, 18.
- Landsberg, J.H., Flewelling, L.J. and Naar, J. *Karenia brevis* red tides, brevetoxins in the food web, and impacts on natural resources: decadal advancements. *Harmful Algae*, **8**, 598-607.
- Lange, W.R., Kreider, S.D., Hattwick, M. and Hobbs, J. 1988. Potential benefit of tocainide in the treatment of ciguatera: report of three cases. *American Journal of Medicine*, **84**, 1087-1088.
- Lange, W.R., Snyder, F.R. and Fudala; P.J. 1992. Travel and ciguatera fish poisoning. *Archives of Internal Medicine*, **152**, 2049-2053.
- Lange, W.R. 1994. Ciguatera fish poisoning. *American Family Physician*, **50**, 579-584.
- Laurent, D. 1993. La ciguatera: Une intoxication liée à la consommation de poisons tropicaux. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, **73**, 7-19.
- Laurent, D. and Amade, P. 1992. La ciguatera : épidémiologie et étiologie, toxicologie et remède traditionnels. Conventions : Sciences de la Vie : Pharmacologie, 2, Editions ORSTOM, Nouméa, Nouvelle-Calédonie, 86 p.
- Laurent, D., Bourdy, G., Amade, P., Cabalion, P. and Bourret, D., 1993. La gratte ou ciguatera : ses remèdes traditionnels dans le Pacifique Sud. ORSTOM Editions, Paris, 116 p.
- Laurent, D., Yeeting B., Labrosse, P. and Gaudechoux, J.P., 2005. Ciguatera: A field reference guide. Secretariat of the Pacific Community, Noumea, New Caledonia, 88 p.
- Laurent, D., Kerbrat, A.S., Darius, T., Girard, E., Golubic, S., Benoit, E., Sauviat, M.P., Chinain, M., Molgó and Pauillac, S. 2008. Are cyanobacteria involved in ciguatera fish poisoning-like outbreaks in New Caledonia? *Harmful Algae*, **7**, 827-838.
- Legrand, A.M., Litaudon, M., Genthon, J.N., Bagnis, R., and Yasumoto, T. 1989. Isolation and some properties of ciguatoxins. *Journal of Applied Phycology*, **1**, 183-188.
- Legrand, A.M., Fukui, M., Cruchet, P. and Yasumoto, T. 1992. Progress on chemical knowledge of ciguatoxins. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **85** (5 Pt 2), 467-469.
- Lehane, L. and Lewis, R.J. 2000. Ciguatera: recent advances but the risk remains. *International Journal Food Microbiology*, **61**, 91-125.
- Lewis, N.D. 1979. The impact of ciguatera fish poisoning in the Pacific. *South Pacific Bulletin*, (29), 8-12.
- Lewis, N.D. 1986. Epidemiology and impact of ciguatera in the Pacific: A review. *Marine Fisheries Review*, **48**, 6-13.
- Lewis, R.J. 1992. Socioeconomic impacts and management of ciguatera in the Pacific. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **85** (5 Pt 2), 427-434.
- Lewis, R. Ciguatera management. 2000. *South Pacific Commission Live Reef Fish Information Bulletin*, **7**, 11-13.
- Lewis, R.J., 2001. The changing face of ciguatera. *Toxicon* **39**, 97-106.
- Lewis R.J., 2006. Ciguatera: Australian perspectives on a global problem, *Toxicon*, **48**, 799-809.
- Lewis, R.J. and Endean, R. 1983. Occurrence of a ciguatoxin-like substance in the Spanish mackerel (*Scomberomorus commersoni*). *Toxicon*, **21**, 19-24.
- Lewis, R.J. and Endean, R., 1986. Direct and indirect effects of ciguatoxins on guinea-pig atria and papillary muscles. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **334**, 313-323.
- Lewis, R.J., Sellin, M., Poli, M.A., Norton, R.S., MacLeod, J.K. and Sheil, M.M. 1991. Purification and characterization of

- ciguatoxins from moray eel (*Lycodontis javanicus*, Muraenidae). *Toxicon*, **29**, 1115-1127.
- Lewis, R.J. and Holmes M.J. 1993. Origin and transfer of toxins involved in ciguatera. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology*, **106**, 615-628.
- Lewis, R.J. and Ruff, T.A. 1993. Ciguatera: ecological, clinical and socioeconomic perspectives. *Critical Reviews of Environmental Science and Technology*, **23**, 137-156.
- Lewis, R.J., Hoy, A.W. and Sellin, M. 1993. Ciguatera and mannitol: *in vivo* and *in vitro* assessment in mice. *Toxicon*, **31**, 1039-1050.
- Lewis, R. J., Sellin, M., Gillespie, N. C., Holmes, M. J., Keys, A., Street, R., Smythe, H., Thaggard, H. and Bryce, S. 1994. Ciguatera and herbivores: uptake and accumulation of ciguatoxins in *Ctenochaetus striatus* on the Great Barrier Reef. *Memoirs of the Queensland Museum*, **34**, 565-570.
- Lewis, R.J., Vernoux, J.P. and Brereton, I.M. 1998. Structure of Caribbean ciguatoxins isolated from *Caranx latus*. *Journal of American Chemical Society*, **120**, 5914-5920.
- Lewis, R.J., Molgó, J. and Adams, D.J. 2000. Ciguatera toxins: pharmacology of toxins involved in ciguatera and related fish poisonings. Diversity of marine and freshwater algal toxins. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. L.M. Botana (Ed), Marce Dekker Inc., New York, 419-447.
- Li, K.M. 1965. Ciguatera fish poison: a cholinesterase inhibitor. *Science*, **147**, (3665), 1580-1581.
- Lindsay, J.A. 1997. Chronic sequelae of foodborne disease. *Emerging Infectious Diseases*, **3**, 443-452.
- Lobel, P. S., 1979. Folk remedies for tropical fish poisoning in the Pacific. *Sea Frontiers*, **25**, 239-245.
- Lombet, A., Bidard, J.N. and Lazdunski, M. 1987. Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na⁺ channel. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **219**, 355-359.
- Manger, R.L., Leja, L.S., Lee, S.Y., Hungerford, J.M. and Wekell, M.M. 1993. Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins and ciguatoxins. *Analytical Biochemistry*, **214**, 190-194.
- Manger, R.L., Leja, L.S., Lee, S.Y., Hungerford, J.M., and Wekell, M.M. 1994. Cell bioassay for the detection of ciguatoxins, brevetoxins and saxitoxins. *Memoirs of the Queensland Museum*, **34**, 571-575.
- Manger, R.L., Leja, L.S., Lee, S.Y., Hungerford, J.M., Hokoma, Y., Dickey, R.W., Granade, H.G., Lewis, R., Yasumoto, T. and Wekell, M. 1995. Detection of sodium channel toxin: directed cytotoxicity assays of purified ciguatoxins, brevetoxins, saxitoxins and seafood extracts. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, **78**, 521-527.
- Martyr d'Anghera, P. 1555. De orbo novo: The eight decades of Peter Martyr d'Anghera. Translated to English by F.A. MacNutt. (1912) 2 Volume, G.A. Putnama Sons, N.Y.
- Mattei, C., Benoit, E., Juzans, P., Legrand, A.M. and Molgó, J. 1997. Gambiertoxin (CTX-4B), purified from wild *Gambierdiscus toxicus* dinoflagellates, induced Na⁺ 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. and Benoit, E. 1999. Neurotoxins targetting receptor site 5 of voltage-dependent sodium channels increase the nodal volume of myelinated axons. *Journal of Neuroscience Research*, **55**, 666-673.

- Mattei, C., Wen, P.J., Nguyen-Huu, T.D., Alvarez, M., Benoit, E., Bourdelais, A.J., Lewis, R.J., Baden, D.G., Molgó, J. and Meunier, F.A. 2008. Brevenal inhibits pacific ciguatoxin-1B-induced neurosecretion from bovine chromaffin cells. *PLoS One*, **3**, e3448.
- McKee, D., Fleming, L.E., Tamer, R., Weisman, R. and Blythe, D. 2001. Ciguatera fish poisoning reporting by physicians in an endemic area. In: Harmful Algal Blooms 2000. G.M. Hallegraeff, S.I. Blackburn, C.J. Bolch and R.J. Lewis (Eds), IOC of UNESCO, Paris, 451-453.
- McNabb, P. 2008. Chemistry, metabolism and chemical analysis of okadaic acid group toxins. In: Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection. L.M. Botana (Ed), Marce Dekker, New York, 209-228.
- Medline Plus: Drugs, Supplements and Herbal Information
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/>
- Medscape: Drug Reference
<http://search.medscape.com/>
- Merck Manuals: Online Medical Library
<http://www.merck.com/>
- Mitchell, G. 2005. Treatment of a mild chronic case of ciguatera fish poisoning with intravenous mannitol, a case study. *Pacific Health Dialog*, **12**, 155-157.
- Molgó, J., Comella, J.X. and Legrand, A.M. 1990. Ciguatoxin enhances quantal transmitter release from frog motor nerve terminals. *British Journal of Pharmacology*, **99**, 695-700.
- Molgó, J., Shimahara, T., Gaudry-Talarmain, Y.M., Comella, J.X. and Legrand, A.M. 1992. Ciguatoxin-induced changes in acetylcholine release and in cytosolic calcium levels. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **85**, 486-488
- Molgó, J., Shimahara, T. and Legrand, A.M. 1993a. Ciguatoxin extracted from poisonous moray eels, causes sodium-dependent calcium mobilization in NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cells. *Neuroscience Letters*, **158**, 147-150.
- Molgó, J., Gaudry-Talarmain, Y., Legrand, A.M. and Moulian, N. 1993b. Ciguatoxin extracted from poisonous moray eels *Gymnothorax javanicus* triggers acetylcholine release from *Torpedo* cholinergic synaptosomes via reversed Na(+)-Ca²⁺ exchange. *Neuroscience Letters*, **160**, 65-68.
- Mons, M.N., van Egmond, H.P. and Speijers, G.J.A. 1998. Paralytic shellfish poisoning: review. RIVM Report 388802005, National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven.
- Morris J.G. Jr., Lewin, P., Hargrett, N.T., Smith, C.W., Blake, P.A. and Schneider, R. 1982a. Clinical features of ciguatera fish poisoning: a study of the disease in the U.S. Virgin Islands. *Archives of Internal Medicine*, **142**, 1090-1092.
- Morris J.G. Jr., Lewin, P., Smith, C.W., Blake, P.A. and Schneider, R. 1982b. Ciguatera fish poisoning: epidemiology of the disease on St. Thomas, U.S. Virgin Islands. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **31** (3 Pt 1), 574-578.
- Munday, R. 2008. Occurrence and toxicology of palytoxins. In: Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection. L.M. Botana (Ed), Marce Dekker, New York, 693-713.
- Murata, M., Legrand, A.M., Ishibashi, Y. and Yasumoto, T. 1989. Structures of ciguatoxins and its congeners. *Journal of the American Chemical Society*, **111**, 8929-8931.
- Murata, M., Legrand, A.M., Ishibashi, Y., Fukui M. and 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.
- Narayan, Y. 1980. Fish poisoning in Fiji. *Fiji Medical Journal*, **8**, 567-574.
- Ng, S. and Gregory, J. 2000. An outbreak of ciguatera fish poisoning in Victoria.

- Communicable Diseases Intelligence*, **24**, 344-346.
- Nicholson, G.M., Blanche, T., Mansfield, K. and Tran, Y. 2002. Differential blockade of neuronal voltage-gated Na⁺ and K⁺ channels by antidepressant drugs. *European Journal of Pharmacology*, **452**, 35-48.
- Nicholson, G.M. and Lewis, R.J. 2006. Ciguatoxins: Cyclic polyether modulators of voltage-gated ion channel function. *Marine Drugs*, **4**, 82-118.
- Noro, T., Nishihara G.N., Terada R. and Yoropiy A., 2003. Ciguatera fish poisoning in Ulithi Atoll, Yap state, Micronesia. In: The progress report of the 2000 and 2001 survey of the research project "Social homeostasis of small island in an island-zone," Yap Proper and Ulithi Atoll, Micronesia. Aoyama T. (Ed), Kagoshima University Research Center for the Pacific Islands, Kagoshima, Japan, Occasional Papers N° 39, Section 2, Report 9, 83-86.
- Ogura, Y., Nara, J. and Yoshida, T. 1968. Comparative pharmacological actions of ciguatoxin and tetrodotoxin, a preliminary account. *Toxicon*, **6**, 131-140.
- Olsen, D.A. 1988. The impact of ciguatera fish poisoning within a changing Caribbean environment. *Population & Environment*. **10**, 14-31.
- Pagliaro, L.A. and Pagliaro, A.M. 1993. Fluoxetine abuse by an intravenous drug user. *American Journal of Psychiatry*, **150**, 1898.
- Palafox, N.A., Jain, L.G., Pinano, A.Z., Gulick, T.M., Williams, R.K. and Schatz, I.J. 1988. Successful treatment of ciguatera fish poisoning with intravenous mannitol. *Journal of the American Medical Association*, **259**, 2740-2742.
- Palafox, N.A. 1992. Review of the clinical use of intravenous mannitol with ciguatera fish poisoning from 1988 to 1992. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **85** (5 Pt 2), 423-424.
- Pauly, D. 2009. Beyond duplicity and ignorance in global fisheries. *Scientia Marina*, **73**, 215-224.
- Pearce, R., Hines C. Jr., Burns, T.W. and Clark, C.E. 1983. Ciguatera (fish poisoning). *Southern Medical Journal*, **76**, 560-561.
- Pearn, J.H., Lewis, R.J., Ruff, T., Tait, M., Quinn, J., Murtha, W., King, G., Mallett, A. and Gillespie, N.C. 1989. Ciguatera and mannitol: experience with a new treatment regimen. *Medical Journal of Australia*, **151**, 77-80.
- Pearn J.H. 1995. Ciguatera – a potent cause of the chronic fatigue syndrome. *Journal of Immunology and Immunopharmacology*, **15**, 63-65.
- Pearn, J.H. 1996. Chronic ciguatera: one organic cause of the chronic fatigue syndrome. *Journal of Chronic Fatigue Syndrome*, **2**, 29-34.
- Pearn, J.H. 1997. Chronic fatigue syndrome: chronic ciguatera poisoning as a differential diagnosis. *Medical Journal of Australia*, **166**, 309-310.
- Pearn, J. 2001. Neurology of ciguatera. *Journal of Neurological and Neurosurgical Psychiatry*, **70**, 4-8.
- Peles, E., Schreiber, S. and Adelson, M., 2008. Tricyclic antidepressants abuse, with or without benzodiazepines abuse, in former heroin addicts currently in methadone maintenance treatment (MMT). *European Neuropsychopharmacology*, **18**, 188-193.
- Perez, C.M., Vasquez, P.A. and Perret, C.F. 2001. Treatment of ciguatera poisoning with gabapentin. *New England Journal of Medicine*, **344**, 692-693.
- Perkins, R.A. and Morgan, S.S. 2004. Poisoning, envenomation and trauma from marine creatures. *American Family Physician*, **69**, 885-890.
- Pétard, P., 1986. Plantes utiles de Polynésie et Raau Tahiti. Editions Haere Po No Tahiti. 353 p.
- Pigott, G. M. and Tucker, B. W., 1990. Seafood: Effects of Technology on Nutrition. Food Science and Technology, Marcel Dekker, Inc., New York, vol. 39, 365 p.
- Poey, F., 1866. Ciguatera : Memoria sobre la enfermedad ocasionada por los peces

- venenos. Repertorio Fisico-Natural de la isla de Cuba, Havana, 1, 1-39, 2(1).
- Poli, M.A., Mende, T.J. and 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., Templeton, C.B., Thompson, W.L. and Hewetson, J.F. 1990. Distribution and elimination of brevetoxin-3 in rats. *Toxicon*, **28**, 903-910.
- Poli, M.A., Lewis, R.J., Dickey, R.W., Musser, S.M., Buckner, C.A. and Carpenter, L.G. 1997. Identification of Caribbean ciguatoxins as the cause of an outbreak of fish poisoning among US soldiers in Haiti. *Toxicon*, **35**, 733-741.
- Pottier, I., Vernoux, J.P., Jones, A. and Lewis, R.J., 2002. Characterisation of multiple Caribbean ciguatoxins and congeners in individual specimens of horse-eye jack (*Caranx latus*) by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Toxicon*, **40**, 929-939.
- Prahlw, J.A. and Landrum, J.E. 2005. Amitriptyline abuse and misuse. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, **26**, 86-86
- Pulido, O.M. 2008. Domoic acid toxicologic pathology: a review. *Marine Drugs*, **6**, 180-219.
- Racciatti, D., Vecchiet, J., Ceccomancini, A., Ricci, F. and Pizzigallo, E. 2001. Chronic fatigue syndrome following a toxic exposure. *Science of the Total Environment*, **270**, 27-31.
- Radwan, F.F., Wang, Z. and Ramsdell, J.S. 2005. Identification of a rapid detoxification mechanism for brevetoxin in rats. *Toxicological Sciences*, **85**, 839-846.
- Rageau, J., 1973. Les plantes médicinales de la Nouvelle-Calédonie. Travaux et documents de l'ORSTOM, 23, 139 p.
- Rageau, J., 1983. Fichier des plantes médicinales de Tahiti et de Polynésie. ORSTOM Bondy, no pagination.
- Raikhlin-Eisenkraft, B. and Bentur, Y. 2002. Rabbitfish ('Aras'): an unusual source of ciguatera poisoning. *Israel Medical Association Journal*, **4**, 28-30
- Randall, J.E. 1958. A review of ciguatera, tropical fish poisoning, with a tentative explanation of its cause. *Bulletin of Marine Science*, **8**, 236-267.
- Rayner, M.D., Kosaki, T.I. and Fellmeth, E.L. 1968. Ciguatoxin: more than an acetylcholinesterase. *Science*, **160**, 70-71.
- Rayner, M.D. 1972. Mode of action of ciguatoxins. *Federation Proceedings*, **31**, 1139-1145.
- Ruff, T.A. and Lewis, R.J. 1994. Clinical aspects of ciguatera: an overview. *Memoirs of the Queensland Museum*, **34**, 609-619.
- Russell, F.E. 1975. Ciguatera poisoning: a report of 35 cases. *Toxicon*, **13**, 383-385.
- Ryan, G., Cunningham, K. and Ryan, M.P. 2008. Pharmacology and epidemiological impact of azaspiracids. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. L.M. Botana (Ed), Marce Dekker, New York, 755-761.
- Satake, M., Murata, M. and Yasumoto, T. 1993. The structure of CTX-3C, a ciguatoxin congener isolated from cultured *Gambierdiscus toxicus*. *Tetrahedron Letters*, **34**, 1975-1978.
- Satake, M., Ishibashi, Y., Legrand, A.M. and Yasumoto, T. 1997. Isolation and structure of ciguatoxins-4A, a new ciguatoxin precursor, from cultures of dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* and parrotfish *Scarus gibbus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **60**, 2103-2105.
- Satake, M., Fukui, M., Legrand, A.M., Cruchet, P. and Yasumoto, T. 1998. Isolation and structures of new ciguatoxin analogs, 2,3-dihydroxy-CTX-3C and 51-hydroxy-CTX-3C, accumulated in tropical reef fish. *Tetrahedron Letters*, **39**, 1197-1198.
- Sauviat, M.P., Boydrón-Le Garrec, R., Masson, J.B., Lewis, R.L., Vernoux, J.P., Molgó, J., Laurent, D. and Benoit, E. 2006. Mechanisms involved in the swelling of erythrocytes caused by Pacific

- and Caribbean ciguatoxins. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, **36**, 1-9.
- Scheuer, P.J., Takahashi, W., Tsutsumi, J. and Yoshida, T. 1967. Ciguatoxin: isolation and chemical nature. *Science*, **155**, 1267-1268.
- Schnorf, H., Taurarii, M. and Cundy T., 2002. Ciguatera fish poisoning: a double-blind randomized trial of mannitol therapy. *Neurology*, **58**, 873-880.
- Scholin, C.A., Gulland, F., Doucette, G.J., Benson, S., Busman, M., Chavez, F.P., Cardaro, J., DeLong, R., de Vogelaere, A., Harvey, J., Haulena, M., Lefebvre, K., Lipscomb, T., Loscutoff, S., Lowenstine, L., Marin R. 3rd, Miller, P.E., McLellan, W.A., Moeller, P.D., Powell, C.L., Rowles, T., Silvagni, P., Silver, M., Spraker, T., Trainer, V. and Van Dolah, F.M. 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature*, **403**, 80-84.
- Schwarz, E.S., Mullins, M.E. and Brooks, C.B. 2008. Ciguatera poisoning successfully treated with delayed mannitol. *Annals of Emergency Medicine*, **52**, 476-477.
- Sims, J.K. 1987. A theoretical discourse on the pharmacology of toxic marine ingestions. *Annals of Emergency Medicine*, **16**, 1006-1015.
- Slobbe, L., van Genderen, P.J. and Wisman, P.J. 2008. Two patients with ciguatera toxicity: a seafood poisoning in travellers to (sub) tropical areas. *Netherlands Journal of Medicine*, **66**, 389-391.
- Socol, M.C.H. and Oetterer, M. 2003. Seafood as functional food. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **46**, 443-454.
- Sozzi, G., Marotta, P., D. Aldeghi, D., Tredici, G. and Calvi, L. 1988. Polyneuropathy secondary to ciguatoxin poisoning. *Italian Journal of Neurological Sciences*, **9**, 491-495.
- SPC 1968. Report. Seminar on ichthyosarcotoxism, 16th-22nd August, 1968, Papeete, French Polynesia, South Pacific Commission, Noumea, New Caledonia, p. 2.
- Stewart, M.P. 1991. Ciguatera fish poisoning: treatment with intravenous mannitol. *Tropical Doctor*, **21**, 54-55.
- Stommel, E.W., Jenkyn, L.R. and Parsonnet, J. 1993. Another case of polymyositis after ciguatera toxin exposure. *Archives of Neurology*, **50**, 571.
- Swift, A.E. and Swift, T.R. 1993. Ciguatera. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*, **31**, 1-29.
- Ting, J.Y. and Brown, A.F. 2001. Ciguatera poisoning: a global issue with common management problems. *European Journal of Emergency Medicine*, **8**, 295-300.
- Tosteson, T.R., Bard, R.F., Gonzalez, I.M., Ballantine, D.L. and Bignami, G.S. 1995. Toxin diversity in the ciguatera food chain. In: Proceedings of the International Symposium on Ciguatera and Marine Natural Products Asian Pacific Research Foundation. Y. Hokama, P.J. Scheuer and T.Y Takeshi (Eds), Honolulu, Hawaii, pp. 73-87.
- Tran, K.T., Hranicky, D., Lark, T. and Jacob, N.J. 2005. Gabapentin withdrawal syndrome in the presence of a taper. *Bipolar Disorders*, **7**, 302-304.
- Tubaro, A., Sosa, S., Bornancin, A. and Hungerford, J. 2008. Pharmacology and toxicology of diarrhetic shellfish toxins. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. L.M. Botana (Ed), Marce Dekker, New York, 229-253.
- Twiner, M.J., Rehmann, N., Hess, P. and Doucette, G.J. 2008. Azaspiracid shellfish poisoning: a review on the chemistry, ecology and toxicology with an emphasis on human health impacts. *Marine Drugs*, **6**, 39-72.
- Vale, C. 2008. Palytoxins: pharmacology and biological detection methods. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. L.M. Botana (Ed), Marce Dekker, New York, 675-691.
- van Apeldoorn, M.E., van Egmond, H.P. and Speijers, G.J.A. 1999. Amnesic shellfish poisoning: a review. RIVM Report 388802 019, National Institute of Public

- Health and the Environment (RIVM), Bilthoven.
- van Apeldoorn, M.E., van Egmond, H.P. and Speijers, G.J.A. 2001. Neurotoxic shellfish poisoning: a review. RIVM Report 388802 023, National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven.
- van Dolah, F.M. 2000a. Marine algal toxins : Origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspectives*, **108**, (Suppl. 1), 133-141.
- van Dolah, F.M. 2000b. Diversity of marine and freshwater algal toxins. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. L.M. Botana (Ed), Marce Dekker, New York, 19-43.
- Vernoux, J.P. 1994. The mouse ciguatoxin bioassay: directions for use to control fish for consumption. *Memoirs of the Queensland Museum*, **34**, 625-629.
- Vernoux, J.P. and Lewis, R.J. 1997. Isolation and characterisation of Caribbean ciguatoxins from the horse-eye jack (*Caranx latus*). *Toxicon*, **35**, 889-900.
- Vienne, B., 1981-1982. Les usages médicaux de quelques plantes communes de la flore des Iles Banks (Vanuatu). *Cahiers ORSTOM, Série Sciences Humaines XVIII*, 569-589.
- Wang, D.Z. 2008. Neurotoxins from marine dinoflagellates: a brief review. *Marine Drugs*, **6**, 349-371.
- Wasay, M., Sarangzai, A., Siddiqi, A. and Nizami, Q. 2008. Ciguatera fish poisoning with elevated muscle enzymes and abnormal spinal MRI. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **39**, 307-309.
- Watkins, S.M., Reich, A., Fleming, L.E. and Hammond, R. 2008. Neurotoxic shellfish poisoning. *Marine Drugs*, **6**, 431-455.
- Weiner, M. A., 1985. *Secrets of Fijian Medicine*. University of California, Berkeley, 141 p.
- Whittle, K. and Gallacher, S. 2000. Marine toxins. *British Medical Bulletin*, **56**, 236-253.
- Williamson, J., 1990. Ciguatera and mannitol: a successful treatment. *Medical Journal Australia*, **151**, 77-80.
- Yasumoto, T. 1993. Structures and the origin of toxins involved in ciguatera. *South Pacific Commission Ciguatera Information Bulletin*, **3**, 4-5.
- Yasumoto, T., Bagnis, R. Thevenin, S. and Garcom, M. 1977a. A survey of comparative toxicity in the food chain of ciguatera. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **43**, 1015-1019.
- Yasumoto, T., Nakajima, I., Bagnis, R. and Adachi, R. 1977b. Finding of a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **43**, 1021-1026.
- Yasumoto, T. and Murata, M. 1993. Marine toxins. *Chemical Review*, **93**, 1897-1909.
- Yasumoto, T., Igarashi, T., Legrand, A.M., Cruchet, P., Chinain, M., Fujita, T. and Naoki, H. 2000. Structural elucidation of ciguatoxin congeners by fast-atom bombardment tandem mass spectroscopy. *Journal of American Chemical Society*, **122**, 4988-4989.
- Yasumoto, T. 2005. Chemistry, etiology and food chain dynamics of marine toxins. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical & Biological Sciences*, **81**, 43-51.
- Zaccaroni, A. and Scarvelli, D. 2008. Toxicity of sea algal toxins to humans and animals. In: *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*. V. Evangelista, L. Barsanti, A.M. Frassanito, V. Passarelli and P. Gualtieri (Eds), NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology, Springer Science, Pisa, Italy, 91-158.

II. Historique : les études de criblage antérieures

Au début des années 1990, l'ORSTOM (maintenant IRD) a lancé un programme de recherche sur les remèdes traditionnels utilisés pour traiter les symptômes de la ciguatera au sein des populations du Pacifique sud. Ce programme a débuté par des enquêtes ethnobotaniques qui ont duré sur une période de plus de 10 ans dans des tribus et villages de Nouvelle-Calédonie et du Vanuatu. Elles ont permis de récolter et d'identifier 94 espèces de plantes entrant dans la préparation de remèdes contre la ciguatera (Bourdy et al., 1992 ; Laurent et al., 1993).

Cette connaissance acquise, l'étape suivante a consisté en une sélection des plantes inventoriées en fonction de leur activité dans des tests biologiques afin de confirmer scientifiquement leur efficacité.

La nécessité de disposer d'un test approprié qui pourrait être utilisé dans un criblage à moyen débit et dans un fractionnement chimique bioguidé s'est imposée. Au cours des trois dernières décennies, nous avons assisté à l'apparition de nombreuses études expérimentales qui ont permis d'obtenir un aperçu de plus en plus précis du mode d'action des CTXs et de leurs effets sur différents tissus et cellules. Certains de ces modèles expérimentaux ont été adaptés pour évaluer le potentiel thérapeutique de ces plantes contre l'effet des CTXs.

Ces études et quelques uns de leurs avantages et inconvénients sont passées en revue ci-dessous (voir Article 1 pour les informations de plantes testées et les résultats).

II.1 Test souris

Principe d'étude : La première évaluation thérapeutique a été entreprise au centre IRD de Nouméa à l'aide d'un test souris (Amade et Laurent, 1992). Cet essai est basé sur la sensibilité des souris qui manifestent des symptômes bien définis après injection de CTXs ou d'extraits contenant des CTXs (Kimura et al. 1982 ; Ito et al., 2003). Pour évaluer le potentiel thérapeutique des remèdes traditionnels, les souris sont co-injectées avec une gamme de concentration d'extrait de plantes (traitement) et une dose sublétales de toxines

(CTXs pures ou extrait riches en CTXs, tels ceux de foies de murène). L'activité thérapeutique chez la souris traitée se manifeste par une récupération pondérale et physique plus rapide que chez la souris témoin injectée avec l'extrait toxinique seul.

Avantages & Défautes : Grâce à cet essai biologique, nous avons été en mesure d'identifier des extraits de plantes comme celui d'*H. foertherianum* ou de *S. terebenthifolius* qui ont démontré des effets bénéfiques. Toutefois, les deux critères d'évaluation de cette méthode n'offrent qu'un aperçu qualitatif (période de récupération) ou quantitatif (perte de poids) mais peu sensible. Etant donné la complexité d'un organisme vivant, ce test souffre d'une faible spécificité et d'une grande variabilité. Pour ces raisons, nous nous sommes tournés vers d'autres tests qui nous offraient plus de spécificité et de précision.

II.2 Tests d'électrophysiologie et de neurophysiologie

Principe d'étude : La liaison des CTXs aux CSDP bloquent ces canaux en position ouverte et déclenchent l'afflux d'ions sodium dans les cellules excitables de divers tissus. Cela se traduit par l'induction d'une dépolarisation membranaire et des décharges de potentiel d'action spontanées et répétitives dans les cellules nerveuses. Parallèlement, l'accroissement de la concentration intra-axonale en ions sodium perturbe l'équilibre osmotique entre les milieux intra et extra-axonaux, ce qui entraîne une entrée d'eau responsable de gonflements cellulaires et neuronaux de longue durée (Benoit et al., 1986 ; 1996). Ces deux effets ont été bien décrits chez les axones myélinés de grenouille (*Rana esculenta*) avec les techniques de « patch clamp » et de microscopie confocale à balayage laser (Benoit et al., 1986). Notre collaboration avec le Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire du CNRS, Gif-sur-Yvette nous a permis d'utiliser ces deux modèles et d'observer les effets d'extraits d'*H. foertherianum* et *D. solida* contre l'action de la P-CTX-1B sur l'excitabilité membranaire et le volume axonal de ces fibres nerveuses (Benoit et al., 2000).

Avantages & Défautes : Ces deux méthodes offrent une approche à la fois spécifique et sensible, permettant une observation directe sur la façon dont le courant électrique et l'osmose entraînés par l'entrée de Na^+ , sont influencés par les CTXs à des concentrations nanomolaires. Cependant, cette technique hautement spécialisée, exigeant des opérateurs qualifiés et des instruments coûteux, ne pouvait pas être développée dans notre laboratoire à Nouméa. Pour ces raisons, son utilisation dans une sélection à moyen débit et dans un fractionnement chimique bioguidé n'a pas été retenue. Cependant, comme ces

deux techniques permettent une approche rationnelle de l'évaluation thérapeutique, elles devront être reconsidérées pour une utilisation sur les molécules potentiellement actives isolées à l'aide d'autres tests biologiques.

II.3 Tests sur érythrocytes de grenouille et humain

Principe d'étude : S'appuyant sur les expériences de microscopie confocale à balayage laser qui nous avaient permis de visualiser en trois dimensions l'œdème induit par la P-CTX-1B dans les axones myélinés de grenouille, les effets apparents de cette toxine sur la surface des érythrocytes de grenouille ont été observés avec un simple microscope inversé (Boydron-Le Garrec, 2005). Il a été ainsi montré que l'application de P-CTX-1B à des concentrations de l'ordre du nanomolaire influençait la géométrie (longueur et largeur) des érythrocytes, en augmentant sensiblement leur surface apparente. Ce test nous a permis de mettre en évidence l'activité inhibitrice de ce gonflement par un extrait d'*H. foertherianum* (Boydron et al., 2001a).

Avantages & Défautes : Ce test s'est avéré simple, peu coûteux et relativement sensible (Boydron-Le Garrec, 2005). Cependant, les observations microscopiques et la mesure des dimensions de ces petits disques elliptiques restent qualitatives à semi-quantitatives et sont assez fastidieuses pour des grands volumes et pour une vérification de routine des effets thérapeutiques d'extraits de plantes.

Principe d'étude : Afin de contourner les difficultés rencontrées dans l'essai précédemment décrit, certains changements ont été opérés, comme le remplacement des hématies de grenouille par celles de l'homme et la quantification du degré d'hémolyse de ces cellules par la spectrophotométrie (Boydron-Le Garrec, 2005). En effet, lors de la lyse des hématies, de l'hémoglobine est relâchée dans le milieu environnant et cette libération peut être mesurée à la longueur d'onde de 540 nm. Ce test, comme le précédent, a été appliqué à l'extrait d'*Argusia argentea* pour étudier sa capacité à contrecarrer l'hémolyse provoquée par la P-CTX-1B (Boydron et al., 2001b).

Avantages & Défautes : Ce test biologique d'évaluation du potentiel anti-ciguatérique de plantes avait l'avantage d'être réalisé au format microplaques à 96 puits. Cependant, nous avons rapidement réalisé qu'il manquait de sensibilité (Boydron-Le Garrec, 2005). Pour une lecture spectrophotométrique exploitable de l'action hémolytique, de fortes densités d'érythrocytes sont nécessaires à la libération de quantités suffisantes d'hémoglobine et cette augmentation de concentrations cellulaires entraîne l'emploi de plus fortes

concentrations en toxine ou de plus longues périodes d'incubation, ce qui constitue à l'évidence des facteurs limitants pour une sélection à grande échelle des plantes. Ce modèle a donc finalement été abandonné au profit d'un autre test en microplaques utilisant des neuroblastomes murins (Neuro-2a).

II.4 Test sur neuroblastomes

Principe d'étude : Le test biologique de cytotoxicité utilisant la lignée cellulaire Neuro-2a pour une détection spécifique des neurotoxines agissant sur les CSDP dans les extraits d'échantillons marins a été développé par Manger et al. (1993). Ce test permet de détecter les toxines capables d'amplifier la mortalité des Neuro-2a initialement provoquée par la ouabaïne et la vératridine. La viabilité des cellules est quantifiée par le test de réduction du MTT observée à la longueur d'onde de 490 nm. L'augmentation de la concentration en Na⁺ dans le cytoplasme des Neuro-2a suite à l'activation des CSDP par des CTXs et des PbTx_s, est accentuée par la vératridine qui agit sur le site 2 des CSDP et par la ouabaïne qui inhibe la pompe Na⁺/K⁺, entraînant ainsi la mortalité cellulaire. Basé sur ce phénomène biologique, ce test de détection a été légèrement modifié pour mesurer le potentiel des plantes à contrecarrer la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B et/ou la PbTx-3 en présence de ouabaïne et de vératridine (Boydron-Le Garrec et al., 2005a).

Avantages & Défautes : Ce test biologique a été une grande avancée pour notre évaluation pharmacologique des plantes utilisées dans le traitement de la ciguatera car, pour la première fois, était utilisée une lignée cellulaire immortalisée, nous permettant de nous affranchir de l'utilisation d'animaux vivants. Il est également adapté à un usage en routine, car 31 extraits de plantes ont pu être testés avec une quantification par spectrophotométrie relativement aisée (Boydron-Le Garrec et al., 2005a). Autre avantage non négligeable de cet essai, la substitution de toxines très rares à l'état pur, les CTXs, par une toxine commercialisée, la PbTx-3, de structure et de mode d'action similaires. Néanmoins, ce dosage biologique admet certaines limites parmi lesquelles la résistance des Neuro-2a à ces toxines est un facteur majeur. En effet, sans les effets de synergie de cytotoxicité de la ouabaïne et de la vératridine, ces toxines ne seraient pas capables d'induire une toxicité. L'addition de ces substances n'est certainement pas représentative des conditions cliniques d'une intoxication ciguatérique. En raison des effets synergiques de la ouabaïne et de la vératridine, une réponse anticytotoxique d'un extrait de plante ne reflétera pas nécessairement un effet préventif de la toxicité induite par les CTXs ou les

PbTxs. Dans ces conditions, le pronostic d'efficacité de l'extrait de plantes dans le traitement de la ciguatera ne serait donc pas très fiable et sujet à controverse.

III. Objectifs de l'étude

Bien que la ciguatera soit rarement fatale, les victimes dans la zone Pacifique présentent un état morbide sévère et durable. Les nombreux médicaments prescrits dans la médecine occidentale n'offrent qu'un traitement symptomatique et de soutien et font preuve d'une efficacité irrégulière. Le recours à la médecine traditionnelle pour traiter la ciguatera est une connaissance acquise et transmise aux générations suivantes par les populations insulaires du Pacifique, plaçant plus de foi par expérience personnelle ou collective en ce système traditionnel.

Première étape vers des investigations scientifiques, une étude ethnobotanique exhaustive menée au Vanuatu et en Nouvelle-Calédonie a été réalisée en 1993 par l'ORSTOM (ex-IRD). Cette étude a permis d'identifier près de 94 espèces de plantes utilisées dans la préparation de remèdes pour traiter les symptômes de la ciguatera (Bourdy et al., 1992 ; Laurent et al., 1993). Par la suite, plusieurs expérimentations se sont succédées sur certaines de ces plantes qui ont abouti à mettre en évidence leur efficacité sur des modèles animaux et cellulaires (article 1). Néanmoins, ces approches furent non-spécifiques, laborieuses ou nécessitant des techniques et des matériels spécialisés et coûteux ainsi que l'usage d'animaux. Par ailleurs, d'autres approches ont été tentées mais manquaient, soit de sensibilité, soit de cohérence clinique (Section II, Introduction générale).

Dans ces conditions, la sélection rapide, précise et à moindre coût, des plantes et par la suite leur fractionnement chimique bioguidé, se trouvaient sérieusement limités. C'est en considérant ces aspects que nous avons entrepris la présente recherche. Notre objectif a consisté à mettre en place un ou plusieurs tests appropriés permettant une sélection à moyenne échelle qui mènerait à terme à l'isolement des principes actifs des extraits de plantes les plus intéressants.

Deux tests ont ainsi été développés :

- Le premier test s'appuie sur les études antérieures menées sur le mécanisme moléculaire des CTXs induisant le gonflement des érythrocytes de grenouilles et l'hémolyse des érythrocytes humains (Section II, Introduction générale). Elles nous ont permis d'avancer l'hypothèse de l'implication de médiateurs inflammatoires comme le radical libre d'oxyde nitrique (NO•) et les cytokines pro-inflammatoires ainsi que de la surexpression de l'enzyme NO synthétase inductible (iNOS) dans l'empoisonnement ciguatérique. Le test de Griess (TG) et la Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative (qPCR) ont été employés pour évaluer, respectivement, les taux de production de NO• et de surexpression d'iNOS dans les macrophages murins (RAW 264.7) stimulés par la P-CTX-1B. Ainsi, diverses plantes ont été testées selon ces méthodes. Pour ces études de criblage, la P-CTX-1B étant extrêmement rare et donc précieuse, nous l'avons remplacée par le lipopolysaccharide (LPS). Cette endotoxine d'origine bactérienne, bien que différente de la P-CTX-1B en terme de structure, est reconnue pour ses propriétés inflammatoires.
- Le second essai a été adapté du test *in vitro* d'interaction ligand-récepteur (TILR) pour permettre l'identification des plantes ayant des activités antagonistes vis-à-vis de la liaison de composés « type-ciguatoxines » sur les canaux sodiques de synaptosomes de cerveaux de rats. Les CTXs marquées n'étant pas disponibles, elles ont été remplacées par la brévéttoxine-3 (PbTx-3) tritriée. Cette toxine présente en effet d'étroites analogies avec les CTXs quant à sa structure et à son mode d'action.
- Suite à ces criblages, des travaux supplémentaires de phytochimie utilisant les deux tests ci-dessus ont été menés.

Ce travail de recherche a collectivement conduit à quatre publications dans des revues internationales à comité de lecture, une soumission de revue et deux en préparation; certaines d'entre elles ont été incluses dans cette thèse de façon appropriée. Ce travail a également mené à une déclaration d'invention (Annexe 1).

La première partie de ce travail a essentiellement été réalisée à l'Institut de Recherche pour le Développement du Centre de Nouméa et à l'Institut de Pasteur de Nouvelle-Calédonie en collaboration avec ma collègue Mariko Matsui.

J'ai eu l'opportunité, au cours de mon doctorat de réaliser un stage de 3 mois au Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox (UMR 152-UPS-IRD dirigé par Mme la Professeur Françoise Nepveu) à Toulouse, sous la responsabilité du Dr. Karine Reybier, stage au cours duquel j'ai effectué le test au DPPH pour la recherche d'activités antioxydantes.

Parallèlement, dans le cadre de la sélection de méthodes pour la quantification de NO• produit par les cellules RAW 264.7 activées au LPS, j'ai pu mettre en place un protocole utilisant l'appareil de Résonance Paramagnétique Électronique. Cette technique ayant pour défaut une grande consommation de toxine, nous n'avons pas pu poursuivre les études de mesure de NO• induit dans ces cellules par la P-CTX-1B. Les quelques résultats préliminaires obtenus ne seront donc pas présentés dans le cadre de cette thèse.

En ce qui concerne la deuxième partie de la thèse, les expériences d'interaction ligand-récepteur se sont déroulées à l'Institut Louis Malardé de Tahiti au Laboratoire de Recherche sur les Micro-algues Toxiques (LMT dirigé par le Dr. Mireille Chinain). Une grande partie de cette étude a été effectuée par le Dr. Taiana Hélène Darius à qui j'avais fourni les extraits de plantes et ensuite les fractions et le produit pur. J'ai néanmoins pu effectuer un stage de 5 jours à l'Institut Louis Malardé ce qui m'a permis de découvrir les bases de ce test.

Les analyses d'élucidation de structure des produits isolés ont été faites par le Dr. Nicolas Fabre (UMR 152-UPS-IRD à Toulouse).

PARTIE 1

**Modulation de la synthèse d'oxyde
nitrique (NO•) par la P-CTX-1B**

Étude du potentiel inducteur d'oxyde nitrique (NO•) de la P-CTX-1B

I. Cadre d'étude

La nécessité de trouver un médicament qui puisse traiter avec succès la ciguatera a conduit à une analyse scientifique de l'efficacité des remèdes traditionnels sur des modèles *in vitro* et *in vivo*. Cependant, ces études ont été entravées par les difficultés inhérentes à l'acquisition de toxines pures et par l'absence de tests biologiques pratiques, rapides, peu coûteux et pharmacologiquement judicieux (Section II, Introduction générale).

Les CTXs sont connues pour se lier sélectivement sur le site 5 des canaux sodiques dépendants du potentiel (CSDP) et les maintenir en position ouverte même au potentiel de repos de la membrane cellulaire. Ce blocage résulte en un influx d'ions sodium (Na^+) qui entraîne des dérégulations électrophysiologiques et osmotiques dans les neurones excitables et dans certaines cellules non-excitables (cf. Al-Sabi et al., 2006 ; Lewis et al., 2000 ; Nicholson et Lewis, 2006 ; Wang, 2008). D'autres études ont démontré que les CTXs pouvaient également induire l'activation sélective de canaux calciques de type L et le blocage de canaux potassiques dépendants du potentiel (Nicholson et Lewis, 2006 ; Sauviat et al., 2006).

Cependant, vu la complexité et les aspects multiples du syndrome ciguatérique chez l'homme, la dérégulation de canaux ioniques ne peut à elle seule expliquer l'action des CTXs (Dechraoui et al., 1999). Ainsi, certains médicaments classés comme modulateurs de canaux sodiques (tocainide, mexiletine et amitriptyline) ou de canaux calciques (gabapentine et nifedipine) (Nicholson et al., 2002 ; Nicholson et Lewis, 2006) n'ont pas montré une grande efficacité dans le traitement des patients atteints de ciguatera. En effet, les patients souffrant de cette intoxication manifestent une combinaison complexe de symptômes variant de manifestations gastrointestinales à neurologiques et avec, pour les cas sévères, des problèmes cardiovasculaires (Bagnis et al., 1979 ; Gillespie et al., 1986).

Il est rapporté parfois que des symptômes comme le prurit, la paresthésie des extrémités, les myalgies, les arthralgies, la fatigue généralisée, les malaises, la dépression ou l'irritabilité ont duré des semaines voire des mois, ou ont ressurgi des années plus tard (Friedman et al., 2007 ; 2008 ; Lehane et Lewis, 2000 ; Ruff et Lewis, 1994). Observée plus particulièrement dans le Pacifique, la chronicité de ces symptômes neuromusculaires et neuropsychiatriques évoque le syndrome de fatigue chronique (CFS), aussi appelé encéphalomyélite myalgique (Chateau-Degat et al., 2007 ; Gillespie et al., 1986 ; Racciatti et al., 2001). Des molécules de structure proche des CTXs ont été détectées dans des échantillons de sang de certains patients atteints de CFS (Hokama et al., 2003).

De nombreux travaux scientifiques sur le CFS ont montré que ce syndrome était modulé par la surexpression de facteurs inflammatoires tels que le NO• et des cytokines circulantes (Buchwald et al., 1997 ; Cannon et al., 1999 ; Gupta et al., 1997). Ceci nous a conduit à avancer l'hypothèse d'un lien éventuel entre la ciguatera et le système inflammatoire. Ce lien est appuyé par l'observation de deux désordres inflammatoires chez certains patients souffrant ou ayant souffert de la ciguatera : le syndrome de Guillain-Barré (une neuropathie inflammatoire aiguë) et la polymyosite (une inflammation musculaire chronique) (Angibaud et Rambaud, 1998 ; Gatti et al., 2008 ; Stommel et al., 1991 ; 1993). Par ailleurs, en raison de son caractère distinctif de symptômes neurologiques de longue durée, la ciguatera est souvent diagnostiquée à tort comme la sclérose en plaque (Ting et Brown, 2001). Il a d'ailleurs été montré que l'iNOS, une des enzymes responsables de la production de NO•, était surexprimée chez des patients atteints de cette maladie neurologique auto-immune (Bagasra et al., 1995 ; Bö et al., 1994).

Une production excessive de cytokines inflammatoires stimule l'iNOS pour générer du NO•. Les cytokines sont des médiateurs chimiques qui orientent les réponses immunitaires et participent aux phénomènes inflammatoires (Oberholzer et al., 2000). Il est admis qu'à des taux physiologiques, le NO• joue un rôle majeur dans la régulation de la pression sanguine et dans le tonus vasculaire. Toutefois, la libération incontrôlée du NO• par l'iNOS module l'hypotension et est impliquée dans les mécanismes qui sous-tendent la dysfonction cardiovasculaire (Moncada et Higgs, 2006). Cela a été observé dans des cas sévères de ciguatera (Ruff et Lewis, 1994). En outre, des démangeaisons persistantes souvent ressenties dans les cas chroniques peuvent être présentées comme

une allergie dermatologique (Baden et al., 1995 ; Ruff et Lewis, 1994). Il a en effet été montré que l'expression de l'iNOS augmente significativement durant la pathogénèse de maladies urticaires chez la souris et l'homme (Bécherel et al., 1997).

L'étude du mode d'action des CTXs sur les érythrocytes humains et de grenouilles a mis en évidence leur gonflement provoqué par l'entrée d'ions calcium (Ca^{2+}) qui serait à l'origine d'une cascade d'événements impliquant l'activation de l'oxyde nitrique synthétase (Sauviat et al., 2006). L'équipe de Ryan et collaborateurs (2007) a également constaté l'implication du système inflammatoire chez les souris injectées avec la P-CTX-1B. Cette implication pourrait expliquer non seulement la diversité mais aussi la durée des symptômes observées chez les malades ciguatériques.

Ainsi, sur la base de la nature inflammatoire des symptômes de la ciguatera décrits dans la littérature et nos résultats antérieurs, nous avons décidé d'entreprendre la présente étude afin de démontrer la capacité de la P-CTX-1B à activer l'iNOS et à générer le $\text{NO}\bullet$ dans les cellules de macrophages murins (RAW 264.7).

II. Introduction sur l'oxyde nitrique ($\text{NO}\bullet$) et l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS)

Bien qu'étant une des molécules les plus simples de la nature, l'oxyde nitrique (monoxyde d'azote ou radical $\text{NO}\bullet$) est d'un intérêt tout particulier. Messager secondaire peu ordinaire, le $\text{NO}\bullet$ influence pratiquement toutes les fonctions physiologiques de l'organisme, agissant à la fois comme un neurotransmetteur, un autacoïde, un médiateur constitutif, un médiateur inductible, une molécule cytoprotective ou une molécule cytotoxique. Toutefois, une altération dans sa production *in vivo* entraîne une variété de situations pathologiques (voir les revues de Conner et Grisham, 1995 ; Moncada et Higgs, 1993 ; Singh et Evans, 1997 ; Tuteja et al., 2004).

II.1 Biologie du NO•

Le NO• endogène est synthétisé dans de nombreux type de cellules à partir de L-arginine et d'oxygène moléculaire (O₂) sous le contrôle enzymatique d'une famille d'enzymes appelées collectivement NO synthétases (NOSs). Il existe trois isoformes distinctes de NOS qui sont les produits de gènes différents : la NOS neuronale (nNOS – dite aussi de type I), la NOS inductible (iNOS – dite aussi de type II), et la NOS endothéliale (eNOS – dite aussi de type III)¹. En règle générale, comme les isoformes eNOS et nNOS sont constitutionnellement exprimées, elles sont aussi collectivement dénommées NOS constitutives (cNOS). Quant à l'iNOS, elle n'est normalement pas présente mais peut apparaître en quelques heures sous l'influence de stimuli très variés parmi lesquels de nombreux produits bactériens comme le LPS, ou plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α), l'interleukine-1 beta (IL-1β) et l'interféron gamma (IFN-γ), ou encore les radicaux libres de l'oxygène (Alderton et al., 2001 ; Feihl et Liaudet, 2002 ; Förstermann et al., 1998 ; Michel, 1999 ; Xie et Nathan, 1994).

Les trois isoformes² partagent un schéma catalytique global (Fig. 1) dans lequel ces enzymes dimériques convertissent, par oxydation, l'acide aminé L-arginine en L-citrulline, tout en générant du NO•. Cependant, les activités enzymatiques des trois isoformes diffèrent dans leur dépendance au Ca²⁺. Conséquence de cette régulation³, les cNOSs ne produisent du NO• à vitesse maximale que de manière intermittente en réponse à des signaux calciques et sont donc associées à une production de NO• à des taux physiologiquement bas de l'ordre du nano-molaire. Cette propriété de la nNOS et de l'eNOS est adaptée à leur rôle dans les phénomènes de signalisation.

¹ Ces enzymes sont désignées sous deux appellations : l'appellation classique nNOS, iNOS et eNOS qui reflète leur caractérisations initiales respectivement dans le tissu neuronal, les macrophages (ou autres cellules immunitaires) et dans les cellules endothéliales, et l'appellation officielle NOS1, NOS2 et NOS3 qui reflète plutôt l'ordre de l'isolement et la caractérisation des clones du génome humain.

² La NOS est un très gros complexe dont l'activité dépend d'un certain nombre de cofacteurs tels que la tétrahydrobioptérine (BH4), des flavines adénine dinucléotide (FAD) et mononucléotide (FMN), l'hème et la calmoduline, et des co-substrats, comme l'O₂ et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH).

³ L'activité des eNOS et nNOS est régulée par la liaison du Ca²⁺ à la calmoduline, et ainsi ces cNOS requièrent des concentrations élevées de Ca²⁺ cytosolique. En revanche, du fait de sa très forte liaison à la calmoduline, l'activité de la iNOS, est indépendante du Ca²⁺.

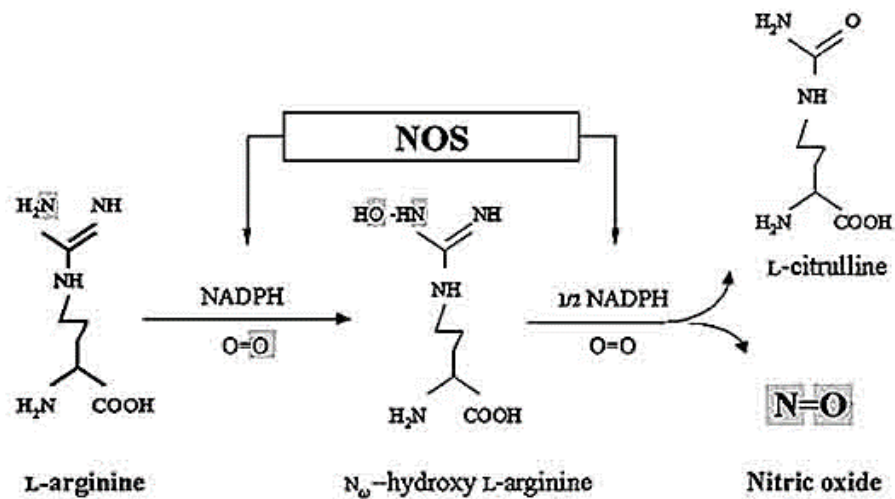


Figure 1: Biosynthèse d'oxyde nitrique (NO•) par la NOS d'après Torreilles (2001).

Le NO• endogène est synthétisé à partir de L-arginine dans une réaction catalysée par les oxyde nitrique synthétases (NOSs). Les électrons sont fournis par le NADPH au domaine réductase (partie C-terminale) de l'enzyme. La liaison de la calmoduline chargée en Ca^{2+} permet le transport de ces électrons jusqu'au groupement hème situé dans le domaine oxygénase (partie N-terminale) des isoformes eNOS et nNOS. Celui-ci active alors $1'O_2$. Il en résulte l'oxydation successive de la L-arginine en N-hydroxy-L-arginine, puis en L-citrulline avec libération de NO•. Les cofacteurs BH₄, FMN et FAD sont aussi requis.

Au contraire, pour autant que les substrats, O₂ et L-arginine, soient présents en quantité suffisante, l'expression de l'iNOS entraîne toujours une production de NO• à haut débit, de l'ordre du micro-molaire, et sur des périodes plus soutenues (Alderton et al., 2001 ; Bogdan, 2001 ; Feihl et Liaudet, 2002 ; Xie et Nathan, 1994).

Le rôle du NO• dans les milieux biologiques est dicté par sa chimie. Le NO• est une petite molécule lipophile et de nature gazeuse qui, pour cette raison, traverse facilement les membranes cellulaires pour y activer ses cibles moléculaires. En vertu d'un électron non apparié, le NO• répond à la définition d'un radical libre, mais n'est pas pour autant très réactif en lui-même. Il possède néanmoins un large éventail d'effets biologiques, physiologiques et pathologiques, basés sur l'une ou l'autre des trois groupes distincts de réactions : avec les métaux de transition (Fe²⁺, Fe³⁺, Cu⁺, Cu²⁺, etc.), avec l'O₂, ou avec les autres radicaux libres comme l'ion superoxyde (O₂•⁻). L'interaction préférentielle avec telle ou telle molécule dépend de la concentration de NO libérée localement (Feihl et Liaudet, 2002 ; Grisham et al., 1999 ; Wink et Mitchell, 1998).

Etant donné que le NO• produit par ces trois isoformes est associé à des processus physiologiques particuliers⁴, des défauts dans leur expression, conduisant à un excès ou à déficit dans la production du NO•, peuvent entraîner le développement de nombreuses pathologies⁵ dans le cadre d'un même évènement physiologique (voir les revues Billiar, 1995 ; Grisham et al., 1999 ; Kröncke et al., 1998 ; Lowenstein et al., 1994 ; Mayer et Hemmens, 1997 ; Moncada et Higgs, 1993 ; Moshage, 1997 ; Nathan, 1992 ; Singh et Evans, 1997 ; Wink et Mitchell, 1998 ; Wink et al., 2001).

⁴ Principalement impliquées dans les processus biochimiques et physiologiques de l'homéostasie, eNOS et nNOS jouent un rôle dans la régulation de la transduction du signal, le péristaltisme, la relaxation des muscles lisses et la neurotransmission. Les autres effets vitaux des cNOSs incluent l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, la modulation de la pression artérielle et la potentialisation de la mémoire à long terme. Quant au NO• produit par l'iNOS dans les cellules de macrophage activées, il agit comme agent cytotoxique dans la défense immunitaire contre les microorganismes et les cellules tumorales.

⁵ Cependant, une altération dans l'expression correcte des cNOSs peut conduire à plusieurs conditions pathophysiologiques telles que l'hypertension, l'athérosclérose, les maladies coronaires, les attaques cardiaques, l'hypertension pulmonaire, l'impuissance, les complications vasculaires dans le diabète sucré, les ulcères gastro-intestinaux, l'asthme et autres désordres systémiques ou du CNS. En outre, suite à l'activation de l'iNOS, les hauts niveaux de NO• produits engendrent un certain nombre de maladies inflammatoires chroniques comme le diabète juvénile, l'arthrite, l'hépatite, les maladies inflammatoires de l'intestin, les chocs septiques et hémorragiques, et certains désordres auto-immuns comme la sclérose multiple ou sclérose en plaque (SEP). L'expression chronique du NO• est aussi associée à divers carcinomes.

Pour conclure ce survol biologique, le NO• se caractérise par une intrication d'effets potentiellement favorables et dangereux pour l'hôte. Par conséquent, une intervention sur sa production pourrait se révéler propice à des fins thérapeutiques. Pour notre présente étude, nous nous sommes intéressés particulièrement à la voie de transduction du signal impliquant l'enzyme iNOS.

II.2 La quantification du NO• et de l'iNOS

Il est maintenant admis que l'augmentation de la production de NO• suivant l'induction de l'iNOS est impliquée dans la pathogénèse de l'inflammation (Korhonen et al., 2005 ; Kröncke et al., 1998 ; Nussler et Billiar, 1993). Cette voie de transduction peut être régulée à de multiples niveaux⁶. Ainsi chaque séquence d'événement, de l'activation du gène de l'iNOS à l'expression de la protéine iNOS jusqu'à la production du NO•, peut être identifiée comme une cible thérapeutique potentielle (Aktan, 2004). De nos jours, nous disposons de nombreux outils moléculaires, biochimiques et pharmacologiques pour pouvoir doser ces différentes cibles. Grâce à ces techniques et à la cascade d'évènements de la voie du iNOS/NO•, plusieurs cibles peuvent être exploitées, donnant ainsi de multiples possibilités de criblage de nos plantes médicinales utilisées dans le traitement de la ciguatera.

II.2.1 Méthodes d'évaluation de la production du NO•

Les propriétés chimiques et physiques du NO•, sa réactivité, sa rapidité de diffusion, sa courte demi-vie de 6 à 50 secondes et le fait que les concentrations de ce radical varient du pico- à la micromole dans les milieux biologiques, compliquent sa quantification (Archer, 1993 ; Hetrick et Schoenfisch, 2009). Malgré ces difficultés, plusieurs méthodes directes et indirectes de détermination du NO• et de ses produits ou métabolites ont émergé.

Les tests de détection directe du NO• incluent la détection par chimioluminescence, la fluorimétrie, la spectrophotométrie, la résonance paramagnétique électronique (RPE) et la détection électrochimique.

⁶ L'expression de l'iNOS est essentiellement régulée au niveau transcriptionnel (cytokines, facteurs de transcription, etc.) mais également au niveau post-transcriptionnel, translationnel et post-translationnel.

Les méthodes indirectes comprennent la détermination de la L-arginine, la L-citrulline ou de métabolites biologiques stables du NO• comme les nitrites, les nitrates, les S-nitrosothiols, la 3-nitrotyrosine par la spectrophotométrie, la fluorimétrie, la chromatographie, la spectroscopie de masse, l'électrophorèse ou la radiométrie (voir les revues d'Archer, 1993 ; Nagano, 1999 ; Tarpey et al., 2004 ; Yao et al., 2004 pour toutes ces techniques).

Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients. La chimioluminescence est la méthode de détection directe du NO• la plus sensible et la plus spécifique mais le détecteur est coûteux et nécessite une importante maintenance, ce qui le rend inaccessible à de nombreux laboratoires (Archer et al., 1995 ; Ridnour et al., 2000). En outre, si cette méthode est très utile pour les applications liées au gaz exhalé, elle n'est pas efficace dans la détection du NO dans les liquides biologiques (Yao et al., 2004), en particulier dans les échantillons contenant de l'albumine ou du sang qui ont tendance à former de la mousse durant les tests (Archer, 1993).

La détection par microcapteurs électrochimiques permet la détection en temps réel et semble une technique prometteuse pour les mesures *in vivo*. Cependant, cette technique n'a pas trouvé une large application en raison d'un encrassement naturel et d'une information uniquement spatiale, influencée par le placement de l'électrode (Brunet et al., 2000 ; Zhang, 2004).

L'utilisation de sondes fluorescentes permet un monitoring temporel et spatial *in vivo* et *in situ* à des limites de détection très basses (Gomes et al., 2006). Cette technique souffre toutefois d'interférences avec les fluides biologiques et d'une faible stabilité des sondes (Yao et al., 2004). De plus, pour beaucoup de laboratoires, un investissement dans la fluorimétrie reste relativement onéreux.

La RPE permet une quantification directe du NO• dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Cette technique admet néanmoins une limite de détection relativement élevée (1 μM) et son lourd appareillage ne lui permet pas d'être utilisée en routine (Archer, 1993 ; Yao et al., 2004).

La détection indirecte par chromatographie associée à la spectrométrie de masse a également fourni un moyen sensible de mesure de la concentration du NO• dans des solutions, mais ces méthodes requièrent des instruments coûteux et très spécialisés, nécessitant un personnel hautement qualifié ainsi que des frais de maintenance élevés (Ridnour et al., 2000).

Pour les mesures par spectrophotométrie, les taux de NO• sont évalués soit directement en quantifiant la formation de méthémoglobine à la suite de l'oxydation induite par le NO• de l'oxyhémoglobine, soit indirectement par l'analyse de la concentration en nitrites en utilisant le test de Griess. La détection du NO• par spectrophotométrie *via* l'oxydation des oxyhémoglobines est limitée car ce composé est assez instable, non disponible dans le commerce et doit donc être préparé avant chaque test (Nims et al., 1995 ; Ridnour et al., 2000). Considérant la capacité oxydante de NO•, d'autres réactifs comme le ferricyanure ou l'ABTS [(2,2'-azion-bis- (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] peuvent également être utilisés à la place des oxyhémoglobines. L'oxydation par le NO• induit un changement dans la couleur quantifiable par spectrophotométrie. Bien que relativement simple et facile à mettre en place, ces essais ne sont pas spécifiques car d'autres espèces réductrices produites pendant l'activité normale des cellules pourraient intervenir dans l'oxydation de ces produits (Yao et al., 2004).

Quant au test de Griess, il n'est pas sujet à de telles interférences (Yao et al., 2004). Ce test est rapide et facile à mener pour une estimation indirecte du NO• *via* la mesure des nitrites (NO₂⁻). Bien qu'elle ne soit pas aussi sensible (de l'ordre de la micromole) que la chimioluminescence et que des particules colorées ou en suspension dans les échantillons peuvent interférer dans les lectures spectrophotométriques, cette technique représente la solution la plus simple pour quantifier les émissions du NO•, même pour les laboratoires ne disposant que d'un équipement de base (Archer et al., 1995 ; Miranda et al., 2001).

II.2.2 Méthodes d'évaluation de l'expression de l'iNOS

La voie de transduction du signal conduisant à la production du NO• *via* l'activation de l'iNOS consiste en une longue chaîne d'événements qui implique la transcription de

l'acide désoxyribonucléique (ADN) en acide ribonucléique messenger (ARNm), suivie par sa traduction en un produit protéique actif (Aktan, 2004). Les récents progrès dans les techniques moléculaires et immunochimiques ont ouvert la voie à de nombreuses méthodes d'analyse qui permettent de quantifier, en parallèle du NO•, les taux d'ARNm et de protéine iNOS.

Le Western Blot ou immunoblot est la méthode utilisée pour détecter une protéine dans un échantillon donné d'homogénat de tissu ou d'extrait *via* des anticorps spécifiques. Bien que spécifique pour détecter une protéine particulière, les limites du Western blot sont nombreuses. La procédure nécessite du temps et un travail laborieux, souffre d'un manque de précision quantitative, et son interprétation reste largement subjective (analyse quantitative ou seulement semi-quantitative). Sa haute sensibilité et spécificité dépendent de la standardisation de la technique et requièrent une grande qualification des manipulateurs ainsi qu'une bonne organisation du laboratoire. D'autres techniques utilisant également des anticorps peuvent servir à la détection des protéines dans les tissus (immunohistochimie) et les cellules (immunocytochimie) : elles sont de plus en plus utilisées dans la détection de l'iNOS (cf. Chandler et Colitz, 2006 ; Crabbé et Laga, 1999).

Basée sur la réaction de polymérisation en chaîne, la qPCR est une technique d'amplification permettant de multiplier les copies d'une séquence spécifique d'acides nucléiques, et est un puissant outil pour mesurer l'expression différentielle des gènes au niveau des ARNm. Du fait de sa très grande sensibilité, la qPCR est une méthode de choix pour déterminer quantitativement ou semi-quantitativement l'expression relative de gènes qui sont exprimés à un niveau très bas dans un test à haut débit (cf. Bustin, 2000 ; Chandler et Colitz, 2006). Bien que très rapide, ce test reste relativement cher, nécessitant des réactifs et un matériel sophistiqués.

III. La sélection et le principe des tests

Compte tenu de la panoplie de techniques décrites ci-dessus, un certain nombre de ces méthodes peut être appliqué à notre présente étude pour confirmer si la P-CTX-1B, la CTX la plus toxique et majoritaire dans le Pacifique, induit la production de NO• et si ce

haut niveau de production résulte bien de l'activation enzymatique de l'iNOS. La sélection des méthodes fut fondée sur ce qui semblait le plus approprié à notre étude et en même temps a été arbitrée en fonction des possibilités du laboratoire en termes de matériel, d'équipements et d'expertise. La disponibilité en P-CTX-1B pure étant un facteur extrêmement limitant, l'évaluation du NO•, en plus d'être robuste et précise, devait donc être miniaturisée.

En conséquence, le test de quantification indirecte du NO• par le TG, en utilisant le spectrophotomètre pour microplaques, a été retenu. Ensuite, la technique de qPCR a été utilisée afin de confirmer que la production du NO• résultait bien de l'activation enzymatique de l'iNOS. Une brève introduction aux principes de cette technique est décrite ci-dessous.

III.1 Test de Griess – Test biochimique

Cette méthode repose sur la réaction des deux composés, sulfanilamide et N-naphtyl-éthylènediamine (NED), avec des ions nitrites en milieu acidifié.⁷ Le NO• produit par les cellules est spontanément converti en nitrite et relargué dans les surnageants cellulaires. La réaction des nitrites au réactif de Griess conduit à la formation d'un complexe coloré de rose à pourpre. En absence de nitrite, le réactif reste incolore. La formation de chromophore dont l'intensité dépend de la concentration en nitrite dans les échantillons est ensuite mesurée par spectrophotométrie à la longue d'onde de 540 nm (Ivanov, 2004 ; Miranda et al., 2001).

III.2 Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative – Test biomoléculaire

La technique PCR est fondée sur l'amplification des séquences d'ADN, permettant d'identifier leur présence. La qPCR étend l'utilité de la PCR grâce à la quantification de cette amplification par l'incorporation d'un agent intercalant fluorescent mesurée au cours de la phase exponentielle du processus.

⁷ Il s'agit d'une réaction de diazotation en deux étapes : les nitrites forment un sel de diazonium avec la sulphanilamide qui est ensuite couplé avec la N-(1-naphtyl)éthylène-diamine ce qui génère un colorant azoïque qui absorbe à 540 nm.

La PCR repose sur deux principes. Elle est basée premièrement sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser les brins complémentaires d'une molécule d'ADN à partir d'une molécule d'ADN matrice, donnant ainsi naissance à une molécule d'ADNc double-brin. Pour initier le processus sur chaque brin, un petit segment d'acide nucléique de séquence complémentaire à celle du brin à amplifier doit s'y associer afin de servir d'amorce. Le deuxième principe de la PCR repose sur le contrôle de la température qui est ainsi associée aux différentes étapes de dénaturation, hybridation et élongation de cette technique. En effet, la PCR consiste en une succession cyclique de ces trois étapes.

La première étape d'une PCR classique consiste en la séparation par la chaleur des deux brins d'ADN par rupture des liaisons hydrogènes, et la deuxième en l'hybridation des amorces complémentaires à ces brins d'ADN. Cette association est finalement suivie de leur élongation par l'enzyme polymérase, aboutissant ainsi à la synthèse d'un ADNc double brin. Ainsi chaque cycle, correspond au doublement du nombre de copies de l'information génétique (Ameziane et al., 2005 ; Tse et Capeau, 2003).

L'amplification du matériel génétique à partir de l'ARNm nécessite une étape supplémentaire en début de cycle. La transcriptase inverse est une enzyme qui transcrit l'information génétique de l'ARNm en ADNc. Cette propriété est très utile car l'utilisation de l'ADNc simple brin produit par la reverse transcriptase permet d'effectuer par la suite une PCR classique.

Ainsi, en ajoutant des séquences d'amorce spécifique, par exemple celle de l'iNOS, nous pouvons sélectionner l'amplification des molécules d'ADNc correspondantes aux molécules d'ARNm cibles de départ. L'intensité de la fluorescence, qui augmente proportionnellement à chaque molécule d'ADN amplifiée, est mesurée en fin d'élongation de chaque cycle de la qPCR. Ce test permet donc de mesurer la cinétique d'accumulation d'une séquence d'information génétique ciblée par la fluorescence dans un délai très bref, avec en plus l'avantage de ne nécessiter aucun traitement post-PCR, permettant une diminution considérable du risque de contamination du produit de PCR.

IV. Matériel, méthodes et résultats

Pour ces expérimentations, deux lignées cellulaires furent utilisées : les neuroblastomes Neuro-2a (utilisées préalablement pour évaluer la cytotoxicité induite par les CTXs) et les macrophages RAW 264.7 (utilisés généralement pour analyser l'expression de l'iNOS). Ces cellules cultivées en masse en flacons de culture de 75 cm², ont été incubées dans le même milieu, mais en microplaques à 24 et 96 puits pour les expériences. Leur réponse à l'addition de P-CTX-1B fut analysée comparativement à celle du LPS, endotoxine bactérienne facilement disponible et reconnue pour son pouvoir inducteur de l'iNOS et sa capacité à produire des concentrations significatives de NO•.

Pour le TG, les valeurs de densité optique ont été enregistrées à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaque à 96 puits. Quant à la réaction de qPCR, la fluorescence a été mesurée à 522 nm dans un spectrofluorimètre à 32 tubes capillaires portés sur un carrousel (LightCycler 2.0, Roche Applied Science, Auckland, New Zealand).

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal *Nitric Oxide* (Publication 1). Les matériels et les méthodologies utilisés ainsi que les résultats obtenus y sont décrits.

Publication 1

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



Contents lists available at ScienceDirect

Nitric Oxide

journal homepage: 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^a, Mariko Matsui^{a,b}, Mireille Chinain^c, Dominique Laurent^a, Serge Pauillac^{b,*}

^aLaboratoire 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

^bLaboratoire des Biotoxines, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, 9-11 Avenue Paul Doumer, BP 61, 98845 Noumea, New Caledonia

^cLaboratoire 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 μ M range after 48 h of RAW 264.7 cells exposure to LPS and P-CTX-1B (0.05 μ 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*_ω-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 μ 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⁺ 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⁺ and Ca²⁺ concentrations [17]. The blockade of voltage-gated K⁺ channels [18] and activation of L-type Ca²⁺ 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 (pares-thesis, 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 patho-nomonic 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, pauillac_serger@hotmail.com (S. Pauillac).

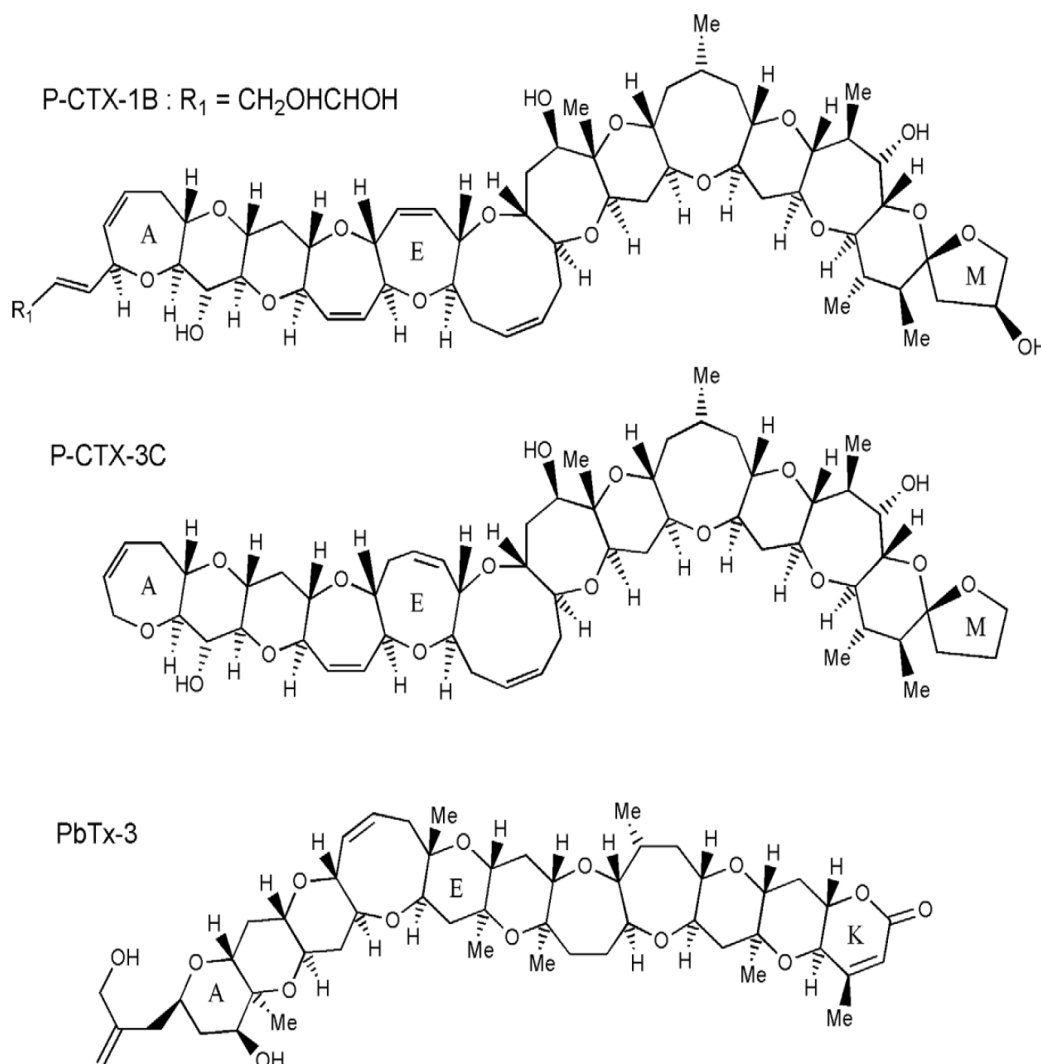


Fig. 1. Chemical structure of some polyether marine neurotoxins (P-CTXs: Pacific ciguatoxins; PbTxs: brevetoxins).

profiles, individual susceptibility and previous intoxication episodes [4].

Generally acute or subacute, certain CFP symptoms, particularly observed in Pacific insular inhabitants, like fatigue, algia, depression, pruritus and peculiar feeling in extremities, can persist in varying severity for weeks to months or recur periodically [4,21,24,25]. This state of disorder is also known as chronic fatigue syndrome (CFS) [25,26]. Increasing evidences have been relating elevated nitric oxide (NO) production as a cause of CFS [27–29]. Indeed observations that infections that precede and may therefore induce CFS, act to induce excessive production of inflammatory cytokines which, in turn, is known to stimulate the inducible nitric oxide synthase (iNOS) [30]. Likewise several lines of scientific investigation show that NO generated through iNOS plays a critical role in inflammation, central neuronal sensitization and in the generation and maintenance of neuropathic pain states [31,32]. iNOS expression markedly increases during the pathogenesis of urticarial diseases in mouse and human models [33,34]. Persistent itching often experienced in chronic CFP, can present as a dermatologic allergy [20,24]. Regarding the cardiovascular symptoms of CFP, it is well established that at physiological levels, NO plays a major role in the regulation of blood pressure and vascular tone. However, uncontrolled NO

release by iNOS mediates hypotension and is involved in mechanisms underlying cardiovascular dysfunction [35–37].

We believe that above mentioned myriad of CFP symptoms including the prolonged allergy-like effects cannot be exclusively accounted by the sole blockade of VSSC [15] and that NO may play a potential etiological role. Therefore, this study was undertaken to determine whether P-CTX-1B up-regulates NO and iNOS expression in two *in vitro* murine experimental models. We compared the effects of a potent iNOS inducer, lipopolysaccharide (LPS) and P-CTX-1B on neuroblastoma Neuro-2a, and on macrophage RAW 264.7 cell lines. NO production was quantified by measuring nitrite levels present in cellular supernatant using Griess reagent and iNOS mRNA expression was monitored by Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

To the best of our knowledge, this is the first experimental study presenting evidence that CTXs are capable of enhancing the production of NO via the induction of iNOS in a mammalian model. Owing to the importance of NO as a pleiotropic biological and pathophysiological mediator in various mammalian tissues, characterisation of the potential effects of CTXs on NO induction in macrophages is of significance. These findings can be further exploited to in the search of newer, effective treatments, especially to study the traditional remedies preferentially used against CFP in the Pacific [38,39].

Materials and methods

Materials

The Neuro-2a mouse neuroblastoma cell line (CCL 131) was obtained from the American cell type culture collection (ATCC, Rockville, USA) while the murine macrophage cell line RAW 264.7 (TIB-71) was generously provided by Dr. M. Adib-Conquy (Pasteur Institute, Paris, France). Ciguatoxin (P-CTX-1B) was isolated at the Louis Malarde Institute (Tahiti, French Polynesia) from moray eel liver (*Gymnothorax javanicus*) using organic solvent extraction and a combination of low and high pressure liquid chromatography as previously described [40]. Thiazolyl blue tetrazolium bromide (3-(4',5'-dimethylthiazol-2'-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) or MTT, sulfanilic acid (SA), *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NEDD), lipopolysaccharide (*Escherichia coli*, 0111:B4; LPS), sodium nitrite, *N*_ω-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) and all reagents used during cell culture were obtained from Sigma Aldrich (Lyon, France). While those used for RT-PCR were purchased from Roche Applied Science (Auckland, New Zealand), except when stated otherwise.

Cell culture

Neuro-2a cells were maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) medium buffered with 25 mM HEPES to which 2 mM L-glutamine, 0.2% of sodium bicarbonate and 1 mM sodium pyruvate were added. 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 and 2 mM L-glutamine. Both culture media were supplemented with 10% foetal bovine serum, and 1% of antibiotic and antimycotic solution containing penicillin (10,000 U), streptomycin (10 µg/ml) and amphotericin B (25 µg/ml). All cultures were maintained in a humidified incubator in 5% CO₂ at 37 °C and cells were split two times a week.

Cell viability assay

Cell viability was determined via MTT assay according to previous methods [15,40]. This assay is based on the capacity of mitochondrial succinyl dehydrogenase of viable cells to convert the soluble yellow tetrazolium salt into an insoluble formazan product. Briefly cells were seeded at 5.0×10^4 cells/well in 96-well plates and allowed to adhere. After 24 h LPS or P-CTX-1B diluted in complete growth medium were added to wells ($n = 6$) to give the final concentrations indicated under the figure legend. Controls without treatment were run in parallel in a minimum of 10 replicate wells. Following a 24- or 48-h incubation period with or without toxins, the medium was removed and the cells were further incubated for 1 h at 37 °C with 50 µl of a 0.7 mg/ml solution of MTT in phosphate buffered solution (PBS). The dark blue crystal formazan resulting from the reduction of MTT was dissolved by adding 150 µl of dimethyl sulfoxide (DMSO) and the plates were left for another 1 h of incubation. The optical density (OD) was measured at 490 nm using an ELISA plate reader (ELx 800, Bio-Tek Instruments, Inc., Fisher Scientific, France) and cell viability was estimated as the percentage absorbance of sample relative to control.

Determination of nitrite production

Neuro-2a and RAW 264.7 cells were seeded at 2.5×10^5 cells/well in 24-well plates and allowed to recover for 24 h before treatment by incubation in appropriate media containing LPS, P-CTX-1B and L-NAME, as indicated under the figure legends. Nitrite accumulation was determined as an indicator of NO production in the culture media, as previously described [41]. Briefly, samples (100 µl) of culture media were incubated with 100 µl of Griess reagent (1:1; 1% SA, 0.1% NEDD in 5% phosphoric acid solution) at room temperature for 10 min in 96-well plates. Absorbance at 540 nm was read using an ELISA plate reader (ELx 800, Bio-Tek Instruments, Inc., Fisher Scientific, France). Standard calibration curves were prepared using sodium nitrite as standard.

Total RNA isolation and cDNA synthesis

Following supernatant collection for nitrite quantification experiments, cells from each well were harvested with 400 µl of the PAXgene tube reagent (PreAnalytix, Qiagen, Doncaster, Australia), which induces total cell lysis and mRNA stabilization [42]. Using the High Pure RNA isolation kit as recommended by the manufacturer, total RNA was extracted from stimulated and non-stimulated cells with a final elution volume of 80 µl. cDNA was synthesized using the transcriptor first strand cDNA synthesis kit following the manufacturer's protocol, with the supplied random hexamers as the priming strategy. Nucleic acid concentrations were measured on a spectrophotometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany) at OD_{260nm} with 220–1600 nm cuvettes (Eppendorf). Purity of the RNA extracted was determined as the OD_{260nm}/OD_{280nm} ratio with expected values between 1.8 and 2.0.

Oligonucleotides

Considering that the choice of a reliable housekeeping gene is very important in quantitative PCR, glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH), β-actin and hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) were tested to determine the most suitable one (i.e. not influenced by the experimental treatment). Sequences of all primers used in this study were designed with the LightCycler Primer Probe Design Software 2.0 (Roche Applied Science) according to gene sequences retrieved from the GenBank® database. The following criteria were applied during this process: product size from 200 to 400 bp, primer size from 16 to 25 bp, and a mean melting temperature of 60 °C. Proposed oligonucleotides were selected according to intron spanning to prevent amplification of genomic DNA and percentage of G–C. Therefore, the following primer pairs were used to amplify the relevant target and reference genes: iNOS-1 forward, 5'-CCT CAT GCC ATT GAG TTC-3'; iNOS-1 reverse, 5'-AGT CAT GTT TGC CGT C-3' (349 bp product); iNOS-2 forward, 5'-AGC CTG TGA GAC CTT T-3'; iNOS-2 reverse, 5'-CGC TCC AAG ATT CCC TG-3' (333 bp product); β-actin forward, 5'-AAG AGA AGC TGT GCT ATG TT-3'; β-actin reverse, 5'-GTT GGC ATA GAG GTC TTT ACG-3' (251 bp product); GAPDH forward, 5'-TCA TCC CAG AGC TGA ACG -3'; GAPDH reverse, 5'-GGG AGT TGC TGT TGA AGTC-3' (213 bp product); HPRT forward, 5'-CCC TCT GTG TGC TCA AAG-3'; HPRT reverse, 5'-GTC AAG GGC ATA TCC AAC-3' (392 bp product). Primers were synthesized by Prologo Singapore Pty Ltd. (Biopolis, Singapore) and tested to ensure the amplification of single discrete bands with no primer-dimers.

Real-time PCR and amplification protocol

PCR amplification and analysis were achieved using LightCycler 2.0 instrument (Roche Applied Science) with software version 4.0. All reactions were performed with the LightCycler FastStart DNA master SYBR green I. The PCR method was optimised and specified to achieve a single band for iNOS and housekeeping genes by electrophoresis on a 1.8% agarose gel containing 0.2 µg/ml ethidium bromide in a TBE 1× buffer. Optimization included evaluation of different concentrations of cDNA, and MgCl₂ concentrations, thermal cycle programmes and design of PCR primers. After selection of the best parameters, the PCR reaction was carried out by using a final volume of 20 µl per reaction containing: (1) H₂O up to 20 µl; (2) 2.4 µl of 25 mM of MgCl₂; (3) 1 µl of 1 µM of each coupled primers; (4) 2 µl of 10× SYBR Green I reaction mix; and (5) 2 µl of cDNA. 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 three following steps: 95 °C for 8 s, 60 °C for 5 s, and 72 °C for 12 s, the fluorescence being read during this last step of elongation. Melting curve analysis was performed immediately after amplification at a linear temperature transition rate of 0.1 °C/s from 65 to 95 °C with continuous fluorescence acquisition.

Standard curve construction and quantitative evaluation of iNOS mRNA

For all target and reference genes, a standard curve obtained from serial dilutions of a known concentration of purified DNA was generated. This purified DNA consists of specific amplicon extracted from agarose gel with the MinElute gel extraction Kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations after a conventional PCR with specific primers. The copy number of the extracted DNA was calculated by classic methods using the Avogadro constant after measuring concentrations at OD_{260nm}. During the RT-PCR, fluorescent signal of each cycle is plotted against cycle number by the LightCycler software. The crossing point (Cp) or threshold cycle (Ct) 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 [43]. As the log of initial target copy number versus Cp gives a straight line, the standard curve with known amounts of cDNA was used to achieve the absolute quantification of iNOS or reference genes in unknown samples [43,44]. The log ranges of the different standard curves were from 10⁸ copies to 1 copy.

Two mathematical models are generally proposed for relative quantification of a target gene and here both were compared. The first method involves the use of standard curves and leads to the absolute quantification of mRNA in copy numbers per microlitre or per cells. Quantity is then normalised with a reference gene to correct specific errors due to minor differences in initial amount of RNA or differences in reverse-transcription efficiency [45]. The second model, named the "delta-delta Ct method", is calculated based on Ct difference with the equation: $\text{ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, where $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{target}} \text{ pulsed}} - C_{t_{\text{reference}}})_{\text{Time } X} - (C_{t_{\text{target}} \text{ control}} - C_{t_{\text{reference}}})_{\text{Time } X}$. Time X is any time point. The target gene is normalised to reference gene [46,47]. This model does not require standard curves but assumes the efficiency of target and reference gene to be identical and equal to 2.

Statistical analysis

The results from nitrite determination are reported as mean ± SD from individual determinations with at least three replicates. Differences between mean values were tested either with Wilcoxon–Mann–Whitney test with stratified data (an equivalent of the Student's *t*-test but computed from ranks) or Jonckheere–Terpstra test (an

equivalent of ANOVA but computed from ranks, a more powerful test than Kruskal–Wallis test for comparing K samples against ordered alternatives). As the number of observations were generally small, we chose to use *P*-values based on deriving the true distribution of the test statistic and then evaluating its tail area [48], therefore called exact *P*-values. All these calculations were performed with StatXact-3®, statistical software for exact distribution free inference using the algorithms developed by Mehta & Patel [48] for performing permutation tests. The *P*-value associated to each test was either based on complete enumeration of the original data or on a random subset ($N = 10,000$) of all possible outcomes in the reference set. Significance was accepted when $P < 0.05$. For PCR results, two-way ANOVA was used to study the association between toxin-stimulation time and the iNOS mRNA expression (GraphPad Prism® v4). Significance was accepted when $P < 0.05$.

Results

Viability of RAW 264.7 cells upon various incubation times and treatments

Owing to the relatively long incubation times used throughout the experiments, 24 h for cell recovery, followed by further incubation for 24–48 h with varying concentrations of LPS (0–500 ng/ml) or P-CTX-1B (0–6 nM), the cell viability was verified using MTT assay (Fig. 2). Neither LPS (Fig. 2A) nor P-CTX-1B (Fig. 2B), seem to affect the viability of cells after 24 h, whereas after 48 h, cell viability dropped slightly to 87 and 91%, respectively, for the higher concentrations. Thus despite some cytotoxicity, little to no impact on cell viability was observed with both toxins within the working concentration range.

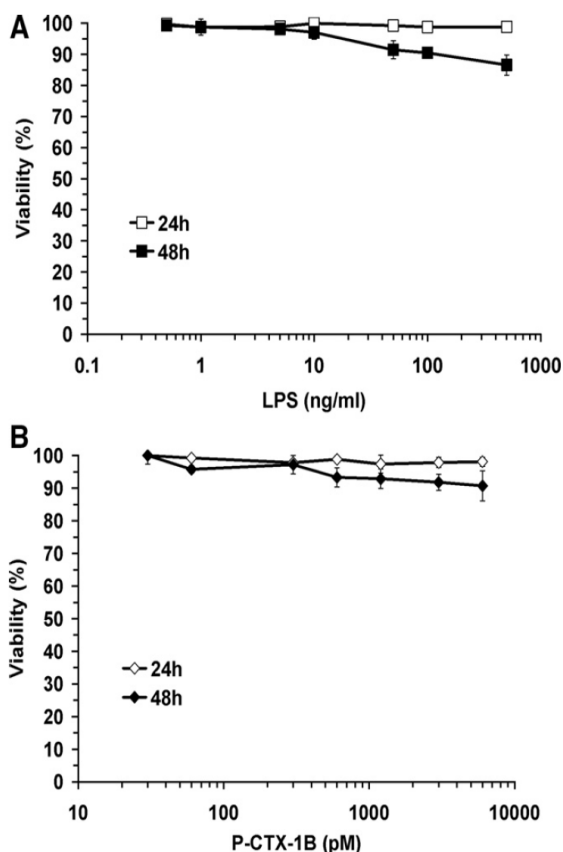


Fig. 2. Effects on the viability of RAW 264.7 cells upon various incubation treatments. Cells were seeded in 96-well tissue culture plates at a cell density of 5×10^4 cell/well in the DMEM. After 24 h, the indicated concentrations of LPS (A) or P-CTX-1B (B) were added and cells were further incubated for 24 h (open symbols) or 48 h (filled symbols). The cell response was verified by measuring the reduction of MTT at 490 nm. Data are means \pm SD of six replicates. Viability differed significantly with LPS and P-CTX-1B after 48 h only (Jonckheere–Terpstra test, *P*-value based on Monte-Carlo algorithm based on 10,000 of all possible outcomes in the reference set).

Measurement of nitrites

Adequate dilutions of sodium nitrite ranging from 0–25 μ M as the nitrite (NO_2^-) source were made in RPMI-1640- and DMEM-complete culture medium to which Griess reagent was added. The purple-colored azo compound formed was quantified spectrophotometrically at 540 nm. The accuracy of these standard curves was deduced from the respective values of the correlation coefficient which are very close to 1 (data not shown). The equation of the regression line ($\text{OD}_{540} = 0.03 \times [\text{NO}_2^-] - 0.0017$) obtained for the DMEM medium was used to determine LPS or P-CTX-1B-elicited cellular production of nitrite in 100 μ l of cell culture supernatant collected. This method has a detection limit of 1 μ M and is linear over the concentration range investigated.

Effects of LPS or P-CTX-1B treatment on Neuro-2a and RAW 264.7 cells

In the first set of experiments, we investigated the nitrite producing capacity of Neuro-2a and RAW 264.7 cells upon LPS and P-CTX-1B stimulation (Fig. 3). Even after 48 h of incubation period with both toxins, Neuro-2a cells failed to exhibit any detectable nitrite accumulation. However, with RAW 264.7 cells, no sooner than 24 h considerable difference in nitrite levels between control and treated cells was already observed (data not shown). This was even more evident after 48 h of incubation, averaging to 11.7 and 8.6 μ M for LPS and P-CTX-1B stimulation, respectively.

Effects of increasing concentration of LPS or P-CTX-1B on nitrite production

In order to further investigate the capacity of P-CTX-1B to induce nitrite production in RAW 264.7 cells, a dose–response curve was constructed (Fig. 4). Nitrite accumulation elicited by P-CTX-1B (Fig. 4B) is comparable to that elicited by LPS (Fig. 4A) with respect to the shape of the dose–response curves. However, the levels produced by P-CTX-1B were approximately 2-fold lower than that of LPS, except for the highest concentration of 6 nM at 48 h. Extension of incubation times from 24 to 48 h resulted in a dramatic increase in nitrite accumulation for both toxins. Therefore, with both toxins, NO production increases in a dose- and time-dependant manner.

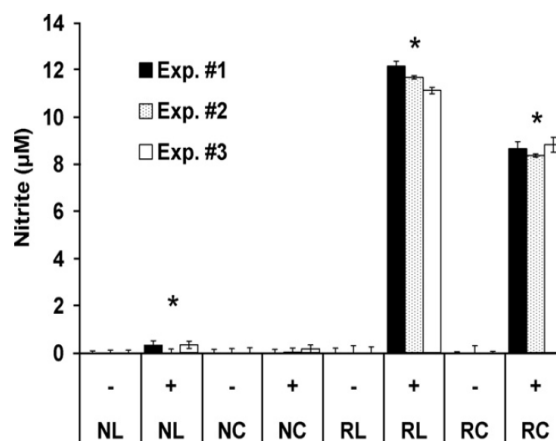


Fig. 3. Comparative ability of Neuro-2a and RAW 264.7 cells to produce nitrite in response to stimulation with LPS or P-CTX-1B. Neuro-2A (N) and RAW 264.7 (R) cells were seeded in 24-well tissue culture plates at a cell density of 2.5×10^5 cell/well in their corresponding medium. After 24 h, the cells were further incubated for 48 h in presence (+) or absence (–) of LPS (L: 0.5 μ g/ml) or P-CTX-1B (C: 3 nM). The amount of NO released by cells was measured by the method of Griess reaction. Each bar represents the mean \pm SD of nitrite concentration from three independent experiments done in triplicate. Asterisks indicate significant effect (Wilcoxon–Mann–Whitney test with stratified data, *P*-value based on complete enumeration of the original data).

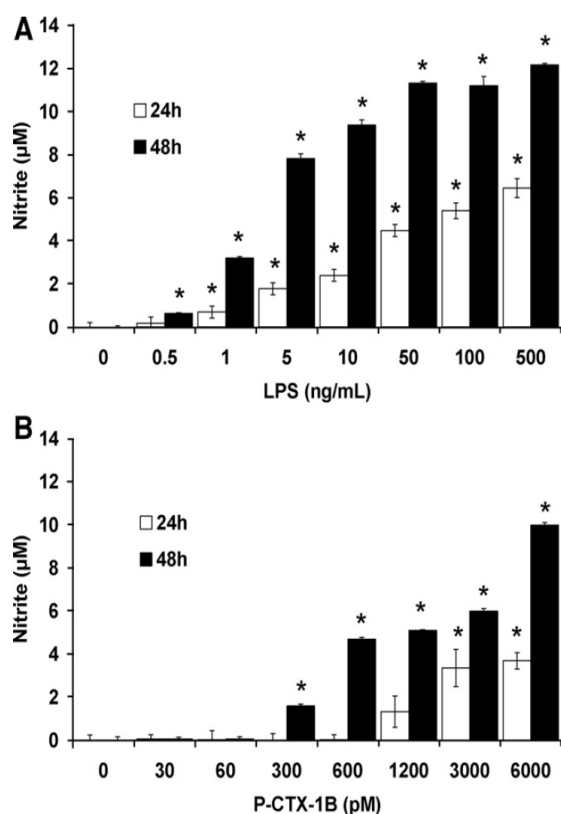


Fig. 4. Dose–response curves for LPS and P-CTX-1B-elicited nitrite production by RAW 264.7 cells. Cells were seeded in 24-well tissue culture plates at a cell density of 2.5×10^5 cell/well in the DMEM and left for 24 h. At the end of an incubation time of either 24 h (open bar) or 48 h (filled bar) with the indicated concentrations of LPS (A) or P-CTX-1B (B), 100 μ l of culture supernatant was subjected to nitrite determination using the Griess reaction. Each bar represents the mean \pm SD of nitrite concentration from a representative experiment done in triplicate. Nitrite concentration differed significantly for LPS and P-CTX-1B concentrations after 24 and 48 h (Jonckheere–Terpstra test, *P*-value based on Monte-Carlo algorithm based on 10,000 of all possible outcomes in the reference set). Asterisks indicate significantly higher values (Wilcoxon–Mann–Whitney test with stratified data, *P*-value based on complete enumeration of the original data).

Time-course nitrite production elicited by LPS or P-CTX-1B

We further explored the time-course effects of P-CTX-1B on the production of nitrite in RAW 264.7 cells, comparing the response to that of LPS-pulsed cells (Fig. 5). The nitrite levels in supernatants from RAW 264.7 cells treated either with or without LPS (Fig. 5A) or P-CTX-1B (Fig. 5B) were determined after 0, 12, 24 and 48 h of incubation. The incubation conditions induced a lag phase of 12 and 24 h for LPS and P-CTX-1B, respectively. This phase was followed by an increased output of NO rapidly converted into measurable nitrites. As mentioned above prolonging the incubation times from 24 to 48 h resulted in a dramatic increase in nitrite accumulation, especially in P-CTX-1B-treated cells (from 5 to 13 μ M).

Quantitative real-time RT-PCR analysis of the iNOS mRNA level

In order to confirm the origin of the nitrite accumulation in RAW 264.7 treated with P-CTX-1B, we employed quantitative RT-PCR (Fig. 6) using two sets of primers for iNOS and 3 commonly used housekeeping genes (GAPDH, HPRT and β -actin). We compared P-CTX-1B (Fig. 6B) and LPS (Fig. 6A) effects on RAW 264.7 cells. Standard curves from the five DNAs were highly reproducible and exhibited identical amplification efficiency of ~ 1.9 , a condition

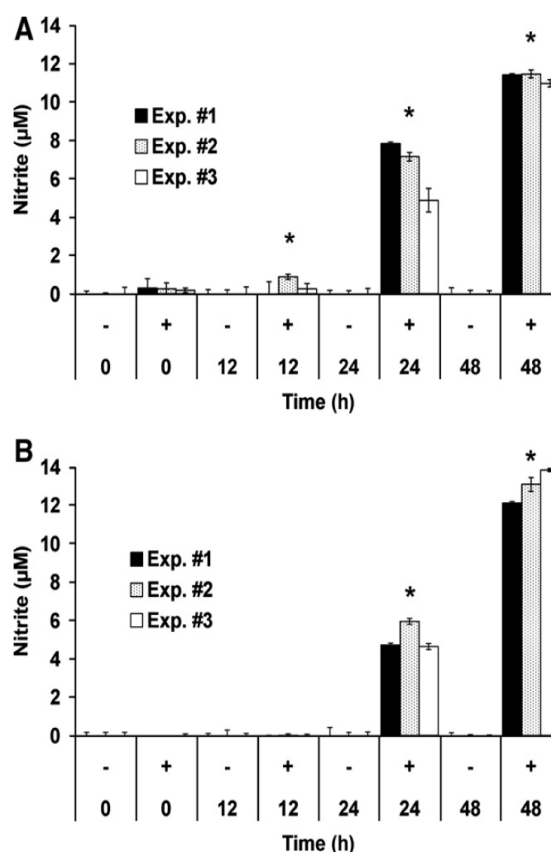


Fig. 5. Time-dependent effect of LPS or P-CTX-1B on the production of nitrite in RAW 264.7 cells. Cells were seeded in 24-well tissue culture plates at a cell density of 2.5×10^5 cell/well in the DMEM. After 24 h, the cells were further incubated for a maximum of 48 h in presence (+) or absence (–) of LPS (A: 0.5 μ g/ml) or P-CTX-1B (B: 3 nM). Following various incubation times, 100 μ l of culture supernatant was subjected to nitrite determination using the Griess reaction and corresponding cells were harvested for RT-PCR experiments (see legend of Fig. 6). Each bar represents the mean \pm SD of nitrite concentration from three independent experiments done in triplicate. Asterisks indicate significant effect (Wilcoxon–Mann–Whitney test with stratified data, *P*-value based on complete enumeration of the original data).

necessary for the comparative “delta-delta Ct” method. However, as GAPDH expression level remained more constant between Neuro-2a and RAW 264.7 cell lines and under the various experimental conditions tested, this housekeeping gene was preferred. For the same reason, the couple primer iNOS-1 was chosen (data not shown). Results in Fig. 6 are expressed as fold change of the ratio of iNOS mRNA expression relative to their respective negative controls after normalisation against GAPDH expression. iNOS mRNA expression was hardly detectable in RAW 264.7 cells after 1 h but was highly responsive to LPS- and P-CTX-1B-stimulation after 4 and 8 h (~ 10 - and 24-fold increase, respectively). The expression patterns then differed, as after this time, LPS-induced iNOS expression gradually decreased to reach negligible level at 48 h (only 2-fold), whereas P-CTX-1B-induced iNOS expression alternated, slightly decreasing at 12 h to 19-fold, then increasing at 24 h to 27-fold and once again decreasing to 16-fold at 48 h.

Effects of L-NAME on LPS- or P-CTX-1B-induced NO production

To further assess if the nitrite accumulation in the cellular supernatant was effectively due to NOS modulation, RAW 264.7 cells were pulsed with LPS or P-CTX-1B in presence or absence of the stereoselective NOS inhibitor, L-NAME (Fig. 7). As already shown, stimulated cells produced nitrite in large quantities after

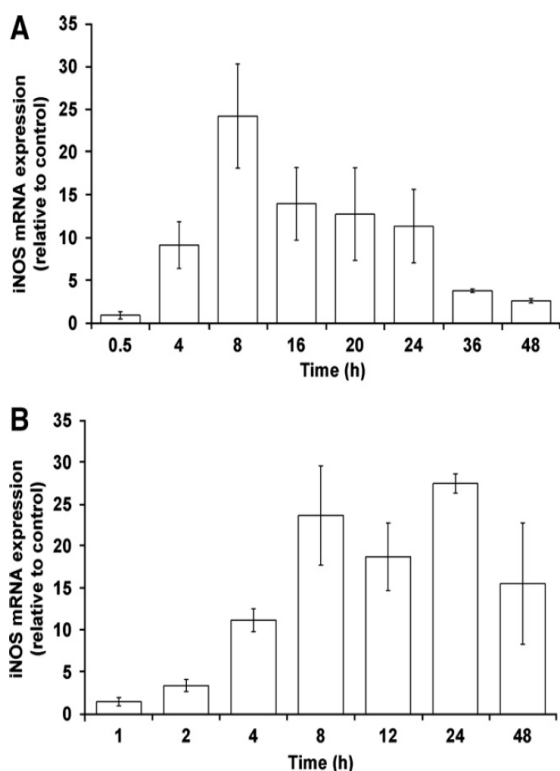


Fig. 6. Time-course LPS or P-CTX-1B-elicited iNOS mRNA expression in RAW 264.7 cells. For cell culture and treatment, see legend of Fig. 5. At each time point, total RNA were purified from the cells, corresponding cDNA were synthesised, and RT-PCR for iNOS and reference genes were performed in duplicate. Results are expressed as fold increases of the ratio of iNOS mRNA expression relative to their respective negative controls after normalisation against GAPDH expression using the “delta-delta Ct” method. Shown are the mean \pm SD of two (A: LPS) or three (B: P-CTX-1B) observations. Comparison with control leads to a P -value ≤ 0.05 calculated by ANOVA.

48 h of incubation ($\sim 10 \mu\text{M}$), while co-treatment of cells with L-NAME (10 mM), markedly inhibited this production ($< 1 \mu\text{M}$). In contrast, iNOS mRNA expression was not significantly affected by L-NAME (data not shown).

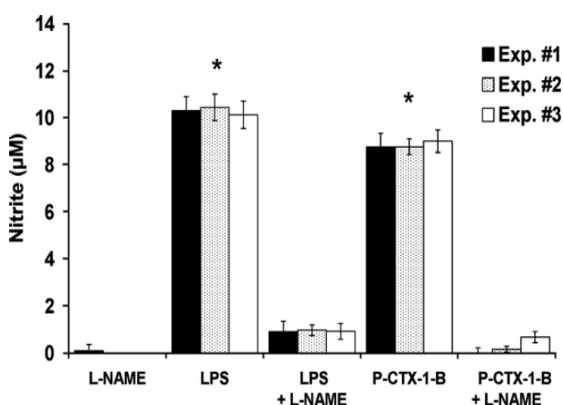


Fig. 7. Inhibitory effect of L-NAME on LPS or P-CTX-1B-induced NO production in RAW 264.7 cells. Cells were seeded in 24-well culture plates at a cell density of 2.5×10^5 cells/well in the DMEM. LPS (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or P-CTX-1-B (3 nM) or L-NAME (10 mM) or a combination of P-CTX-1-B + L-NAME or LPS + L-NAME was added and the cells were incubated for 48 h. At the end of the incubation time, 100 μl of culture supernatant was subjected to nitrite determination using the Griess reaction. Each bar represents the mean \pm SD of nitrite concentration from three independent experiments done in triplicate. Asterisks indicate significant effect (Wilcoxon–Mann–Whitney test with stratified data, P -value based on complete enumeration of the original data).

Discussion

Data from this study confirm our hypothesis that P-CTX-1B induces NO production in murine macrophages RAW 264.7 cells via modulation of iNOS expression. In the past, the implication of NO in CFP, though proposed, was never clearly demonstrated by means of molecular or biochemical techniques.

In the present study, to ascertain the origin and role of NO in CFP, we compared two murine cell lines, the neuroblastoma Neuro-2a cells (used to assess CTXs-induced cytotoxicity) [40,49] and the macrophage RAW 264.7 cells (preferred for their iNOS expression) for their capacity to release NO upon LPS or P-CTX-1B treatment. We found that both LPS and P-CTX-1B induced a dose- and time-dependent increase in NO release in the RAW 264.7 cells only, with a maximum accumulation level of $\sim 10 \mu\text{M}$ reached after 48 h (Fig. 5). At the onset, the iNOS mRNA expression levels for both toxins show a similar trend, that is ~ 10 - and 24-fold increase to their respective negative controls at 4 and 8 h (Fig. 6). Thereafter, the kinetics of iNOS mRNA expression differed, as the level tends to gradually decrease for LPS in contrast to PCTX-1B, which seems to maintain longer the expression at relatively high levels. Thus LPS seems to modulate rapidly the production of NO, whereas P-CTX-1B is able to sustain this production by maintaining high, prolonged iNOS mRNA expression. Finally, the NO synthase inhibitor L-NAME (10 mM) significantly inhibited both the LPS and P-CTX-1B-induced NO production in RAW 264.7 cells, providing further evidence of the implication of iNOS in CFP.

It is well accepted that VSSC are primary targets of CTXs. Na^+ influx through the blocked open VSSC leads to membrane depolarization, causing spontaneous and/or repetitive action potential discharges and thereby enhancing membrane excitability. The chronicity and sensitisation of convalescent victims are attributed to the fact that CTXs, being lipid-soluble are difficult to eliminate, and thus inactivate permanently certain VSSC sub-types [4,17,21].

As the clinical picture of CFP is multifaceted, the unique effect of CTXs as VSSC activators seems insufficient. VSSC are the molecular targets for several other groups of biological toxins and venoms, binding to one of its several different receptor sites [50,51]. During certain spider and scorpion envenomations in humans, priapism and respiratory distress is experienced [52–59]. A number of studies in animal models, using selective blockers or inhibitors, have demonstrated that penile and muscular relaxations evoked by these VSSC activators are NO-mediated [52–58], notably via neuronal NOS (nNOS) pathway [57,58], while the activity of nNOS and iNOS has also been indicated for nociceptive and inflammatory responses during these envenomations [59,60]. In support to the role of NO in CFP, P-CTXs were found to induce penile erection in mice [61].

Recently CTXs have been reported to activate L-type Ca^{2+} channels that lead to extracellular Ca^{2+} influx. Inhibition of RBC CTXs-induced swelling by competitive, non selective NOS antagonist N^G -methyl-L-arginine (L-NMA) underlined the involvement of NO via NOS pathway that may lead to subsequent activation of L-type Ca^{2+} channels [19].

Based on studies showing upregulation of certain inflammatory cytokines and elevation of L-citrulline and neopterin (a by- and a side-product, respectively, synthesized by NOS) levels in urine and serum of CFS patients [27–29], the following theory [62] was proposed for CFS etiology in CFP: excessive N -methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activity due to prolonged VSSC activity results in influx of Ca^{2+} , leading to activation of constitutive NOS (cNOS) and production of NO. The latter reacts with superoxide radicals (O_2^-) to produce peroxynitrite anion (ONOO^-), a noxious oxidant. This anion creates an oxidative stress that will activate the transcription factor NF- κB , which in turn stimulates iNOS gene

transcription leading to further NO production and so forth on, thus furnishing to a self-sustaining vicious cycle.

Though the possibility that cNOS could be up-regulated by CTXs cannot be excluded, our experiments demonstrate P-CTX-1B inductive effects on the macrophage activation are due to iNOS expression. We believe that this modulation comes most probably through the activation of NF- κ B [63]. NF- κ B being a pleiotropic transcription factor also regulates the transcription of various other genes encoding the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6 [64]. Hence the cytokines mRNA expression profiles of RAW 264.7 cells after exposure to P-CTX-1B are currently under investigation in our laboratory and will be later studied in mice models.

Structural reminiscences of CTXs (Fig. 1), the brevetoxins (PbTx), extracted from the bloom-forming, marine dinoflagellate *Karenia brevis* [15,65–67], act on the same binding receptor (site 5) on the VSSC as CTXs [55,56,68,69]. PbTx is reported to induce injury in rat neurons mediated by NMDA receptors that are activated indirectly as a consequence of PbTx-induced VSSC activation [67,69,70]. This NMDA-mediated excitotoxic injury has been demonstrated to induce a delayed, but sustained activation of Ca²⁺-independent iNOS activity [71,72]. One of the PbTx analogues, PbTx-3 studied in our laboratory (data not shown), was unable to trigger NO production in RAW 264.7 cells at 1 μ M even after 48 h of incubation in spite the fact that this toxin like P-CTXs is able to induce penile erection in mice via nNOS activation [55,56]. Having stated that, it is noteworthy that PbTx-induced pathology rarely lasts more than few hours [69]. Thus P-CTX-1B iNOS inducing activity could explain its high toxicity observed over that of PbTx-3 or other congeners [15,73].

Though speculated, no direct experimental evidence exists on CTXs NMDA receptor enhancing signalling [69]. Thus it would be of interest to investigate this activity and its role in the P-CTX-1B-mediated iNOS induction. Likewise it would also be interesting to study various CTXs and like congeners possessing different *in vivo* potencies for their iNOS inductive capacities. This may enlighten the phenomenon of varying clinical symptomatology experienced due to different toxins profiles.

The role of NO in CFP provides new insight into the mode of action of these cyclic polyether marine neurotoxins, that other cellular mechanism than just the VSSC dysregulation is involved. Indeed this better explains the pleiotropic pathophysiology nature of ciguatoxicosis and hence provides a necessary step in designing specific treatment protocols. By far, treatment by western medicine still remains symptomatic and supportive [4,20]. It is worth mentioning that mannitol, like many of the drugs used for the treatment of CFP, is a free radical scavenger [20,74]. Similarly, some of the traditional herbal remedies commonly used in the Pacific region (e.g. *Davallia solida*) [75] contain mangiferin, a well-known NO inhibitor [76,77]. Therefore, it can be reasonably speculated that NO scavenging and even iNOS inhibitory activities can be of use as therapeutic effects in CFP. Hence these models are currently being exploited in our laboratory to study the beneficial activities of the plants used in traditional remedy in the Pacific.

In conclusion, our chemical and molecular biology data provide the first evidence of the implication of iNOS in CFP in *in vitro* mammalian model, opening the way for new therapies for both western and traditional medicines.

Acknowledgments

This work was partly funded by a grant from the French Overseas Ministry. S.K.-R. and M.M. were supported by a doctoral fellowship from IRD (Paris, France) and the Southern Province of New Caledonia, respectively. We thank Fanny Jeffroy for her technical assistance during the initiation of the present study and

Dr. Dominique Ponton (IRD, Nouméa, New Caledonia) for his valued assistance in statistical analysis.

References

- [1] R. Adachi, Y. Fukuyo, The thecal structure of a marine toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* collected in a ciguatera endemic area, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 45 (1979) 67–71.
- [2] M. Chinain, M.A. Faust, S. Pauillac, Morphology and molecular analyses of three toxic species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae): *G. pacificus*, sp. nov., *G. australes*, sp. nov., and *G. polynesiensis*, sp. nov., *J. Phycol.* 35 (1999) 1282–1296.
- [3] R.J. Lewis, The changing face of ciguatera, *Toxicon* 39 (2001) 97–106.
- [4] L. Lehane, R.J. Lewis, Ciguatera: recent advances but the risk remains, *Int. J. Food Microbiol.* 61 (2000) 91–125.
- [5] M. Murata, A.M. Legrand, Y. Ishibashi, T. Yasumoto, Structures of ciguatoxin and its congener, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 8929–8931.
- [6] R.J. Lewis, M. Sellin, M.A. Poli, R.S. Norton, J.K. MacLeod, M.M. Sheil, Purification and characterization of ciguatoxins from moray eel (*Lycodontis javanicus*, Muraenidae), *Toxicon* 29 (1991) 1115–1127.
- [7] M. Satake, M. Murata, T. Yasumoto, The structure of CTX-3C, a ciguatoxin congener isolated from cultured *Gambierdiscus toxicus*, *Tetrahedron Lett.* 34 (12) (1993) 1975–1978.
- [8] M. Satake, M. Fukui, A.M. Legrand, P. Cruchet, T. Yasumoto, Isolation and structure of new ciguatoxin analogs, 2,3-dihydroxyCTX-3C and 51-hydroxyCTX-3C, accumulated in tropical reef fish, *Tetrahedron Lett.* 39 (1998) 1197–1198.
- [9] T. Yasumoto, T. Igarashi, A.M. Legrand, P. Cruchet, M. Chinain, T. Fujita, H. Naoki, Structural elucidation of ciguatoxin congeners by fast-atom bombardment tandem mass spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (20) (2000) 4988–4989.
- [10] J.P. Vernoux, R.J. Lewis, Isolation and characterisation of Caribbean ciguatoxins from the horse-eye jack (*Caranx latus*), *Toxicon* 35 (6) (1997) 889–900.
- [11] R.J. Lewis, A. Jones, J.P. Vernoux, HPLC/tandem electrospray mass spectrometry for the determination of sub-ppb levels of Pacific and Caribbean ciguatoxins in crude extract of fish, *Anal. Chem.* 71 (1) (1999) 247–250.
- [12] I. Pottier, J.P. Vernoux, A. Jones, R.J. Lewis, Analysis of toxin profiles in three different fish species causing ciguatera fish poisoning in Guadeloupe, French West Indies, *Food Addit. Contam.* 19 (11) (2002) 1034–1042.
- [13] I. Pottier, J.P. Vernoux, A. Jones, R.J. Lewis, Characterization of multiple Caribbean ciguatoxins and congeners in individual specimens of horse-eye jack (*Caranx latus*) by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry, *Toxicon* 40 (7) (2002) 929–939.
- [14] B. Hamilton, M. Hurbungs, J.P. Vernoux, A. Jones, R.J. Lewis, Isolation and characterization of Indian Ocean ciguatoxin, *Toxicon* 40 (2002) 685–693.
- [15] M.Y. Dechraoui, J. Naar, S. Pauillac, A.M. Legrand, Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels, *Toxicon* 37 (1999) 125–143.
- [16] R.J. Lewis, Ciguatera: Australian perspectives on a global problem, *Toxicon* 48 (2006) 799–809.
- [17] M.N. Nicholson, R.J. Lewis, Ciguatoxins: cyclic polyether modulators of voltage-gated ion channel function, *Mar. Drugs* 4 (2006) 82–118.
- [18] J. Hidalgo, J.L. Liberona, J. Molgo, E. Jaimovich, Pacific ciguatoxin-1B effect over Na⁺ and K⁺ currents, inositol 1,4,5-triphosphate content and intracellular Ca²⁺ signals in cultured rat myotubes, *Br. J. Pharmacol.* 137 (2002) 1055–1062.
- [19] M.P. Sauviat, R. Boydrón-Le Garrec, J.B. Masson, R.L. Lewis, J.P. Vernoux, J. Molgo, D. Laurent, E. Benoit, Mechanisms involved in the swelling of erythrocytes caused by Pacific and Caribbean ciguatoxins, *Blood Cells Mol. Dis.* 36 (2006) 1–9.
- [20] T.A. Ruff, R.J. Lewis, Clinical aspects of ciguatera: an overview, *Mem. Queensl. Mus.* 34 (3) (1994) 609–619.
- [21] G. Klisbister, M.C. Kiernan, Neurotoxic marine poisoning, *Lancet Neurol.* 4 (2005) 219–228.
- [22] L.H. Kimura, Y. Hokama, M.A. Abad, M. Oyama, J.T. Miyahara, Comparison of three different assays for the assessment of ciguatoxin in fish tissues: radioimmunoassay, mouse bioassay and *in vitro* guinea pig atrium assay, *Toxicon* 20 (1982) 907–912.
- [23] E. Ito, F. Suzuki-Toyota, K. Toshimori, H. Fuwa, K. Tachibana, M. Satake, M. Sasaki, Pathological effects on mice by gambierol, possibly one of the ciguatera toxins, *Toxicon* 42 (2003) 733–740.
- [24] D.G. Baden, L.E. Fleming, J.A. Bean, Marine toxins, in: F.A. DeWolf (Ed.), *Handbook of Clinical Neurology: Intoxications of the Nervous Systems, Part H. Natural Toxins and Drugs*, Elsevier, Press, Amsterdam, 1995, pp. 141–175.
- [25] J. Pearn, Neurology of ciguatera, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 70 (2001) 4–8.
- [26] D. Racciatti, J. Vecchiet, A. Ceccomancini, F. Ricci, E. Pizzigallo, Chronic fatigue syndrome following a toxic exposure, *Sci. Total Environ.* 270 (2001) 27–31.
- [27] S. Gupta, S. Aggarwal, D. See, A. Starr, Cytokine production by adherent and non-adherent mononuclear cells in chronic fatigue syndrome, *J. Psychiat. Res.* 31 (1) (1997) 149–156.
- [28] C.C. Chao, M. Gallagher, J. Phair, P.K. Perterson, Serum neopterin and interleukin-6 levels in chronic fatigue syndrome, *J. Infect. Dis.* 162 (1990) 1412–1413.
- [29] M.L. Pall, Levels of nitric oxide synthase product citrulline are elevated in sera of chronic fatigue syndrome patients, *J. Chronic Fatigue Syndrome* 10 (3/4) (2002) 37–40.

- [30] M.L. Pall, Common etiology of posttraumatic stress disorder, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and multiple chemical sensitivity via elevated nitric oxide/peroxynitrite, *Med. Hypotheses* 57 (2) (2001) 139–145.
- [31] N. Tuteja, M. Chandra, R. Tuteja, M.K. Misra, Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology, *J. Biomed. Biotech.* 4 (2004) 227–237.
- [32] D. Levy, D.W. Zochodne, NO pain: potential roles of nitric oxide in neuropathic, *Pain Practice* 4 (1) (2004) 11–18.
- [33] S.J. Bae, J.B. Lee, M. Takenaka, Y. Tanaka, K. Shimizu, I. Katayama, Topical glucocorticoid augments scratching behaviour in dinitrofluorobenzene-sensitized mice by the induction of substance P, *Exp. Dermatol.* 13 (2004) 780–785.
- [34] J. Yamaoka, M. Sasaki, Y. Miyachi, Ultraviolet B radiation downregulates inducible nitric oxide synthase expression induced by interferon- γ or tumor necrosis factor- α in murine keratinocyte Pam 212 cells, *Arch. Dermatol. Res.* 292 (2000) 312–319.
- [35] V. Strunk, K. Hahnenkamp, M. Schneuing, L.G. Fischer, G.F. Rich, Selective iNOS inhibition prevents hypotension in septic rats while preserving endothelium-dependent vasodilation, *Anesth. Analg.* 92 (2001) 681–687.
- [36] D. Wang, J. Wei, K. Hsu, J.C. Jau, M.W. Lieu, T.J. Chao, H.I. Chen, Effects of nitric oxide synthase inhibitors on systemic hypotension, cytokines and inducible nitric oxide synthase expression and lung injury following endotoxin administration in rats, *J. Biomed. Sci.* 6 (1999) 28–35.
- [37] S. Moncada, E.A. Higgs, The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology, *Br. J. Pharmacol.* 147 (2006) S193–S201.
- [38] R. Boydrion-Le Garrec, E. Benoit, M.P. Sauviat, R.J. Lewis, J. Molgo, D. Laurent, 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 (2005) 625–634.
- [39] G. Bourdy, P. Cabalion, P. Amade, D. Laurent, Traditional remedies used in the western pacific for the treatment of ciguatera poisoning, *J. Ethnopharmacol.* 36 (1992) 163–174.
- [40] R.L. Manger, L.S. Leja, S.Y. Lee, J.M. Hungerford, M.M. Wekell, Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins, and ciguatoxins, *Anal. Biochem.* 214 (1993) 190–194.
- [41] W.L. Stone, H. Yang, M. Qui, Assays for nitric oxide expression, *Methods Mol. Biol.* 315 (2006) 246–256.
- [42] P. Stordeur, L. Zhou, B. Byl, F. Brohet, W. Burny, D. de Groote, T. van der Poll, M. Goldman, Immune monitoring in whole blood using real-time PCR, *J. Immunol. Methods* 276 (2003) 69–77.
- [43] L. Overbergh, D. Valckx, M. Waer, C. Mathieu, Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR, *Cytokines* 11 (4) (1999) 305–312.
- [44] R.G. Rutledge, C. Cote, Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves, *Nucleic Acids Res.* 31 (16) (2003) e93.
- [45] L. Overbergh, A. Giulietti, D. Valckx, B. Decallonne, R. Bouillon, C. Mathieu, The use of Real-Time Reverse Transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression, *J. Biomol. Tech.* 14 (1) (2003) 33–43.
- [46] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method, *Methods* 25 (2001) 402–408.
- [47] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (9) (2001) 2002–2007.
- [48] C. Mehta, N. Patel, StatXact 3 for Windows, Statistical Software for Exact Nonparametric Inference, CYTEL Software Corp., Cambridge, 1997 (p. 788).
- [49] K.T. LePage, R.W. Dickey, W.H. Gerwick, E.L. Jester, T.F. Murray, On the use of Neuro-2a neuroblastoma cells versus intact neurons in primary culture for neurotoxicity studies, *Crit. Rev. Neurobiol.* 17 (1) (2005) 27–50.
- [50] H. Denac, M. Mevissen, G. Scholtysik, Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362 (2000) 453–479.
- [51] W.A. Caterall, S. Cestele, V. Yarov-Yarovsky, F.H. Yu, K. Konoki, T. Scheuer, Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins, *Toxicol.* 49 (2007) 124–141.
- [52] M.C.E. Gwee, S. Nirthanan, H.E. Khoo, P. Gopalakrishnakone, R.M. Kini, L.S. Cheah, Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29 (2002) 795–801.
- [53] C.E. Teixeira, J.F. de Oliveira, J.S. Baracat, F.B.M. Priviero, C.E. Okuyama, N.R. Netto Jr., A. Fregonesi, E. Antunes, G. de Nucci, Nitric oxide release from human corpus cavernosum induced by a purified scorpion toxin, *Urology* 63 (2004) 184–189.
- [54] C.E. Teixeira, R. Faro, R.A. Moreno, N.R. Netto Jr., A. Fregonesi, E. Antunes, G. de Nucci, Nonadrenergic, noncholinergic relaxation of human isolated corpus cavernosum induced by scorpion venom, *Urology* 57 (2001) 816–820.
- [55] J.F. de Oliveira, C.E. Teixeira, E.C. Arantes, G. de Nucci, E. Antunes, Relaxation of rabbit corpus cavernosum by selective activators of voltage-gated sodium channels: role of nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway, *Urology* 62 (2003) 581–588.
- [56] C.E. Teixeira, J.S. Baracat, E.C. Arantes, G. de Nucci, E. Antunes, Effects of β -adrenoceptor antagonists in the neural nitric oxide release induced by electrical field stimulation and sodium channel activators in the rabbit corpus cavernosum, *Eur. J. Pharmacol.* 519 (2005) 146–153.
- [57] C.M. Yonamine, L.R.P. Troncone, M.A.P. Camillo, Blockade of neuronal nitric oxide synthase abolishes the toxic effects of Tx2-5, a lethal *Phoneutria nigriventer* spider toxin, *Toxicol.* 44 (2004) 169–172.
- [58] K.N. Srinivasan, S. Nirthanan, T. Sasaki, K. Sato, B. Cheng, M.C.E. Gwee, R.M. Kini, P. Gopalakrishnakone, Functional site of bukatoxin, an α -type sodium channel neurotoxin from the Chinese scorpion (*Buthus martensi* Karsch) venom: probable role of the 52 PDKVP 56 loop, *FEBS Lett.* 494 (2001) 145–149.
- [59] E.M. Zanchet, I. Longo, Y. Cury, Involvement of spinal neurokinins, excitatory amino acids, proinflammatory cytokines, nitric oxide and prostanooids in pain facilitation induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom, *Brain Res.* 1021 (2004) 101–111.
- [60] G. Picolo, Y. Cury, Peripheral neuronal nitric oxide synthase activity mediates the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom, a δ - and κ -opioid receptor agonist, *Life Sci.* 75 (2004) 559–573.
- [61] J.C. de Fouw, H.P. van Egmond, G.J.A. Speijers, Ciguatera fish poisoning: a review, *RIVM report 388802 021* (2001) 1–66.
- [62] M.L. Pall, Elevated, sustained peroxynitrite levels as the cause of chronic fatigue syndrome, *Med. Hypotheses* 54 (1) (2000) 115–125.
- [63] J. MacMicking, Q.W. Xie, C. Nathan, Nitric oxide and macrophage function, *Annu. Rev. Immunol.* 15 (1997) 323–350.
- [64] P. Tripathi, A. Aggarwal, NF- κ B transcription factor: a key player in the generation of immune response, *Curr. Sci.* 90 (4) (2006) 519–531.
- [65] M.A. Poli, T.J. Mende, D.G. Baden, Brevetoxins, unique activators of voltage-sensitive sodium channels, bind to specific sites in rat brain synaptosomes, *Mol. Pharmacol.* 30 (1986) 129–135.
- [66] M.A. Poli, C.B. Templeton, J.G. Pace, H.B. Hines, Detection metabolism and pathophysiology of brevetoxins, in: S. Hall, G. Strichartz (Eds.), *Marine Toxins Origin, Structure and Molecular Pharmacology*, ACS Symposium Series, vol. 418, American Chemical Society, Washington, DC, 1990, pp. 176–191.
- [67] S.M. Dravid, D.G. Baden, T.F. Murray, Brevetoxin augments NMDA receptor signaling in murine neocortical neurons, *Brain Res.* 1031 (2005) 30–38.
- [68] D.G. Baden, Brevetoxins: unique polyether dinoflagellate toxins, *FASEB J.* 3 (1989) 1807–1817.
- [69] F.W. Berman, T.F. Murray, Brevetoxins cause acute excitotoxicity in primary cultures of rat cerebellar granule neurons, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290 (1999) 439–444.
- [70] A.R. Massensini, M.A. Romano-Silva, M.V. Gomez, Sodium channel toxins and neurotransmitter release, *Neurochem. Res.* 28 (10) (2003) 1607–1611.
- [71] L. Lecanu, C. Verrecchia, I. Margail, R.G. Boulou, M. Plotkine, iNOS contribution to the NMDA-induced excitotoxic lesion in the rat striatum, *Br. J. Pharmacol.* 125 (1998) 548–590.
- [72] L. Lecanu, M. Plotkine, Contribution of oxidation stress to excitotoxicity-induced deleterious iNOS in the CNS, *DDT* 4 (6) (1999) 292–293.
- [73] H.T. Darius, D. Ponton, T. Revel, P. Cruchet, A. Ung, M. Tchou Fouc, M. Chinain, Ciguatera risk assessment in two toxic sites of French Polynesia using the receptor-binding assay, *Toxicol.* 50 (2007) 612–626.
- [74] J.M. Desesso, A.R. Scialli, G.C. Goeringer, *p*-Mannitol, a specific hydroxyl free radical scavenger, reduces the developmental toxicity of hydroxyurea in rabbits, *Teratology* 49 (1994) 248–259.
- [75] S. Rancon, A. Chaboud, N. Darbour, G. Comte, D. Barron, J. Raynaud, P. Cabalion, A new C-glycosyl xanthone isolated from *Davallia solida*, *Phytochem.* 52 (1999) 1677–1679.
- [76] G. Garrido, R. Delgado, Y. Lemus, J. Rodríguez, D. García, A.J. Núñez-Sellés, Protection against septic shock and suppression of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production on macrophages and microglia by a standard aqueous extract of *Mangifera indica* L. (VIMANG[®]) Role of mangiferin isolated from the extract, *Pharmacol. Res.* 50 (2004) 165–172.
- [77] J.M. Leiro, E. Alvarez, J.A. Arranz, I.G. Siso, F. Orallo, *In vitro* effects of mangiferin on superoxide concentrations and expression of the inducible nitric oxide synthase, tumour necrosis factor- α and transforming growth factor- β genes, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 1361–1371.

V. Discussion et conclusion

Les données obtenues à partir des études *in vitro* menées avec le TG et la qPCR confirment notre hypothèse de l'induction de la production de NO• par la P-CTX-1B dans les macrophages murins RAW 264.7 *via* la surexpression de l'enzyme iNOS. En effet, nos expériences ont démontré que la P-CTX-1B tout comme le LPS induisent une production de nitrite de façon dose-dépendante. Il doit être souligné que cette surproduction du NO• n'a été observée qu'avec les RAW 264.7 et non pas avec les cellules Neuro-2a.

Cette différence montre que la lignée cellulaire Neuro-2a utilisée pour étudier la cytotoxicité induite par les CTXs n'est pas adaptée à la présente recherche. L'étude bibliographique confirme que les Neuro-2a ne sont que peu utilisées pour de telles expériences, à l'inverse des RAW 264.7 qui sont largement mises à contribution pour étudier la voie iNOS/NO•. Pour cette raison, nos expérimentations ultérieures sur le criblage de plantes exerçant une activité inhibitrice sur la surproduction de NO• ont été menées sur cette lignée macrophagique.

Nous avons également évalué l'effet du N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), un inhibiteur non spécifique de NOS, sur la production de nitrite induite par la P-CTX-1B dans le surnageant de cellules de RAW 264.7. Tandis que les cellules stimulées par le LPS ou la P-CTX-1B produisent de fortes quantités de nitrite (caractéristiques de la surexpression de l'iNOS), le co-traitement par le L-NAME a provoqué une forte inhibition de la production du NO•, révélée par une nette diminution du taux de nitrite. Ces expériences ont confirmé que la production de NO• par la P-CTX-1B était bien due à la modulation de l'expression de l'enzyme iNOS. Ainsi, pour confirmer ces résultats chimiques, nous avons étudié la modulation de l'expression de l'ARNm iNOS par la P-CTX-1B dans ces cellules. Les résultats de ces études par la qPCR sont en bon agrément avec ceux obtenus avec le TG.

Finalement, cette modulation de l'iNOS par la P-CTX-1B nous a conduit à étudier le rôle probable des cytokines dans la ciguatera. Pour cela, nous avons utilisé le même modèle cellulaire avec la comparaison LPS/P-CTX-1B. Ainsi le profil de l'ARNm des

cytokines pro- et anti-inflammatoires induites par la P-CTX-1B fut évalué par qPCR (Matsui et al., 2009a)⁸.

Bien que le rôle de cette surproduction de NO• *via* la surexpression de l'enzyme iNOS dans la ciguatera n'ait pas été confirmé chez l'homme, la nécessité d'enrichir l'arsenal thérapeutique pour traiter cette intoxication, combinée à l'implication probable des mécanismes inflammatoires dans la pathologie, nous a conduit à analyser le potentiel anti-inflammatoire des plantes utilisées dans les remèdes traditionnels. Au vue de notre expérience, le TG offre le mode d'évaluation le mieux adapté (coût, rapidité, et fiabilité) à la mesure de l'activité inhibitrice du NO•⁹ des plantes sélectionnées.

⁸ Ces travaux font l'objet de la thèse de doctorat Mariko MATSUI, intitulée «Rôle des cytokines dans la ciguatera : application à l'isolement et à l'étude du potentiel thérapeutique des principes actifs de remèdes traditionnels».

⁹ Ce terme « activité inhibitrice du NO » est relativement général et prend en compte à la fois une inhibition de la production du radical et son élimination par piégeage ce qui se traduit par la baisse de sa concentration.

PARTIE 2

Les études de criblage thérapeutique

Etude de criblage thérapeutique des plantes utilisées pour traiter la ciguatera

I. Cadre de l'étude

Le second objectif de cette thèse était d'évaluer l'efficacité des plantes utilisées dans la médecine traditionnelle par les populations du Pacifique pour soigner la ciguatera (Laurent et al., 2005).

Ainsi, deux approches expérimentales mimant les mécanismes pathogéniques des CTXs, l'induction du NO• et la liaison de ces toxines au site 5 des canaux sodiques furent exploitées. Les tests basés sur la réaction de Griess et l'interaction ligand-récepteur sont les deux modèles *in vitro* correspondants qui ont été modifiés pour étudier, respectivement, le potentiel thérapeutique de vingt-huit et vingt-quatre extraits de plantes.

Ces études ont permis de sélectionner trois extraits aqueux de plantes, *Euphorbia hirta*, *Vitex trifolia* et *Heliotropium foertherianum*, qui furent soumis à un fractionnement chimique bioguidé conduisant à l'isolement et à la purification de trois molécules actives.

Les chapitres suivants décrivent séparément les expérimentations qui permirent d'évaluer l'activité anti-inflammatoire et détoxifiante des plantes.

Chapitre 1 : Evaluation du potentiel inhibiteur du NO• des phytothérapies utilisées contre la ciguatera

I. Introduction

Alors que la mesure du NO• est essentielle pour tirer des conclusions mécanistiques sur la genèse et le déroulement de plusieurs évènements physiologiques ou physiopathologiques, elle est également un complément nécessaire à l'élaboration de stratégies thérapeutiques. Etant donné sa forte implication dans les neuropathologies, parmi d'autres pathologies inflammatoires, la régulation de l'iNOS fait maintenant l'objet d'une grande attention.

Prenant en compte les symptômes de type inflammatoire observés dans la ciguatera, nous avons démontré que le traitement de macrophages murins (RAW 264.7) avec la P-CTX-1B provoquait une surexpression de l'enzyme iNOS. Cette dernière conduit à une surproduction du radical libre NO•, mise en évidence par un fort accroissement des nitrites mesuré dans le surnageant cellulaire par le TG (Publication 1).

Nos études subséquentes montrèrent que la P-CTX-1B augmentait l'expression de certaines cytokines comme les interleukines (IL)-1 β , IL-6, IL-10, et le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α dans ces cellules (Matsui et al., 2009a).

L'implication du système inflammatoire dans la ciguatera a aussi été étudiée par Ryan et collaborateurs (2007), qui *via* des puces à ADN, caractérisèrent la réponse génomique et protéomique à une dose sublétales de P-CTX-1B dans le sang de souris injectées en *i.p.* Ils conclurent que les profils d'expression des gènes étaient comparables à la réponse immunitaire de cellules T helper de type 2 (T_h2) chez des modèles asthmatiques. Les cellules T_h sont impliquées dans l'activation, la différenciation et la prolifération d'autres cellules immunes (macrophages, cellules B ou cellules tueuses naturelles) et leur activation par un antigène entraîne la libération de cytokines (Meert et al., 2003). Les cellules T_h2 sont essentielles pour l'immunité humorale ce qui pourrait expliquer le

phénomène d'hypersensitivité observé chez certains patients ciguatériques, bien que la présence d'IgE sériques spécifiques de CTXs n'a jamais été démontrée.

Suite à ces récentes avancées, la nécessité d'évaluer les plantes pour leur potentiel anti-inflammatoire, devint évidente. Le TG est une méthode simple, peu onéreuse, rapide et reproductible. Il permet aussi un criblage aisé des phytothérapies à moyenne échelle. Ainsi, pour notre étude de l'activité anti-inflammatoire des remèdes, nous avons choisi d'évaluer la capacité des extraits de plantes à réduire les taux de NO• produit par des macrophages activés au moyen du TG.

II. Matériel, méthodes et résultats

S'appuyant sur les résultats de précédentes études *in vitro* reportés par Boydrón-Le Garrec et al. (2005a), 28 extraits aqueux préparés à partir de 25 plantes furent sélectionnés (Tableau 1). Etant donné la rareté de la P-CTX-1B, le modèle cellulaire inflammatoire a été établi par addition de LPS dans les milieux de cultures des macrophages RAW 264.7.

Les extraits redissous dans l'eau distillée ont été co-incubés à 4 concentrations différentes (2,5, 25, 250 et 2500 µg/mL) en présence de 10 µg/mL de LPS avec des cellules RAW 264.7 cultivées en microplaques à 96 puits (Fig. 2). Après 24 h, l'effet de ces extraits de plantes sur l'inhibition du NO• fut détecté *via* le TG et qualifié à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaque équipé d'un filtre à 540 nm.

Pour vérifier si la réduction de taux de nitrite n'était pas due à la mortalité des cellules, la cytotoxicité de ces 28 extraits (aux quatre concentrations étudiées) fut parallèlement analysée (Fig. 2) *via* le test au MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tétrazolium bromide). Ce test colorimétrique quantitatif s'appuie sur la capacité sélective des cellules vivantes à réduire le sel de bromure de tétrazolium de couleur jaune en des cristaux de formazan de couleur bleue. Les densités optiques ont été ensuite mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaque équipé d'un filtre à 490 nm.

Tableau 1 : Les espèces de plantes testées, leurs appellations communes en Nouvelle-Calédonie, les lieux de collecte, les parties de plantes récoltées et la manière dont elles ont ensuite été extraites dans de l'eau distillée, les poids de matières humides et de matières sèches.

<i>Espèces de Plantes (Famille)</i>	<i>Synonymes</i>	<i>Noms Communs</i>	<i>Lieu de Collection</i>	<i>Parties récoltées & extraction*</i>	<i>Matière humide (g)</i>	<i>Matière sèche (g)</i>
<i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg (Moraceae)	<i>Artocarpus communis</i> J.R. Forst. & G. Forst. <i>Artocarpus incisus</i> L.f. (ou <i>A. incisa</i> L.) <i>Sitodidium altile</i> Parkinson	Arbre à pain	Yahoué	Macération de bourgeons de feuilles et de latex	83,3	1,1
<i>Capsicum frutescens</i> L. (Solanaceae)		Piments (ou piment du Chili)	Naïna, La Foa	Macération de fruits	57,0	1,3
<i>Carica papaya</i> L. (Caricaceae)		Papayer	Fun Beach, Anse Vata, Noumea	Décoction de fleurs d'un pied mâle	8,4	0,3
<i>Cerbera manghas</i> L. (Apocynaceae)	<i>Cerbera odollam</i> Gaertner ? <i>Cerbera lactaria</i> Ham. ?	Faux manguier	CPS, Anse Vata, Noumea	Homogénéisation du latex libéré de pétiole de feuilles dans l'eau à 40°C	0,5	0,03
<i>Cocos nucifera</i> L. (Palmae)		Cocotier	Fun Beach, Anse Vata, Noumea	Décoction de racines	300,0	6,5
<i>Davallia solida</i> (J.R Forst. & G. Forst.) Swartz (Davalliaceae)			Naïna, La Foa	Décoction de rhizomes	50,0	2,6
<i>Dendrolobium umbellatum</i> (L.) Benth. (Papilionaceae)	<i>Hedysarum umbellatum</i> L. <i>Desmodium umbellatum</i> (L.) DC. <i>Desmodium australe</i> DC. <i>Meibomia umbellata</i> (L.) Kuntze.		Naïna, La Foa	Décoction de feuilles	55,0	2,8
<i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq. (Sapindaceae)			Mise à eau, Nouville, Noumea	Infusion de feuilles	90,0	4,4
<i>Duboisia myoporoides</i> R. Br. (Solabaceae)			Mise à eau, Nouville, Noumea	Infusion de feuilles	70,0	3,0
<i>Erythrina variegata</i> var. <i>fastigiata</i> Panch & Guillaumin (Papilionaceae)		Peuplier canaque	IRD, Anse Vata, Noumea	Macération d'écorce	300,0	5,2
<i>Euphorbia hirta</i> L. (Euphorbiaceae)	<i>Chamaesyce hirta</i> (L.) Millsp. <i>Euphorbia capitata</i> (Lam.) <i>Euphorbia pilulifera</i> (Jaquin) <i>Euphorbia pilulifera</i> L. var. <i>hirta</i> (L.) Thell.	Herbe à dysenterie	IRD, Anse Vata, Noumea	Décoction de la plante entière	43,7	2,5
<i>Heliotropium foertherianum</i> Diane & Hilger (Boraginaceae)	<i>Argusia argentea</i> (L.f.) Heine <i>Messerschmidia argentea</i> (L.f.) Johnston <i>Tournefortia argentea</i> L.f. <i>Tournefortia arborea</i> Blanco	Faux tabac	Propriété de Rouvray, Anse Vata, Noumea	Décoction d'écorce Décoction de feuilles jaunies	80,0 20,0	2,4 0,5
<i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R. Brown (Convolvulaceae)	<i>Ipomoea pes-caprae</i> subsp. <i>brasiliensis</i> (L.) Van Ooststr.	Liseron de mer	Fun Beach, Anse Vata, Noumea	Décoction de racines	48,0	0,8

Tableau 1 Les espèces de plantes testées, leurs appellations communes en Nouvelle-Calédonie, les lieux de collecte, les parties de plantes récoltées et la manière dont elles ont ensuite été extraites dans de l'eau distillée, les poids de matières humides et de matières sèches.

<i>Espèces de Plantes (Famille)</i>	<i>Synonymes</i>	<i>Noms Communs</i>	<i>Lieu de Collection</i>	<i>Parties récoltées & extraction*</i>	<i>Matière humide (g)</i>	<i>Matière sèche (g)</i>
<i>Morinda citrifolia</i> L. (Rubiaceae)		Fromager	Rocher à la Voile Anse Vata	Macération de fruits	123,2	8,6
<i>Pandanus tectorius</i> Parkinson (Pandaneaceae)	<i>Pandanus veitchii</i> Mast. & T. Moore	Pandanus	IRD, Anse Vata, Noumea	Décoction de racines aériennes	266,0	1,2
<i>Punica granatum</i> L. (Punicaceae)		Grenadier	Naïna, La Foa	Décoction de fruits	837,5	42,0
<i>Rhizophora x selala</i> (Salv.) Toml. (Rhizophoraceae)		Palétuvier rouge	Magenta, Ouémo	Décoction d'écorce	50,0	10,0
<i>Saccharum officinarum</i> L. (Gramineae)		Canne à sucre	Naïna, La Foa	Macération de tiges	1000,0	8,1
<i>Scaevola sericea</i> Vahl (Goodeniaceae)	<i>Scaevola taccada</i> (Gaertn.) Roxb. <i>Lobelia taccada</i> Gaertn. <i>Scaevola frutescens</i> K. Krause <i>Scaevola koenigii</i> Vahl		Mise à eau, Nouvelle, Noumea	Décoction de feuilles	150,0	4,5
<i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae)		Faux poivrier	IRD, Anse Vata, Noumea	Infusion de feuilles	90,0	37,0
<i>Spondias cytherea</i> Sonnerat (Anacardiaceae)	<i>Spondias dulcis</i> Soland ex Parkinson	Pomme cythère	Station de RFO, Nouméa	Macération d'écorce Décoction de feuilles	360,0 80,0	13,9 9,9
<i>Stachytarpheta australis</i> Moldenke (Verbanaceae)	<i>Stachytarpheta dichotoma</i> (Ruiz & Pavón) Vahl	Herbe bleue	Mise à eau, Cote Blanche, Nouméa	Macération de racines	31,9	1,1
<i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae)	<i>Eugenia malaccensis</i> L. not Lour. <i>Jambosa malaccensis</i> (L.) DC.	Pomme canaque	SICAR, Motor- Pool, Noumea	Macération d'écorce Infusion de feuilles	130,0 400,0	0,9 0,6
<i>Vitex trifolia</i> L. (Labiataeae)	<i>Vitex trifolia</i> var. <i>trifolia</i> L. <i>V. lagundi</i> Ridley <i>V. repens</i> Blanco <i>Vitex rotundifolia</i> L.f. ? <i>V. trifolia</i> var. <i>simplicifolia</i> L.? <i>Vitex negundo</i> L.? <i>Vitex ovate</i> Thunb.?		Mise à eau, Nouvelle, Noumea	Décoction de feuilles	58,0	6,9
<i>Ximenia americana</i> L. (Olacaceae)	<i>Ximenia elliptica</i> J.R. Forst <i>Ximenia inermis</i> L.	Prunier canaque	Ilot Corbeille, Mara, La Foa	Macération d'écorce de racines	586,0	1,2

* Toutes les extractions ont été faites en utilisant de l'eau distillée comme décrites par Laurent et al. (1993).

? Plantes parfois reportées comme étant de la même espèce et parfois distinctes

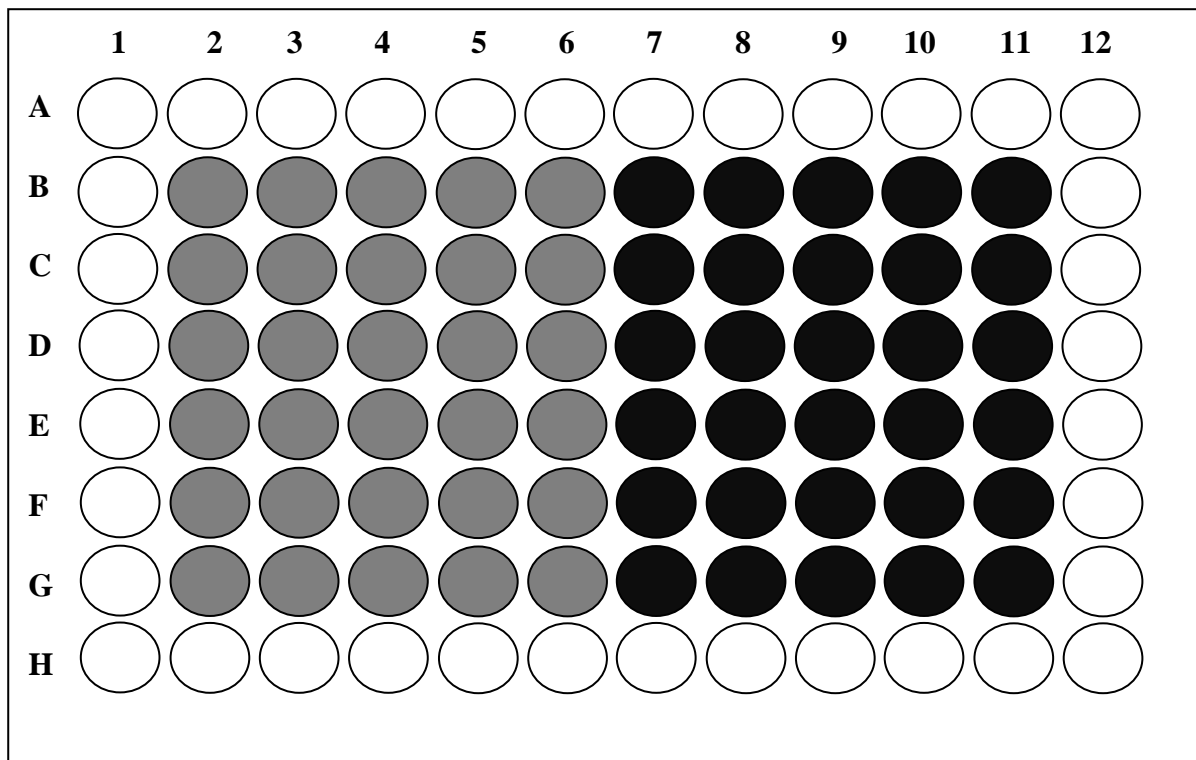


Figure 2 : Distribution des traitements dans des microplaques à 96 puits pour l'évaluation *in vitro* de l'inhibition du NO• avec les extraits aqueux de plantes utilisées pour soigner la ciguatera. Parallèlement, les potentiels cytotoxiques et d'induction spontanée du NO• sont évalués. Les contrôles négatifs présentent les plus fortes proportions (% v/v) de l'eau distillée utilisée ($n = N \times 2$; $N = 6$).

- Puits avec eau distillée
- Macrophages RAW 264.7 à la densité de 5×10^4 cellules/puits incubés avec 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPS et des concentrations croissantes d'extraits de plantes (0, 2,5, 25, 250 et 2500 $\mu\text{g/mL}$)
- Macrophages RAW 264.7 à la densité de 5×10^4 cellules/puits incubés uniquement avec des concentrations croissantes d'extraits de plantes (0, 2,5, 25, 250 et 2500 $\mu\text{g/mL}$)

Les valeurs de densité optique mesurées au spectrophotomètre sont souvent sujettes à des interférences dues aux pigments et/ou particules non solubles contenus dans les extraits de plantes. Afin d'éliminer ou de minimiser ces influences indésirables, des contrôles négatifs furent menés. Les cellules RAW 264.7 furent ainsi traitées uniquement avec les extraits de plantes aux quatre concentrations (Fig. 2). De cette façon, nous avons pu également observer si ces extraits de plantes pouvaient par eux même induire spontanément une production du NO• et/ou une prolifération cellulaire.

En complément, nous avons entrepris l'étude du potentiel antioxydant de ces 27 extraits de plantes. Leur évaluation fut menée *via* leur potentiel de piégeage du radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). En présence d'un antioxydant, la coloration pourpre sombre du DPPH s'affaiblit avec le temps. Cette expérience fut effectuée en utilisant des cuves jetables et un spectrophotomètre UV/Vis (à 530 nm).

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Journal of Ethnopharmacology* (Publication 2). Le matériel, la méthode et les résultats obtenus y sont décrits.

Publication 2

Kumar-Roiné, S., Matsui, M., Reybier, K., Darius, H.T., Chinain, M., Pauillac, S., Laurent, D., **2009**. Ability of certain plant extracts traditionally used to treat ciguatera fish poisoning to inhibit nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 123, 369-377.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: 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^{a,b,c}, Mariko Matsui^{a,b,c}, Karine Reybier^a, Hélène Taiana Darius^d, Mireille Chinain^d, Serge Pauillac^c, Dominique Laurent^{a,b,*}

^a 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

^b Institut de Recherche pour le Développement (IRD); UMR-152; F-98 848 Nouméa, New Caledonia

^c Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Laboratoire des Biotoxines, F-98845 Nouméa, New Caledonia

^d 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 5 April 2009

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 terebenthifolius* (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 Ca²⁺-dependence (eNOS and nNOS) or Ca²⁺-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

release could explain the pleiotropic pathophysiological nature of this disorder, especially certain symptoms like hypotension, chronic fatigue and pruritus (a prolonging and recurring allergic reaction), which the primary action of CTXs on voltage sensitive sodium channel (VSSC) may not solely account for (Dechraoui et al., 1999; Kumar-Roiné et al., 2008).

iNOS modulation has been extensively studied in *in vitro* and *in vivo* murine macrophage models (Bottley and Fernandez, 2000). Upon stimulation by endotoxin lipopolysaccharide (LPS) and/or tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and interferon (IFN)- γ , these phagocytic cells, crucial in specific and non-specific immune responses, synthesize a variety of biological mediators, including pro- and anti-inflammatory cytokines, and NO through iNOS activation (Hirvonen et al., 1996; Bogdan, 2001; Fujihara et al., 2003). Unfortunately, NO produced in large amounts can react with reactive oxygen species (ROS) such as superoxide ($O_2^{\bullet-}$) to produce peroxynitrite ($ONOO^-$), a highly noxious oxidant (Brune and Cantoni, 2000; Lechner et al., 2005; Stone et al., 2006; Pacher et al., 2007). As a consequence, iNOS/NO pathway has been implicated in human autoimmune disorders, in acute and chronic inflammation and neurodegeneration, as well as in infectious diseases, and in the multistage process of carcinogenesis (Moncada and Higgs, 1993; Kröncke et al., 1998; Bogdan, 2001; Lechner et al., 2005; Shen et al., 2005). NO is also known to be responsible for the vasodilatation and hypotension observed in septic shock (Moncada and Higgs, 1993; Cuzzocrea et al., 2001; Bhor et al., 2005). Therefore, inhibitors of iNOS or scavengers of NO radicals have a great potential as general therapeutic and anti-inflammatory agents and could also be effective in relieving certain debilitating symptoms of CFP.

A number of occidental drugs such as vitamins B1, B6 and B12, methylprednisolone, lidocaine, amitriptyline, fluoxetine and nifedipine, currently prescribed in the treatment of CFP are known to suppress NO induction (Szabo et al., 1993; Tsuneyoshi et al., 1996; Yaron et al., 1999; Shiga et al., 2001; Sharma et al., 2003; Yanaka et al., 2005). Yet, to present, no specific therapy for ciguatera has been identified. As these drugs provide only symptomatic and supportive relieve, with little success (Ruff and Lewis, 1994; Lehane and Lewis, 2000; Nicholson and Lewis, 2006; Friedman et al., 2008), it is vital that newer and more effective remedies be sought. In the Pacific, numerous traditional herbal remedies are preferentially employed to treat CFP. An ethnopharmacological survey carried out mainly in New Caledonia and Vanuatu reported the use of at least 90 plant species in CFP folk remedies (Bourdy et al., 1992; Laurent et al., 1993). In New Caledonia, the use of these remedies is so popular that most people prefer seeking advice from traditional healers or resorting to self-made herbal preparations, rather than consulting a physician.

Although well accepted by patients, these remedies still remain inadequately characterised. Nevertheless, preliminary studies have demonstrated that *Argusia argentea* (L.f) Heine (Boraginaceae) leave extract, the most popular remedy in the Pacific (Hashimoto et al., 1969; Bagnis, 1973; Halstead, 1978; Noro et al., 2003; Boydron-Le Garrec et al., 2005) could reduce CTXs-induced weight loss in mice (Amade and Laurent, 1992; Laurent et al., 1993), counteract the electrophysiological effects in frog myelinated axon (Benoit et al., 2000), and inhibit the swellings in the frog and human red blood cells (Boydron et al., 2001, 2002). Further investigations, using murine neuroblastoma (Neuro-2a) cells, showed that 27 plant extracts exerted a protective effect against the cytotoxic action of P-CTX-1B and/or brevetoxin-3 (PbTx-3) (Boydron-Le Garrec et al., 2005). Brevetoxins (PbTxs) are marine toxins, closely resembling CTXs in structure and activity. Both of these neurotoxins, CTXs and PbTxs, bind to site 5 of VSSC, which depolarises excitable membranes towards more negative potentials, resulting in the inhibition of their normal inactivation (Bidard et al., 1984; Lombet et al., 1987; Dechraoui et al., 1999). The resulting prolonged stimulation accom-

panied by an abnormal influx of Na^+ is responsible for the cytotoxic activity of these neurotoxins (Manger et al., 1995).

In our continuing effort to better study these traditional remedies, based on the novel molecular target described for CTXs (Kumar-Roiné et al., 2008), we report herein a second experimental investigation with 25 plants screened for their NO inhibitory activity. The aim of this study was to screen various plant extracts for their biological activity on the iNOS/NO system. The reduction in NO production by the plant extracts was quantified in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells via Griess reaction. The antioxidant property of these plant extracts was also assessed using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) test.

2. Materials and methods

2.1. Materials and chemicals

The murine macrophage cell line RAW 264.7 (TIB-71) was generously provided by Dr. M. Adib-Conquy (Pasteur Institute, Paris, France). Lipopolysaccharide (*Escherichia coli*, 0111:B4; LPS), sodium nitrite, sulfanilic acid (SA), *N*-(-1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NEDD), thiazolyl blue tetrazolium bromide [3-(4',5'-dimethylthiazol-2'-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical and all reagents used for cell cultures were obtained from Sigma Aldrich (Lyon, France).

2.2. Preparation of plant extracts

The 25 plants used in the screening experiments were collected in the coastal regions of New Caledonia. Although commonly used and easily recognized, plant determination of each botanical sample was confirmed by comparison with fully registered samples of the IRD herbarium (Table 1). The studied parts of the plants were gathered and extracted according to the folk recipes as previously described (Laurent et al., 1993) (Table 1). Briefly, the inflorescences, leaves, barks or roots of different plants were either boiled in water or infused in hot or cold water. All extracts were then filtered and the filtrates were freeze dried. The dried 28 plant extracts were weighed and re-dissolved in water for tests. In some cases when heavy suspensions were obtained, the solutions were decanted and only supernatant was used.

2.3. Cell culture 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 and 2 mM L-glutamine. The culture media were supplemented with 10% foetal bovine serum, 1% of 1 mM sodium pyruvate, and 1% of antibiotic and antimycotic solution containing penicillin (10,000 U), streptomycin (10 μ g/ml) and amphotericin B (25 μ g/ml). The culture was maintained in a humidified incubator in 5% CO_2 at 37°C and the cells were split twice a week for tests. RAW 264.7 were seeded at 5×10^4 cells/well in 96-well tissue culture plates and allowed to recover for 24 h before treatment in the presence (+) or absence (-) of LPS (10 μ g/ml) and/or the 28 aqueous plant extracts (0.0025, 0.025, 0.25 and 2.5 g/l) for another 24 h.

2.4. Determination of nitrite production

Following 24 h of treatment, nitrite (NO_2^-) accumulation was determined as an indicator of NO production in culture media as previously described (Kumar-Roiné et al., 2008). Briefly, 100 μ l of Griess reagent (1:1 mixture of 1% SA and 0.1% NEDD in 5% phosphoric acid solution) was added to 100 μ l of cellular supernatant

Table 1

Parts of plants used and type of extraction as previously described (Laurent et al., 1993).

Plant name	Family	Registered sample ^a	Part	Extraction
<i>Argusia argentea</i> (L.f) Heine	Boraginaceae	McKee 31 745	Bark	Decoction 30 min
<i>Argusia argentea</i> (L.f) Heine	Boraginaceae	McKee 31 745	Yellowed leaves	Decoction 20 min
<i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg	Moraceae	Veillon 686	Leave bud, latex secreted	Maceration 24 h
<i>Capsicum frutescens</i> L.	Solanaceae	McKee 20 668	Fruit	Maceration 30 min
<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	Veillon 639	Male flowers	Decoction 30 min
<i>Cerbera manghas</i> L.	Apocynaceae	McKee 46015	Latex from petiole	Dissolution in water at 40 °C
<i>Cocos nucifera</i> L.	Palmae		Young roots	Decoction 30 min
<i>Davallia solida</i> (J.R Forster & G. Forster) Swartz	Davalliaceae	Munzinger 1084	Roots	Decoction 3 min
<i>Dendrolobium umbellatum</i> (L.) Benth.	Papilionaceae	Labat 3927	Leaves	Decoction 15 min
<i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq.	Sapindaceae	McKee 44578	Leaves	Infusion 20 min
<i>Duboisia myoporoides</i> R. Br.	Solanaceae	Pillon 665	Young leaves	Infusion 20 min
<i>Erythrina variegata</i> var. <i>fastigiata</i> Panch & Guillaumin	Papilionaceae	McKee 45314	Bark	Maceration 3 h
<i>Euphorbia hirta</i> L.	Euphorbiaceae	McKee 45 871	Whole plant	Decoction 10 min
<i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R. Brown	Convolvulaceae	Veillon 6930	Roots	Decoction 20 min
<i>Morinda citrifolia</i> L.	Rubiaceae	McKee 45891	Fruit	Maceration 30 min
<i>Pandanus tectorius</i> Parkinson	Pandanaceae	McKee 23233	Aerial roots	Decoction 30 min
<i>Punica granatum</i> L.	Punicaceae	McKee 42620	Fruit	Decoction 10 min
<i>Rhizophora x selala</i> (Salv.) Toml.	Rhizophoraceae	McKee 44546	Bark	Decoction 30 min
<i>Saccharum officinarum</i> L.	Gramineae		Stem	Maceration 24 h
<i>Scaevola sericea</i> Vahl	Goodeniaceae	McKee 45902	Leaves	Decoction 15 min
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Anacardiaceae	Lauri 112	Leaves	Infusion 30 min
<i>Spondias cytherea</i> Sonnerat	Anacardiaceae	McKee 44280	Leaves	Decoction 10 min
<i>Spondias cytherea</i> Sonnerat	Anacardiaceae	McKee 44280	Bark	Maceration agitation 1 h
<i>Stachytarpheta australis</i> Moldenke	Verbenaceae	McKee 38568	Roots	Maceration 10 min
<i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & Perry	Myrtaceae	McKee 19526	Bark	Maceration 30 min
<i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & Perry	Myrtaceae	McKee 19526	Leaves	Infusion 20 min
<i>Vitex trifolia</i> L.	Labiataeae	Holt 45	Leaves	Decoction 30 min
<i>Ximelia americana</i> L.	Olaceaeae	McKee 33571	Roots	Cold water maceration 30 min

^a The plants have been identified by comparison to plant sample registered in the IRD herbarium and re-confirmed by botanists.

samples in 96-well plates and left to agitate for 10 min at room temperature. Absorbance at 540 nm (A_{540}) was read using an ELISA plate reader (Elx 800, Bio-Tek Instruments, Inc., Fisher Scientific, France). The reduction or increase in nitrite levels was estimated as the percentage absorbance of sample relative to their respective control. Standard calibration curves ($A_{540} = 0.03 \times [\text{NO}_2^-] - 0.0017$) were prepared using sodium nitrite dilutions (0–25 μM). Due to the excellent correlation factor of this linear regression ($r^2 = 0.999$), the nitrite concentrations accumulated in the cellular supernatants could be accurately determined.

2.5. Cell viability assay

Cell viability was determined via MTT assay according to the methods previously described (Boydron-Le Garrec et al., 2005). This assay is based on the capacity of mitochondrial succinyl dehydrogenase of viable cells to convert the soluble yellow tetrazolium salt into an insoluble formazan product. Briefly, after 24 h of treatment, 100 μl of cellular supernatants were harvested for nitrite determination, and the remaining medium was then removed and replaced with 50 μl of 0.7 g/l of MTT in a phosphate buffered solution. The cells were incubated for 1 h at 37 °C. The dark blue crystal formazan resulting from the reduction of MTT was dissolved by adding 150 μl of DMSO, followed by another incubation time of 1 h. The absorbance was measured at 490 nm using an ELISA plate reader (Elx 800, Bio-Tek Instruments, Inc., Fisher Scientific, France) and cell viability was estimated as the percentage absorbance of sample relative to control.

2.6. DPPH radical scavenging activity test

The DPPH radical scavenging activity of 27 plant extracts was investigated according to the procedure previously described (Monje et al., 2006), with slight modifications. Briefly, a 0.3 mM DPPH solution in ethanol was prepared and left overnight. A 500 μl

aliquot of this solution was then mixed with appropriate volumes of the aqueous plant extract solutions. Degassed MilliQ water was added to obtain a final volume of 1.5 ml. The final concentrations of plant extracts tested were 0.0025, 0.025, 0.25 and 2.5 g/l. Radical scavenging activity was measured spectrophotometrically (Uvikon 931 Kontron, Milan, Italy) in 1.5 ml disposable cuves and calculated as percentage decrease in absorbance at 534 nm, after 30 min of incubation in the dark, relative to control.

2.7. Data analysis

Five parameters were assessed based upon the equations indicated below.

The percentage of reduction of LPS-induced nitrite accumulation was calculated as inhibition of NO produced according to Eq. (1):

$$\% \text{ NO inhibition} = 100 \times \left[1 - \frac{[(A_{\text{PE+LPS}} - A_{\text{Blank}})]}{[(A_{\text{LPS}} - A_{\text{Blank}})]} \right] \quad (1)$$

The spontaneous NO inducing aptitude of plants was compared to that of LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) and thus was calculated as follows:

$$\% \text{ NO induction} = 100 \times \frac{[(A_{\text{PE}} - A_{\text{Blank}})]}{[(A_{\text{LPS}} - A_{\text{Blank}})]} \quad (2)$$

The percentage of cell viability in the presence of LPS was estimated using the following equation:

$$\% \text{ cell viability} = 100 \times \frac{[(A_{\text{PE+LPS}} - A_{\text{BG}})]}{[(A_{\text{LPS}} - A_{\text{BG}})]} \quad (3)$$

Finally, the percentage of DPPH radical scavenging activity was calculated according to the following equation:

$$\% \text{ DPPH scavenging} = 100 \times \frac{[A_{\text{DPPH}} - A_{\text{DPPH+PE}}]}{[A_{\text{DPPH}}]} \quad (4)$$

A_{LPS} , A_{PE} , $A_{\text{PE+LPS}}$ and A_{Blank} are the means of absorbances of the n wells containing cells incubated with either LPS or aqueous plant extracts alone or combined (plant extracts + LPS) and with media

alone (Blank), respectively. The A_{BG} are values obtained from the background (BG) absorbance of MTT. A_{DPPH} and $A_{DPPH+PE}$ are the means of absorbances of the n cuves with DPPH alone and DPPH with plant extracts, respectively.

2.8. Statistics

Results are expressed as the mean of each experiment performed in duplicates ($n = N \times 2$, where $N = 6$, except for anti-DPPH assay where $N = 2$). Data related to NO inhibition and induction were statistically assessed by Student's t -test. Differences were considered significant at $P \leq 0.05$. Statistical evaluation of cytotoxicity data was done by analysis of variance (two-way ANOVA) followed by Bonferroni's post tests to compare replicate means by row using Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., USA). P values ≤ 0.05 were considered significant. The 50% of DPPH scavenging activity (IC_{50}) were also calculated from Prism 4.0 from logarithm-transformed best fit curves.

3. Results and discussion

The use of medicinal plants and herbal therapy has been practiced long before recorded history. In the Pacific, the traditional medicine used to treat CFP is quite rich, and given that no efficient allopathic medicine exists, alternative medicine is highly practiced (Laurent et al., 1993). Here we report the antioxidation activities investigated for various plant extracts used in folk CFP treatment (Table 1), based on two anti-free radical (NO and DPPH) spectrophotometric assays.

3.1. Dose-dependent nitrite accumulation in LPS-activated RAW 264.7 cells

The Griess reaction provides a simple and rapid method for determining indirectly the production of NO in aqueous medium, by measuring the accumulation of nitrite, a stable end product of NO in the presence of oxygen (Dirsch et al., 1998). Given that P-CTX-1B is not commercially available and is difficult to obtain in sufficient quantities, the preliminary selection of plant extracts having NO scavenging and/or NO suppressing capacity was investigated by using LPS as iNOS stimulus instead.

The NO production induced by LPS (0.001–10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in RAW 264.7 cells was found to be concentration-dependent with a more salient effect in the 0.01–0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration range, reaching saturation thereafter (Fig. 1). At the highest concentration, the nitrite accumulated to $46.97 \pm 3.08 \mu\text{M}/\text{ml}/5 \times 10^4$ cells from the basal level of $0.01 \pm 1.49 \mu\text{M}/\text{ml}/5 \times 10^4$ cells without LPS ($n = 12$). To better ascertain the NO inhibitory ability of various plant

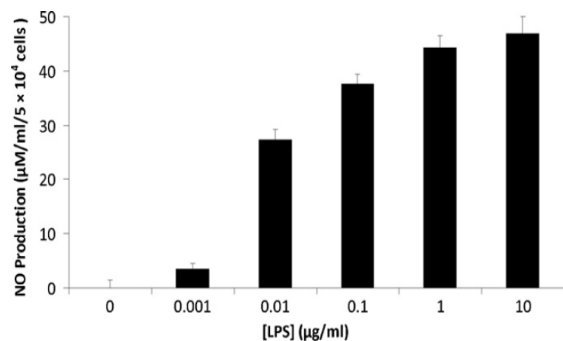


Fig. 1. Dose-dependent increase of nitrite accumulation in the cellular supernatant of LPS-stimulated RAW 264.7 cells after 24h as an indication of NO production ($n = 12$).

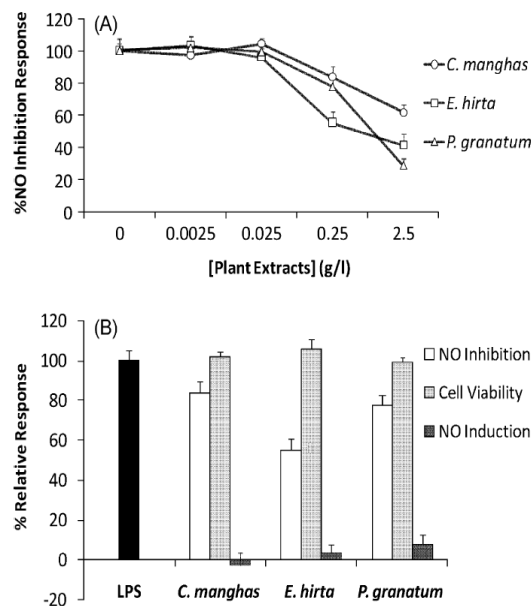


Fig. 2. Plant extracts classed in first category (I) show NO inhibition without significant cytotoxicity nor NO induction in LPS- and non-activated RAW 264.7 cells at 0.25 g/l. (A) Dose-dependent % NO inhibition response of *C. manghas*, *E. hirta* and *P. granatum* in the presence of LPS after 24 h. (B) % Relative responses of *C. manghas*, *E. hirta* and *P. granatum* at 0.25 g/l after 24 h in NO inhibition ($P < 0.001$), cellular viability and NO induction assay compared to cells activated with LPS.

extracts, we adopted the highest LPS concentration (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) throughout the subsequent experiments. Comparatively, the innate NO inducing and cytotoxic capacity of the aqueous plant extract solution was also investigated in non-activated and LPS-activated RAW 264.7 cells, respectively.

3.2. Effects of plant extracts on nitrite accumulation

Upon 24 h incubation, several of the 28 plant extracts tested were found to attenuate nitrite accumulation in LPS-activated RAW 264.7 cells, to various extents. Of the four different concentrations tested for each of the 28 plant extracts, only 0.25 and 2.5 g/l exhibited significant NO inhibitory activities (Fig. 2A). However, most plant extract solutions at 2.5 g/l deeply imbued the cellular supernatants. Therefore, owing to previously reported interferences of chlorophyll and other pigments present in samples in such spectrophotometric assays (Dirsch et al., 1998), only data obtained from experiments performed with plant extracts at 0.25 g/l were analysed. Comparatively, the data demonstrating NO inducing and cytotoxic capacity of plant extracts at 0.25 g/l were also analysed (Table 2 and Figs. 2–5).

Out of 28 plant extracts tested, 16 exhibited low to strong nitrite reduction in the cell supernatant, while the remaining 12 were inactive (Table 2). However, in certain cases, it was difficult to draw any firm conclusion concerning the NO inhibitory effect of these plants as some extracts had dual and/or opposite effects (i.e. were capable of simultaneously inhibiting and inducing NO release and/or reducing the number of viable cells via cytotoxicity). Probably resulting from the presence of various compounds or even of certain molecules having different activities in the extracts, the combination of these two or more activities leads to positive or negative synergistic effects that are often difficult to dissociate. Thus we chose to classify these plant extracts into four categories (I–IV), principally based on their NO inhibitory or non-NO inhibitory capacity, when tested at a concentration of 0.25 g/l (Table 2 and Figs. 2–5).

Table 2

Free radical scavenging and NO inhibition effects versus cytotoxic and NO inducing activities of plant extract in LPS- and non-activated RAW 264.7 cells.

Plant name	NO inhibition ^a		Cytotoxicity ^b		NO induction ^c		DPPH scavenging ^d IC ₅₀ (µg/ml)	Category ^e	Anti-cytotoxicity ^f		Comments ^g
									OVB	OVC	
<i>Euphorbia hirta</i>	44.9	+++	NS	NS	NS	NS	10.0	I		---	
<i>Rhizophora x selala</i>	38.4	+++	NS	---	---	---	5.9	II			
<i>Capsicum frutescens</i>	32.3	+++	+++	NS	NS	NS	476.6	III	---		
<i>Syzygium malaccense</i> (b)	26.7	+++	NS	NS	NS	NS	19.4	I			
<i>Argusia argentea</i> (b)	26.6	+++	NS	---	---	---	12.6	II			
<i>Dodonaea viscosa</i>	26.6	+++	NS	---	---	---	20.1	II			
<i>Ipomoea pes-caprae</i>	23.8	+++	NS	---	---	---	28.0	II			
<i>Schinus terebenthifolius</i>	22.6	+++	NS	NS	NS	NS	18.8	I			MB
<i>Punica granatum</i>	22.5	+++	NS	NS	NS	NS	20.1	I			
<i>Scaevola sericea</i>	21.1	+++	+++	NS	NS	NS	66.7	III			
<i>Spondias cytherea</i> (b)	19.9	+++	-	---	---	---	18.2	II	-		
<i>Cerbera manghas</i>	16.6	+++	NS	NS	NS	NS	687.7	I			
<i>Vitex trifolia</i>	13.8	++	NS	NS	NS	NS	64.5	I			
<i>Ximenia americana</i>	13.7	+++	NS	NS	NS	NS	> 2500	I			
<i>Syzygium malaccense</i> (l)	12.0	++	NS	NS	NS	NS	22.9	I			
<i>Pandanus tectorius</i>	7.3	+++	NS	NS	NS	NS	164	I			
<i>Dendrolobium umbellatum</i>	5.9	NS	NS	NS	NS	NS	25.4	IV			
<i>Stachytarpheta australis</i>	5.3	NS	+	---	---	---	>2500	IV	-		
<i>Davallia solida</i>	4.5	NS	NS	NS	NS	NS	ND	I			EP, NP
<i>Argusia argentea</i> (l)	3.3	NS	NS	NS	NS	NS	29.0	IV			MB, EP, CP
<i>Saccharum officinarum</i>	0.3	NS	NS	---	---	---	>2500	IV			
<i>Erythrina variegata</i> var. <i>fastigiata</i>	-0.9	NS	NS	---	---	---	330.3	IV			
<i>Cocos nucifera</i>	-1.3	NS	NS	NS	NS	NS	22.2	IV			
<i>Duboisia myoporoides</i>	-3.4	NS	NS	NS	NS	NS	106.3	IV	---		
<i>Morinda citrifolia</i>	-4.0	NS	NS	NS	NS	NS	643.4	IV	---		
<i>Spondias cytherea</i> (l)	-5.1	NS	NS	NS	NS	NS	71.3	IV			
<i>Carica papaya</i>	-5.4	NS	NS	NS	NS	NS	175.3	IV			
<i>Artocarpus altilis</i>	-21.0	NS	NS	---	---	---	175.3	IV		---	

Abbreviations—(l): leaves; (b): bark; ND: not done; NS: no significant change ($P > 0.05$); (+), (++) and (+++): significant decrease ($0.01 < P < 0.05$, $0.001 < P < 0.01$ and $P < 0.001$); (-), (--) and (---): significant increase ($0.01 < P < 0.05$, $0.001 < P < 0.01$ and $P < 0.001$).

^a % NO inhibitory capacity of plant extracts (0.25 g/l) in RAW 264.7 cells exposed to 10 µg/ml LPS after 24 h expressed as the mean values ($n = 12$).

^b % cytotoxicity of plant extracts (0.25 g/l) in RAW 264.7 cells exposed to 10 µg/ml LPS after 24 h ($n = 12$).

^c % NO inductive capacity of plant extracts (0.25 g/l) in RAW 264.7 cells after 24 h ($n = 12$).

^d IC₅₀ values of % DPPH scavenging activity of plant extracts (0.025, 0.025, 0.25, 2.5 g/l) after 30 min calculated from the mean values ($n = 4$).

^e Category (I–IV) in which the plant extracts were placed in the present study based on their NO inhibition activities (cf. Section 3).

^f Cell viability of Neuro-2a cells exposed to 417 µM ouabain, 41.7 µM veratridine and 12 nM PbTx-3 (OVB) or 5 µM P-CTX-1B (OVC) (Boydron-Le Garrec et al., 2005).

^g Other activities reported in mouse bioassay (MB) (Amade and Laurent, 1992; Laurent et al., 1993), electrophysiology (EP), neurophysiology (NP) (Benoit et al., 2000), and in cellular physiology (Boydron et al., 2001, 2002).

3.2.1. Plant extracts exhibiting NO inhibitory but no significant NO inducing or cytotoxic effects

Plants in the first category (I) exhibited only NO inhibitory activities and no NO inducing effects, nor significant cytotoxicity (Table 2 and Fig. 2A and B). Out of the 16 plant extracts capable of suppressing NO production, 9 plants fell in this category. This included *Euphorbia hirta* L. (Euphorbiaceae), bark (b) extract of *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae), *Schinus terebenthifolius* Raddi (Anacardiaceae), *Punica granatum* L. (Punicaceae) and *Cerbera manghas* L. (Apocynaceae), which show nitrite reduction between 15 to 45%, followed by *Vitex trifolia* L. (Labiatae), *Ximenia americana* L. (Olacaceae) and leave (l) extract of *S. malaccense* (~13%). Another plant included in this category is *Pandanus tectorius* L. (Pandanaceae).

Our findings corroborate previous results obtained by Boydron-Le Garrec et al. (2005), who demonstrated that the whole plant extract of *E. hirta* at 0.5 g/l was able to counteract the cytotoxicity in Neuro-2a cells induced by P-CTX-1B (C) in the presence of the toxins ouabain (O) and veratridine (V), a specific blocker of the Na⁺/K⁺ ATPase and a site 2-specific VSSC activator, respectively (Table 2). Interestingly, *E. hirta* which showed the strongest activity in this Neuro-2a test model, also proved to be the most potent NO inhibitor in the current study.

Ryu et al. (2001) also reported that the whole plant of *E. hirta* attenuated LPS-activated NO production in RAW 264.7 by 45% at concentrations as little as 0.05 g/l, which is 5-fold lower than the concentration (0.25 g/l) reported in the present study. This may be explained by the fact that methanol was used for extraction in

this former study. In contrast to water, used in the current study, organic solvents like methanol are known to greatly concentrate small, non-polymeric compound(s), which are often highly active in such bioassays. It is interesting to note that in Australia, the herb *E. hirta* is popularly called “asthma plant”, named after the condition for which it was commonly used (Johnson et al., 1999). Asthma is one of chronic inflammatory processes associated with sustained expression and production of iNOS and NO (Guo et al., 2000).

Quercetin, a naturally occurring dietary flavonoid found in many plants including *E. hirta* (Adedapo et al., 2005) and in pomegranate juice (*P. granatum*) (Poyrazoğlu et al., 2002), inhibits IL-1β-induced proliferation in human airway smooth muscle cells. This proinflammatory cytokine is largely expressed in asthmatic airways (Chaabi et al., 2007). Indeed, quercetin was demonstrated to attenuate NO production in IL-1β-stimulated hepatocytes through the inhibition of iNOS expression via inhibition of nuclear factor (NF)-κB activation (Martínez-Flórez et al., 2005). Activation of NF-κB is necessary for the induction of iNOS and for certain proinflammatory cytokine genes expression (Liu et al., 1997; Kim et al., 2004).

Moreover, 3-O-methylquercetin, a methyl derivative of quercetin, is believed to exert anti-inflammatory effect through the inhibition of iNOS DNA transcription in LPS-activated RAW 264.7 cells (Jiang et al., 2006). It also significantly attenuated secretion of the cytokines TNF-α, IL-4 and IL-5 (Ko et al., 2004).

Finally, quercitrin, a glycoside of quercetin, isolated from *E. hirta* was shown to be responsible for the antiarrhoeic activity of this plant (Gálvez et al., 1993). NO overproduction of iNOS contributes significantly to gastrointestinal pathology and quercitrin treatment

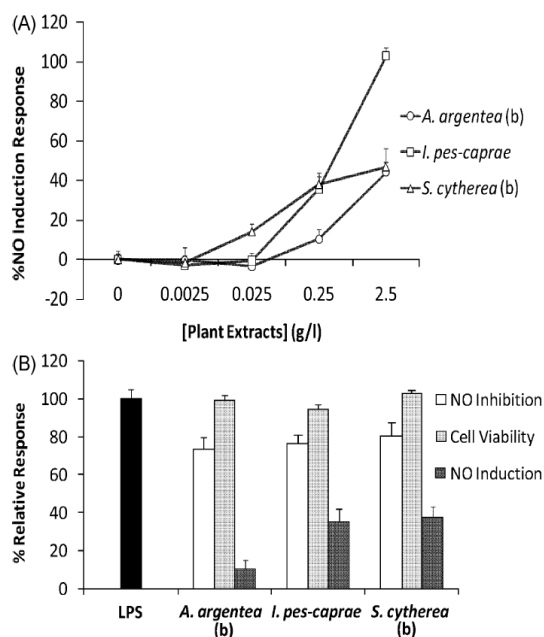


Fig. 3. Plant extracts classed in second category (II) show NO inhibition and NO induction responses without significant cytotoxicity in LPS- and non-activated RAW 264.7 cells at 0.25 g/l. (A) Dose-dependent % NO induction response of *A. argentea* (b), *I. pes-caprae* and *S. cytherea* (b) in the absence of LPS after 24 h. (B) % Relative responses of *A. argentea* (b), *I. pes-caprae* and *S. cytherea* (b) at 0.25 g/l after 24 h in NO inhibition ($P < 0.001$), cellular viability and NO induction ($P < 0.001$) assay compared to cells activated with LPS. Abbreviations (b): Bark.

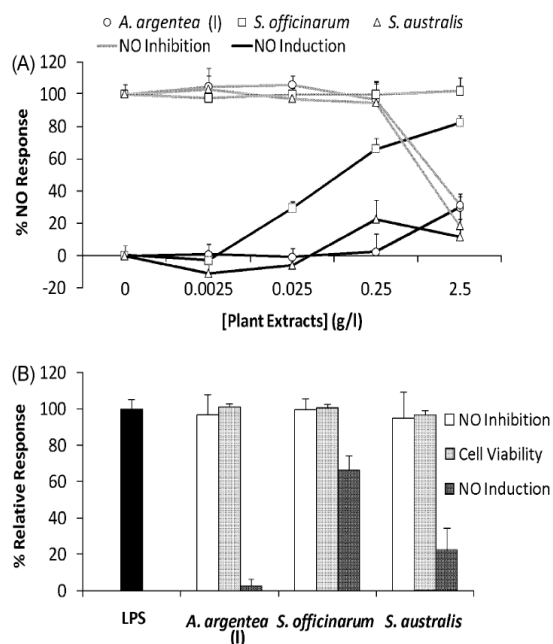


Fig. 5. Plant extracts classed in fourth category (IV) do not exert NO inhibition capacities in LPS-activated RAW 264.7 cells but show NO induction in RAW 264.7 cells or cytotoxicity or remains inactive at 0.25 g/l. (A) Dose-dependent % NO inhibition (in grey) or induction (in black) responses of *A. argentea* (l), *S. officinarum* and *S. australis* in the presence and absence of LPS, respectively, after 24 h. (B) % Relative responses of *A. argentea* (l), *S. officinarum* and *S. australis* at 0.25 g/l after 24 h in NO inhibition, cellular viability and NO induction ($P < 0.01$ except for *A. argentea* (l)) assay compared to cells activated with LPS. Abbreviations (l): leaf.

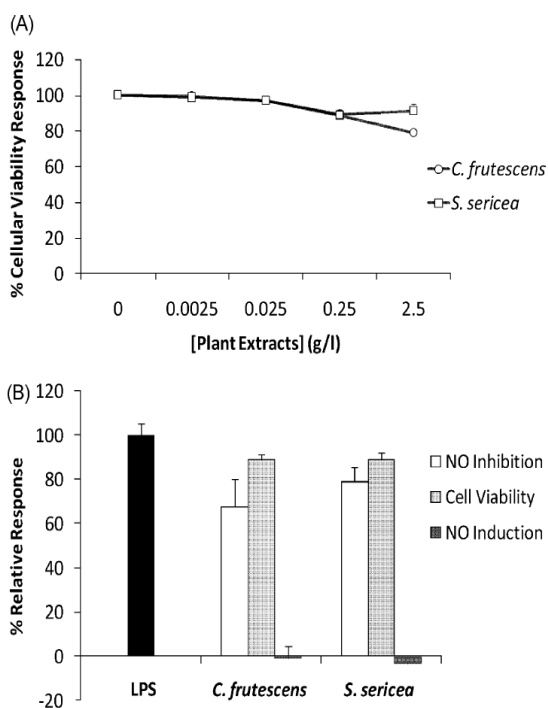


Fig. 4. Plant extracts classed in third category (III) show NO inhibition and cytotoxicity responses without significant NO induction in LPS- and non-activated RAW 264.7 cells at 0.25 g/l. (A) Dose-dependent % cellular viability response of *C. frutescens* and *S. sericea* in the presence of LPS after 24 h. (B) % Relative responses of *C. frutescens* and *S. sericea* at 0.25 g/l after 24 h in NO inhibition ($P < 0.001$), cellular viability ($P < 0.001$) and NO induction assay compared to cells activated with LPS.

to colitic rats effectively inhibited iNOS enzyme expression via down-regulation of NF- κ B. Quercitrin is also well known for its antioxidant properties (Camuesco et al., 2004).

Our findings are also coherent with the fact that the aqueous extract of *S. terebinthifolius* leaves has been shown to reduce the weight loss in mice intoxicated by a sublethal intraperitoneal injection of ciguatoxic fish extracts (Amade and Laurent, 1992). Masticadienoic and masticadienolic acids, two triterpenoids that occur widely and have been previously isolated from *S. terebinthifolius* berries (Jain et al., 1995), have demonstrated NO inhibitory activities in *in vitro* LPS-activated peritoneal macrophages and inhibitory effects in the later phase of carrageenan-induced rat paw edema. In this delayed phase following the intraplantar injection of carrageenan, the cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-1 and IL-2 known to induce iNOS are produced (Oviedo-Chávez et al., 2004). Likewise, the flower extract of *P. granatum* and its components oleoanolic acid, ursolic acid, gallic acid, and maslinic acid were reported to inhibit LPS-induced NF- κ B activation in murine macrophages (Huang et al., 2005; Lansky and Newman, 2007). *In vivo* inhibition of NF- κ B has been found to prevent iNOS expression and systemic hypotension in a rat model of septic shock (Liu et al., 1997). This is of interest considering that cardiovascular distress reported in severely touched CFP victims is characterised by bradycardia and hypotension and signs of shock have also been observed (Lewis, 2001). Therefore, it is conceivable that, here, the protective effects of plant extracts in CFP could occur via selective inhibition of pro-inflammatory cytokines.

3.2.2. Plant extracts exhibiting both NO inhibitory and NO inducing effects

Plants classed in the second category (II) curiously exhibited dual but opposite effects, i.e. NO inhibition and induction (Table 2 and Fig. 3A and B). In this category, *Rhizophora x selala* (Salv.) Toml. (Rhizophoraceae), *A. argentea* (b), *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. (Sapindaceae), *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Brown (Convolvulaceae)

and *Spondias cytherea* (b) Sonnerat (Anacardiaceae) all revealed potent dual activities, i.e. significant NO inhibition and NO induction. Paradoxically, NO is known to play a pro-inflammatory role in the cutaneous diseases like allergies (Sahin et al., 2001) and is also involved in regulatory and protective functions in the skin via its vasodilatory action (Bruch-Gerharz et al., 1998). Leaves of *I. pes-caprae* are used traditionally as antidote against skin damages caused by jellyfish toxins. Severe vasoconstriction has been shown to be involved in the dermatitis caused by toxic jellyfishes, leading to local vascular insufficiency and gangrene (Pongprayoon et al., 1992). Prolonged pruritus leading to severe allergic-like dermatosis is one of the problems encountered by CFP victims (Lewis, 2001). Thus it is not surprising that some of these water-based CFP remedies like *A. argentea*, *Erythrina variegata* var. *fastigiata* Panch & Guillaumin (Papilionaceae), *S. malaccense* and *V. trifolia* are either taken orally as antiallergic agents, or used in antipruritic baths (Laurent et al., 1993).

S. cytherea (b) demonstrated significant activity in all of the three bioassays. However, instead of being cytotoxic, this extract showed an inverse effect by mildly increasing the cell viability (Table 2 and Fig. 3B). At 2.5 g/l, this effect was more significant ($P < 0.001$) and has also been observed for *X. americana* ($P < 0.01$) (data not shown). Such an increase was also reported in Neuro-2a models by Boydrone-Le Garrec et al. (2005) with plants such as *E. hirta*, *Scaevola sericea* Vahl (Goodeniaceae) and *P. granatum*.

3.2.3. Plant extracts exhibiting NO inhibitory activity as well as cytotoxicity

Included in the third (III) category are extracts of *Capsicum frutescens* L. (Solanaceae) and *S. sericea* (Table 2 and Fig. 4A and B) which presented NO inhibitory activity of ~30 and 20%, respectively, in addition to being cytotoxic (~10%) (data not shown). When studied in Neuro-2a model, *C. frutescens* presented no cytotoxicity on its own. On the contrary, it exerted protective effects against the toxicity induced by PbTx-3 (B), a functional congener of P-CTX-1B (Table 2), in combination with OV (Boydrone-Le Garrec et al., 2005). Unfortunately, in the present study the NO inhibitory activity of *C. frutescens* remains questionable as this suppressive effect could result from reduction in the viability of cells.

3.2.4. Plant extracts exhibiting NO induction and/or cytotoxicity but no significant NO inhibition or remaining inactive

The 12 plant extracts that did not exhibit any NO inhibitory activities fell in this fourth (IV) category (Table 2 and Fig. 5A and B). The extracts from *Saccharum officinarum* L. (Gramineae), *E. variegata* var. *fastigiata*, *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg (Moraceae) and *Stachytarpheta australis* Moldenke (Verbenaceae) did not exhibit any NO inhibitory activities. In contrast, these extracts induced spontaneous release of NO. In addition, the extract of *S. australis* was slightly cytotoxic. *Dendrobium umbellatum* (L.) Benth. (Papilionaceae), *Davallia solida* (J.R Forster & G. Forster) Swartz (Davalliaceae), *A. argentea* (l), *Duboisia myoporoides* (L.) Benth. (Solanaceae), *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae), *S. cytherea* (l), *Cocos nucifera* L. (Palmae) and *Carica papaya* L. (Caricaceae) were totally inactive when screened for NO inhibition, NO induction or cytotoxicity effects.

Strong spontaneous release of NO by plant extracts was observed for *S. officinarum* (30% induction, at a concentration of 0.025 g/l) and for *E. variegata* var. *fastigiata* (38% induction, at a concentration of 0.0025 g/l) (data not shown). The extract of *S. officinarum*, one of the few solution samples, which did not present any interference when tested at 2.5 g/l, was void of any NO inhibitory activity (Fig. 5B). Furthermore, the DPPH discoloration results obtained for *S. officinarum* correlate with this data (refer to Section 3.3). It is also worth mentioning that *S. officinarum* and *E. variegata* var. *fastigiata* both inactive in NO inhibition assay were also reported to be inactive

in Neuro-2a anticytotoxicity tests, even at a concentration of 5 g/l (Boydrone-Le Garrec et al., 2005). Nevertheless, it remains difficult to draw a parallel between these two tests. For example, the extracts of *M. citrifolia* and *D. myoporoides* that exhibited significant protective activity against OV and PbTx-3 (B)-induced cytotoxicity in Neuro-2a, were inactive in all of the three bioassays used in the present study (Table 2).

3.3. Effects of plant extracts on DPPH assay

The DPPH assay has been widely used as an antioxidation test to measure the free radical scavenging nature of various natural products. When this organic radical is stabilized by accepting an electron or hydrogen radical, its absorptive characteristic vanishes (Monje et al., 2006). Thus, DPPH scavenging capacities of 27 plant extracts have been investigated to provide complementary information on their antioxidation potentials (Table 2). With the exception of *S. officinarum*, all extracts tested show excellent activity at concentrations as low as 0.025 and 0.25 g/l (data not shown). In this regard, plants such as *E. hirta*, *A. argentea* (b), *R. x selala*, *S. terebenthifolius*, *S. cytherea* (b), *P. granatum*, *D. viscosa*, and *S. malaccense* (b) were found to exhibit strong IC₅₀ % DPPH scavenging values of ≤ 0.02 g/l.

4. Conclusion

Natural products are increasingly appreciated as leads for drug discovery and development. One key issue for successful discovery programs is to find cheap and rapid bioassays to identify biologically active secondary metabolites. Due to the lack of specific and practical bioassays permitting routine-based investigations, the study of beneficial effects of medicinal plants used in the Pacific in the treatment of CFP has been hampered. With the insight into P-CTX-1B iNOS inducing ability (Kumar-Roiné et al., 2008), the current study was undertaken and has disclosed that a number of plant extracts tested were able to inhibit nitrite accumulation in RAW 264.7 cellular supernatant. In particular, the extracts of *E. hirta*, *S. malaccense* (b), *S. terebenthifolius*, *P. granatum*, *C. manghas*, *V. trifolia* and *X. americana* have revealed to be effective NO inhibitors without showing cytotoxic or NO inductive effects.

The chemical nature of the water-soluble active molecules present in our plant extracts is unknown and further work is underway to fractionate and isolate the active molecules from these plants. Moreover, certain extracts like *S. malaccense* (l) and *P. tectorius* that did not exhibit potent NO inhibitory activity, may be worthy of further fractionation as the activity could be further enhanced if the active fractions are concentrated. However, we cannot rule out the possibility that the activity of complex extracts could sometimes be stronger than that of individual isolated compounds, thus emphasizing the need to preserve the native composition of herbal medicines.

The use of LPS instead of P-CTX-1B poses a limit to our study. The induction of iNOS is a complex process involving expression in a cascade of a multitude of factors and mediators all intercatenated to each other. This would mean that the process of up-regulation of iNOS may not be identical for the two stimuli. This could lead to variations in the results obtained with plants if the inhibitory activity is at transcriptional level. In addition, we cannot at this point differentiate if the ability of the plants to reduce nitrite accumulation in the cellular supernatants is resulting from the scavenging of NO radical produced or from the inhibition of iNOS formation or both. This would require biomolecular techniques involving the quantification of the iNOS protein and/or mRNA. Upon isolation of pure molecules, such activities would be investigated with P-CTX-1B.

Nevertheless, the preliminary results presented here validate the use of Griess reagent bioassay to study the beneficial effects

of plants used in CFP traditional medicine and show how these plants could be utile in curing certain chronic and even acute CFP inflammatory neuropathy and other NO-associated disorders. Further studies are currently carried out to characterize the therapeutic agents responsible for this activity in these plants.

Acknowledgments

This work was partly funded by a grant from the French Overseas Ministry. S.K.-R. and M.M. were supported by a doctoral fellowship from IRD (Paris, France) and the Southern Province of New Caledonia, respectively. The authors wish to thank Antoine Holu e and Alain Videault for their assistance in the collection and extraction of plant material.

References

- Adedapo, A.A., Abatan, M.O., Idowu, S.O., Olorunsogo, O.O., 2005. Effects of chromatographic fractions of *Euphorbia hirta* on the rat serum biochemistry. *African Journal of Biomedical Research* 8, 185–189.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G., 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* 357, 593–615.
- Amade, P., Laurent, D., 1992. Screening of traditional remedies used in ciguatera fish poisoning treatment. In: Gopalakrishnakone, P., Tan, C.K. (Eds.), *Recent Advances in Toxinology Research*, vol. 2. National University of Singapore, Singapore, pp. 503–508.
- Bagnis, R.A., 1973. L'ichtyosarcotoxisme dans le Pacifique Sud. *South Pacific Commission, Noumea, New Caledonia*, 112 pp.
- Benoit, E., Laurent, D., Mattei, C., Legrand, A.M., Molgó, J., 2000. Reversal of Pacific ciguatoxin-1B effects on myelinated axons by agent used in ciguatera treatment. *Cybiurn* 24, 33–40.
- Bhor, V.M., Thomas, C.J., Surolia, N., Surolia, A., 2005. Polymyxin B: an ode to an old antidote for endotoxic shock. *Molecular BioSystems* 1, 213–222.
- Bidard, J.N., Vijverberg, H.P.M., Frelin, C., Chungue, E., Legrand, A.M., Bagnis, R.A., Lazdunski, M., 1984. Ciguatoxin is a novel type of Na⁺ channel toxin. *Journal of Biological Chemistry* 259, 8353–8357.
- Bogdan, C., 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* 2, 907–916.
- Bottley, G., Fernandez, N., 2000. Dimerization of major histocompatibility complex class I on the surface of THP-1 cells stimulates the expression of inducible nitric oxide synthase and subsequent nitric oxide release. *Immunology* 100, 449–454.
- 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, R., Laurent, D., Sauviat, M.P., 2001. Un test biologique destin e à identifier les principes actifs des plantes utilisées comme remèdes traditionnels contre l'intoxication cigu terique en Nouvelle-Calédonie. In: Bon, C., Goudey-Perrière, F., Poulain, B., Puisieux-Dao, S. (Eds.), *Rencontres en toxinologie: Explorer, exploiter les toxines et maîtriser les organismes producteurs*, Editions scientifiques et médicales, Elsevier, Paris, pp. 63–66.
- Boydron, R., Sauviat, M.P., Benoit, E., Molgó, J., 2002. L'hémolyse des érythrocytes humains par la P-CTX-1: une méthode pour évaluer le potentiel thérapeutique des remèdes traditionnels utilis es en Nouvelle-Calédonie pour traiter la cigu tera. In: Goudey-Perrière, F., Bon, C., Puisieux-Dao, S., Sauviat, M.P. (Eds.), *Rencontres en toxinologie: Toxines et recherches biomédicales*, Editions scientifiques et médicales, Elsevier, Paris, pp. 101–104.
- 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 *in vitro* neurotoxicity produced by sodium channel activators. *Toxicol* 46, 625–634.
- Bruch-Gerharz, D., Ruzicka, T., Kolb-Bachofen, V., 1998. Nitric oxide in human skin: current status and future prospects. *Journal of Investigative Dermatology* 110, 1–7.
- Brune, B., Cantoni, O., 2000. Nitric oxide-mediated redox reactions in pathology, biochemistry and medicine. *Cell Death Differentiation* 7, 1018–1020.
- Camuesco, D., Comalada, M., Rodriguez-Cabezas, M.E., Nieto, A., Lorente, M.D., Concha, A., Zarzuelo, A., Gálvez, J., 2004. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *British Journal of Pharmacology* 143, 908–918.
- Chaabi, M., Freund-Michel, V., Frossard, N., Randriantra, A., Andriantsitohaina, R., Lobstein, A., 2007. Anti-proliferative effect of *Euphorbia stenoclada* in human airway smooth muscle cells in culture. *Journal of Ethnopharmacology* 109, 134–139.
- Chinain, M., Faust, M.A., Pauillac, S., 1999. Morphology and molecular analyses of three toxic species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae): *G. pacificus*, sp. nov., *G. australis*, sp. nov., and *G. polynesiensis*, sp. nov. *Journal of Phycology* 35, 1282–1296.
- Conner, E.M., Grisham, M.B., 1995. Nitric oxide: biochemistry, physiology, pathophysiology. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 7, 3–13.
- Cuzzocrea, S., Ripley, D.P., Caputi, A.P., Salvemini, D., 2001. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological Reviews* 53, 135–159.
- Dechraoui, M.Y., Naar, J., Pauillac, S., Legrand, A.M., 1999. Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels. *Toxicol* 37, 125–143.
- Dirsch, V.M., Stuppner, H., Vollmar, A.M., 1998. The Griess assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts? *Planta Medica* 64, 393–490.
- Farstad, D.J., Chow, T., 2001. A brief case report and review of ciguatera poisoning. *Wilderness and Environmental Medicine* 12, 263–269.
- Friedman, M.A., Fleming, L.E., 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.
- Fujihara, M., Muroi, M., Tanamoto, K., Suzuki, T., Azuma, H., Ikeda, H., 2003. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacological Therapeutics* 100, 171–194.
- Gálvez, J., Zarzuelo, A., Crespo, M.E., Lorente, M.D., Ocete, M.A., Jiménez, J., 1993. Antidiarrhoeic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent. *Planta Medica* 59, 333–336.
- Guo, F.H., Comhair, S.A.A., Zheng, S., Dweik, R.A., Eissa, N.T., Thomassen, M.J., Calhoun, W., Erzurum, S.C., 2000. Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. *Journal of Immunology* 164, 5970–5980.
- Halstead, B.W., 1978. *Poisonous and Venomous Marine Animals of the World*, Revised ed. The Darwin Press Inc, Princeton, USA, 238 pp.
- Hashimoto, Y., Konosu, S., Yasumoto, T., Kamiya, H., 1969. Ciguatera in the Ryukyu and Amami Islands. *Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Science* 35, 316–326.
- Hirvonen, M.R., Brune, B., Lapetina, E.G., 1996. Heat shock proteins and macrophage resistance to the toxic effects of nitric oxide. *Biochemistry Journal* 315, 845–849.
- Huang, T.H.W., Yang, Q., Harada, M., Li, G.Q., Yamahara, J., Roufogalis, B.D., Li, Y., 2005. Pomegranate flower extract diminishes cardiac fibrosis in Zucker diabetic fatty rats: modulation of cardiac endothelin-1 and nuclear factor-kappaB pathways. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 46, 856–862.
- Jain, M.K., Yu, B.Z., Rogers, J.M., Smith, A.E., Boger, E.T., Ostrander, R.L., Rheingold, A.L., 1995. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry* 39, 537–547.
- Jiang, J.S., Shih, C.M., Wang, S.H., Chen, T.T., Lin, C.N., Ko, W.C., 2006. Mechanisms of suppression of nitric oxide production by 3-O-methylquercetin in RAW 264.7 cells. *Journal of Ethnopharmacology* 103, 281–287.
- Johnson, P.B., Abdurahman, E.M., Tiam, E.A., Abdu-Aguye, I., Hussaini, I.M., 1999. *Euphorbia hirta* leaf extracts increase urine output and electrolytes in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 65, 63–69.
- Kim, J.Y., Choi, C.Y., Lee, K.L., Shin, D.W., Jung, K.S., Chung, Y.C., Lee, S.S., Shin, J.G., Jeong, H.G., 2004. Induction of inducible nitric oxide synthase and pro-inflammatory cytokines expression by o, p'-DDT in macrophages. *Toxicology Letters* 147, 261–269.
- Ko, W.C., Shih, C.M., Chen, M.C., Lai, Y.H., Chen, J.H., Chen, C.M., Lin, C.N., 2004. Suppressive effects of 3-O-methylquercetin on ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness. *Planta Medica* 70, 1123–1127.
- Kröncke, K.D., Fehsel, K., Kolb-Bachofen, V., 1998. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clinical and Experimental Immunology* 113, 147–156.
- Kumar-Roiné, S., Matsui, M., Chinain, M., Laurent, D., Pauillac, S., 2008. Modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in RAW 264.7 murine macrophages by Pacific ciguatoxin. *Nitric Oxide* 19, 21–28.
- Lansky, E.P., Newman, R.A., 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology* 109, 177–206.
- Laurent, D., Bourdy, G., Amade, P., Cabalion, P., Bourret, D., 1993. La gratte ou cigu tera: ses remèdes traditionnels dans le Pacifique Sud. ORSTOM Editions, Paris, pp. 51–116.
- Lechner, M., Lirk, P., Rieder, J., 2005. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Seminars in Cancer Biology* 15, 277–289.
- Lehane, L., Lewis, R.J., 2000. Ciguatera: recent advances by the risk remains. *International Journal of Food Microbiology* 61, 91–125.
- Lewis, R.J., 2001. The changing face of ciguatera. *Toxicol* 39, 97–106.
- Liu, S.F., Ye, X., Malik, A.B., 1997. *In vivo* inhibition of nuclear factor- B activation prevents inducible nitric oxide synthase expression and systemic hypotension in a rat model of septic shock. *Journal of Immunology* 159, 3976–3983.
- Lombet, A., Bidard, J.N., Lazdunski, M., 1987. Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na⁺ channel. *FEBS Letters* 219, 355–359.
- 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.
- Martínez-Florez, S., Gutiérrez-Fernández, B., Sánchez-Campos, S., González-Gallego, J., Tu n on, M.J., 2005. Quercetin attenuates nuclear factor- B activation and nitric oxide production in interleukin-1 -activated rat hepatocytes. *Journal of Nutrition* 135, 1359–1365.
- Moncada, S., Higgs, A., 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England Journal of Medicine* 329, 2002–2012.
- Monje, M.C., Berger, M., Farines, V., Reybier, K., Verger, A., Dayde, J., Theodorou, V., Nepveu, F., 2006. Antioxidant capacity of cotyledons and germs of soybean in relation to their isoflavone content. *Food Technology and Biotechnology* 44, 493–498.
- Nicholson, G.M., Lewis, R.J., 2006. Ciguatoxins: cyclic polyether modulators of voltage-gated ion channel function. *Marine Drugs* 4, 82–118.

- Noro, T., Hishihara, G.N., Terada, R., Yoropiy, A., 2003. Ciguatera fish poisoning in Ulithi Atoll, Yap state, Micronesia. In: Aouama, T. (Ed.), The Progress Report of the 2000 and 2001 Survey of the Research Project "Social Homeostasis of Small Island in an Island-Zone", Yap Proper and Ulithi Atoll, Micronesia. Kagoshima University Research Center for the Pacific Islands, Kagoshima, Japan, Occasional Papers N°39, Section 2, Report 9, pp. 83–86.
- Oviedo-Chávez, I., Ramírez-Apan, T., Soto-Hernández, M., Martínez-Vázquez, M., 2004. Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine* 11, 436–445.
- Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L., 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews* 87, 315–424.
- Pearn, J., 2001. Neurology of ciguatera. *Journal of Neurological and Neurosurgical Psychiatry* 70, 4–8.
- Pongprayoon, U., Baeckström, P., Jacobsson, U., Lindström, M., Bohlin, L., 1992. Antispasmodic activity of beta-damascenone and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. *Planta Medica* 58, 19–21.
- Poyrazoğlu, E., Gökmen, V., Artık, N., 2002. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis* 15, 567–575.
- Ruff, T.A., Lewis, R.J., 1994. Clinical aspects of ciguatera: an overview. *Memorial of Queensland Museum* 34, 609–619.
- Ryu, J.H., Ahn, H., Lee, H.J., Feng, L., Qun, W.H., Han, Y.N., Han, B.H., 2001. Inhibitory activity of Chinese medicinal plants on nitric oxide synthesis in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Journal of Applied Pharmacology* 9, 183–187.
- Sahin, S., Onder, M., Sancak, B., Bukan, N., Gurer, M., 2001. The role of nitric oxide in allergic contact dermatitis. *Archives of Dermatological Research* 293, 214–217.
- Sharma, V.S., Pliz, R.B., Boss, G.R., Magde, D., 2003. Reactions of nitric oxide with vitamin B12 and its precursor cobinamide. *Biochemistry* 40, 8900–8908.
- Shen, Y.C., Shiao, Y.J., Sung, Y.J., Wang, C.N., 2005. Pathogenesis of neurodegenerative diseases and the effect of natural products on nitric oxide production implication in these diseases. *Journal of Clinical Medicine* 16, 63–87.
- Shiga, M., Nishina, K., Mikawa, K., Obara, H., 2001. The effects of lidocaine on nitric oxide production from an activated murine macrophage cell lines. *Anaesthesia Analgesia* 92, 128–133.
- Stone, W.L., Yang, H., Qui, M., 2006. Assays for nitric oxide expression. *Method in Molecular Biology* 315, 246–256.
- Szabo, C., Mitchell, J.A., Gross, S.S., Thiemermann, C., Vane, J.R., 1993. Nifedipine inhibits the induction of nitric oxide synthase by bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 265, 674–680.
- Tsuneyoshi, I., Kanmura, Y., Yoshimura, N., 1996. Methylprednisolone inhibits endotoxin-induced depression of contractile function in human arteries *in vitro*. *British Journal of Anaesthesia* 76, 251–257.
- Weisz, A., Cicatiello, L., Esumi, H., 1996. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- γ , bacterial lipopolysaccharide and N^G-monomethyl-L-arginine. *Biochemical Journal* 316, 209–215.
- Yanaka, N., Koyama, T.A., Komatsu, B., Nakamura, E., Kanda, M., Kato, N., 2005. Vitamin B6 suppresses NF-kappaB activation in LPS-stimulated mouse macrophages. *International Journal of Molecular Medicine* 16, 1071–1075.
- Yaron, I., Shirazi, I., Judovich, R., Levartovsky, D., Caspi, D., Yavon, M., 1999. Fluoxetine and amitriptyline inhibit nitric oxide, prostaglandin E2 and hyaluronic acid production in human synovial cells and synovial tissue cultures. *Arthritis and Rheumatism* 42, 2561–2568.

III. Discussion

III.1 Les tests biochimiques

Après 24 h d'incubation, les résultats des deux tests, TG et au MTT, sont analysés. Aucun effet d'interférence ne fut observé dans les témoins négatifs lors du test au MTT pour les 28 extraits de plantes, ce qui ne fut pas le cas avec le TG. En effet, de nombreux surnageants contenant des extraits de plantes à la concentration de 2500 µg/mL furent saturés par la couleur des pigments des plantes. Par conséquent, les données obtenues à ces concentrations de plantes ne furent pas prises en considération. Cependant, aucun de ces 28 extraits de plantes ne provoqua une inhibition du NO• aux deux plus faibles concentrations de 2,5 et 25 µg/mL. En revanche, des données intéressantes furent obtenues avec les traitements à la concentration de 250 µg/mL. Les données obtenues à cette concentration furent donc analysées (voir l'annexe 2 pour l'intégralité des données).

Parmi les 28 extraits de plantes testés, 16 furent capables de réduire significativement les taux de nitrite dans les surnageants cellulaires. De ces 16 extraits aqueux, ceux à partir de la plante entière d' *Euphorbia hirta*, de feuilles et d'écorce de *Syzygium malaccense*, de feuilles de *Schinus terebenthifolius* et de *Vitex trifolia*, de fruits de *Punica granatum*, du latex de *Cerbera manghas*, de racines de *Ximenia americana* et de racines aériennes de *Pandanus tectorius* montrèrent une plus ou moins forte activité inhibitrice du NO• sans manifester de cytotoxicité ni d'effets inducteurs dans les 24 heures.

Nous avons constaté que les extraits aqueux provenant d'écorce d' *Heliotropium foertherianum* (anciennement nommé *Argusia argentea*), d' *Erythrina variegata* var. *fastigiata*, de *Rhizophora x selala*, et de *Spondias cytharea*, de racines d' *Ipomoea pes-caprae* et de *Stachytarpheta australis*, de feuilles de *Dodonaea viscosa*, de tiges de *Saccharum officinarum* et de bourgeons de feuilles et de latex d' *Artocarpus altilis* étaient capables d'induire une surproduction spontanée du NO• avec l'apparition d'une coloration rose dans les surnageants après addition du réactif de Griess.

Le test au MTT a révélé que les extraits de fruits de *Capsicum frutescens* et des feuilles de *Scaevola sericea* présentaient une toxicité sur les cellules RAW 264.7. Quant à l'extrait de

racine de *S. australis*, il a provoqué une légère mais significative augmentation de la viabilité cellulaire.

En ce qui concerne le criblage avec le test au DPPH, à l'exception de l'extrait de *S. officinarum* et de *X. americana*, tous les extraits de plantes ont manifesté des activités antioxydantes significatives. Les extraits d'*E. hirta*, de *S. malaccense* (feuille et écorce), de *S. terebenthifolius*, et de *P. granatum* montrèrent une IC_{50} inférieure à 20 $\mu\text{g/mL}$ dans leur capacité à piéger le radical DPPH.

III.2 Les tests complémentaires

Suite au criblage décrit ci-dessus, notre équipe a entrepris des études complémentaires au niveau moléculaire pour confirmer le caractère anti-inflammatoire de certains de ces extraits, notamment ceux d'*E. hirta*, de *V. trifolia*, de *C. manghas* et de feuilles de *H. foertherianum*. Les effets de ces quatre extraits sur la modulation de l'expression de l'iNOS et de différentes cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α et IL-10) induites par le LPS dans les cellules RAW 264.7 furent étudiés par les techniques de qPCR et d'ELISA (Matsui et al., 2009b ; 2009c). Bien que les méthodes et les résultats obtenus ne fassent pas dans leurs détails l'objet de cette thèse¹⁰, leur interaction générale avec le présent projet de recherche est néanmoins discutée ci-dessous. Les résultats de ces expériences sont notamment détaillés et comparés à ceux obtenus avec le TG dans le Tableau 2.

A l'aide de ces tests biologiques, nous avons montré que les extraits d'*E. hirta* et de *V. trifolia* étaient capables d'agir sur l'activité inflammatoire du LPS en modulant fortement la surexpression des ARNm de l'iNOS et des cytokines. De même, pour ces deux extraits, une forte diminution du niveau d'expression protéique de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF- α) a également été observée. Il est important de noter que ces résultats reflètent ceux obtenus avec le TG. Par ailleurs, l'extrait de feuilles d'*H. foertherianum* ne présente qu'un léger potentiel anti-inflammatoire dans le test qPCR, confirmant également les résultats obtenus avec le TG.

¹⁰ Ces travaux sont développés dans la thèse de doctorat de Mariko MATSUI.

Tableau 2 : Les effets des extraits aqueux de *Cerbera manghas*, d'*Euphorbia hirta*, d'*Heliotropium foertherianum* et de *Vitex trifolia* sur l'accumulation de nitrite dans les surnageants de cellules RAW 264.7 stimulées avec du LPS, comparés à l'inhibition ou l'induction de l'expression de l'ARNm et/ou protéine de l'iNOS, de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF- α) et d'une cytokine anti-inflammatoire (IL-10).

Plantes (extraction)	% Activité inhibitrice sur l'accumulation de nitrite (TG) ^a	Activité inhibitrice sur l'expression d'ARNm de l'iNOS (qPCR) ^b	Activité inhibitrice sur l'expression d'ARNm des cytokines (qPCR) ^b	Effet sur le taux d'expression protéique des cytokines (ELISA) ^c	Activité antioxydante (test au DPPH) avec IC ₅₀ (μ g/mL) ^d	Niveau de régulation de l'inhibition de la voie de iNOS/ NO•
<i>Euphorbia hirta</i> L. (Décoction de la plante entière)	44,9 +++	Inhibition à 2, 4, 8, 12 et 24 h NS, NS, ++, ++, +++	Inhibition à 2, 4, 8 à 12 h (IL-1 β) NS, +, +++, ++	Inhibition à 12 et 24 h (IL-6) NS, ++ Inhibition à 12 et 24 h (TNF- α) ++, ++	10,0	Transcriptionnel
<i>Cerbera manghas</i> L. (Homogénéisation du latex libéré de pétiole de feuilles dans l'eau à 40°C)	16,6 +++	Inhibition NS	NS (IL-1 β)	ND	687,7	Transductionnel ou piègeur de NO•
<i>Vitex trifolia</i> L. (Décoction de feuilles)	13,9 +++	Inhibition à 2, 4, 8 et 12 h NS, +, +, +	Inhibition à 2, 4, 8, 12 et 24 h (IL-1 β) +, +++, +++, ++, ++ Inhibition à 2, 4, 8 et 12 h (IL-6) +, ++, +++, ++	Inhibition à 12 et 24 h (IL-6) +, + Inhibition entre 12 et 24 h (TNF- α) +, NS Induction à 12 et 24 h (IL-10) -, -	64,5	Transcriptionnel
<i>Heliotropium foertherianum</i> Diane & Hilger (Décoction de feuilles jaunies)	3,3 NS	Inhibition à 8, 12 et 24 h NS, NS, +	Inhibition entre 12 et 24 h (IL-1 β) +, +	ND	29,0	

^a Effet des extraits aqueux de plantes, *C. manghas*, *E. hirta*, *H. foertherianum* et *V. trifolia* à 250 μ g/mL sur l'accumulation de nitrite dans les surnageants des cellules RAW 264.7 co-traitées avec du LPS (10 μ g/mL) à 24 h. Les inhibitions exprimées en pourcentage sont pondérées par rapport aux témoins positifs (cellules traitées au LPS uniquement) (Publication 2).

^b Cinétique de l'effet des extraits aqueux de plantes, *E. hirta* et *H. foertherianum* à 250 et *V. trifolia* à 2500 μ g/mL sur la surexpression de l'ARNm de l'iNOS et des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et IL-6) induite dans les cellules RAW 264.7 stimulées avec du LPS (0,5 μ g/mL) de 0 à 24 h (Matsui et al., 2009b ; 2009c).

^c Effet des extraits aqueux de plantes, *E. hirta* à 250 et *V. trifolia* à 2500 μ g/mL à 12 et 24 h sur la modulation du taux d'expression protéique des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF- α) et d'une cytokine anti-inflammatoire (IL-10) induite dans les cellules RAW 264.7 stimulée au LPS (0,5 μ g/mL) (Matsui et al., 2009b ; 2009c).

^d Effet antioxydant des extraits aqueux de plantes, *C. manghas*, *E. hirta*, *H. foertherianum* et *V. trifolia* (0, 2,5, 25, 250 et 2500 μ g/mL) sur le radical DPPH après 30 mins exprimé en valeur d'IC₅₀ valeurs (Publication 2).

Abréviations : ND : indéterminé ; NS : non significatif ($P > 0,05$) ; (+), (+ +) et (+ + +) : diminution significative ($0,01 < P < 0,05$, $0,001 < P < 0,01$ et $P < 0,001$) ; (-), (--) et (---) : augmentation significative ($0,01 < P < 0,05$, $0,001 < P < 0,01$ et $P < 0,001$).

A contrario, l'extrait de *C. manghas* qui était modérément actif au cours du TG (montrant une inhibition à peine plus forte que celle le *V. trifolia*) n'a pas provoqué d'inhibition de la surexpression des gènes de l'iNOS, ni des différentes cytokines. Ceci indique que l'aptitude pharmacologique de cet extrait à réduire la production du NO• se situerait plutôt dans sa capacité à inhiber l'expression de la protéine iNOS. Mais il est aussi possible, étant donné sa complexité matricielle chimique, que l'activité inhibitrice du NO• observée par le TG dans cet extrait et ceux d'*E. hirta* et *V. trifolia*, puisse aussi être partiellement attribuée à leur forte activité antioxydante révélée par le test au DPPH. Cependant, l'extrait de feuilles d'*H. foertherianum* manifeste une activité équivalente de piégeage du radical DPPH que les extraits de *V. trifolia* et d'*E. hirta*, bien qu'à l'inverse de ceux-ci, il ne présente qu'une légère activité avec le TG.

En nous appuyant sur les activités pharmacologiques observées dans ces présentes études (TG, qPCR et ELISA) ainsi que sur celles du passé (tests d'électrophysiologie, de neurophysiologie, de physiologie cellulaire, et de neurotoxicité), nous avons sélectionné trois extraits de plantes : l'extrait de la plante entière d'*E. hirta* et de feuilles d'*H. foertherianum* et de *V. trifolia*, pour un fractionnement chimique bioguidé avec le TG.

Bien que l'extrait d'*H. foertherianum* n'ait pas démontré d'activités anti-inflammatoires probantes, nous l'avons néanmoins sélectionné pour les études chimiques bioguidées ultérieures en raison de ses diverses propriétés thérapeutiques démontrées dans plusieurs des études effectuées précédemment dans le cadre de recherche thérapeutique sur la ciguatera. Une autre raison de ce choix est que, après la séparation chimique, il sera éventuellement possible d'observer des activités du fait de la plus grande concentration de la ou des molécules actives dans les fractions. Cette question sera abordée dans la partie 3.

Chapitre 2 : Etude *in vitro* de l'inhibition de la liaison de brévéttoxine tritiée à son site de haute affinité par les phytothérapies utilisées contre la ciguatera

I. Introduction

Eléments critiques pour la génération et la propagation des signaux électriques dans la plupart des cellules excitables, les canaux sodiques dépendants du potentiel (CSDP) sont des cibles pour un grand nombre de composés tels que les anesthésiques locaux, les insecticides ou les diverses neurotoxines comme les ciguatoxines (CTXs) ou les brévéttoxines (PbTx). La liaison de ces toxines affecte la fonction du canal sodique en provoquant 4 effets distincts : un déplacement du potentiel d'activation vers des valeurs plus négatives, une prolongation du temps moyen d'ouverture, l'inhibition de l'inactivation et la visualisation de multiples états de sous-conductance (Ojeda et al., 2008).

Les CTXs se lient quasi-irréversiblement au site 5 des CSDP (Ulbricht, 2005). Cette liaison rentre en jeu dans la manifestation de symptômes neurologiques centraux et périphériques observés dans la ciguatera. Le caractère irréversible ou très faiblement réversible de la liaison des CTXs à leur cible peut expliquer les longues périodes nécessaires à un rétablissement clinique chez les patients souffrant de ciguatera, les rechutes des années plus tard observées chez certains malades ainsi que la sévérité croissante des symptômes lors d'intoxications répétées (Dickey, 2008 ; Lehane et Lewis, 2000).

Le test d'interaction ligand-récepteur (TILR) associé à la synthèse d'une brévéttoxine radiomarquée au tritium *via* la réduction du PbTx-2 (aldéhyde) en [³H]-PbTx-3 (alcool primaire) par le [³H] borohydrure de sodium fut une étape décisive dans la recherche pharmacologique des neurotoxines, PbTxs et CTXs. Ce test a en effet permis d'identifier le site 5 comme étant la cible primaire des PbTxs sur la sous-unité α du CSDP (Catterall et Gainer, 1985; Ramsdell, 2008). Ceci a été suivi par plusieurs expériences de déplacement homologue pour déterminer les affinités (K_i) relatives aux différents analogues des PbTxs (Poli et al., 1986).

Par la suite, sur la base des expériences de déplacement hétérologue¹¹, les CTXs furent également classées comme neurotoxines du site 5 (Dechraoui et al., 1999). Les CTXs et PbTxS sont ainsi deux familles de toxines liposolubles et polyéthérées, ayant des structures chimiques similaires et partageant la même cible moléculaire. Elles furent donc longuement étudiées pour leur capacité à entrer en compétition avec la [³H]-PbTx-3 (voir Fig. 3 pour les valeurs de K_i).

II. Principe des études d'interaction ligand-récepteur

Outil neuropharmacologique relativement simple mais puissant, le TILR est aujourd'hui utilisé en association avec le test souris et le test de cytotoxicité sur les cellules Neuro-2a pour détecter la présence de CTXs ou d'autres toxines de « type-ciguatoxines » dans des échantillons biologiques tels que des extraits de *Gambierdiscus* (sauvages ou de culture) ou de poissons (Boydron-Le Garrec et al., 2005b ; Guzmán-Perez et Park, 2000). Le principe de ces expériences consiste à mettre les récepteurs, et par conséquent les préparations membranaires riches en canaux sodiques, en présence d'un ligand, la [³H]-PbTx-3, et de doser la quantité de complexe ligand-récepteur formé en présence ou en absence de molécules inhibitrices, telles que les PbTxS, CTXs, ou bien d'autres composés, par la mesure de la radioactivité par scintillation liquide. L'inhibition sélective de la fixation de la [³H]-PbTx-3 au site 5 est observée par la diminution dose-dépendante de la radioactivité (Fig. 3).

Les CTXs radiomarquées n'étant pas disponibles, la [³H]-PbTx-3 est utilisée pour évaluer l'activité inhibitrice des CTXs. Ces expériences de déplacement hétérologue ont également été utilisées pour étudier le comportement des polyéthers isolés comme les yessotoxines, le gambierol, l'acide gambierique A et le brevenal. Le gambierol et le brevenal déplacent la [³H]-PbTx-3 du site 5 des synaptosomes avec une valeur de K_i respective de 1.4-4.8 μ M et de 685 nM (Bourdelaïs et al., 2004 ; LePage et al., 2007 ; Inoue et al., 2003). Ces activités inhibitrices des CTXs, du gambierol et du brevenal sont purement de nature compétitive, de telle sorte qu'ils empêchent l'accès des [³H]-PbTx-3 au site 5 des CSDP.

¹¹ Les déplacements hétérologues à l'inverse de déplacement homologues consistent en une inhibition de la liaison de la [³H]-PbTx-3 au récepteur par une molécule autre que les PbTxS.

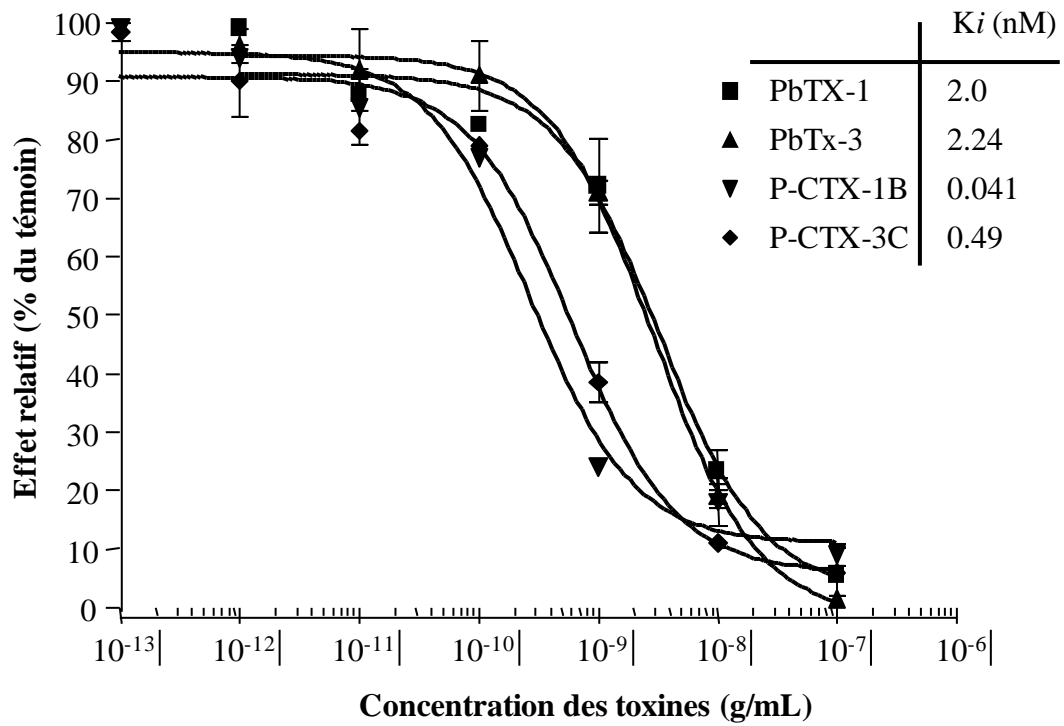


Figure 3 : Courbes de compétition de la fixation de [^3H]-PbTx-3 par différents inhibiteurs, ciguatoxines (déplacement hétérologue) et brevéttoxines (déplacement homologue), sur les synaptosomes de cerveaux de rats et leurs valeurs de K_i d'après Dechraoui-Bottein, 1999.

Composés respectivement de 8 et 5 cycles condensés, le gambierol et le brevenal (Fig. 4), - bien que capables de se fixer au site 5 - ne semblent pas provoquer de réponses neurotoxiques comme le font les CTXs et les PbTx_s (Bourdelaïs et al., 2004 ; LePage et al., 2007) et se révèlent être de bon antagonistes de ces deux familles de toxines. Aussi, ces deux composés et leurs analogues peuvent servir de pistes intéressantes dans le développement de thérapies visant à prévenir ou soigner les intoxications neurologiques dues aux PbTx_s ou aux CTXs.

Lors de l'étude pharmacologique *in vitro* menée par Boydrón-Le Garrec et al. (2005a), 21 des 23 remèdes traditionnels non toxiques testés montrèrent une action préventive contre la cytotoxicité induite par la PbTx-3 et la P-CTX-1B sur les cellules Neuro-2a. Dans cet essai, l'application simultanée de la ouabaïne et de la vératridine, deux agents qui potentialisent les effets des CTXs et des PbTx_s sur les canaux sodiques, est nécessaire. En effet, en absence de ces agents, ni les PbTx_s, ni les CTXs n'ont d'effet d'abaissement de la viabilité cellulaire. Par conséquent, nous sommes en présence de réponses cytotoxiques induites dans ces cellules par l'action spécifique de ces neurotoxines sur les canaux sodium (Dickey, 2008).

Le TILR devrait pouvoir nous permettre de spécifier si la réponse inhibitrice de la cytotoxicité observée avec ces extraits de plantes est due à leur action sur ces canaux. Aussi, dans cette optique, nous avons recherché si un de nos extraits de plantes inhibait la liaison de la [³H]-PbTx-3 au site 5 des CSDP. Ce projet est très novateur car, à notre connaissance, aucun extrait de plantes n'avait été testé avec ce modèle bien que cette technique ait été employée dans de nombreux autres programmes de pharmacochimie pour identifier des composés leaders qui agiraient sur des récepteurs vitaux dans les fonctions neuronales, immunologiques, gastrointestinales ou cardiovasculaires (Caballero-George et al., 2001 ; Vlietinck et Apers, 2001).

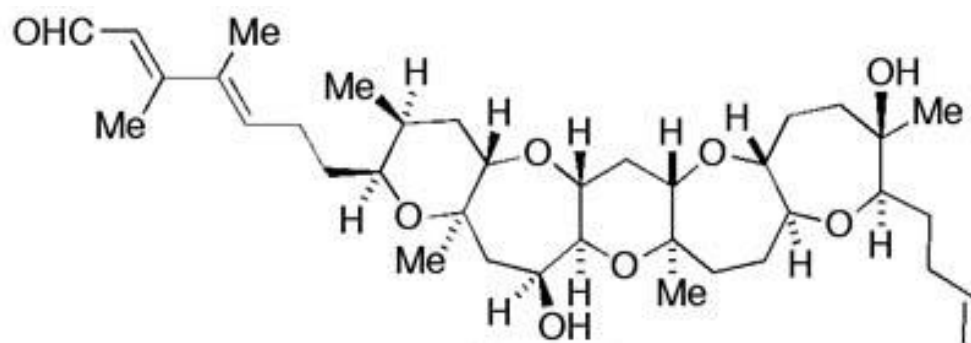
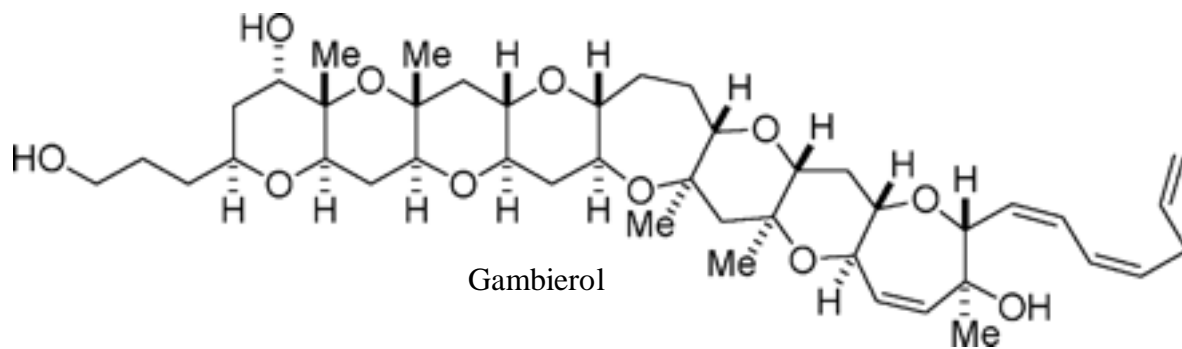


Figure 4 : Structure chimique du gambierol et du brevenal

III. Matériel et méthodes

Dans le cadre d'un programme de recherche sur la gestion de risque de ciguatera dans les lagons de Polynésie Française, le Laboratoire de recherche sur les Micro-algues Toxiques de l'Institut Louis Malardé à Tahiti emploie plusieurs voies de détection de CTXs dont le TILR. Ce dernier, suffisamment précis et sensible, a abouti à la mise au point d'une méthode de dosage en routine des CTXs. Pour la présente étude, nous avons procédé à une légère modification dans le protocole en remplaçant les extraits d'algues ou de poissons potentiellement ciguatoxiques par des extraits de plantes en concentrations croissantes.

III.1 Matériel

Sauf spécifications, tous les réactifs et milieux utilisés dans les expérimentations suivantes proviennent de chez Sigma-Aldrich (Lyon, France).

III.2 Préparation des extraits de plantes

En s'appuyant sur les résultats des études précédentes *in vitro* reportées par Boydrón-Le Garrec et al. (2005a), 24 extraits aqueux préparés à partir de 21 plantes furent sélectionnés (Tableau 3). Récoltés dans les régions côtières de Nouvelle-Calédonie, la détermination taxonomique des échantillons botaniques fut confirmée par comparaison avec des échantillons référencés déposés à l'herbier de l'IRD. Les parties étudiées (feuilles, racines, écorce, ou autres) des différentes plantes ont été recueillies et extraites par ébullition, infusion ou macération dans de l'eau distillée (voir Tableau 3). Les extraits aqueux ont été filtrés et le filtrat lyophilisé. Les extraits secs ont été pesés et redissous dans l'eau pour les tests. En cas d'apparition de suspensions lourdes, la solution a été décantée et seul le surnageant a été utilisé.

Tableau 3 : Activités inhibitrices des extraits aqueux de plantes utilisées dans le traitement de la ciguatera vis-à-vis de la fixation de la [³H]-PbTx-3 au site 5 de canaux sodiques dépendants du potentiel de synaptosomes de cerveaux de rats.

Nom des plantes	Parties de plante	Extraction	Solution stock (mg/mL)	Concentrations testées (µg/mL)	IC ₅₀ (mg/ml)		Coefficient de Hill	Anti-cytotoxicité ^b	
								PbTx-3	P-CTX-1B
<i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg	Feuilles bourgeons, latex sécrété	Macération 24 h	100	120 - 40 000	2,4	+	-0,4	55,0	36,0
<i>Capsicum frutescens</i> L.	Fruits	Macération 30 min	100	120 - 40000	9,8	+	-0,6	40,7	
<i>Carica papaya</i> L.	Fleurs mâles	Décoction 30 min	100	120 - 40000	23,7	+	-1,3	44,1	
<i>Cocos nucifera</i> L.	Jeunes racines	Décoction 30 min	100	120 - 40000	≥ 40	-	ND	-16,1	
<i>Davallia solida</i> (J.R Forster & G. Forster) Swartz	Racines	Décoction 3 min	100	120 - 40000	0,2	+	-0,4	-16,1	
<i>Dendrobium umbellatum</i> (L.) Benth.	Feuilles	Décoction 15 min	100	120 - 40000	13,2	+	-0,2	33,8	
<i>Duboisia myoporoides</i> R. Br.	Jeunes Feuilles	Infusion 20 min	50	60 – 20000	1,8	+	-0,6	30,7	
<i>Euphorbia hirta</i> L.	Plante entière	Décoction 10 min	100	120 - 40000	3,3	+	-0,4	74,8	101,9
<i>Heliotropium foertherianum</i> Diane & Hilger	Ecorce	Décoction 30 min	100	120 - 40000	24,8	+	-0,5	33,5	
<i>Heliotropium foertherianum</i> Diane & Hilger	Feuilles jaunes	Décoction 20 min	50	60 – 20000	3,6 ^a	++	-0,7	26,0	
<i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R. Brown	Racines	Décoction 20 min	100	120 - 40000	21,3	+	-0,3	18,9	
<i>Morinda citrifolia</i> L.	Fruits	Macération 30 min	100	120 - 40000	3,5	+	-3,1	38,4	
<i>Pandanus tectorius</i> Parkinson	Racines aériennes	Décoction 30 min	100	120 - 40000	3,5 ^a	++	-0,7	33,7	
<i>Punica granatum</i> L.	Fruits	Décoction 10 min	100	120 - 40000	0,6	+	-0,4	49,8	
<i>Rhizophora x selala</i> (Salv.) Toml.	Ecorce	Décoction 30 min	100	120 - 40000	≥ 40	-	ND	69,8	
<i>Scaevola sericea</i> Vahl	Feuilles	Décoction 15 min	100	120 - 40000	3,8	+	-0,4	52,0	61,0
<i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi	Feuilles	Infusion 30 min	100	120 - 40000	≥ 40	-	ND	28,3	
<i>Spondias cytherea</i> Sonnerat	Ecorce	Macération agitation 1 h	100	120 - 40000	≥ 40	-	ND	61,6	44,0
<i>Spondias cytherea</i> Sonnerat	Feuilles	Décoction 10 min	50	60 – 20000	3,3	+	-1,2	34,4	
<i>Stachytarpheta australis</i> Moldenke	Racines	Macération 10 min	50	60 – 20000	1,8	+	-0,5	50,3	28,9
<i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & Perry	Ecorce	Macération 30 min	100	120 - 40000	6,2	+	-0,3	13,8	
<i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & Perry	Feuilles	Infusion 20 min	100	120 - 40000	≥ 40	-	ND	48,7	
<i>Vitex trifolia</i> L.	Feuilles	Décoction 30 min	50	60 – 20000	4,8 ^a	++	-1,0	28,9	
<i>Ximения americana</i> L.	Racines	Macération froide 30 min	100	120 - 40000	7,4	+	-1,3	40,6	

^a Pour ces 3 extraits uniquement n = 8 (n=N × 4 ; N = 2).

^b Augmentation de la viabilité cellulaire des Neuro-2a co-traitées avec les extraits de plantes (5 g/L), l'ouabaine (417 µM), la vétratridine (41,7 µM) et la PbTx-3 (12 nM) [OVV] ou la P-CTX-1B (5 pM) [OVC] exprimée en pourcentage de cellules exposées à OVB ou à OVC (Boydron-Le Garrec et al., 2005a).

Les extraits présentant une toxicité sur les cellules Neuro-2a sont surlignés en grisé comme précédemment reporté par Boydron-Le Garrec et al. (2005a).

Abréviations : ND : non défini ; (-) : valeur d'IC₅₀ ≥ 20 mg/mL pour les extraits testés à 50 mg/mL ou ≥ 40 mg/mL pour les extraits testés à 100 mg/mL ; (+) : valeur d'IC₅₀ < 20 mg/mL pour les extraits testés à 50 mg/mL ou < 40 mg/mL pour les extraits testés à 100 mg/mL ; (++) : extraits ayant la valeur d'IC₅₀ < 20 mg/mL mais également la courbe d'une allure de sigmoïde.

III.3 Test d'interaction ligand-récepteur

III.3.1 Préparation des synaptosomes

Les synaptosomes ont été préparés suivant le protocole décrit par Dechraoui-Bottein (1999). Cette méthode consiste à débarasser l'homogénat des tissus cérébraux, débris cellulaires, mitochondries, myéline et microsomes par trois centrifugations successives sur solution de sucrose (Fig. 5).

Des rats adultes (250 g) sont tués par inhalation de CO₂, leurs hémisphères cérébraux sont prélevés et congelés à l'azote liquide, pour être stockés à -80 °C avant d'être utilisés pour la préparation des synaptosomes. Toutes les étapes de purification sont réalisées à 4 °C avec des récipients préalablement refroidis.

Une trentaine d'hémisphères cérébraux est pesée (45 g), décongelée puis homogénéisée dans un tampon phosphate contenant du sucrose (0,32 M) à l'aide d'un appareil de Potter (50 mL, tige en téflon, tube en verre de 15 mL et de 2 cm de diamètre, espace mortier-piston 0,5 mm). Les broyats obtenus sont centrifugés à 4 °C pendant 10 min à 2000 × g (centrifugeuse Hettich). Le surnageant est déposé sur une solution de sucrose à 1,2 M (7 mL/4 mL) pour être centrifugé 50 min à 220000 × g à 4 °C dans des tubes en polycarbonate. Les interfaces sont délicatement prélevées, mélangées et homogénéisées dans un tampon sucrose à 0,32 M (2 mL/5 mL). Des fractions de 7 mL sont réparties sur 4 mL de tampon sucrose 0,8 M pour être centrifugées dans les mêmes conditions (Fig. 5). Les culots sont repris dans un volume minimum de tampon d'incubation sans BSA (Hepes/Tris 50 mM pH 7,4 contenant 130 mM de chlorure de choline, 5 mM de glucose, 5,4 mM de KCl, 0,8 mM de MgSO₄ et de l'émulphore à 0,01%) puis sont homogénéisés à l'aide d'un petit appareil de Potter de 2 mL (tige et tube en verre).

Les synaptosomes sont finalement aliquotés puis stockés à -80 °C pour une durée maximum de 6 mois.

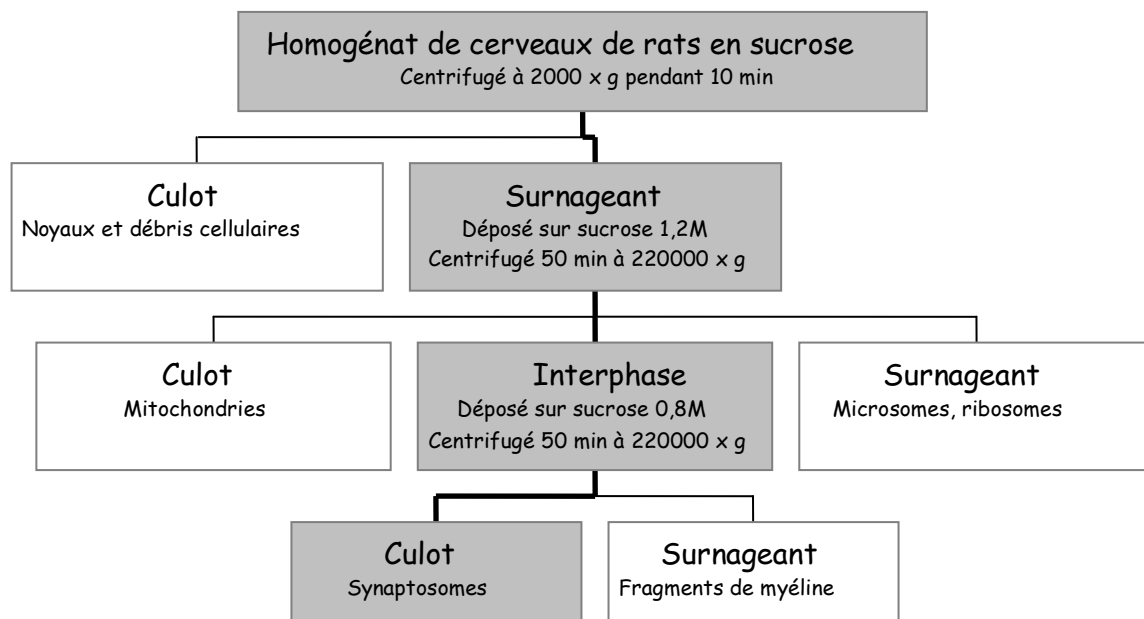


Figure 5 : Procédure de purification des synaptosomes (les fractions *non grisées* ne sont pas conservées).

III.3.2 Dosage des protéines totales par la méthode de Bradford

Le dosage des protéines totales de la préparation membranaire obtenue est effectué en suivant la méthode de Bradford en se basant sur une gamme étalon de BSA (0,5 g/L). La gamme étalon (courbe linéaire log-log) est obtenue à partir d'aliquotes contenant entre 1,25 et 20 µg/mL de BSA diluée dans une solution de NaCl à 0,15 M. Les synaptosomes sont dilués au 1/10^{ème} dans le tampon d'incubation sans BSA et une gamme de 8 dilutions est préparée de la façon suivante : 2, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30 et 40 µL dilué à chaque fois dans 1 mL de NaCl à 0,15 M.

Ensuite, la solution de Bradford est rajoutée à chacun des tubes (1 mL) et les tubes sont agités au vortex. Un tube « blanc » est préparé avec 1 mL de NaCl (0,15 M) + 1 mL de réactif de Bradford. La densité optique (DO) de chaque tube de BSA est mesurée en duplicate (2 × 1 mL) à 595 nm puis celle des tubes du lot de synaptosomes est mesurée de la même façon. Les quantités de protéines contenues dans les échantillons sont déduites de la courbe standard décrite par l'équation $\log DO = f(\log [BSA])$.

En général, la quantité de protéines finales utilisées dans le TILR est comprise entre 60 et 120 µg/mL.

III.3.3 Évaluation de la qualité des synaptosomes pour le test d'interaction ligand-récepteur

Le TILR est réalisé en tube, suivant le protocole de Darius et al. (2007). Le lot de [³H]-PbTx-3 utilisé a été préparé sur commande par la société GE Healthcare (Luxembourg) selon la réaction chimique précédemment citée. Le radioligand présente une radioactivité spécifique de 14 Ci/mmol (18,5 MBq/mmol) et une pureté radiochimique déterminée par HPLC proche de 99%.

La solution stock de [³H]-PbTx-3 (250 µCi dans 2,5 mL d'éthanol) est conservée à -80 °C et les dilutions sont effectuées juste avant utilisation. Les expériences de fixation spécifique sur les synaptosomes de cerveaux de rats sont classiquement effectuées dans un tampon d'incubation HEPES/Tris 50 mM (pH 7,4) contenant 130 mM de choline chloride, 5 mM de

glucose, 5,4 mM de KCl, 0,8 mM de MgSO₄, de l'émulphore à 0,01%, et de la BSA à 1 mg/mL, dans un volume final de 500 µL.

Des volumes croissants de synaptosomes (60-120 µg de protéines totales) sont mis à incuber en présence de [³H]-PbTx-3 (1 nM) ce qui permettra d'obtenir la fixation totale (FT) pour chacun des volumes testés. Après 1 h d'incubation, la réaction est arrêtée par addition de tampon de lavage froid. Le lavage se fait avec un tampon HEPES/Tris 5 mM (pH 7,4) contenant 163 mM de chlorure de choline, 1,8 mM de CaCl₂ et 0,8 mM de MgSO₄. Les complexes [³H]-PbTx-3-synaptosomes formés sont isolés du milieu réactionnel par filtration rapide (Brown, 1986) sur filtre GF/C (Whatman). Chaque filtre est déposé dans une fiole de comptage contenant 2 mL de liquide scintillant (Perkin Elmer Betaplate). La radioactivité recueillie sur ces filtres est comptée pendant 4 min dans un compteur à scintillation liquide (Perkin Elmer Microbeta Trilux 1450, Waltham, MA, USA).

La fixation non spécifique (NS) est déterminée par des incubations en parallèle, faites en présence d'un excès de ligand froid (PbTx-3 à 0,67 mM). La fixation spécifique (FS) de chaque volume de synaptosomes est donc déterminée par la formule suivante : FS = FT – NS.

Le volume de synaptosomes efficace aura une FS comprise entre 8 et 10% de la valeur de la radioactivité totale. Un fois ce volume déterminé, il sera fixe pour toutes les expériences du TILR appliqué aux extraits de plantes.

III.3.4 Calibration du test d'interaction ligand-récepteur

Selon les conditions optimales définies précédemment, le TILR a été calibré avec la P-CTX-3C obtenue à partir d'une culture clonale de *Gambierdiscus polynesiensis* (Chinain et al., 1999). La P-CTX-3C est utilisée comme standard interne pour la calibration des échantillons et son IC₅₀ a été définie à 0,62 ± 0.16 ng/mL ($r^2 = 0.9796$, coefficient de Hill = -0.84, $K_i = 0.49$ nM) (Fig. 6 ; Darius et al., 2007 ; Chinain et al., 2009a).

Des contrôles "Qualité" sont réalisés lors de chaque TILR à partir d'un extrait toxique de *G. polynesiensis* ayant une concentration connue de 3.1 pg d'équivalent P-CTX-3C en duplicate (Darius et al., 2007 ; Chinain et al., 2009a ; 2009b).

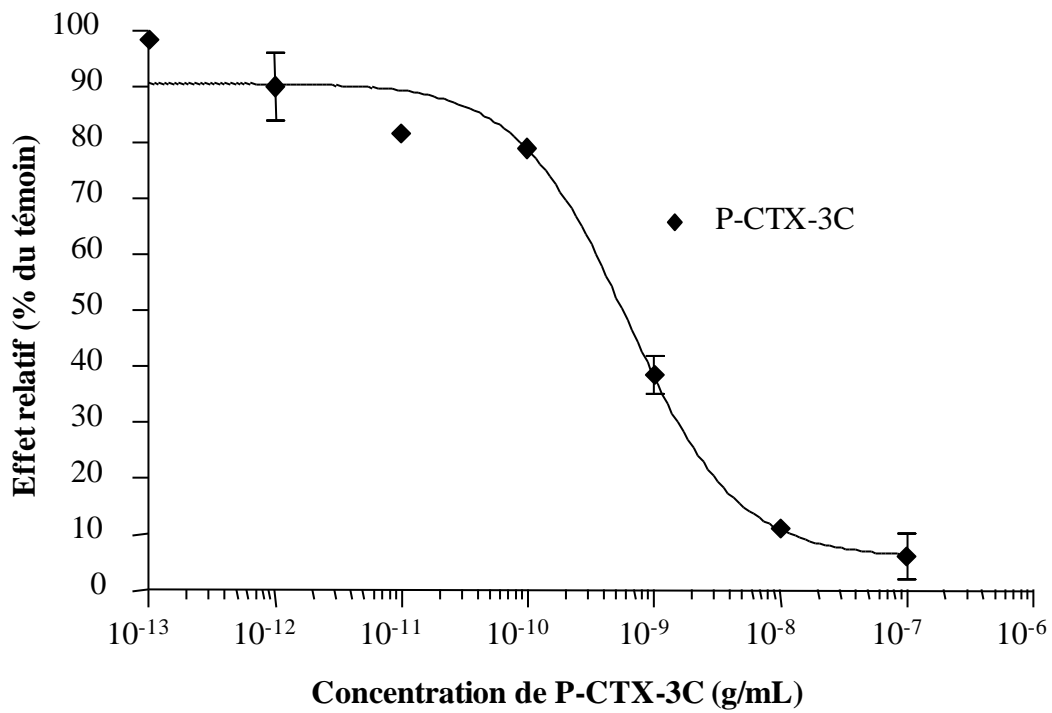


Figure 6 : Courbe de compétition de la P-CTX-3C sur les synaptosomes de cerveaux de rat. Des concentrations croissantes de P-CTX-3C ont été incubées en présence de brevétoxine tritiée ($[^3\text{H}]$ -PbTx-3, 0.89 nM). La fixation spécifique de la $[^3\text{H}]$ -PbTx-3 a été mesurée suivant le protocole décrit dans « Matériels et Méthodes ».

III.3.5 Application du test d'interaction ligand-récepteur aux extraits de plantes

Pour chaque extrait de plante (solution stock à 50 mg/mL, dissous dans l'eau distillée), des doses de 1000 et 10000 µg/mL ont été testées en duplicate. En fonction des réponses, chacun des 24 extraits a été testé lors de 1 à 4 expérimentations avec 8 dilutions en duplicate : soit à partir d'une solution à 50 mg/mL (60, 200, 600, 1200, 2000, 6000, 12000 et 20000 µg/mL) ; soit à partir d'une solution à 100 mg/mL (120, 400, 1200, 2400, 4000, 12000, 24000 et 40000 µg/mL)

III.3.6 Analyse de données

Les résultats de comptage sont analysés au moyen des logiciels Multicalc software 2.6 (Wallac, Perkin Elmer France) et Graphpad Prism 4.0 (Software Inc., San Diego, CA, USA) afin d'obtenir une courbe de compétition. L'IC₅₀, qui est la concentration d'extrait capable d'inhiber la fixation de [³H]-PbTx-3 à 50%, est exprimée en mg/mL (Tableau 3).

Les extraits de plante dans le Tableau 3 classés « - » ont une valeur d'IC₅₀ ≥ 20 mg/mL lorsqu'ils sont testés à 50 mg/mL ou ≥ 40 mg/mL lorsqu'ils sont testés à 100 mg/mL. Les extraits ayant une valeur inférieure sont classés « + ». Et ceux dont la courbe aura une allure de sigmoïde sont classés « ++ ».

IV. Résultats et discussion

Parmi les 24 extraits aqueux testés, ceux de cinq plantes n'ont montré aucune activité d'inhibition de la fixation de la [³H]-PbTx-3 avec une IC₅₀ ≥ 40 mg/ml d'extrait (Tableau 3). Pour ce qui concerne les autres plantes, même si une valeur d'IC₅₀ a pu être générée par Graphpad pour la majorité d'entre elles, elles présentent des droites au lieu de sigmoïdes (Fig. 7A). Seuls trois extraits, *H. foertherianum* (feuilles), *P. tectorius* (racines aériennes) et *V. trifolia* (feuilles) présentent des courbes de type sigmoïdale et peuvent être considérés comme réellement actifs sur le site 5 du canal sodique (Fig. 7B).

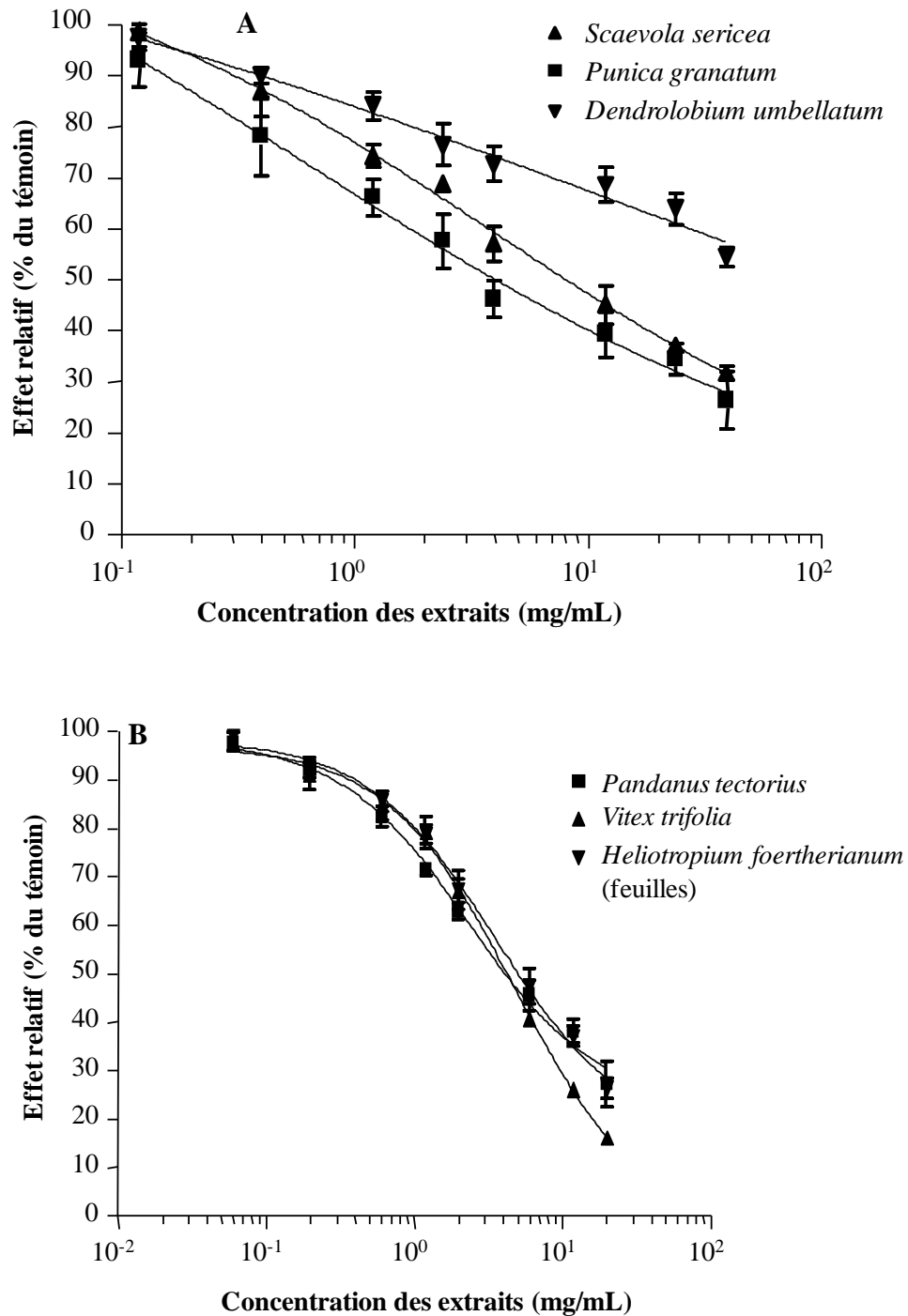


Figure 7 : Courbes de compétition des extraits aqueux de plantes sur les synaptosomes de cerveaux de rats. Ces extraits de plante étaient utilisés soit à partir d'une concentration de 100 mg/mL (**7A**) soit de 50 mg/mL (**7B**). Des dilutions croissantes d'extraits ont été incubées en présence de brevétoxine tritiée ($[^3\text{H}]\text{-PbTx-3}$; 1 nM).

Ces trois plantes sont susceptibles de contenir soit des molécules qui se fixeraient sur les CSDP (donc inhibition par compétition), soit des molécules qui pourraient réagir avec les PbTx_s (et probablement les CTX_s) en changeant leur configuration.

Afin de conclure pour l'une ou l'autre de ces deux hypothèses, l'extrait de feuilles d'*H. foertherianum* (à concentration variable) a été préalablement mis en présence d'un extrait de 5000 cellules de *G. polynesiensis* de la culture identifié comme très toxique (Chinain et al., 2009a). Puis, le TILR a été appliqué comme défini précédemment. Les résultats sont présentés sur la Fig. 8.

L'extrait de *H. foertherianum* (feuilles) mélangé à l'extrait de *G. polynesiensis* « déplace » la courbe vers la gauche (Fig. 8A) par rapport à celle de l'extrait de *G. polynesiensis* seul (Fig. 8B). Cet extrait est donc bien susceptible de contenir des molécules qui entrent en compétition par interaction avec les CSDP.

Bien que cette expérience nous ait permis de démontrer que l'activité inhibitrice observée avec l'extrait d'*H. foertherianum* était de nature compétitive, elle ne nous a pas permis d'estimer si cette activité d'extrait était due une compétition directe (action spécifique sur le site 5) ou à un effet allostérique. Ce type de travail nécessiterait dans un premier temps l'isolement du principe actif et sa conversion en ligand radiomarqué avant de mener des expériences de déplacements hétérologues avec plusieurs neurotoxines spécifiques du site 5 et des autres sites récepteurs (1, 2, 3, 4 et 6) du CSDP (Catterall, 1986).

Néanmoins, les résultats obtenus ici avec l'extrait de feuilles d'*H. foertherianum* sont très intéressants dans la mesure où cet extrait avait auparavant démontré des effets inhibiteurs dans l'axone myéliné de grenouille contre les décharges spontanées et répétitives de potentiel d'action et contre le gonflement dûs à l'activation des canaux sodium par la P-CTX-1B (Benoit et al., 2000). Bien que les expériences présentes n'aient pas été faites avec une CTX radiomarquée (en raison de son indisponibilité), notre étude permet d'avancer l'hypothèse qu'une plante telle que l'*H. foertherianum* pourrait contenir des molécules qui empêcheraient la liaison des CTX_s au CSDP, expliquant ainsi ses effets bénéfiques sur les dysfonctionnements électrophysiologiques et neurophysiologiques dans l'axone de grenouille.

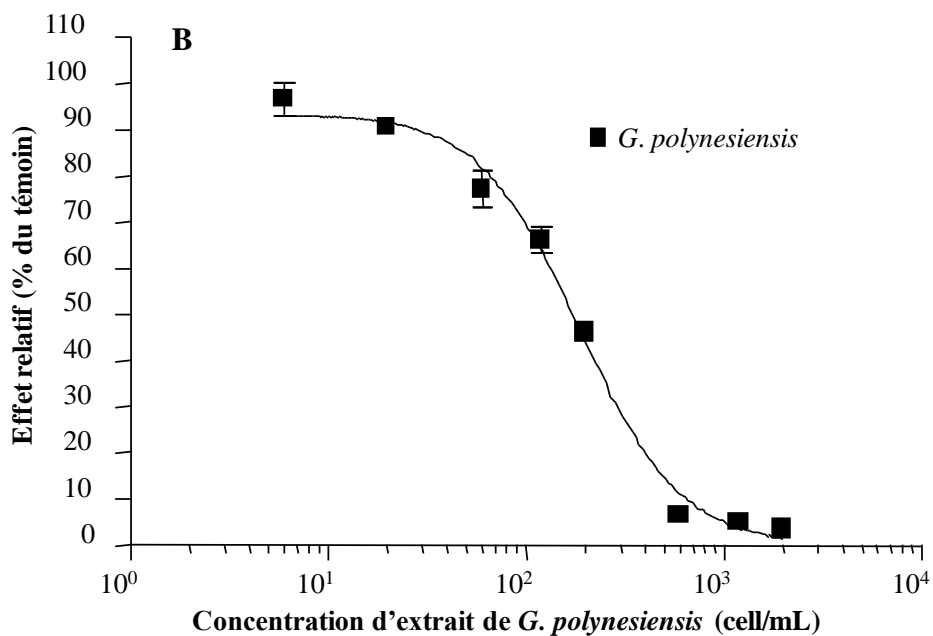
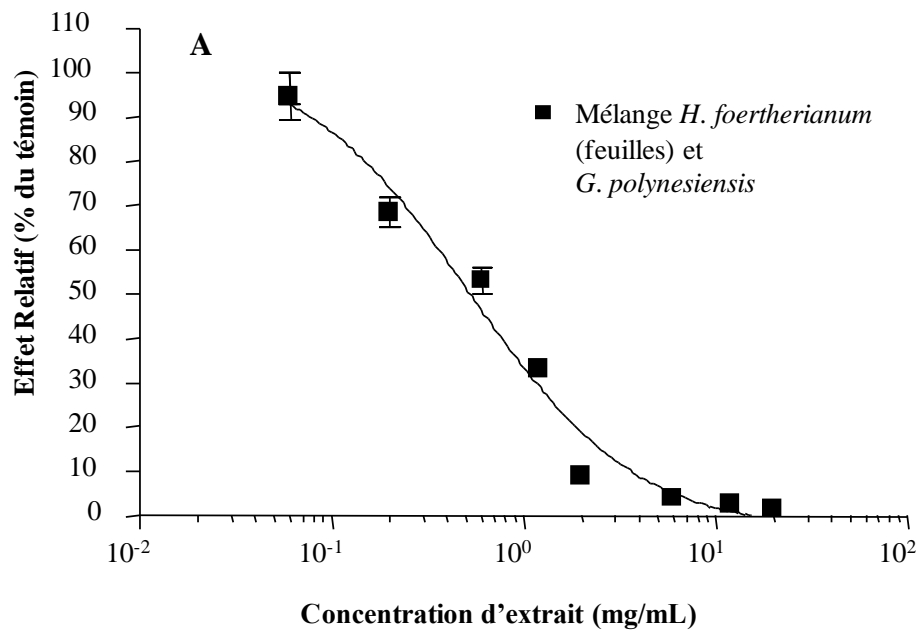


Figure 8 : Courbe de compétition d'un mélange d'extrait d'*H. foertherianum* (feuilles) avec l'extrait de *G. polynesiensis* (**8A**) et d'un extrait provenant seul d'une culture *in vitro* du dinoflagellé *Gambierdiscus polynesiensis* (**8B**) sur les synaptosomes de cerveaux de rats. Des dilutions croissantes d'extrait (dinoflagellé ou plante) ont été incubées en présence de brevétoxine tritiée ([³H]-PbTx-3, 1 nM).

Au contraire, l'extrait aqueux de rhizomes de *Davallia solida*, bien qu'étant capable de contrecarrer cette action induite par la P-CTX-1B sur les axones de grenouille (Benoit et al., 2000) n'a pas démontré d'activité inhibitrice significative dans le TILR (Tableau 3). De même, nous n'avons pas observé de corrélation entre les résultats obtenus avec le TILR et ceux obtenus avec le test d'inhibition de la cytotoxicité sur les cellules Neuro-2a (Tableau 3). Ainsi, l'extrait de la plante entière d'*E. hirta*, qui a fortement contrarié la cytotoxicité induite par PbTx-3 et P-CTX-1B, fut inactif dans le TILR alors que les extraits de feuilles de *V. trifolia* et *H. foertherianum*, qui furent seulement modérément actifs sur les Neuro-2a, montrèrent la plus forte activité inhibitrice sur la fixation de [³H]-PbTx-3.

Ceci étant, nous ne devons pas exclure la possibilité d'une teneur élevée en sel dans ces extraits puisque la majorité des plantes a été récoltée en zone côtière. Les préparations se faisant par extraction à l'eau, leur taux en sucre est aussi important. Ces teneurs élevées en sels et sucres peuvent intervenir sur le déséquilibre osmotique provoqué par les neurotoxines, ce qui peut expliquer, en partie, de telles divergences dans les données. Ces remarques sont également valables pour les activités électrophysiologiques et neurophysiologiques mentionnées ci-dessus. De même, étant donné la complexité chimique de ces extraits naturels, il est difficile de juger si le potentiel d'inhibition de la cytotoxicité observée avec ces plantes est dû entièrement à une interaction directe avec les CSDP ou à d'autres événements.

Même si l'utilisation de ce test nous permet d'identifier un extrait contenant un ou plusieurs composé(s) possédant des affinités pour le site 5, leur innocuité devrait être soigneusement examinée. Pour cela, en plus de la séparation et de la purification chimique des principes actifs, des tests fonctionnels sur animal entier, organes isolés, tissus ou cellules, évaluant la toxicité, la neurotoxicité et les divers flux ioniques, seront nécessaires.

C'est en gardant ceci à l'esprit que nous avons choisi de rechercher le principe actif contenu dans l'extrait de feuilles d'*H. foertherianum* en relation avec le TILR. En effet, cet extrait a été étudié par le passé pour ces activités dans les différents tests biologiques, allant des modèles électrophysiologiques, neurophysiologiques, osmotiques et neurotoxiques *in vitro* aux tests souris *in vivo* (Amade et Laurent, 1992 ; Benoit et al., 2000 ; Boydrion et al., 2001a ; 2001b ; Boydrion-Le Garrec et al., 2005a). Ces études ont mis en évidence la remarquable efficacité de cet extrait dans tous ces tests. Pour cette raison et malgré le caractère très onéreux de l'utilisation de composés radioactifs, nous avons décidé de pratiquer

un fractionnement chimique bioguidé de l'extrait de feuilles d'*H. foertherianum* avec le TILR. Cette question sera abordée dans la partie suivante.

II. Conclusion de la Partie 2

En raison de l'absence de tests biologiques spécifiques et pratiques permettant des enquêtes de routine, l'étude des effets bénéfiques des plantes médicinales utilisées dans le traitement de la ciguatera dans le Pacifique a été retardée. Lors de nos études, nous avons utilisé une combinaison de divers tests biologiques *in vitro* afin de détecter des vertus thérapeutiques de ces plantes vis-à-vis des effets négatifs des CTXs.

En nous appuyant sur notre découverte de la capacité de la P-CTX-1B à induire l'iNOS, nos premières études se sont portées sur la sélection d'extraits inhibiteurs du NO• *via* le TG. Il en est ressorti qu'un certain nombre d'extraits de plantes présentait un potentiel d'inhibition de l'accumulation de nitrite dans le surnageant cellulaire de macrophages murins (RAW 264.7) stimulés par du LPS. Ces données ont été comparées à celles obtenues simultanément pour ce qui concerne la cytotoxicité et l'induction spontanée de NO• avec le test au MTT et le TG. Etant donné la complexité chimique des échantillons, ces deux derniers tests apportent des informations complémentaires et parfois discriminatoires sur la valeur réelle du potentiel d'un extrait. Ainsi, sur la base de ces trois tests, les extraits de la plante entière d' *E. hirta*, de feuilles et d'écorce de *S. malaccense*, de feuilles de *S. terebenthifolius* et de *V. trifolia*, de fruits de *P. granatum*, du latex de *C. manghas*, de racines de *X. americana* et de racines aériennes de *P. tectorius* ont été identifiés comme des inhibiteurs effectifs du NO• sans manifester d'effets cytotoxiques ou inducteur de ce radical. De même, ces extraits ont été évalués pour leur potentiel antioxydant en mesurant leur capacité à piéger le radical DPPH.

A la suite de ces études, quatre extraits de plantes, *E. hirta*, *C. manghas*, *V. trifolia* et *H. foertherianum*, ont été sélectionnés et leurs effets sur la modulation de l'expression de l'iNOS et de différentes cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α et IL-10) induite par le LPS, ont été étudiés par les techniques de qPCR et d'ELISA. L'activité anti-inflammatoire des extraits d'*E. hirta* et de *V. trifolia*, déjà observée avec le TG, a ainsi été confirmée (Matsui et al., 2009b ; 2009c).

Dans notre seconde étude, pour la première fois a été évaluée (à l'aide du TILR) la capacité des extraits de plantes à inhiber la fixation de la [³H]-PbTx-3 sur le site 5 des CSDP. Les résultats de cette étude pilote ont montré que les extraits de racines aériennes de *P.*

tectorius et de feuilles d'*H. foertherianum* et de *V. trifolia trifolia* manifestent une inhibition de la fixation de ligand radioactif sur son récepteur spécifique sur les synaptosomes de rats de façon dose-dépendante.

Par la suite, un examen minutieux de l'extrait d'*H. foertherianum* nous a démontré qu'il contenait des molécules qui avaient une affinité pour le CSDP. Cet extrait pourrait inhiber par compétition la fixation de la [³H]-PbTx-3 au CSDP en se liant soit au site 5 soit à d'autres sites et par conséquent empêcherait (directement ou indirectement par effet allostérique) l'accès du ligand radiomarqué au site 5.

Pour caractériser la nature chimique des molécules hydrosolubles des extraits actifs lors de ces deux études, nous avons entrepris un fractionnement chimique pour isoler et purifier certains des principes actifs de ces plantes. En nous appuyant conjointement sur les activités pharmacologiques révélées au cours de nos travaux (TG, qPCR, ELISA et TILR) et les résultats obtenus par le passé (électrophysiologie, neurophysiologie, physiologie cellulaire, neurotoxicité), trois extraits de plantes ont été sélectionnés pour des études chimiques complémentaires. Ce sont les extraits de la plante entière d'*E. hirta*, ceux de feuilles d'*H. foertherianum* et de *V. trifolia* (voir photos en Annexe 3). Ces fractionnements chimiques bioguidés avec le TG et le TILR sont décrits dans la partie suivante.

PARTIE 3

Les études de fractionnement bioguidé

Fractionnement bioguidé avec les tests de Griess et d'interaction ligand-récepteur de trois phytothérapies utilisées dans le traitement de la ciguatera

I. Introduction

Après les études de criblage, la sélection de plantes pour l'extraction et l'isolement des principes actifs fut une étape d'application dans notre projet d'étude.

Les résultats décrits dans le chapitre 1 de la partie 2 nous ont permis de sélectionner les extraits aqueux de plante entière d'*E. hirta* et de feuilles de *V. trifolia*. Dans des macrophages RAW 264.7 activés par du LPS, ces derniers ont manifesté un fort à moyen potentiel à, d'une part, réduire l'accumulation de nitrite dans le surnageant cellulaire (Publication 2), et à, d'autre part, moduler la surexpression de l'ARNm d'iNOS et de cytokines et à moduler les profils protéiques de cytokines (Matsui et al., 2009b ; 2009c).

Le TILR décrit dans le chapitre 2 de la partie 2, nous a permis de sélectionner l'extrait aqueux de feuilles d'*H. foertherianum* qui a montré une activité d'inhibition de la liaison de la [³H]-PbTx-3 au site 5 des CSDP de synaptosomes de cerveaux de rats.

Bien que l'extrait brut de feuilles d'*H. foertherianum* se soit révélé inactif ou faiblement actif dans le TG (Publication 2) et lors des qPCR (Matsui et al., 2009b ; 2009c), nous avons choisi d'évaluer les fractions, sous-fractions ou le produit isolé de cet extrait par le TG, car leur bioactivité pourrait bien être renforcée du fait de leur plus forte concentration en molécules potentiellement actives.

En attente d'être soumis pour publication dans *Toxicon*, l'article 2 présente en revue les divers tests entrepris et les activités obtenues de ces trois plantes dans le cadre de nos études présentes et passées.

Article 2

Kumar-Roiné, S., Darius H. T., Matsui, M., Molgó, J., Chinain, M., Pauillac, S., Laurent, D. Traditional Remedies Employed in the Treatment of Ciguatera Fish Poisoning: Examples of Use of Three Plants in the Pacific. *Toxicon*, soumis.

Traditional Remedies Employed in the Treatment of Ciguatera Fish Poisoning: Examples of Use of Three Plants in the Pacific

Shilpa Kumar-Roiné^{a,b,c}, H. Taiana Darius^d, Mariko Matsui^{a,b,c}, Jordi Molgó^e,
Mireille Chinain^d, Serge Pauillac^{c*}, Dominique Laurent^a

^aUniversité de Toulouse ; UPS ; UMR 152 (Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox), 118, rte de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex 9, France

^bInstitut de Recherche pour le Développement ; UMR-152 ; F-98848 Noumea, New Caledonia

^cInstitut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Laboratoire des Biotoxines, BP61, F-98845 Noumea, New Caledonia

^dInstitut Louis Malardé, Laboratoire des Microalgues Toxiques, BP30, F-98713 Papeete, Tahiti, French Polynesia

^eCentre National de la Recherche Scientifique, Institut de Neurobiologies Alfred Fessard, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, F-91198 Gif-sur-Yvette, France

Abstract

Ciguatera Fish Poisoning (CFP) is an illness caused by eating tropical coral fishes contaminated with ciguatoxins (CTXs). The clinical management of patients with CFP is generally supportive and symptomatic in nature as no antidote exists. Of the myriad of drugs prescribed, certain have been claimed efficient in small, uncontrolled studies. However, the outcomes of treatments with these medicines are often contradictory. In New Caledonia, the traditional remedies, prepared from different part of plants, are commonly employed in the treatment of CFP. Of the 90 plant species catalogued, by far, the most popular herbal remedy is a concoction prepared from the leaves of *Heliotropium foertherianum* Diane & Hilger (Boraginaceae). A number of pharmacological studies, involving an *in vivo* (mouse bioassay) and various *in vitro* (electrophysiology, neurophysiology, cellular physiology, neurotoxicity, and anti-inflammatory) experimental approaches have been performed to evaluate the efficiency of this phytotherapy. In this review, we have provided a bibliographic account, compiling the information reported on certain of the western medicines used in CFP and on the pharmacological activities of *H. foertherianum*. Concurrently, the therapeutic effects of *Euphorbia hirta* L. (Euphorbiaceae) and *Vitex* L. sp., (Labiatae), two other leading plants in the CFP research are also discussed.

Keywords: ciguatera fish poisoning; western medicine; folk remedy; *Heliotropium foertherianum*; *Euphorbia hirta*; *Vitex trifolia*; *Vitex rotundifolia*; *Vitex rotundifolia* var. *subtrisetata*; pharmacological activities

* Corresponding author. Tel.: +33 5 62 25 98 11; fax: +33 5 62 25 98 02
E-mail : dominique.laurent@ird.fr (D. Laurent)

1. Introduction

Among the existing seafood-borne poisonings, Ciguatera Fish Poisoning (CFP) is one of the most common forms of ichthyosarcotoxism in the Pacific, Indian and Caribbean regions (Freidman et al., 2008; Laurent et al., 2005; Lehane and Lewis, 2000; Lewis et al., 2000; 2006). Though, generally endemic to tropical and sub-tropical islands and coastal regions, CFP cases are now more and more reported in inland areas (Hammond, 1992) and in temperate countries due to international seafood exportation (Moullignier et al., 1995; Ng and Gregory, 2000; Sadovy, 1997), tourism (Bavastrelli et al., 2000; de Haro et al., 2003; Johnson and Jong, 1983) and global warming incidences (Hales et al., 1999; Raikhin-Eisenkraft and Bentur, 2002). Though, largely under-reported (Barbier and Diaz, 2003), today the frequency of CFP is, nonetheless, estimated to between 50 000 to 100 000 cases per year (Flemming et al. 2006). While the mortality due to CFP is low (typically <0.5%), this malady manifests itself by a variable combination of gastrointestinal, neurological and cardiovascular symptoms, differing from person to person in intensity and duration (Farstad and Chow, 2001; Lehane and Lewis 2000; Pearn, 1994). This leads to an elevated morbidity and has important socio-economic impacts on island population (Glazious and Legrand, 1994; Laurent et al., 2005; Lewis, 1992; Olsen, 1988).

The marine neurotoxins named ciguatoxins (CTXs) are predominantly responsible for CFP. Produced by certain strains of benthic dinoflagellates of the genus *Gambierdiscus* (Bagnis et al., 1980), CTXs are transferred up the marine food chain from the microalgae to herbivorous and then to carnivorous coral fishes. At the same time, these toxins undergo an oxidation process concomitant with an increase in toxicity up the chain (Lewis and Holmes, 1993; Lewis et al., 1994).

All CTXs possess a ladder-shaped polyether backbone (Nicholson and Lewis, 2006; Yasumoto & Murata 1993) that bind

with high affinity to receptor site 5 of voltage-sensitive sodium channels (VSSC) (Bidard et al., 1984; Lombet et al., 1987). Recently, they have also been shown to act on the L-type calcium channel by an activation of the Nitric Oxide Synthase (NOS) pathway (Sauviat et al., 2006). Subsequently, the Pacific CTX-1B (P-CTX-1B) was shown to up-regulate the mRNA expression of inducible NOS (iNOS) that leads to overproduction of nitric oxide (NO) in murine macrophages RAW 264.7 cells (Kumar-Roiné et al., 2008). Significant increase in the mRNA expression of proinflammatory cytokines; tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), the interleukin (IL)-1 β and -6, and an anti-inflammatory cytokine, IL-10 were also observed (Matsui et al., this issue). An important physiological mediator (Tuteja et al., 2004), NO may become a noxious radical when released in large amounts. Indeed, in these conditions, it is actively oxidised by reactive oxygen species (ROS) such as superoxide ($O_2^{\cdot-}$) to produce peroxynitrite ($ONOO^-$). This extremely cytotoxic anion, in turn, avidly modifies and functionally impairs proteins, lipids and DNA, and depletes tissue antioxidant stores (Singh and Evans, 1997).

The clinical presentation of CFP has been addressed in substantial detail by various authors throughout the global (Arenas et al. 2004; Bagnis et al., 1979; Cheng and Chung 2004; de Haro et al. 1997; 2003; Dickey 2008; Geller et al. 1991; Gillespie et al. 1986; Friedman et al. 2008; Farstad and Chow 2001; Goodman et al. 2003; Kipping et al. 2006; Laurent et al. 2005, Lehane and Lewis 2000; Katz et al. 1993; Ng and Gregory 2000; Nicholson and Lewis, 2006; Ruff and Lewis 1994). The typical clinical features of CFP include acute gastroenteritis (nausea, vomiting, diarrhoea and abdominal pain) within 6-12 h of contaminated fish ingestion. This is followed within 12-72 h by dramatic neurocutaneous symptoms comprising circumoral and limb paresthesia, Dysaesthesia and pathognomonic paradoxical apparent temperature sensation reversal.

During this stage, musculoskeletal features such as myalgia, arthralgia, cramps and weakness as well as pruritus, sweating and dental pain may be present. In severe cases, cardiovascular disorders have been signalled. Although the acute illness resolves after a mean of 8 days, neurological symptoms can last for months and even years (Ting and Brown, 2001; Lewis, 2006). The chronic effects of CFP, that include fatigue, loss of energy, myalgias and headaches, have been recorded in 3 to 20% of the cases (Barnett and DiPalma, 2004).

2. Occidental Treatment

At present, no specific therapy for CFP has been identified. Treatment has been and is still primarily symptomatic and supportive. The palliative care consists of inducing spontaneous vomiting and diarrhea, which are thought to enhance elimination of the toxin. Activated charcoal if administered early enough is believed to bring some benefit through toxin decontamination. The gastrointestinal symptoms are usually brief and self-limited, requiring little more than adequate fluid intake in order to prevent dehydration. However, in severe cases of dehydration, intravenous (*i.v.*) or oral fluid and electrolyte replacement therapy may be required. Bed rest and cold shower in cases of pruritus are advised. In critical cases involving comatose that requires airway protection or in cases of respiratory failure, assistance *via* endotracheal intubation and mechanical ventilation may be administered. For cardiovascular disorders like bradycardia, *i.v.* atropine is generally used. In cases of shock, mechanical circulatory support including positive inotropic agents like dopamine, adrenaline or calcium gluconate may be required (Baden et al., 1995; Cheng and Chung, 2004; Gillespie et al., 1986; Ruff and Lewis, 1994). Occasionally, in order to manage the dysrhythmias, temporary cardiac pacing may also be inserted (Friedman et al., 2008; Ruff and Lewis, 1994).

A number of occidental medications, mostly responding to the symptoms of CFP, are also currently prescribed, however, without significant or consistent success (Ruff and Lewis, 1994; Farstad and Chow, 2001; Friedman et al., 2008). Antiemetic and anti-diarrheic medications are sometimes prescribed for severe gastrointestinal disorders. Pruritus usually responds to antihistamine therapy, but severe pruritus is difficult to treat. Symptomatic treatment also includes analgesics for musculoskeletal symptoms. The relief of neurologic symptoms has been reported with amitriptyline, a tricyclic antidepressant, with variable success (Bowman, 1984; Davis and Villar, 1986; Calvert et al., 1987; Lange et al. 1992). Gabapentin, with a known efficacy in neuropathic pain, has recently been reported to improve ongoing polyneuropathic symptoms of CFP in two patients (Perez et al., 2001). Paracetamol and nifedipine are prescribed for headaches, and fluoxetine has been used for chronic fatigue (Calvert et al., 1987; Berlin et al., 1992; Friedman et al., 2008). Tocainide was reported to provide potential benefit to three patients (Lange et al., 1988).

Other reports have also made claims of efficiency of tocainide, lignocaine, mexiletine, calcium gluconate, corticosteroids, and vitamin B12 (Farstad and Chow, 2001; Cheng and Chung, 2004). However, all of these claims are entirely based on small, uncontrolled trial series and case reports. Owing to the relative infrequency and irregularity of CFP occurrence, small numbers, variability in time of treatment and variability in the symptomatic profile of study participants, and the potential inter and intra differences between Pacific, Indian Ocean and Caribbean toxins, investigation of specific treatments has remained unexplored. This is further exacerbated by the lack of resources for conducting such studies in regions where CFP is endemic and by the absence of a clinical analytic test providing diagnostic precision. This void of information presents

difficulties on the part of treating physicians to make adequate therapy recommendations.

Intravenous D-mannitol, an acyclic sugar, is the most studied therapy for CFP and is considered treatment of choice (Blythe et al., 1992; Blythe et al., 1994; Eastaugh, 1996; Mitchell, 2005; Palafox, 1992; Pearn et al., 1989; Schwarz et al., 2008; Slobbe et al., 2008; Stewart, 1991; Williamson, 1989). Generally, if administered within 48-72 h after toxic fish ingestion, D-mannitol was reported to alleviate acute and chronic neurologic and muscular dysfunction, but not the gastrointestinal symptoms (Blythe et al., 1994; Palafox et al., 1988). The basis by which this simple polyol confers its neuroprotectant effect is unclear, though, being an osmotic agent it is thought to be mediated by the osmotic reduction of neuronal edema (Birinyi-Strachan et al., 2005; Pearn, 2001). D-mannitol is also the only therapy that has been evaluated by randomized blinded clinical trials (Schnorf et al., 2002). This recent study compared the effects of D-mannitol to normal saline and found no difference in relieving symptoms at 24 h. Thus even if the use of D-mannitol has often been reported utile in CFP, its efficacy still remains controversial, leading to general scepticism and reluctance amongst clinicians (Palafox et al., 1992; Schnorf et al., 2002).

3. Traditional Remedies

In the Pacific, numerous traditional herbal remedies are preferentially employed to treat CFP (Barrau, 1950; Bourdeau, 1985; Bourdy et al., 1992; Bourret, 1981; Cabalion, 1984a; 1984b; 1984c; 1984d; 1984e; Dufva et al., 1973; Haddock, 1973; Laurent et al., 1993; Lobel, 1979; Pétard, 1986; Rageau, 1973; 1983; Vienne, 1981; Weiner, 1985). An ethnopharmacological survey carried out in New Caledonia and in Vanuatu, inventoried the use of at least 90 plant species as folk remedy in CFP (Bourdy et al., 1992; Laurent et al., 1993). These traditional remedies are usually water-based and are concocted in different manners (ebullition,

infusion or maceration) from different parts (leaves, barks, roots or latex) of the plants. The application of these herbal preparations can either be internal as oral administration, external in the form of a bath to help calm the sensation of pruritus or both (Bourdy et al., 1992; Laurent et al., 1993). In New Caledonia, a wide number of the population when suffering from CFP prefers, rather than consulting a physician, to seek advice from traditional healers or to resort to self-made herbal preparations. Among these, the use of *Heliotropium foertherianum* Diane & Hilger is highly preferred in a number of Pacific islands. Other plants like *Euphorbia hirta* L. and species of *Vitex* L. are also employed in the treatment of CFP (Bourdy et al., 1992; Laurent et al., 1993).

An anterior survey carried out in New Caledonia revealed that 40% of the persons interrogated used *H. foertherianum* in the case of CFP intoxication (Laurent et al., 1992). It is thus not surprising that the *H. foertherianum* tree has been baptised to 'arbre à gratte' (Bourret, 1981; Laurent et al., 1993), which literally means the 'scratching tree' after the local colloquial appellation of CFP as 'gratte' in New Caledonia due to the phenomenon of pruritus. Its utilisation in CFP has also been reported in other parts of the Pacific region (Bagnis, 1973; Halstead, 1978), namely in Vanuatu, French Polynesia, Tonga (Bourdy et al., 1992; Pétard, 1986), Micronesia (Noro et al., 2003), and in the Ryukyu Islands in Japan (Hashimoto et al., 1969). The remedy prepared from *H. foertherianum* includes essentially either an infusion or a decoction of a large senescent leave, and the concoction is either administered *via* oral intake or used in the form of a bath (Bourdy et al., 1992; Bourret, 1981; Laurent et al., 1993; Pétard, 1986). Similarly, other parts of this plant, like the roots and bark are also used (Bourdy et al., 1992; Bourret, 1981; Cabalion, 1984b; Laurent et al., 1993; Pétard, 1986; Rageau, 1983).

Widespread in Polynesia, Micronesia and Melanesia and also present throughout the Indian Ocean, *H. foertherianum* is a

common coastal plant of the Boraginaceae family. Derived from the fact that these plants turn their light green, pubescent leaves to the sun, it is generally known as the ‘tree heliotrope’ in many of these regions (Manner and Elevitch, 2006). Originally published as *Tournefortia argentea* L.f., it was transferred to *Argusia argentea* (L.f.) Heine, and remained under that name until it was recently restored to *Tournefortia* before being transferred, based on molecular studies, into *Heliotropium* under a new name in 2003 (Hilger and Diane, 2003). It is also known under the scientific names *Messerschmidia argentea* (L.f.) Johnston, *T. arborea* Blanco, *T. sarmentosa* sensu Christian non Lam. and *T. sericea* Cham. (Manner and Elevitch, 2006). Indigenous to most islands of the Pacific, this strand plant is also valued for its other medicinal properties. This includes the application of an infusion of the leaves to infected cuts and stings from certain poisonous fish in Tonga, while in Fiji the roots are used to treat rheumatism. In Nauru, the meristem and inner bark of the root are pounded to prepare medicine for curing rashes in children, diarrhea, and fish poisoning (Manner and Elevitch, 2006).

The other herbal preparation includes a decoction of the whole plant of *E. hirta* (Bourdy et al., 1992; Laurent et al., 1993; Rageau, 1973; 1983). Used in the treatment of CFP in New Caledonia and Vanuatu (Bourdy et al. 1992; Rageau, 1973; 1983), *E. hirta*, generally regarded as weed, is a widespread species distributed throughout the tropical and sub-tropical regions (Steinman, 2003). Belonging to the family of Euphorbiaceae, it is also known as *E. pilulifera* L. or *Chamaesyce hirta* (L.) Millsp. (Johnson et al., 1999). Characterised by an irritant milky sap, the plant exhibits interesting pharmacological activities and is much used in traditional medicines in all tropical countries of Africa, Asia, America and Australia as well as in the South Pacific (Lanthers et al., 1990). In former British colonies and in America during the 18th and 19th century this herb played a major role in

the treatment of asthma, which earned it the name “asthma plant” (Blair, T. S., 1917; British Pharmaceutical Codex, 1911; Felter, 1922; Crellin and Philpott, 1997). Dysenteral® is an improved traditional medicine that consists of lyophilised decoction of aerial part of *E. hirta* that is sold in Mali in form of tea sachets and is employed against acute enteritis and dysentery (Elujoba et al., 2005; Maiga et al., 2005). In New Caledonia due to its frequent use in the treatment of latter disease, it is popularly named as ‘herbe à dysenterie’ (Rageau, 1973; Bourdy et al. 1992; Laurent et al., 1993).

Various species of *Vitex* have also been reported in the use of CFP in New Caledonia and Vanuatu and as well as in the islands of Ryukyu (Bourdy et al., 1992; Bourret, 1981; Halstead, 1978; Laurent et al., 1993; Rageau, 1973; Vienne, 1981). A decoction or maceration of the leaves of *V. rotundifolia* var. *subtrisecta* (Kuntze) Moldenk or *Vitex rotundifolia* L.f. Moldenk is either taken orally or used when bathing. The roots of these two plants are also used (Bourdy et al., 1992; Cabalion, 1984e; Laurent et al., 1993). Other *Vitex* species reported in the use of treatment of CFP are *Vitex negundo* L. (Rageau, 1973), and *Vitex trifolia* L. or *Vitex trifoliata* L. (Bourret, 1981; Halstead, 1978; Vienne, 1981). The genus *Vitex* in the past had been widely included in the family Verbenaceae and has recently been transferred to the family Lamiaceae or Labiatae (Abbas Azimi et al., 2006; Cantino, 1992a; 1992b; Cantino et al., 1992; Wagstaff et al. 1998). However, the infrageneric taxonomy of *Vitex* species is still not clearly established and there is still much confusion in the identification of these plants (Djiéto-Lordon et al., 2005).

V. trifolia is a large aromatic shrub with three-foliolate leaves found along coastlines of East Africa extending across to as far east as French Polynesia. This plant is also known as *V. lagundi* Ridley, *V. repens* Blanco (Wiert, 2006), and is often confounded with *V. rotundifolia* L.f (Laurent et al. 1993). *V. rotundifolia* or *Vitex ovate* Thunb., as the

name indicates, is round, single-leaved. Though, now taxonomically distinguished from *V. trifolia*, certain continue to think of it as a *simplicifolia* variety of *V. trifolia* (Hu et al., 2007). Similarly, certain authors consider that *V. trifolia* and *Vitex negundo* L. are the same species and group them under the name *V. rotundifolia* (Laurent et al., 1993).

Considered a panacea, various parts of the *V. trifolia*, commonly denominated as ‘three-leaves chaste tree,’ and other species of *Vitex* are extensively employed in several traditional systems of medicine, over the globe, for a wide variety of illnesses ranging from minor complaints like headache, coughing and colds to asthma, tuberculosis, diabetes and inflammation (Hernández et al. 1999; Hossain et al., 2001; Kannathasan et al., 2007; Wiart, 2006). *Vitex agnus-castus* L., a species related to *V. trifolia* that is common to the countries of the Mediterranean basin have been used in ancient times as an aphrodisiac, hence the name ‘chaste tree.’ The berries from this shrub were later to be used as a food spice in monasteries where it was called ‘monk’s pepper’ (Ross, 2001). This medicinal plant has also been since long time used in conditions pertaining to deregulations of the female genital system (Daniele et al., 2005; Artz, 2007). In the Pacific, an infusion of the leaves of *V. trifolia* is used in the bath water of women who given birth as it is believed to help remove any remaining blood from the uterus (WHO, 1998). Today, a number of products of chaste berry, categorized as a nutraceutical, are widely commercialized and are indicated for treatment of gynecological disorders in many countries including Europe (Artz, 2007; Dugoua et al 2008).

4. Pharmacological Evaluations

A number of pharmacological studies, involving an *in vivo* (mouse bioassay) and various *in vitro* (electrophysiology, neurophysiology, cellular physiology, neurotoxicity, and anti-inflammatory) experimental approaches have been

performed to evaluate the efficiency of various plants used as traditional remedies against CFP (Table 1). The whole plant extract of *Euphorbia hirta* and the leave extracts of *H. foertherianum* and *V. rotundifolia* var. *subtrisecta*, were evaluated for effects on weight loss and recovery periods in mice injected intraperitoneally (*i.p.*) with sublethal dose of CTXs-containing moray eel liver extract. Of these three phytotherapies, only the mice co-treated with the extract of *H. foertherianum* seemed to have resisted the corporal loss induced by the toxins. As for the extract of *E. hirta*, it proved to be toxic in this bioassay (Table 1) (Amade and Laurent, 1992).

The leave extract of *H. foertherianum* was later shown to have identical effects as that of mannitol on isolated frog myelinated axons treated with P-CTX-1B. By modifying the function of VSSC, CTXs increase the intracellular Na⁺ ion concentration, which triggers an influx of water, resulting in the swelling of the node of Ranvier of myelinated axons (Benoit et al., 2000). Another effect of CTXs is that they induce high-frequency, spontaneous and repetitive action potential discharges in these excitable membranes (Benoit et al., 1996). Upon co-treatment with the *H. foertherianum* extract an inhibition of both the electrophysiological and osmotic effects of P-CTX-1B on isolated frog myelinated axons were observed (Benoit et al., 2000). This extract has also been reported to counteract P-CTX-1B-induced swelling in frog and human blood cells (Table 1) (Boydron et al., 2001; 2002).

Further investigations, using murine neuroblastoma (Neuro-2a) cells, potentialised with VSSC agents, ouabain and veratridine, showed that all of the three above mentioned extracts (whole plant extract of *Euphorbia hirta*, leaves extracts of *H. foertherianum* and *V. rotundifolia* var. *subtrisecta*), in addition to the bark extracts of *H. foertherianum*, exerted a protective effect against the cytotoxic action of brevetoxin-3 (PbTx-3) (Boydron-Le Garrec et al., 2005).

Table 1 Phytotherapies used in the treatment of CFP and evaluation of pharmacological activity in different experimental models

Plant Name	Family	Part	Extraction	Experimental Pharmacological Evaluations/Activity													
				MB	EP	NP	CP	AC	ANF								
								PbTx-3	P-CTX-1B	Cytokines							
							NO	iNOS	IL-1 β	IL-6	IL-10	TNF- α					
<i>Polyscias scutellaria</i> (Burman F.) Fosberg	Araliaceae	Leaves	Decocotion	2													
<i>Punica granatum</i> L.	Punicaceae	Fruit	Decoction 10 min	2				1			1						
<i>Rhizophora x selala</i> (Salv.) Toml.	Rhizophoraceae	Bark	Decoction 30 min					1,3			1,4						
<i>Saccharum officinarum</i> L.	Gramineae	Stem	Maceration 24 h					2			2,4						
<i>Scaevola sericea</i> Vahl	Goodeniaceae	Leaves	Decoction 15 min	2				1	1		1,3						
<i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi	Anacardiaceae	Leaves	Infusion 30 min	1				1,3			1						
<i>Spondias cytherea</i> Sonnerat	Anacardiaceae	Bark	Maceration 1 h					1	1		1,4						
<i>Spondias cytherea</i> Sonnerat	Anacardiaceae	Leaves	Decoction 10 min					1			2						
<i>Stachytarpheta australis</i> Moldenke	Verbenaceae	Roots	Maceration 10 min					1	1		2,3,4						
<i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & Perry	Myrtaceae	Bark	Decoction 10 min					1	1								
<i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & Perry	Myrtaceae	Bark	Maceration 30 min					2,3			1						
<i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & Perry	Myrtaceae	Leaves	Infusion 20 min	3				1			1						
<i>Terminalia catappa</i>	Combretaceae	Bark	Decoction	2													
<i>Vitex rotundifolia</i> var. <i>subtrisecta</i> (Kuntze) Moldenk	Labiataeae	Leaves		2				1									
<i>Vitex trifolia</i> L.	Labiataeae	Leaves	Decoction 30 min								1	1	1	1	1	1	1
<i>Ximenia americana</i> L.	Olacaceae	Roots	Maceration 30 min	3				1			1						
<i>Xylocarpus granatum</i> Koenig	Meliaceae	Bark	Decoction	2													

Abbreviation: (MB): mouse bioassay (Amade and Laurent, 1992, Laurent et al., 1993); (EP): electrophysiological assay on the myelinated frog axons (Benoit et al., 2000); (NP): neurophysiological assay on the node of Ranvier of the myelinated frog axons (Benoit et al., 2000); (CP): cellular physiology on frog and human erythrocytes (Boydron-Le Garrec et al., 2001, 2002); (AC): anticytotoxicity bioassay on PbTx-3- and P-CTX-1B-stimulated Neuro 2a cells (Boydron-Le Garrec et al., 2005); (ANF): antiinflammatory evaluation on LPS-stimulated RAW 264.7 cells (Kumar-Roiné et al., 2009; Matsui et al 2009a; 2009b); (1): active; (2): inactive; (3): toxic; (4) induces spontaneous NO production.

Brevetoxins (PbTx) are another class of marine toxins that resemble CTXs in structure and activity. Both of these neurotoxins bind to site 5 of VSSC, which depolarises the excitable membranes towards more negative potentials and, as a consequence, inhibits its normal inactivation (Dechraoui et al., 1999). The resulting prolonged stimulation accompanied by an abnormal influx of Na⁺ is responsible for the cytotoxic activity of these neurotoxins in Neuro-2a cells (Manger et al., 1995). In this *in vitro* bioassay none of the four extracts by themselves exhibited any cytotoxicity. The extract of *E. hirta* was found to exert the strongest effect against the neurotoxicity induced by both PbTx-3 and P-CTX-1B (Table 1). Furthermore, the extract of *E. hirta* was shown to have mild but significant proliferative activity, increasing the viability cells compared to non-treated cells (Boydron-Le Garrec et al., 2005).

Recently, in the light of the inflammatory nature of P-CTX-1B, we have investigated the effect of these crude extracts on the production of NO in murine macrophage (RAW 264.7) cells stimulated with the bacterial endotoxin, lipopolysaccharide (LPS) that is well known to induce the production of proinflammatory mediators like NO *via* iNOS over-expression and various cytokines. None of the four extracts (whole plant extract of *Euphorbia hirta*, bark extract of *H. foertherianum*, leaves extracts of *H. foertherianum* and *V.trifolia*) tested showed any cytotoxicity on the RAW 264.7 cells. Once again, the extract of *E. hirta* exhibited the highest activity, strongly inhibiting the production of NO. An inhibitory activity was also observed with the leave extract of *V. trifolia*. Though, the bark extract of *H. foertherianum* proved to be quite active, the leaves were not. On the other hand, the bark extract of this plant was also shown to induce NO production, thus exhibiting dual and opposite effects (Table 1) (Kumar-Roiné et al., 2009).

Following the above preliminary experiments, the anti-inflammatory potential of the leave extracts of *H. foertherianum* and

V. trifolia and the whole plant extract of *E. hirta* was also evaluated by monitoring the expression profiles of iNOS and of the pro-inflammatory (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines. *E. hirta* was reported to significantly decrease the LPS-dependent induction of IL-1 β and iNOS mRNA in time-dependant manner and a significant attenuation in the expression levels of IL-6 mRNA and protein was also observed with this plant. In addition, the plant also decreased the LPS-dependant overproduction of TNF- α in the cellular supernatants (Matsui et al., 2009a). The extract of *V. trifolia* also exhibited inhibitory properties, reducing significantly the expression levels of IL-1 β , IL-6 and iNOS mRNA and only slightly affecting the TNF- α mRNA. Moreover, this plant seemed to induce the LPS-dependant IL-10 anti-inflammatory cytokine. These results were in accord with the expression levels of IL-6, TNF- α and IL-10 protein quantified (Matsui et al 2009b). On the other hand, though the extract of *H. foertherianum* was able to reduce the induction of IL-1 β mRNA, only a very slight reduction in the iNOS production was observed (Matsui et al., 2009a), which reflects the results obtained when the NO inhibitory capacity of this extract was studied (Table 1).

5. Discussion and Conclusion

An exceedingly unpleasant illness in man, CFP represents a serious health and socioeconomic problem, particularly in island nations of the South Pacific that depend heavily on fish products for their livelihood, and where the incidence of CFP is high. Unfortunately, there is as yet no medical treatment for CFP beyond the measures designed to relieve some of the early symptoms. Hence, based on anamnesis, a patient can often be prescribed several drugs in relation to the number of symptoms the patient may present. In cases where the symptoms persist, medication may be prescribed over weeks to months, all of

which render the medical care quite costly. This is exacerbated by the fact that none of these palliative treatments are wholly remedial. In many Pacific Islands Countries and Territories (PICTs), the low familial incomes, lack of a social health care system, and even the absence of medical facilities in isolated areas make such occidental health care both unaffordable and inaccessible to common people.

Traditional medicine, on the other hand, an important practice in the Oceanian culture, is commonly employed in the South Pacific in the treatment of CFP, of which the herbal preparation with the leaves of *H. foertherianum* is highly preferred and widely used. Compared to the extracts of *Vitex trifolia* and *E. hirta*, the leave extract of *H. foertherianum* exhibited only a mild anti-inflammatory potential. The inflammatory mediators, NO induced *via* iNOS overexpression and cytokines, are responsible for various pathophysiological conditions in human (Šimko, 2007). Though it is not possible as yet to conclude if this pathway is a result of a direct action of CTXs or not, the modulation of these factors by P-CTX-1B could explain the complex multifaceted clinical nature of CFP observed in the region of Pacific, that sole the activation of VSSC is unlikely to account for (Dechraoui et al., 1999; Kumar-Roiné et al., 2008). Hence, the attenuation of induction of these mediators as observed with the extracts of *V. trifolia* and *E. hirta* could provide symptomatic relieve in CFP.

On the other hand, various other studies have reflected the remarkable efficacy of the leave extract of *H. foertherianum* in impeding electrophysiological and osmotic effects of CTXs. However, it is not yet known how this plant is able to counteract these noxious effects of CTXs. Brevenal, a patented compound isolated from culture of *Karenia brevis*, has been recently reported to act as a molecular antagonist of PbTx-3, inhibiting the binding of the toxin to VSSC (Bourdelaïs et al., 2004). This has solicited huge interest for its therapeutic development against the neurotoxic effects of PbTx

(Abraham et al., 2005; Baden et al., 2005; Abraham and Baden, 2006; LePage et al., 2007; Sayer et al., 2008). Due to the structural and functional similarity of PbTx to CTXs (Baden, 1989; Gawley et al., 1992; Jeglitsch et al., 1998; Dechraoui et al., 1999), it has been suggested that brevenal could have the same inhibitory activity on CTXs (Freidman et al., 2008; Mattei et al., 2008). Given their lipophilic nature and high affinity to site 5 of VSSC, CTXs have been reported to bind quasi-irreversibly to excitable cells like neurons. By blocking these receptor proteins in open position, CTXs provoke electrophysiological dysfunctions and osmotic imbalance (Benoit et al., 1996; Benoit et al., 2000; Ghiaroni et al., 2005). Indeed, such neurocellular effects could be prevented if a molecular antagonist competes with CTXs for their binding site on the nerve membranes and subsequently renders the receptors unavailable.

An effective antidote against CFP would be a substance that would displace the already bounded CTX molecules from the VSSC of the neurones. This may initiate the process of detoxification and eventual purge of CTXs from the biological system. Furthermore, this antagonist, on its own, should not affect the normal propagation of the electrical signal in neurones. The process of synthesising and safely delivering brevenal as drug for human patients will require extensive trials. As CFP is essentially considered a tropical disease, mostly limited to financial resource-poor settings, the for-profit pharmaceutical industries may not invest in the development of a new chemical entity for such condition. To this end, it would be highly interesting to screen certain plants; in particular *H. foertherianum* that has since long provided a primary source of health care to man against CFP, in order to observe such detoxifying ability. Remedies from these plants could also be suggested in the form of improved traditional medicine as already done in other countries with the plants *E. hirta* and *V. agnus-castus*. Undoubtedly, further scientific investigations are necessary. Nonetheless, with the

advances made in the recent years on the study of pharmacology of selected phytotherapies, we have never been closer to proffering a much awaited effective therapy against CFP.

Reference

- Abbas Azimi, R., Jamzad, Z., Sefidkon, F., Bakhshi-Khaniki, Gh., 2006. The potential value of phytochemical and micromorphological characters in taxonomic treatment of genus *Vitex* L. (Lamiaceae). *Iran. J. Bot.* 12 (1), 15-35.
- Abraham, W.M., Bourdelais, A.J., Sabater, J.R., Ahmed, A., Lee, T.A., Serebriakov, I., Baden, D.G., 2005. Airway responses to aerosolized brevetoxins in an animal model of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171, 26-34.
- Abraham, W.M., Baden, D.G., 2006. Aerosolized Florida red tide toxins and human health effects. *Oceanography* 19, 107-109.
- Amade, P., Laurent, D., 1992. Screening of traditional remedies used in ciguatera fish poisoning treatment. In: Gopalakrishnakone, P., Tan, C.K. (Eds.), *Recent Advances in Toxinology Research*, vol 2, Singapore, National University of Singapore, pp. 503-508.
- Artz, M. B., 2007. *Vitex agnus-castus*. In : Tracy, T. S., Kingston, R. L. (Eds) *Herbal Products: Toxicology and Clinical Pharmacology*. 2nd Edition, Humana Press, pp. 245-258
- Baden, D.G., 1989. Brevetoxins: unique polyether dinoflagellate toxins. *FASEB Journal* 3, 1807-1817.
- Baden DG, Fleming LE, Bean JB. 1995. Marine toxins. In: F.A. de Wolff (Ed), *Handbook of Clinical Neurology: Intoxications of the Nervous System Part II. Natural Toxins and Drugs*, Elsevier Press, Amsterdam, 21 (65), 141-175.
- Baden, D.G., Bourdelais, A.J., Jacocks, H., Michelliza, S., Naar, J., 2005. Natural and derivative brevetoxins: historical background, multiplicity, and effects. *Environ. Health Perspect.* 113, 621-625.
- Bagnis, R., Chanteau, S., Chungue, E., Hurtel, J.M., Yasumoto, Y., Inoue A., 1980. Origins of ciguatera fish poisoning: a new dinoflagellate, *Gambierdiscus toxicus* Adachi et Fukuyo, definitely involved as a causal agent. *Toxicon* 18, 199-208.
- Barbier, H.M., Diaz, J.H., 2003. Prevention and treatment of toxic seafoodborne diseases in travellers. *J. Travel Med.* 10, 29-37.
- Barnett, C.B., DiPalma, J.A., 2004. Seafood intoxication. *Pract. Gastroenterol.* 4, 58-62.
- Barrau, J., 1950. Une plante médicinale de la Nouvelle-Calédonie, *Duboisia myoporoides* R. Br. *Revue Agricole de Nouvelle-Calédonie* 1 (7-8), 13-14.
- Bavastrelli, M., Bertucci, P., Midulla, M., Giardini, O., Sanguigni, S., 2000. Ciguatera fish poisoning: An emerging syndrome in Italian travelers. *J. Travel Med.* 8, 139-142.
- Benoit, E., Juzans, P., Legrand, A.M., Molgó, J., 1996. Nodal swelling produced by ciguatoxins-induced selective activation of sodium channels in myelinated nerve fibers. *Neurosci.* 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 agent used in ciguatera treatment. *Cybiurn* 24, 33-40.
- Berlin, R.M., King, S.L., Blythe, D.G., 1992. Symptomatic improvement of chronic fatigue with fluoxetine in ciguatera fish poisoning. *Med. J. Aust.* 157, 567.
- Bidard, J.N., Vijverberg, H.P.M., Frelin, C., Chungue, E., Legrand A.M., Bagnis R.A., Lazdunski, M., 1984. Ciguatoxin is a novel type of Na⁺ channel toxin. *J. Biol. Chem.* 259, 8353-8357.
- Birinyi-Strachan, L.C., Davies, M. J., Lewis, R. J., Nicholson, G. M., 2005. Neuroprotectant effects of iso-osmolar D-mannitol to prevent Pacific ciguatoxins-1 induced alterations in neuronal

- excitability: a comparison with other osmotic agents and free radical scavengers. *Neuropharmacol.* 49, 669-686.
- Blair, T. S., 1917. Botanic Drugs: their material medica, Pharmacology and Therapeutics. The Therapeutic Digest Publishing Company, Cincinnati, Ohio, 170-171 p.
- Blythe, D.G., de Sylva, D.P., Flemming, L.E., Ayyar, R.A., Baden, D.G., Shrank, K., 1992. Clinical experience with *i.v.* mannitol in the treatment of ciguatera. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 85 (5 Pt 2), 425-426.
- Blythe, D., Fleming, L.E., Ayyar, D.R., Baden, D.G., De Sylva, D., Shrank, K., 1994. Mannitol treatment for acute and chronic ciguatera fish poisoning. *Mem. Queensl. Mus.* 34, 465-470.
- Bourdeau, P., 1985. Etude des poissons ciguatoxiques et de la ciguatera aux Antilles Françaises. Epidémiologie sur le plateau de St. Barthelemy, St. Martin, Anguilla. Thèse, Université de Paris Sud, Centre d'Orsay, 289 pp.
- 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 Mol. Neurobiol.* 24, 553-563.
- Bourdy, G., Cabalion, P., Amade, P., Laurent, D., 1992. Traditional remedies used in the Western Pacific for the treatment of ciguatera poisoning. *J. Ethnopharmacol.* 36, 163-174.
- Bourret, D., 1981. Bonnes plantes de Nouvelle-Calédonie et des Loyauté. Les éditions du lagon, 107 pp.
- Bowman, P.B., 1984. Amitriptyline and ciguatera. *Med. J. Aust.* 140, 802.
- Boydron, R., Laurent, D., Sauviat, M.P., 2001. Un test biologique destiné à identifier les principes actifs des plantes utilisées comme remèdes traditionnels contre l'intoxication ciguatérique en Nouvelle-Calédonie. In: Bon, C., Goudey-Perrière, F., Poulain, B., Puiseux-Dao, S. (Eds.), *Rencontres en toxicologie : Explorer, exploiter les toxines et maîtriser les organismes producteurs*, Editions scientifiques et médicales Elsevier, Paris, pp. 63-66.
- Boydron, R., Sauviat, M.P., Benoit, E., Molgó, J., 2002. L'hémolyse des érythrocytes humains par la P-CTX-1 : une méthode pour évaluer le potentiel thérapeutique des remèdes traditionnels utilisés en Nouvelle-Calédonie pour traiter la ciguatera. In: Goudey-Perrière, F., Bon, C., Puiseux-Dao, S., Sauviat, M.P. (Eds.), *Rencontres en toxicologie : Toxines et recherches biomédicales*, Editions scientifiques et médicales Elsevier, Paris, pp. 101-104.
- 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 *in vitro* neurotoxicity produced by sodium channel activators. *Toxicon* 46, 625-634.
- Cabalion, P., 1984a. Les plantes du Vanuatu. La 'gratte' et ses remèdes. 1eme partie : lescauses. *Vanuatu Weekly Hebdomadaire* 12, 11.
- Cabalion, P., 1984b. Les plantes du Vanuatu. La 'gratte' et ses remèdes. 2eme partie : les médicaments traditionnelles bien connues. *Vanuatu Weekly Hebdomadaire* 13, 10.
- Cabalion, P., 1984C. Les plantes du Vanuatu. La 'gratte' et ses remèdes. Les médicaments traditionnelles bien connues. *Vanuatu Weekly Hebdomadaire* 14, 11.
- Cabalion, P., 1984d. Les plantes du Vanuatu. La 'gratte' et ses remèdes. les médicaments traditionnelles bien connues. *Vanuatu Weekly Hebdomadaire* 15, 11.
- Cabalion, P., 1984e. Les plantes du Vanuatu. La 'gratte' et ses remèdes. 3eme partie : les médicaments traditionnelles bien connues. *Vanuatu Weekly Hebdomadaire* 16, 10-11.
- Calvert, G.M., Hryhorczuk, D.O., Leikin, J.B., 1987. Treatment of ciguatera fish poisoning with amitriptyline and nifedipine. *Clin. Toxicol.* 25, 423-428.

- Cantino, P. D., 1992a. Evidence for a polyphyletic origin of the Labiatae. *Ann. Miss. Bot. Gard.* 79, 361-379.
- Cantino, P. D., 1992b. Toward a phylogenetic classification of the Labiatae. In (Eds) Harley, R. M. and Reynolds, T. *Advances in Labiatae science*, Royal Botanic Gardens Kew, 27-37.
- Cantino, P. D., Harley, R. M., Wagstaff, S. J., 1992. Genera of Labiatae: Status and classification. In: (Eds) Harley, R. M. and Reynolds, T., *Advances in Labiatae Science*, Royal Botanic Gardens Kew, pp 511-522.
- Cheng, C.C., Chung, C.H., 2004. Ciguatera fish poisoning: a challenge to emergency physicians. *Hong Kong J. Emergency Med.* 11, 173-177.
- Crellin, J. K., Philpott, J., 1997. A reference guide to medicinal plants: herbal medicine past and present. Duke University Press, vol 2, pp 551.
- Daniele, C., Coon, T. J., Pittler, M. H., Ernst, E., 2005. *Vitex agnus-castus*: A systematic review of adverse events. *Drug Safety* 28 (4), 319-332.
- Davis, R.T., Villar, L.A., 1986. Symptomatic improvement with amitriptyline in ciguatera fish poisoning. *N. Engl. J. Med.* 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.
- de Hiro, L., Pommier, P., Valli, M., 2003. Emergence of imported ciguatera in Europe: Report of 18 cases at the Poison Control Centre of Marseille. *Clin. Toxicol.*, 41 (7), 927-930.
- Djiéto-Lordon, C., Dejean, A., Ring, R. A., Nkongmeneck, B. A., Lauga, J., McKey, D., 2005. Ecology of an improbable association: The pseudomyrmecine plant-ant *Tetraponera tessmanni* and the myrmecophytic liana *Vitex thyrsoflora* (Lamiaceae) in Cameroon. *Biotropica* 37(3), 421-430.
- Dufva, E., Loison, G., Holmsted, B., 1976. *Duboisia myoporoides*, native antidote against ciguatera poisoning. *Toxicon* 14, 55-64.
- Dugoua, J. J., Seely, D., Perri, D., Koren, G., Mills, E., 2008. Safety and efficacy of chastetree (*Vitex agnus-castus*) during pregnancy and lactation. *Can. J. Clin. Pharmacol.* 15 (1), e74-e79.
- Eastaugh, J.A., 1996. Delayed use of intravenous mannitol in ciguatera (fish poisoning). *Ann. Emerg. Med.* 28 (1), 105-106.
- Elujoba, A. A., Odeleye, O. M., Ogunyemi, C. M., 2005. Traditional medicine development for medical and dental primary health care delivery system in Africa. *African J. Trad. CAM.* 2 (1), 46-61.
- Farstad, D.J., Chow, T., 2001. A brief case report and review of ciguatera poisoning. *Wilderness and Environmental Med.* 12, 263-269.
- Felter, H. W., 1922. *The Eclectic Material Medical, Pharmacology and Therapeutics*. Eclectic Medical Publications, Portland, Oregon (reprint in 1922). Vol. 1, p. 177-178.
- Fleming, L. E., Broad, K., Clement, A., Dewailly, E., Elmir, S., Knap, A., Pomponi, S.A., Smith, S., Solo Gabriele, H., Walsh, P., 2006. Oceans and human health: Emerging public health risks in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 53 (10-12), 545-560.
- Friedman, M.A., Fleming, L.E., Fernandez, M., Bienfang, P., Schrank, K., Dickey, R., Bottein, M.Y., Backer, L., Ayyar, R., Weisman, R., Watkins, S., Granada, R., Reich, A., 2008. Ciguatera fish poisoning: treatment, prevention and management. *Mar. Drugs* 6, 456-479.
- Gawley, R.E., Rein, K.S., Kinoshita, M., Baden, D.G., 1992. Binding of brevetoxins and ciguatoxins to the voltage-sensitive sodium channel and conformational analysis of brevetoxin B. *Toxicon* 30, 780-785.
- Ghiaroni, V., Sasaki, M., Fuwa, H., Rossini, G.P., Scelera, G., Yasumoto, T., Pietra, P.,

- Bigiani, A., 2005. Inhibition of voltage-gated potassium currents by gambierol in mouse test cells. *Toxicol. Sci.* 85, 657-665.
- Gillespie, N.C., Lewis, R.L., 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, 863-873.
- Haddock, L., 1973. Quelques plantes médicinales de Guam avec leurs noms vernaculaires. Conférence Technique Régionale sur les Plantes Médicinales, Commission du Pacifique Sud, Tahiti, 15 pp.
- Hales, S., Weinstein, P., Woodward, A., 1999. Ciguatera (fish poisoning), El Niño and Pacific Sea surface temperatures. *Ecosystem Health*, 5 (1), 20-25.
- Halstead, B.W., 1978. Poisonous and venomous marine animals of the world. Revised edition, Darwin Press, Princeton, 1168 p.
- Hammond, R., 1992. Ciguatera: a case study of a foodborne outbreak. *Fla J. Environ. Health* 137, 7-9.
- Hashimoto, Y., Konosu, S., Yasumoto, T., Kamiya, H., 1969. Ciguatera in the Ryukyu and Amami Islands. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 35 (3), 316-326.
- Hernández, M. M., Heraso, C., Villareal, M. L., Vargas-Arispuro, I., Aranda, E., 1999. Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae). *J. Ethnopharmacol.* 67, 37-44.
- Hilger, H.H., Diane, N., 2003. A systematic analysis of *Heliotropiaceae* (Boraginales) based on trnL und ITS1 sequence data. *Bot. Jahrb. Syst.* 125, 19-51.
- Hossain, M. M., Paul, N., Sohrab M. H., Rahman, E., Rashid, M. A., 2001. Antibacterial activity of *Vitex trifolia*. *Fitoterapia* 72, 695-697.
- Hu, Y., Xin, H. L., Zhang, Q. Y., Zheng, H. C., Rahman, K., Qin, L. P., 2007. Antinociceptive and anti-hyperprolactinemia activities of Fructus Vitis and its effective fractions and chemical constituent. *Phytomed.* 14 (10), 668-674.
- Jeglitsch, G., Rein, K., Baden, D.G., Adams, D.J., 1998. Brevetoxin-3 (PbTx-3) and its derivatives modulate single tetrodotoxin-sensitive sodium channels in rat sensory neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248, 516-525.
- Johnson, P. B., Abdurahman, E. M., Tiam, E. A., Abdu-Aguye, I., Hussaini, I. M., 1999. *Euphorbia hirta* leaf extracts increase urine output and electrolytes in rats. *J. Ethnopharmacol.* 65, 63-69.
- Johnson, R., Jong, E.C., 1983. Ciguatera: Caribbean and Indo-Pacific fish poisoning. *Western J. Med.* 138, 872-874.
- Kannathasan, K., Senthilkumar, A., Chandrasekaran, M., Venkatesalu, V., 2007. Differential larvicidal efficacy of four species of *Vitex* against *Culex quinquefasciatus* larvae. *Parasitol. Res.* 101, 1721-1723.
- Kumar-Roiné, S., Matsui, M., Chinain, M., Laurent, D., Pauillac, S., 2008. Modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in RAW 264.7 murine macrophages by Pacific ciguatoxin. *Nitric Oxide* 19, 21-28.
- Kumar-Roiné, S., Matsui, M., Reybier, K., Darius, H.T., Chinain, M., Pauillac, S., Laurent, D., 2009. Ability of Certain Plant Extracts Traditionally Used to Treat Ciguatera Fish Poisoning to Inhibit Nitric Oxide Production in RAW 264.7 Macrophages. *J Ethnopharmacol.* 123 (3), 369-377.
- Lange, W. R., Kreider, S. D., Hattwick, M., Hobbs, J., 1988. Potential benefit of tocainide in the treatment of ciguatera: report of three cases. *Am. J. Med.* 84(6), 1087-1088.
- Lange, W.R., Snyder, F.R., Fudala, P.J. 1992. Travel and ciguatera fish poisoning. *Arch. Intern. Med.* 152, 2049-2053.
- Lanhers, M., C., Fleurentin, J., Cabalion, P., Rolland, A., Dorfman, P., Misslin, R., Pelt, J. M., 1990. Behavioral effects of *Euphorbia hirta* L. Sedative and

- anxiolytic properties. *J. Ethnopharmacol.* 29, 189-198.
- Laurent, D., Joannot, P., Amade, P., Maesse, P., Colmet-Daage, B., 1992. Données sur la ciguatera à nouméa. Knowledges on ciguatera in Noumea (New-Caledonia). *Bull. Soc. Path. Ex.* 85, 520.
- Laurent, D., Bourdy, G., Amade, P., Cabalion, P., Bourret, D., 1993. La gratte ou ciguatera : ses remèdes traditionnels dans le Pacifique Sud. ORSTOM Editions, Paris, pp. 51-116.
- Laurent, D., Yeeting B., Labrosse, P., Gaudechoux, J.P., 2005. Ciguatera : A field reference guide. Secretariat of the Pacific Community, p. 88.
- Lehane, L., Lewis, R.J., 2000. Ciguatera: recent advances but the risk remains. *Int. J. Food Microbiol.* 61, 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. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323, 174-179.
- Lewis, R.J., 1992. Socioeconomic impacts and management of ciguatera in the Pacific. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 85 (5 Pt 2), 427-434.
- Lewis, R. J., Sellin, M., Gillespie, N. C., Holmes, M. J., Keys, A., Street, R., Smythe, H., Thaggard, H., Bryce, S. 1994. Ciguatera and herbivores: uptake and accumulation of ciguatoxins in *Ctenochaetus striatus* on the Great Barrier Reef. *Memoirs of the Queensland Museum*, 34(3), 565-570.
- Lewis R. J., Molgó, J., Adams, D. J., 2000. Ciguatoxin toxins: Pharmacology of toxins involved in ciguatera and related fish poisonings. In: Botana, L. M. (Ed.) *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, Marcel Dekker, Inc., New York, 419-447 pp.
- Lewis, R.J., 2001. The changing face of ciguatera. *Toxicon* 39, 97-106.
- Lewis R.J., 2006. Ciguatera: Australian perspectives on a global problem, *Toxicon* 48, 799-809.
- Lewis, R., Holmes M.J., 1993. Origin and transfer of toxins involved in ciguatera. *Comp. Biochem. Physiol.* 106, 615-628.
- Lobel, P. S., 1979. Folk remedies for tropical fish poisoning in the Pacific. *Sea Frontiers* 25, 239-245.
- Lombet, A., Bidard, J.N., Lazdunski, M., 1987. Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na⁺ channel. *FEBS Lett.* 219, 355-359;
- Maiga, A., Diallo, D., Fane, S., Sanogo, R., Paulsen, B. S., Cisse, B., 2005. A survey of toxic plants on the market in the district of Bamako, Mali: traditional knowledge compared with a literature search of modern pharmacology and toxicology. *J. Ethnopharmacol.* 96, (1-2), 183-193.
- 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. *J. AOAC Int.* 78, 521-527.
- Manner, H.I., Elevitch, C.R., 2006. *Tournefortia argentea* (tree heliotrope). In: Elevitch C.R. (Ed.), *Species profiles for Pacific Island agroforestry, permanent agriculture resources (PAR) Holualua, Hawaii, ver. 3.1.* pp. 1-12.
- Matsui, M., Kumar-Roiné, S., Chinain, M., Laurent, D., Pauillac, S., 2009. Evaluation of the anti-inflammatory potential of plants extracts traditionally used for the treatment of ciguatera fish poisoning in the South Pacific. *Actes des Doctoriales conjointes UPF/UNC, 02 au 06 mars, Tahiti*, no pagination.
- Matsui, M., Kumar-Roiné, S., Darius, H. T., Chinain, M., Laurent, D., Pauillac, S., 2009. Characterisation of the anti-inflammatory potential of *Vitex trifolia* L. (Labiatae), a multipurpose plant of the Pacific traditional medicine. *J.*

- Ethnopharmacol.*
doi:10.1016/j.jep.2009.09.020.
- Matsui, M., Kumar-Roiné, S., Darius, H.T., Chinain, M., Laurent, D., Pauillac, S., 2009. Pacific ciguatoxin 1B-induced modulation of inflammatory mediators in a murine macrophage cell line. *Toxicon* doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.039.
- 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 ciguatoxins-1B-induced neurosecretion from bovine chromaffin cells. *PLoS ONE* 3, e3448.
- Mitchell, G., 2005. Treatment of a mild chronic case of ciguatera fish poisoning with intravenous mannitol, a case study. *Pac. Health Dialog.* 12 (1), 155-157.
- Moullignier, A., Binet, D., Frottier, J., 1995. Ciguatera fish poisoning : also in Europe. *J. Neurol., Neurosurgery, Psych.* 59, 192-199.
- Ng, S., Gregory, J., 2000. An outbreak of ciguatera fish poisoning in Victoria. *Commun. Dis. Intell.* 24, 344-346.
- Nicholson, G.M., Lewis, R.L., 2006. Ciguatoxins: Cyclic polyether modulators of voltage-gated ion channel function. *Mar. Drugs* 4; 82-118.
- Noro, T., Nishihara G.N., Terada R., Yoropiy A., 2003. Ciguatera fish poisoning in Ulithi Atoll, Yap state, Micronesia. In: Aoyama T. (Ed.), The progress report of the 2000 and 2001 survey of the research project "Social homeostasis of small island in an island-zone," Yap Proper and Ulithi Atoll, Micronesia. Kagoshima University Research Center for the Pacific Islands, Kagoshima, Japan, Occasional Papers N° 39, Section 2, Report 9, 83-86.
- Olsen, D.A., 1988. The impact of ciguatera fish poisoning within a changing Caribbean environment. *Population Environ.* 10 (1), 14-31.
- Palafox, N.A., Jain, L.G., Pinano, A.Z., Gulick, T.M., Williams, R.K., Schatz, I.J., 1988. Successful treatment of ciguatera fish poisoning with intravenous mannitol. *JAMA* 259, 2740-2742.
- Palafox, N.A., 1992. Review of the clinical use of intravenous mannitol with ciguatera fish poisoning from 1988 to 1992. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 85 (5 Pt 2), 423-424.
- 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. *Med. J. Aust.* 153 (5), 306-307.
- Pearn, J., 1994. Ciguatera: Dilemmas in clinical recognition presentation and management. *Mem. Queensland Museum* 34 (3), 601-604.
- Pearn, J., 2001. Neurology of ciguatera. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 70 (1), 4-8.
- Perez, C.M., Vasquez, P.A., Perret, C.F., 2001. Treatment of ciguatera poisoning with gabapentin. *N. Eng. J. Med.* 344, 692-693.
- Pétard, P., 1986. Plantes utiles de Polynésie et Raau Tahiti. Editions Haere Po No Tahiti. 353 pp.
- Rageau, J., 1973. Les plantes médicinales de la Nouvelle-Calédonie. Travaux et documents de l'ORSTOM, 23, 139 pp.
- Rageau, J., 1983. Fichier des plantes médicinales de Tahiti et de Polynésie. ORSTOM Bondy, no pagination.
- Raikhlin-Eisenkraft, B., Bentur, Y., 2002. Rabbitfish ("Aras"): An unusual source of ciguatera poisoning. *IMAJ* 4, 28-30.
- Ross, I. A., 2001. Medicinal Plants of the World: Chemical constituent, Traditional and Modern Medicinal Uses. Humana Press, Vol. 2, 427-432.
- Ruff, T.A., Lewis, R.J., 1994. Clinical aspects of ciguatera: an overview. *Mem. Queensl. Mus.* 34, 609-619.
- Sadovy, Y., 1997. Ciguatera hits Hong Kong live reef fish trade. *SPC Fish. Newsletter* 83 (October/December), 26-28.
- Sauviat, M.P., Boydron-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 ciguatoxins. *Blood Cells Mol. Dis.* 36, 1-9.
- Sayer, A., Hu, Q., Bourdelais, A.J., Baden, D.G., Gibson, J.E., 2008. The effect of

- brevenal on brevetoxin-induced DNA damage in human lymphocytes. *Arch. Toxicol.* 79, 683-688.
- Schnorf, H., Taurarii, M., Cundy T., 2002. Ciguatera fish poisoning: a double-blind randomized trial of mannitol therapy. *Neurol.* 58, 873-880.
- Schwarz, E.S., Mullins, M.E., Brooks, C.B., 2008. Ciguatera poisoning successfully treated with delayed mannitol. *Ann. Emerg. Med.* 52 (4), 476-477.
- Šimko, F., 2007. Is NO the King? Pathophysiological Benefit with Uncertain Clinical Impact. *Physiol. Res.* 56, S1-S6.
- Singh, S., Evans, T. W., 1997. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *Eur. Respir. J.* 10, 699-707.
- Slobbe, L., van Genderen, P. J. J., Wisman, P. J. 2008. Two patients with ciguatera toxicity: A seafood poisoning in travellers to (sub) tropical areas. *J. Netherlands Med.* 66 (9), 389-391.
- Steinman, V. W., 2003. *Euphorbia nocens*, formerly a variety of *Euphorbia hirta* (Euphorbiaceae). *Acta Botanica Mexicana* 64, 37-44.
- Stewart, M.P., 1991. Ciguatera fish poisoning: treatment with intravenous mannitol. *Trop. Doct.* 21 (2), 54-55.
- Ting, J.Y.S., Brown, A.F.T., 2001. Ciguatera poisoning: a global issue with common management problems. *Eur. J. Emergency Med.* 8, 295-300.
- Tuteja, N., Chandra, M., Tuteja, R., Misra, M. K., 2004. Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. *J. Biomed. Biotechnol.* 4, 227-237.
- Vienne, B., 1981-1982. Les usages médicaux de quelques plantes communes de la flore des Iles Banks (Vanuatu). *Cahiers ORSTOM, Série Sciences Humaines XVIII* (4), 569-589.
- Wagstaff, S. J. Hickerson, L., Spangler, R., Reeves, P. A., Olmstead, G., 1998. Phylogeny in Labiatae S.L., inferred from cp DNA sequences. *Plant Systematic and Evolution*, pp. 265-274.
- Weiner, M. A., 1985. *Secrets of Fijian Medicine*. University of California, Berkeley, 141 pp.
- World Health Organization (WHO), 1998. *Medicinal plants in the South Pacific. Western Pacific Series No. 19*, WHO Regional Publications, Manila, pp. 199.
- Wiat, C., 2006. *Ethnopharmacology of Medicinal Plants: Asia and the Pacific*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 119-124.
- Williamson, J., 1989. Ciguatera and mannitol: a successful treatment. *Med. J. Aust.* 151 (2), 77-80.
- Yasumoto, T., 2005. Chemistry, etiology and food chain dynamics of marine toxins. *Proc. Japan Acad.* 8 (Ser. B), 43-51.
- Yasumoto, T., Murata, M. 1993. Marine toxins. *Chem. Rev.* 93, 1897-1909.

II. Matériel, méthodes et résultats

Les sections II.2 et III.3 décrivent les expérimentations chimiques et biologiques menées pour chacune des trois plantes *E. hirta*, *H. foertherianum* et *V. trifolia*. Ces plantes ont été respectivement désignées par les codes Eh, Hf et Vt, suivis par les chiffres ou lettres de l'alphabet de façon ascendante en regard des différentes étapes de fractionnement.

Pour chacune de ces plantes, les étapes de fractionnement et les résultats obtenus sont présentés séparément dans la section II.4 de cette partie.

II.1 Matériel

Sauf spécifications, tous les réactifs et milieux utilisés dans les expérimentations suivantes proviennent de chez Sigma-Aldrich (Lyon, France).

II.2 Partie chimique

Les méthodes d'extractions et de séparations chimiques et chromatographiques utilisées pour chacune des trois plantes sont illustrées dans le Schéma 1.

II.2.1 Extraction

Les extractions ayant été essentiellement menées sur de petites biomasses pour les expérimentations de criblage de plantes (Tableau 1), de plus amples récoltes et extractions (> 800 g) des trois plantes sélectionnées ont été nécessaires. Ces procédures sont détaillées dans la section II.4.

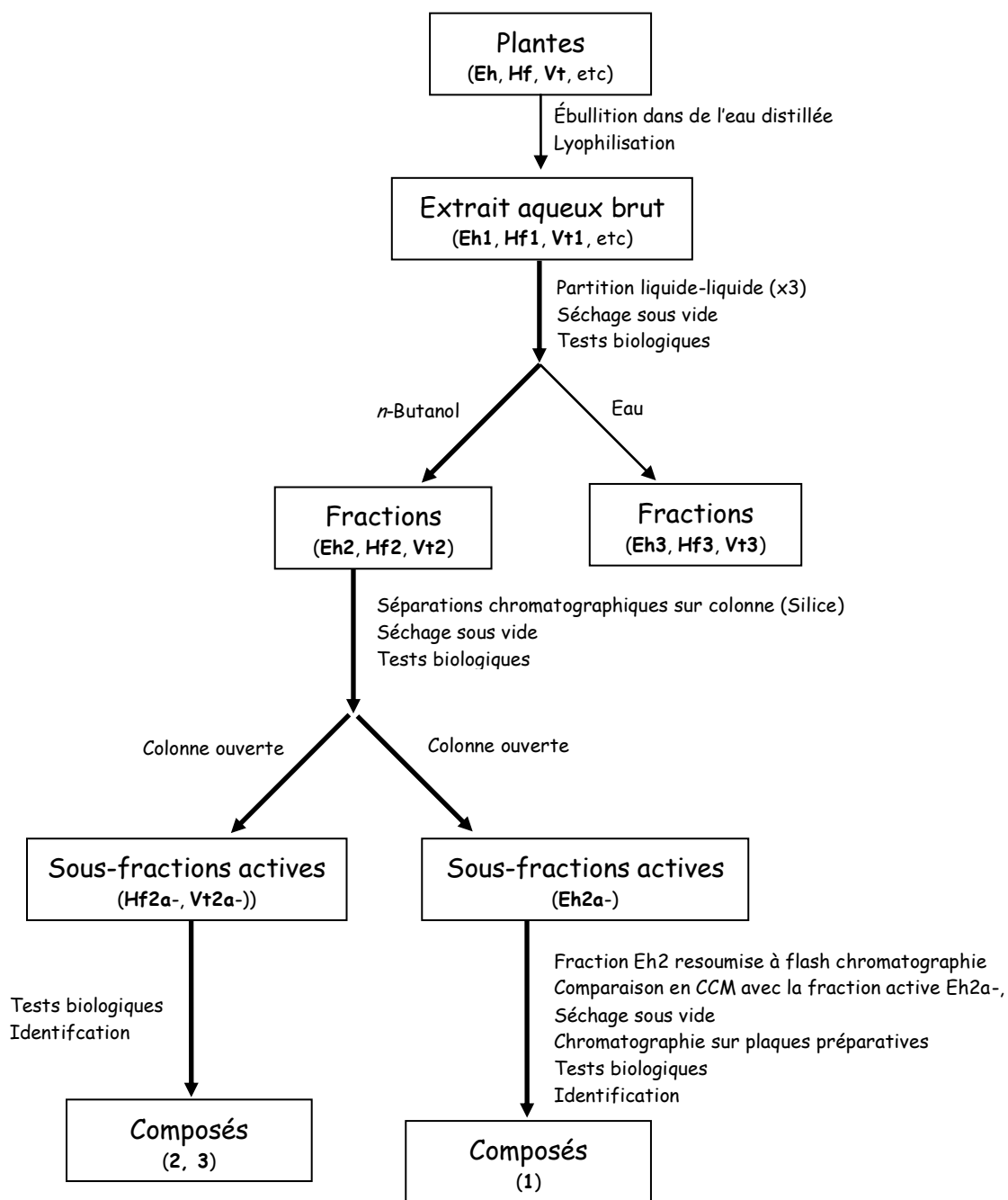


Schéma 1 : Protocole de fractionnement bioguidé mené sur les extraits aqueux d'*E. hirta* (Eh), d'*H. foertherianum* (Hf) et de *V. trifolia* (Vt). La sélection des fractions et sous-fractions pour le travail complémentaire, découlant des évaluations biologiques, est représentée par la succession de flèches **en gras**. Les composés **1** d'*E. hirta*, **2** d'*H. foertherianum* et **3** de *V. trifolia* ont été identifiés puis analysés pour leurs activités biologiques.

II.2.2 Fractionnement et isolement

Les trois extraits (Eh1, Hf1 et Vt1) ont été soumis à une partition liquide-liquide entre du *n*-butanol et de l'eau distillée (3 fois). En fonction des évaluations biologiques, les fractions actives, *n*-butanolique pour les trois, furent ensuite soumises à des purifications ultérieures par chromatographie sur colonne (silice) qui donnèrent plusieurs sous-fractions. Ces sous-fractions ont été à leur tour évaluées pour leurs activités biologiques. Ces purifications successives ont conduit à l'identification de trois composés (**1-3** ; Fig. 9), un pour chaque extrait (Schéma 1). Ces trois produits se sont avérés commercialement disponibles et la confirmation de leur activité a été recherchée sur des produits du commerce.

De plus amples détails sur les paramètres de ces expérimentations sont décrits séparément pour chacune des trois plantes dans la section II.4.

II.2.3 Analyse structurale

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) du ^1H (400 MHz) et du ^{13}C (100 MHz) ont été obtenus (dans du D₂O) sur un spectromètre Bruker ARX 400 (Bruker BioSpin, Courtaboeuf, France). Les spectres de masse (MS ; modes négatif et positif) furent réalisés sur un spectromètre Perkin-Elmer API Sciex 365 triple quadripole (Perkin-Elmer, Concord, ON, Canada) équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI).

II.3 Partie tests biologiques

A chaque étape de la purification, des extraits bruts aux molécules isolées en passant par chaque fraction et sous-fraction, l'activité inhibitrice du NO• induit par le LPS dans les RAW 264.7 (pour Eh, Hf et Vt) et/ou l'activité inhibitrice de la liaison de la [^3H]-PbTx-3 au CSDP (pour Hf) ont été évaluées (Schéma 1).

Il est à noter qu'à l'exception des solvants utilisés pour dissoudre les fractions, sous-fractions et produits isolés, et des concentrations testées par la suite, aucune autre modification n'a été apportée à ces deux essais biologiques par rapport à ce qui a été décrit dans les études de criblage des extraits dans les chapitres 1 et 2 de la partie 2.

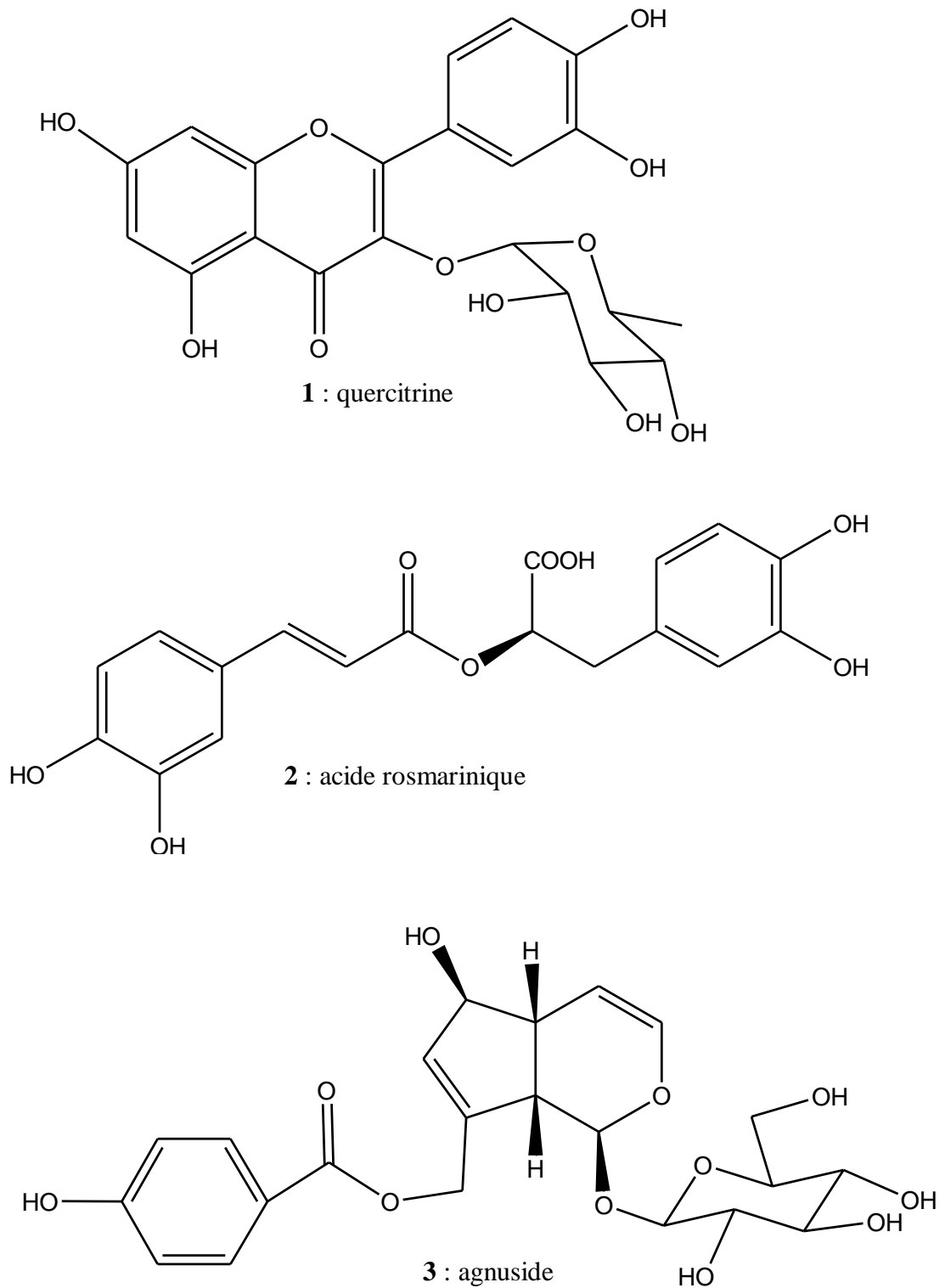


Figure 9 : Structure chimique de la quercitrine (1), de l'acide rosmarinique (2) et de l'agnuside (3).

II.3.1 Bioguidage avec les tests colorimétriques

Les activités inhibitrices du NO• ont été évaluées dans les cellules RAW 264.7 (5×10^4 cellules/puits) activées par 10 µg/mL de LPS par le TG. Parallèlement, les potentiels cytotoxique et inducteur du NO• des différentes fractions ont été évalués.

Les échantillons ont été redissous dans le DMSO, le MeOH ou l'eau distillée suivant leur polarité. Avant de débiter les essais biologiques sur les fractions, des tests ont été effectués sur des concentrations croissantes de DMSO et de MeOH dans les macrophages RAW 264.7 non activés et activés par le LPS pour observer les effets de ces solvants sur la viabilité cellulaire et sur les taux de production de nitrite *via* le TG et le test au MTT, respectivement.

Nous avons observé que le DMSO et le MeOH, au dessus de la concentration minimale de 2 et 3 % v/v, induisait une cytotoxicité significative de respectivement $10,6 \pm 1,1$ et $16,4 \pm 9,3\%$ dans les cellules RAW 264.7. Ainsi, des précautions ont été prises pour ne pas dépasser cette limite dans le volume final déposé. En outre, pour chaque fraction, sous-fraction ou produit pur testé, des contrôles négatifs appropriés ont été appliqués dans chaque microplaque avec la concentration (%v/v) finale en solvant la plus forte.

Alors que l'eau distillée et le MeOH ont été utilisés pour redissoudre les extraits et les fractions, le DMSO et le MeOH ont servi pour la dissolution des sous-fractions et des molécules pures. A l'exception des extraits bruts, pour chacun de ces échantillons, les solutions stocks furent préparées à la concentration de 50 mg/mL et ultrasoniquées pour favoriser la dissolution. Pour ce qui concerne les extraits bruts, elles furent préparées à 250 mg/mL.

Ces solutions furent ensuite diluées dans le milieu d'incubation (DMEM) aux concentrations appropriées pour le test. Ces mélanges ont finalement été répartis dans des microplaques à 96 puits aux concentrations de 2,5, 25, 250 et 2500 µg/mL pour les extraits (Fig. 2), de 50, 100, 500 et 1000 µg/mL pour les fractions (Fig. 10), de 10, 50, 100 et 250 µg/mL pour les sous-fractions (Fig. 11) et de 10, 50, 100 et 500 ou 10, 50, 100 et 250 µg/mL pour les produits purs (Fig. 10).

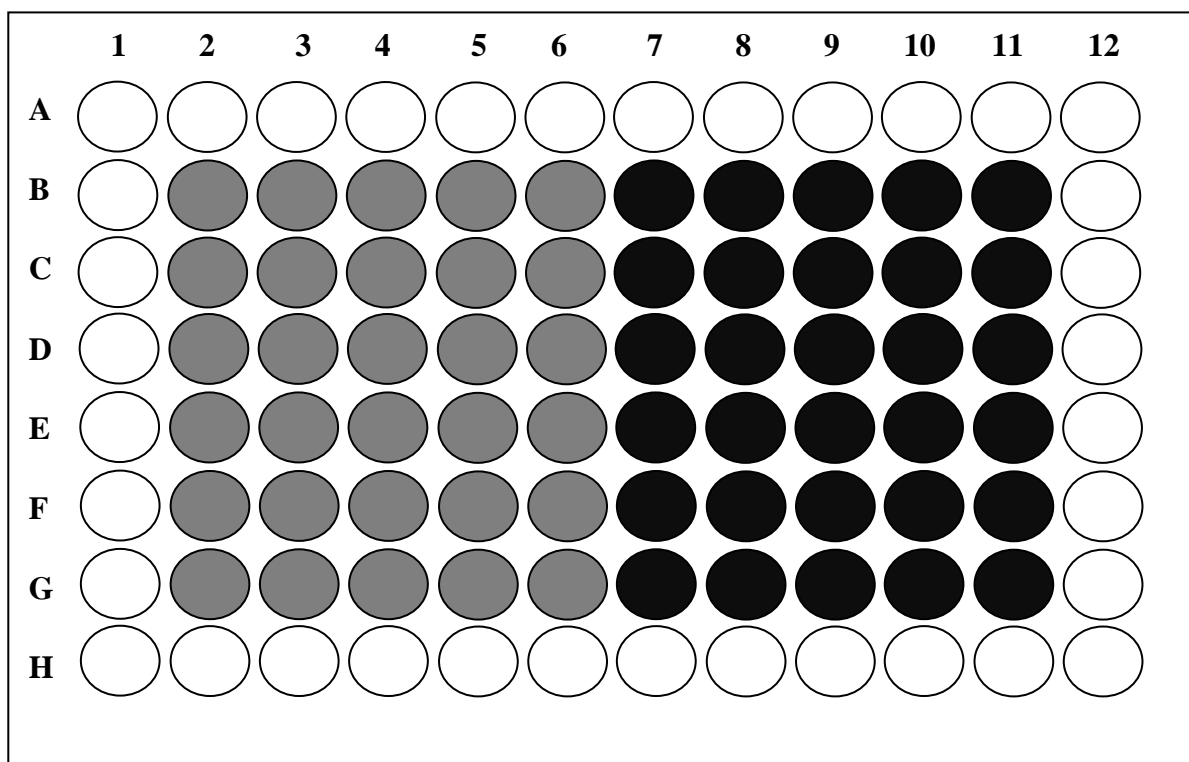


Figure 10 : Distribution des traitements dans des microplaques à 96 puits pour l'évaluation *in vitro* de l'inhibition du NO• avec les fractions et les molécules pures d'*E. hirta*, d'*H. foertherianum* et de *V. trifolia*. Parallèlement, la capacité à induire spontanément du NO• et la cytotoxicité des extraits sont évaluées. Les contrôles négatifs présentent les plus fortes proportions (% v/v) de solvants (MeOH ou eau distillée) utilisées ($n = N \times 2$; $N = 6$).

- Puits avec eau stérile
- Macrophages RAW 264.7 à la densité de 5×10^4 cellules/puits incubés avec 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPS et des concentrations croissantes de différentes fractions (0, 50, 100, 500 et 1000 $\mu\text{g/mL}$) ou des molécules pures (0, 10, 50, 100, et 500 ou 0, 10, 50, 100 et 250 $\mu\text{g/mL}$).
- Macrophages RAW 264.7 à la densité de 5×10^4 cellules/puits incubés uniquement avec les concentrations croissantes de différentes fractions (0, 10, 50, 100 et 500 $\mu\text{g/mL}$) ou des molécules pures (0, 10, 50, 100 et 500 ou 0, 10, 50, 100 et 250 $\mu\text{g/mL}$).

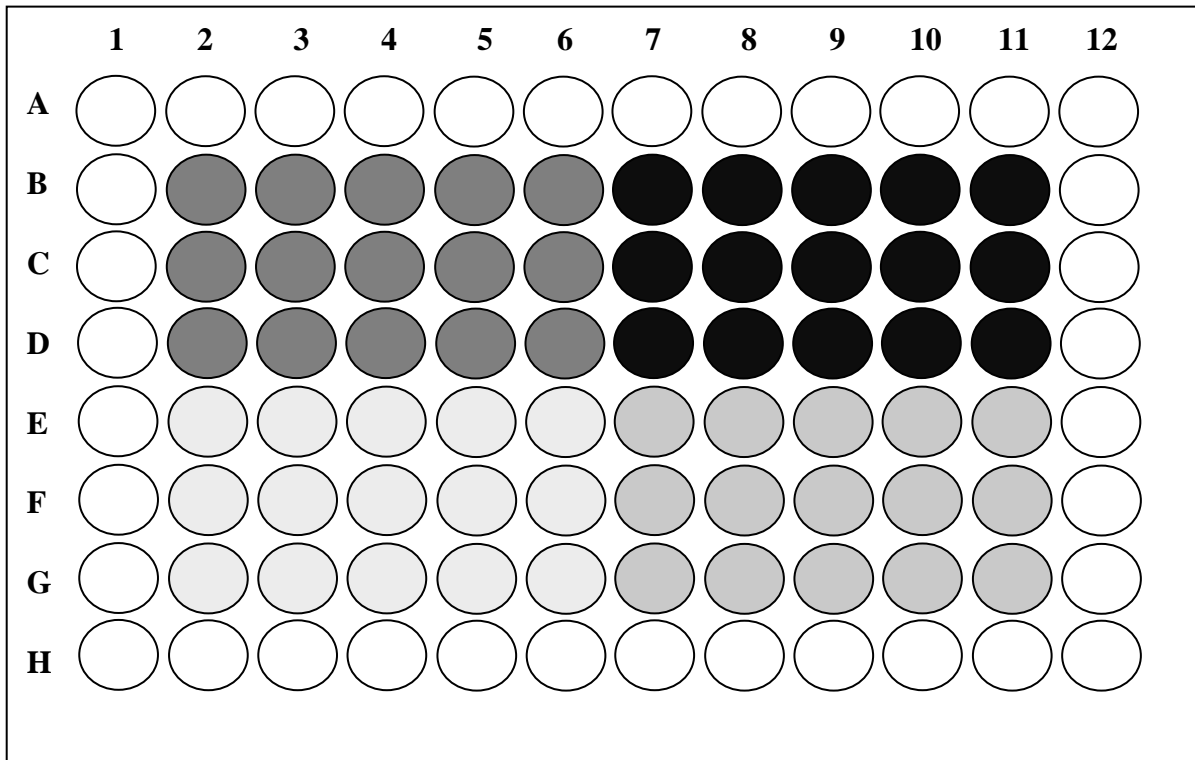


Figure 11 : Distribution des traitements dans des microplaques à 96 puits pour l'évaluation *in vitro* de l'inhibition du NO• avec les sous-fractions d'*E. hirta*, d'*H. foertherianum* et de *V. trifolia*. Parallèlement, la capacité à induire spontanément du NO• et la cytotoxicité des extraits sont évaluées. Pour ces tests biologiques, deux échantillons différents sont analysés par microplaque. Les contrôles négatifs présentent les plus fortes proportions (% v/v) de solvants (DMSO ou MeOH) utilisées ($n = N \times 2$; $N = 3$).

- Puits avec eau stérile
- ○ Macrophages RAW 264.7 à la densité de 5×10^4 cellules/puits incubés avec 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS et des concentrations croissantes de deux différentes sous-fractions (0, 10, 50, 100 et 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- ○ Macrophages RAW 264.7 à la densité de 5×10^4 cellules/puits incubés uniquement avec les concentrations croissantes des deux différentes sous-fractions (0, 10, 50, 100 et 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

II.3.2 Bioguidage avec le test d'interaction ligand-récepteur

L'activité d'inhibition de la liaison de la [³H]-PbTx-3, a été interprétée par le TILR en utilisant les synaptosomes de cerveaux de rats comme décrit dans le chapitre 2 de la partie 2.

Pour ces tests, l'extrait et les fractions sont dissous dans l'eau et préparés en solution stock de 50 ou 167 mg/mL. Les sous-fractions et les produits purs sont redissous dans le DMSO et le MeOH pour fournir des solutions stock à 5 ou 20 mg/mL. Ces solutions sont ensuite diluées dans le tampon d'incubation aux concentrations appropriées pour le test. Ces concentrations sont décrites par la suite.

II.3.3 Analyses des données et statistiques

En ce qui concerne l'analyse des données des premiers tests biologiques, les pourcentages de réduction de l'accumulation de nitrite induite par le LPS, d'induction spontanée du NO• et de viabilité cellulaire furent calculés comme précédemment décrit dans le chapitre 1 de la partie 2.

Les résultats de ces expérimentations ont été exprimés sous forme de moyenne de chaque expérience menée en duplicate ($n = N \times 2$) où $N = 6$ pour les fractions et les composés purs (Fig. 10) et $N = 3$ pour les sous-fractions (Fig. 11).

Les données liées à l'inhibition ou à l'induction du NO• ont été statistiquement évaluées par le test *t* de student. Les différences furent considérées comme significatives à $P \leq 0.05$. L'évaluation statistique de la cytotoxicité a été faite par analyse de variance (ANOVA à deux facteurs) suivi par le test de Bonferroni en utilisant le logiciel Prism 4.0. Les valeurs de $P \leq 0.05$ furent considérées comme significatives.

Pour le TILR, 8 ou 4 concentrations en duplicate ont été testées sur 1 à 4 expérimentations selon les échantillons. La réponse est obtenue à partir de l'IC₅₀ exprimée en mg/mL d'extrait. Un extrait est considéré comme actif lorsque la courbe est de type sigmoïde. L'établissement de la courbe, la valeur de coefficient de Hill et les calculs d'IC₅₀ ont été obtenus avec le logiciel Prism 4.0.

II.4 Fractionnement bioguidé et isolement

Pour chacune des trois plantes (Eh, Hf et Vt), les expérimentations chimiques et biologiques qui ont conduites (Schéma 1) à l'isolement de trois molécules (Fig. 9) sont présentées ci-dessous.

II.4.1 *Euphorbia hirta*

Les poids des fractions et les données des activités biologiques obtenus pendant l'étude de bioguidage par le TG pour la plante entière d'*E. hirta* (Eh) sont présentés dans le Tableau 4.

Les échantillons de plantes entières d'*E. hirta* (Eh ; 839,5 g) ont été récoltés sur la bande côtière de l'Anse Vata, Nouméa, et extraits par ébullition dans 8 L d'eau distillée pendant 30 min. La solution aqueuse a été filtrée et lyophilisée pour donner 32,6 g de résidu sec (Eh1). Testé dans nos criblages sur RAW 264.7 (Fig. 2), l'extrait Eh1 à 250 µg/mL fut très actif démontrant une forte capacité à réduire l'accumulation de nitrite ($44,9 \pm 6,7\%$) sans provoquer ni de cytotoxicité ni d'induction spontanée de production de NO• (Publication 2).

Par la suite, l'extrait Eh1 (30 g) a été redissous dans 1 L d'eau distillée et partitionné entre 300 mL de *n*-butanol (Eh2 ; 10,4 g) et de l'eau distillée (Eh3 ; 19,2 g). Ces deux fractions furent soumises au TG (Fig.10). Les deux fractions se révélèrent capables d'inhiber l'accumulation de nitrite (réduction de $17,8 \pm 7,5\%$ à la plus faible concentration de 50 µg/mL pour Eh2) sans manifester de cytotoxicité. Cependant, les deux fractions, et plus particulièrement Eh2, induirent fortement la production de NO• ou provoquèrent des interférences.

Aussi, la fraction butanolique (Eh2 ; 450 mg) a été sujette à une séparation sur colonne de chromatographie préparée manuellement (L : 24,5 cm, D : 2,06 cm) avec du gel de silice 60 (Merck, 30,0 g, 230-400 µm mesh size) avec le gradient d'élution suivant : CH₂Cl₂-EtOAc-MeOH (100:0:0 → 50:50:0 → 0:100:0 → 0:99:1 → 0:98:2 → 0:90:10 → 0:80:20 → 0:60:40 → 0:40:60 → 0:20:80 → 0:0:100).

Tableau 4 : Fractionnement bioguidé de l'extrait aqueux de la plante entière d'*Euphorbia hirta* (Eh) avec le test d'inhibition du NO• (en comparaison de la cytotoxicité et de l'induction du NO•) dans des macrophages RAW 264.7 activés ou non par du LPS. Les masses obtenues et les concentrations testées sont également spécifiées dans ce tableau (voir données des bioactivités sous forme graphique en Annexe 4).

Echantillons	Poids (mg)	Concentrations testées (µg/mL)	Bioactivités				Echantillons	Poids (mg)	Concentrations testées (µg/mL)	Bioactivités			
			Inhibition du NO• ^a		Induction du NO• ^b	Viabilité Cellulaire ^c				Inhibition du NO• ^a		Induction du NO• ^b	Viabilité Cellulaire ^c
Eh1	32600	2,5	-3,0	NS	NS	NS	Eh2a-4	11,8	10	-1,6	NS	NS	NS
		25	4,5	NS	NS	NS			26,6	++	NS	NS	
		250	44,9	+++	NS	NS			25,5	++	NS	NS	
		2500	58,8	+++	NS	NS			96,5	+++	NS	NS	
Eh2	10400	50	17,8	+	---	NS	Eh2a-5	42,9	10	-8,3	NS	NS	NS
		100	37,0	+++	---	NS			9,0	NS	NS	NS	
		500	52,0	+++	---	NS			2,8	NS	NS	NS	
		1000	27,4	++	---	NS			54,1	+++	---	NS	
Eh3	19200	50	-0,4	NS	NS	NS	Eh2a-6	36,5	10	-3,2	NS	NS	NS
		100	3,2	NS	NS	NS			8,5	NS	NS	NS	
		500	46,2	+++	NS	NS			7,9	NS	NS	NS	
		1000	69,5	+++	-	-			60,1	+++	---	NS	
Eh2a-1	3,4	10	-3,1	NS	NS	NS	Eh2a-7	63,8	10	-7,1	NS	NS	NS
		50	-6,4	NS	NS	NS			-1,5	NS	NS	NS	
		100	-19,8	NS	NS	NS			-4,8	NS	NS	NS	
		500	27,4	NS	NS	--			36,6	+++	---	NS	
Eh2a-2	6,1	10	2,4	NS	NS	NS	Eh2a-8	63,4	10	-1,0	NS	NS	NS
		50	51,1	+++	NS	+++			14,0	NS	NS	NS	
		100	59,3	+++	NS	+++			11,9	NS	NS	NS	
		500	60,0	+++	---	+++			54,9	+++	NS	NS	
Eh2a-3	3,2	10	4,1	NS	NS	NS	Eh2a-9	376,9	10	12,9	NS	NS	NS
		50	71,1	+++	NS	++			16,1	NS	NS	NS	
		100	78,2	+++	NS	++			5,3	NS	NS	NS	
		500	37,2	++	---	+++			17,9	NS	NS	NS	

L'extrait, les fractions, ou sous-fractions qui furent actifs et retenus pour un fractionnement ultérieur sont surlignés en grisé.

^a % de la capacité d'inhibition du NO• d'extrait, des fractions ou sous-fractions dans des macrophages RAW 264.7 traités avec 10 µg/mL de LPS après 24 h et exprimés sous forme de moyennes ($n = 6$ ou 12).

^b % de la capacité d'induction du NO• d'extrait, des fractions ou sous-fractions dans des macrophages RAW 264.7 après 24 h ($n = 6$ ou 12).

^c % d'effet sur la viabilité cellulaire d'extrait, des fractions ou sous-fractions dans des macrophages RAW 264.7 traités avec 10 µg/mL de LPS après 24 h ($n = 6$ ou 12).

Abréviations : NS : pas de changement significatif ($P > 0,05$) ; (+), (++) et (+++) : diminution significative ($0,01 < P < 0,05$, $0,001 < P < 0,01$ et $P < 0,001$) ; (-), (--) et (---) : augmentation significative ($0,01 < P < 0,05$, $0,001 < P < 0,01$ et $P < 0,001$).

Sur la base de leurs profils chimiques sur la chromatographie sur couche mince (CCM), les différentes éluions furent combinées en sous-fractions désignées d'Eh2a-1 à Eh2a-9. Ces 9 sous-fractions furent ensuite soumises aux tests biologiques (Fig. 11), pour conduire à l'identification de la fraction fortement active, Eh2a-4, sans cytotoxicité ni induction spontanée de NO•.

Suite à l'identification de la sous-fraction active (Eh2a-4), la séparation à l'échelle préparative de la fraction Eh2 (2.1 g) a été menée sur l'appareil de flash chromatographie automatisé CombiFlash Companion® (Teledyne Isco, Nebraska, USA) en utilisant une colonne pré-remplie de 40 g (Teledyne Isco, Nebraska, USA). Un gradient d'éluion de polarité croissante avec CH₂Cl₂-EtOAc-MeOH (100:0:0 → 0:100:0 → 0:95:5 → 0:90:10 → 0:80:20 → 0:50:50 → 0:0:100) a été programmé. Ainsi les éluions furent, sur la base de leur CCM, combinées en sous-fractions d'Eh2b-1 à Eh2b-10. Les profils chimiques de ces 10 sous-fractions ont été comparés à celui d'Eh2a-4 par des CCM combinées. Les molécules potentiellement actives d'Eh2a-4 furent observées dans les sous-fractions Eh2b-5 à Eh2b-7.

Ces trois sous-fractions réunies (Eh2b-5-7 ; 200 mg) furent soumises à une chromatographie préparative sur couche épaisse (CCE) de gel de silice 60 (Merck, 2 mm). Chargées à la concentration de 25-30 mg/plaque, ces CCE ont été éluées dans le système de solvant CH₂Cl₂-EtOAc 10:90. Révélés à la lampe UV (254 et 366 nm), le composé **1** (29,7 mg) a été désorbé.

Cette molécule a ensuite été identifiée comme étant la quercitrine d'après les spectres de fragmentation de MS (annexe 5), qui ont été comparés à ceux du produit commercial. La quercitrine (**1** ; 3-[(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)oxy]-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4H-benzopyran-4-one) est un composé polyphénolique, de masse moléculaire 448.4 et de formule chimique C₂₁H₂₀O₁₁ (Fig. 9).

Par la suite, la quercitrine obtenue commercialement a été évaluée pour son potentiel inhibiteur dans le TG (Fig. 10) à différentes concentrations (0, 10, 50, 100 et 500 μ g/mL). La quercitrine possède une légère activité inhibitrice (14,3 \pm 2,4%) à 500 μ g/mL sur l'accumulation de nitrite dans les surnageants de cellules RAW 264.7 activées au LPS (Fig. 12).

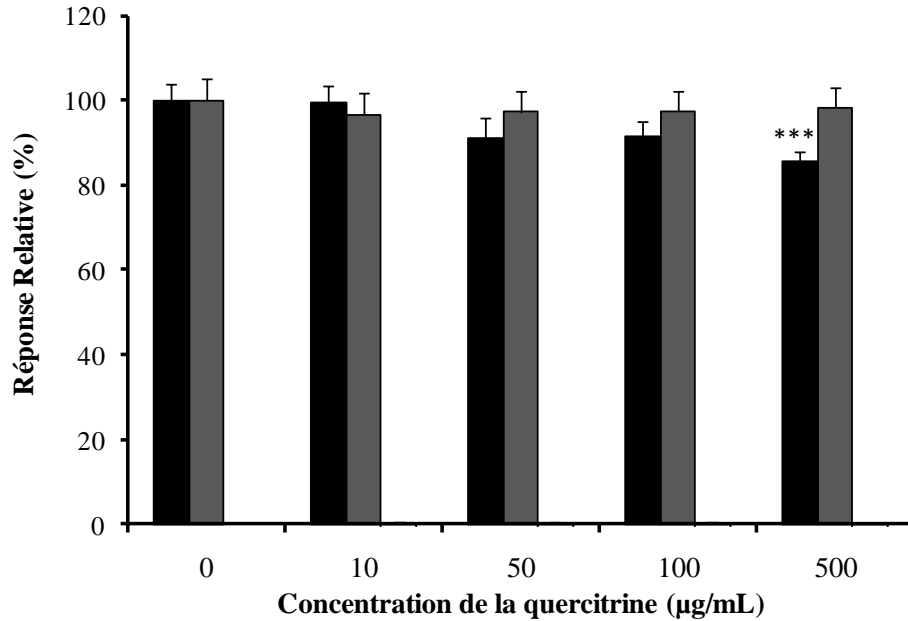


Figure 12 : Effets de la quercitrine (**1**) sur l'accumulation de nitrite dans les surnageants cellulaires et sur la viabilité cellulaire de macrophages RAW 264.7 (5×10^4 cellules/puits) stimulés ou non avec du LPS.

Abréviations : (+), (+ +) et (+ + +): diminution significative ($0,01 < P < 0,05$, $0,001 < P < 0,01$ et $P < 0,001$).

■ % de la capacité d'inhibition du NO• de la quercitrine à 0, 10, 50, 100 et 500 µg/mL dans des macrophage RAW 264.7 après 24 h de traitement avec 10 µg/mL de LPS. Pourcentages d'activité calculés par rapport à la production de NO• observée avec le LPS ($n = 12$).

■ % d'effet sur la viabilité des cellules RAW 264.7 traitées avec 10 µg/mL de LPS et de la quercitrine à 0, 10, 50, 100 et 500 µg/mL après 24 h. Pourcentages d'activité calculés par rapport à la viabilité cellulaire observée avec le LPS ($n = 12$).

□ % de la capacité d'induction du NO• de la quercitrine à 0, 10, 50, 100 et 500 µg/mL dans des macrophages RAW 264.7 après 24 h. Pourcentages d'activité calculés par rapport à la production de NO• observée avec le LPS à 10 µg/mL ($n = 12$).

II.4.2 *Heliotropium foertherianum*

Les poids des fractions et les données des activités biologiques obtenus pendant les études de bioguidage par le TG et le TILR pour les feuilles d'*H. foertherianum* (Hf) sont présentés dans le Tableau 5.

L'extrait d'*H. foertherianum* (Hf) a été préparé à partir de 2,1 kg de feuilles sénescents récoltées près de la zone côtière de l'Anse Vata, Nouméa. Après ébullition pendant 30 min dans 9 L d'eau distillée, la solution fut filtrée et lyophilisée pour donner 51,9 g de résidu sec (Hf1). Testé pour sa capacité à inhiber le NO•, l'extrait Hf1 dans cette étude de criblage (Fig. 2) n'a pas manifesté d'activité (Publication 2).

Cependant, cet extrait a été capable d'inhiber la liaison de la [³H]-PbTx-3 aux synaptosomes de cerveaux de rats dans le TILR avec une IC₅₀ de 4,25 ± 1,58 mg/mL (Fig. 13A).

En conséquence, l'extrait Hf1 (36,8 g) a été redissous dans 1 L d'eau distillée et partitionné entre 300 mL de *n*-butanol (Hf2 ; 2,7 g) et de l'eau distillée (Hf3 ; 30,5 g). Ces deux fractions furent analysées avec le TILR, aux concentrations de 50 mg/mL pour Hf2 et 167 mg/mL pour Hf3 suivi de 8 dilutions (60, 200, 600, 1200, 2000, 6000, 12000 et 20000 µg/mL, et 200, 667, 2000, 4000, 6667, 20000, 40000 et 66668 µg/mL, respectivement) testées en duplicate (n = N × 2 ; N = 2). Alors que la fraction aqueuse Hf3 n'a pas montré d'activité, la fraction *n*-butanolique Hf2 manifesta une activité inhibitrice (IC₅₀ = 3,64 ± 0,36 mg/mL) légèrement plus forte que le remède traditionnel Hf (Fig. 13A).

Les fractions Hf2 et Hf3 furent aussi soumises au test de l'inhibition du NO• (Fig.10). La fraction Hf3 a montré une action modérée mais significative à 1000 µg/mL (29,4 ± 11,4%), alors que la fraction Hf2 manifesta une activité nettement plus forte de 41,3 ± 4,2% à la concentration de 100 µg/mL. Cette dernière fraction provoqua spontanément une induction du NO• ou des interférences à 1000 µg/mL, ainsi qu'un accroissement significatif de la viabilité cellulaire de 9,1 ± 1,7% à la concentration de 500 µg/mL.

Etant donné que la fraction butanolique (Hf2) manifesta des activités dans les deux tests, 500 mg de cette fraction ont fait l'objet d'une séparation analytique sur colonne de

Tableau 5 : Fractionnement bioguidé de l'extrait aqueux de feuilles d'*Heliotropium foertherianum* (Hf) avec le test d'inhibition de NO• (en comparaison de la cytotoxicité et de l'induction du NO•) dans des macrophages RAW 264.7 activés ou non par du LPS et avec le test d'interaction ligand-récepteur pratiqué sur les synaptosomes de cerveaux de rats co-incubés avec la [³H]-PbTx-3. Les masses obtenues et les concentrations testées sont également spécifiées dans ce tableau (voir données de tests biochimiques sous forme graphique en Annexe 4).

Echantillons	Poids (mg)	Bioactivités dans les tests biochimiques					Bioactivités dans les tests d'interaction ligand-récepteur				
		Concentrations testées (µg/mL)	Inhibition du NO• ^a		Induction du NO• ^b	Viabilité Cellulaire ^c	Solution stock (mg/mL)	Concentrations testées (µg/mL)	IC ₅₀ (mg/mL)		Coefficient de Hill
Hf1	51900	2,5 25 250 2500	-4,5 -5,8 3,3 68,6	NS NS NS +++	NS NS NS NS	NS NS NS NS	50	300 - 20000	4,3 ± 1,6	++	-0,9
Hf2	2700	50 100 500 1000	16,7 41,3 68,3 58,6	NS +++ +++ +++	NS NS NS ---	NS NS -- NS	50	60 - 10000	3,6 ± 0,4	++	-1,0
Hf3	30500	50 100 500 1000	3,3 6,4 12,4 29,4	NS NS NS ++	NS NS NS NS	NS NS NS NS	167	200 - 66000	ND	-	-0,1
Hf2a-1	10,3	10 50 100 500	0,7 1,4 19,1 42,5	NS NS NS +++	NS NS NS ---	NS NS - +++	5	6 - 2000	ND	-	ND
Hf2a-2	14,3	10 50 100 500	-0,7 3,8 12,1 92,8	NS NS NS +++	NS NS NS NS	NS NS NS NS	5	6 - 2000	ND	-	ND
Hf2a-3	105,9	10 50 100 500	4,5 6,3 6,4 49,4	NS NS NS +++	NS NS NS NS	NS NS NS -	5	6 - 2000	ND	-	ND
Hf2a-4	93,4	10 50 100 500	-8,2 -18,5 -7,4 55,9	NS NS NS +++	NS NS NS NS	NS NS NS NS	5	6 - 2000	1,1	++	-1,2

Tableau 5 : Fractionnement bioguidé de l'extrait aqueux de feuilles d'*Heliotropium foertherianum* (Hf) avec le test d'inhibition de NO• (en comparaison de la cytotoxicité et de l'induction spontanée du NO•) dans des macrophages RAW 264.7 activés ou non par du LPS et avec le test d'interaction ligand-récepteur pratiqué sur les synaptosomes de cerveaux de rats co-incubés avec la [³H]-PbTx-3. Les masses obtenues et les concentrations testées sont également spécifiées dans ce tableau (voir données de tests biochimiques sous forme graphique en Annexe 4).

Echantillons	Poids (mg)	Bioactivités dans les tests biochimiques					Bioactivités dans les tests d'interaction ligand-récepteur				
		Concentrations testées (µg/mL)	Inhibition du NO•		Induction du NO• ^b	Viabilité Cellulaire ^c	Solution stock (mg/mL)	Concentrations testées (µg/mL)	IC ₅₀ (mg/mL)		Coefficient de Hill
-5	12,9	10	-4,7	NS	NS	NS	5	6 – 2000	ND	-	ND
		50	2,3	NS	NS	NS					
		100	8,3	NS	NS	NS					
		500 Hf2a	59,3	+++	-	NS					
Hf2a-6	258,4	10	-9,8	NS	NS	NS	5	6 – 2000	0,3	++	-1,8
		50	-5,3	NS	NS	NS					
		100	0	NS	NS	NS					
		500	38,6	+++	-	-					

L'extraits, les fractions, ou sous-fractions qui furent actifs et retenus pour un fractionnement ultérieur sont surlignés en grisé.

Tests biochimiques

^a % de la capacité d'inhibition du NO• d'extraits, des fractions ou sous-fractions dans des macrophages RAW 264.7 traités avec 10 µg/ml de LPS après 24 h et exprimés sous forme de moyennes ($n = 6$ ou 12).

^b % de la capacité d'induction du NO• d'extraits, des fractions ou sous-fractions dans des macrophages RAW 264.7 après 24 h ($n = 6$ ou 12).

^c % d'effet sur la viabilité cellulaire d'extrait, des fractions ou sous-fractions dans des macrophages RAW 264.7 traités avec 10 µg/ml de LPS après 24 h ($n = 6$ ou 12).

Abréviations : NS : pas de changement significatif ($P > 0,05$) ; (+), (++) et (+++) : diminution significative ($0,01 < P < 0,05$, $0,001 < P < 0,01$ et $P < 0,001$) ; (-), (--) et (---) : augmentation significative ($0,01 < P < 0,05$, $0,001 < P < 0,01$ et $P < 0,001$).

Test d'interaction ligand-récepteur

Abréviations : ND : non défini ; (-) : valeur d'IC₅₀ ≥ 20 µg/mL pour l'extrait et les fractions ou ≥ 2 mg/ml pour les sous fractions ; (+) : valeur d'IC₅₀ < 20 µg/mL pour l'extrait et les fractions ou < 2 mg/ml pour les sous fractions ; (++) : échantillons ayant la valeur d'IC₅₀ < 20 µg/mL (extrait ou fractions) ou < 2 mg/ml (sous fractions) mais également la courbe d'une allure de sigmoïde.

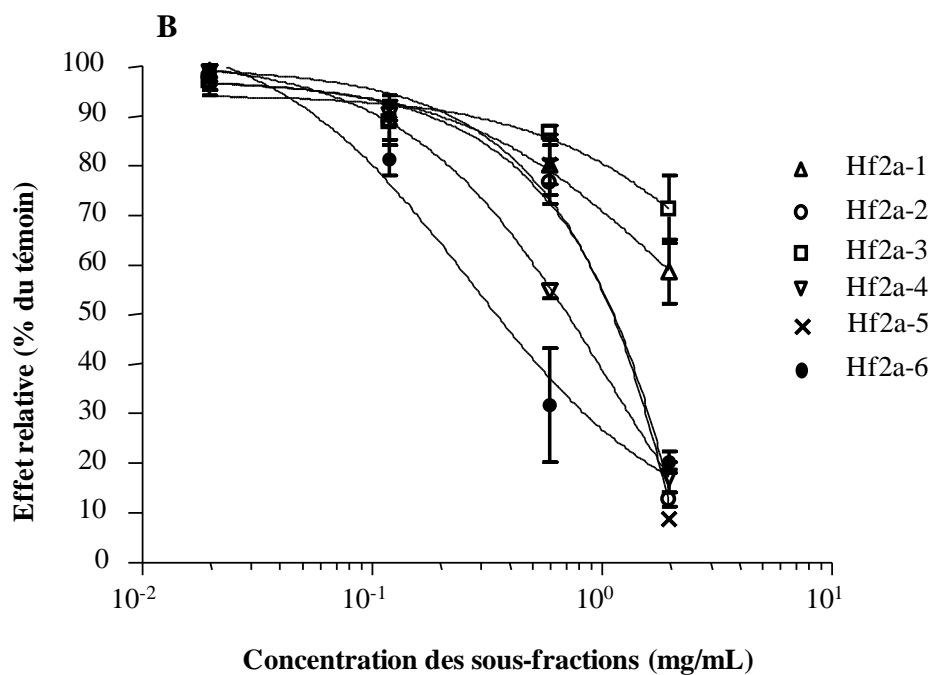
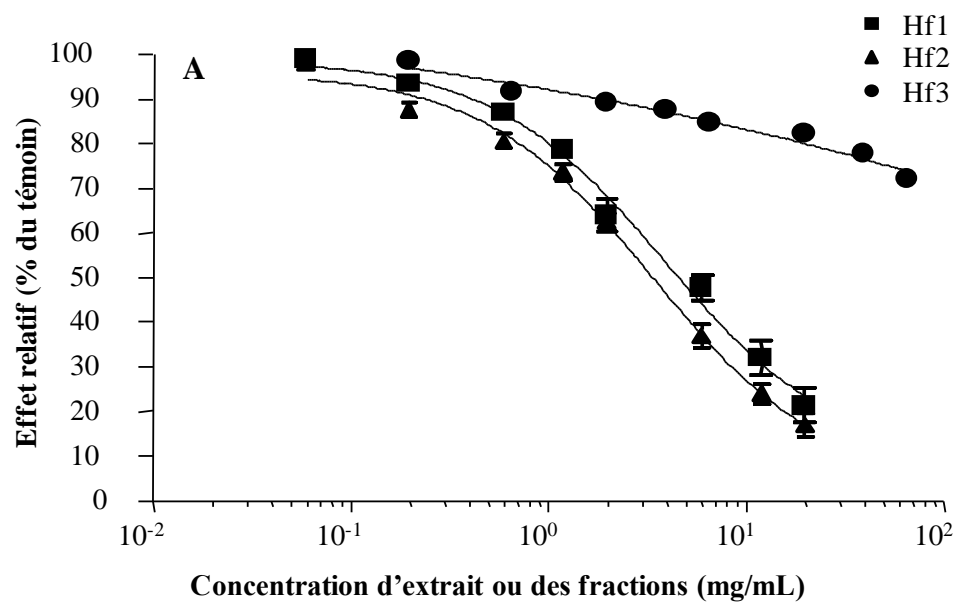


Figure 13 : Courbes de compétition de l'extrait, des fractions et des sous-fractions d'*Heliotropium foertherianum* (feuilles) sur les synaptosomes de cerveaux de rats. L'extrait Hf1 et les fractions butanolique Hf2 et aqueuse Hf3 sont représentés sur la Figure **13A** et les sous-fractions Hf2a-1 à 6 sur le Figure **13B**. Des dilutions croissantes d'échantillons ont été incubées en présence de brévétaxine tritiée ($[^3\text{H}]\text{-PbTx-3}$, 1 nM).

chromatographie (L : 29,0 cm, D : 1,51 cm) sur gel de silice 60 (Merck, 36,1 g, 230-400 μm mesh size) avec comme système éluant : CH_2Cl_2 -MeOH (100:0:0 \rightarrow 0:99:1 \rightarrow 0:98:2 \rightarrow 0:95:5 \rightarrow 0:90:10 \rightarrow 0:80:20 \rightarrow 0:60:40 \rightarrow 0:40:60 \rightarrow 0:20:80 \rightarrow 0:0:100). Les sous-fractions obtenues ont été combinées au vu de leur profil en CCM pour donner les sous-fractions Hf2a-1 à Hf2a-6.

Ces 6 sous-fractions ont été analysées avec le TILR à partir d'une concentration de 5 mg/mL avec 4 dilutions (20, 120, 600 et 2000 $\mu\text{g/mL}$) testées en duplicate ($n = N \times 1$; $N = 2$). Les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau 5 et la Figure 13B. Les sous-fractions Hf2a-4 et 6 montrent une activité dans ce test. Également soumises au TG (Fig. 11), toutes les sous-fractions ont démontré à 500 $\mu\text{g/mL}$ une capacité à réduire l'accumulation de nitrite, dont la sous-fraction Hf2a-1 provoquant en plus une forte cytotoxicité de $98,4 \pm 3,8\%$.

A l'examen des CCM des 6 sous-fractions, on observe que Hf2a-4, Hf2a-5 et Hf2a-6 partagent un profil chimique similaire avec une pureté relative pour la sous-fraction Hf2a-5. Aussi, l'analyse structurale de cette sous-fraction a été effectuée par RMN du proton et du carbone ainsi que par la spectroscopie de masse (Annexe 5).

Le composé a été identifié comme étant l'acide rosmarinique (**2** ; ~ 12 mg) par comparaison des données de spectre de masse et de RMN avec celles d'un échantillon standard et celles de la littérature. L'acide rosmarinique (acide (R)-a-[[3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2E-propenyl]oxy]-3,4-dihydroxy-benzenepropanoïque) est un composé polyphénolique, de masse moléculaire 360,3 et de formule chimique $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$ (Fig. 9).

Un échantillon commercial de l'acide rosmarinique a ensuite été évalué pour son potentiel inhibiteur dans le TG (Fig. 10) et le TILR. L'acide rosmarinique testé en concentrations croissantes (0, 10, 50, 100 et 250 $\mu\text{g/mL}$) a démontré une forte activité sur la réduction de l'accumulation de nitrite ($14,6 \pm 7,7\%$ à 100 $\mu\text{g/mL}$ et $65,2 \pm 7,5\%$ à 250 $\mu\text{g/mL}$) dans les surnageants de cellules RAW 264.7 induite par le LPS (Fig. 14). L'acide rosmarinique testé à 20 mg/mL avec les 8 dilutions (24, 80, 240, 480, 800, 2400, 4800 et 8000 $\mu\text{g/mL}$) a démontré une activité inhibitrice de la liaison de la [^3H]-PbTx-3 aux synaptosomes

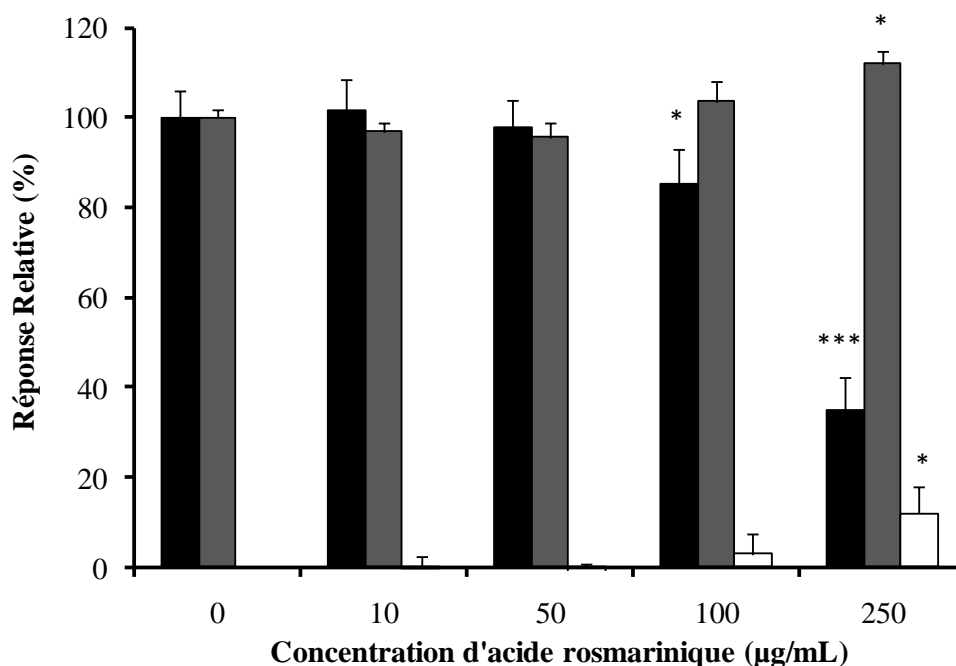


Figure 14 : Effets de l'acide rosmarinique (**2**) sur l'accumulation de nitrite dans les surnageants cellulaires et sur la viabilité cellulaire de macrophages RAW 264.7 (5×10^4 cellules/puits) stimulés ou non au LPS.

Abréviations : (+), (+ +) et (+ + +): augmentation ou diminution significative ($0,01 < P < 0,05$, $0,001 < P < 0,01$ et $P < 0,001$).

■ % de la capacité d'inhibition du NO• de l'acide rosmarinique à 0, 10, 50, 100 et 250 µg/mL dans des macrophages RAW 264.7 après 24 h de traitement au 10 µg/mL de LPS. Pourcentages d'activité calculés par rapport à la production de NO• observée avec le LPS ($n = 12$).

■ % d'effet sur la viabilité des cellules RAW 264.7 traitées avec 10 µg/mL de LPS et de l'acide rosmarinique à 0, 10, 50, 100 et 250 µg/mL après 24 h. Pourcentages d'activité calculés par rapport à la viabilité cellulaire observée avec le LPS ($n = 12$).

□ % de la capacité d'induction du NO• de l'acide rosmarinique à 0, 10, 50, 100 et 250 µg/mL dans des macrophages RAW 264.7 après 24 h. Pourcentages d'activité calculés par rapport à la production de NO• observée avec le LPS à 10 µg/mL ($n = 12$).

avec une valeur d'IC₅₀ évaluée à 0,88 mg/L et un coefficient de Hill -1,35 (Fig. 15). La valeur de Ki de l'acide rosmarinique a ensuite été calculée à 1,43 mM.

Afin d'estimer précisément le rendement de ce composé, nous avons reproduit la séparation de la fraction Hf2 (2,1 g) sur l'appareil de flash chromatographie automatisé CombiFlash Companion® en utilisant une colonne pré-remplie de 40 g. Le gradient d'élution a été programmé pour un accroissement de polarité avec les solvants CH₂Cl₂-EtOAc-MeOH (100:0:0 → 30:70:0 → 5:95:0 → 0:100:0 → 0:90:5 → 0:90:10 → 0:80:20 → 0:50:50 → 0:0:100). Au vu des profils sur CCM, les éluions ont été combinées en sous-fractions et désignées comme Hf2b-1 à Hf2b-17.

Les profils chimiques de ces 17 sous-fractions ont été comparés avec celui de la fraction Hf2a-5 qui contenait majoritairement l'acide rosmarinique (**2**). En conséquence, les sous-fractions Hf2b-7, Hf2b-8, Hf2b-9 et Hf2b-10 identifiées comme contenant l'acide rosmarinique furent regroupées (Hf2b-7-10 ; 210 mg) pour une nouvelle flash chromatographie automatisée sur une colonne pré-remplie de 12 g. L'appareil a été programmé pour une détection UV à 329 nm (λ_{\max} de l'acide rosmarinique) et avec un gradient d'élution EtOAc-MeOH (100:0 → 98:2 → 95:5 → 90:10 → 90:20 → 0:100). Finalement, 97 mg d'acide rosmarinique furent isolés et le rendement de ce produit a été estimé à 0,34% de l'extrait sec de feuille d'*H. foertherianum* (Hf1).

II.4.3 *Vitex trifolia*

Les poids des fractions et les données des activités biologiques obtenues pendant l'étude de bioguidage par le TG pour les feuilles de *V. trifolia* (Vt) sont présentés dans le Tableau 6.

L'extrait de *V. trifolia* (Vt ; 962 g) a été préparé à partir de feuilles collectées en bord de plage à Nouville, Nouméa. Après 30 min d'ébullition dans 7,5 L d'eau distillée, la solution fut filtrée et lyophilisée pour donner 47,7 g de poudre sèche (Vt1). Testé pour ses qualités d'inhibition du NO• (Fig. 2), Vt1 avait manifesté une légère mais significative activité de 13,8 ± 9,0% à 250 µg/mL. Comme l'extrait brut d'*E. hirta*, Vt1 n'a pas provoqué de cytotoxicité ni d'induction spontanée du NO• (Publication 2).

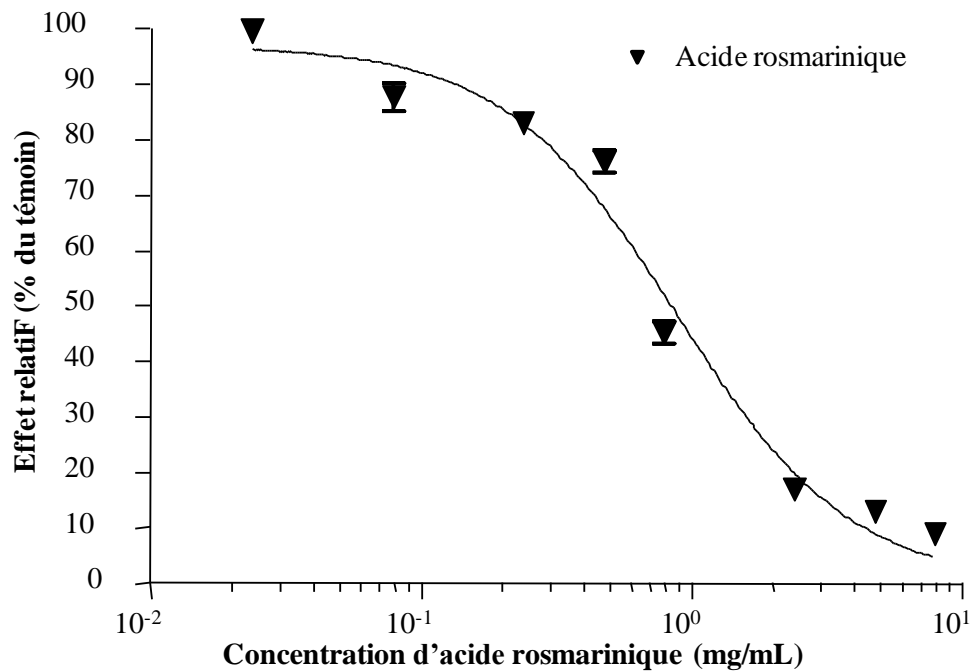


Figure 15 : Courbe de compétition de l'acide rosmarinique (2) sur les synaptosomes de cerveaux de rats. Des dilutions croissantes de ce composé ont été incubées en présence de brevéttoxine tritiée ([3H]-PbTx-3, 1 nM).

Tableau 6 : Fractionnement bioguidé de l'extrait aqueux de feuilles de *Vitex trifolia* (Vt) avec le test d'inhibition du NO• (en comparaison de la cytotoxicité et de l'induction du NO•) dans des macrophages RAW 264.7 activés ou non par du LPS. Les masses obtenues et les concentrations testées sont également spécifiées dans ce tableau (voir données de bioactivité sous forme graphique en Annexe 4).

Echantillons	Poids (mg)	Concentrations testées (µg/mL)	Bioactivités				Echantillons	Poids (mg)	Concentrations testées (µg/mL)	Bioactivités			
			Inhibition du NO• ^a		Induction du NO• ^b	Viabilité Cellulaire ^c				Inhibition du NO• ^a		Induction du NO• ^b	Viabilité Cellulaire ^c
Vt1	47700	2,5	-2,1	NS	NS	NS	Vt2a-4	123,2	10	1,2	NS	NS	NS
		25	-0,5	NS	NS	NS			18,8	NS	NS	NS	
		250	13,8	+++	NS	NS			100	11,6	NS	NS	
		2500	67,0	+++	NS	NS			500	94,0	+++	NS	+++
Vt2	13400	50	5,3	NS	NS	NS	Vt2a-5	1604	10	-2,7	NS	NS	NS
		100	4,9	NS	NS	NS			50	-0,8	NS	NS	NS
		500	41,1	+++	NS	NS			100	-7,6	NS	NS	NS
		1000	80,2	+++	NS	NS			500	11,6	NS	NS	NS
Vt3	22200	50	-8,4	NS	NS	NS	Vt2a-6	175,2	10	-2,0	NS	NS	NS
		100	-6,4	NS	NS	NS			50	1,0	NS	NS	NS
		500	1,3	NS	NS	NS			100	-8,7	NS	NS	NS
		1000	8,3	NS	-	NS			500	24,2	+	NS	NS
Vt2a-1	4,3	10	1,9	NS	NS	NS	Vt2a-7	393,3	10	-2,7	NS	NS	NS
		50	14,3	NS	NS	-			50	9,2	NS	NS	NS
		100	9,3	NS	NS	-			100	16,9	NS	NS	NS
		500	69,2	+++	-	+++			500	69,7	+++	NS	NS
Vt2a-2	6,7	10	82	NS	NS	NS	Vt2a-8	879,6	10	-0,3	NS	NS	NS
		50	46,2	+++	NS	--			50	1,4	NS	NS	NS
		100	48,9	+++	NS	--			100	6,8	NS	NS	NS
		500	60,3	+++	---	+++			500	29,8	+	NS	NS
Vt2a-3	18,4	10	2,0	NS	NS	NS							
		50	44,2	+++	NS	NS							
		100	48,2	+++	NS	NS							
		500	87,6	+++	NS	+++							

L'extrait, les fractions, ou sous-fractions qui furent actifs et retenus pour un fractionnement ultérieur sont surlignés en grisé.

^a % de la capacité d'inhibition du NO• de l'extrait, des fractions ou sous-fractions dans des macrophages RAW 264.7 traités avec 10 µg/ml de LPS après 24 h et exprimés sous forme de moyennes ($n = 6$ ou 12).

^b % de la capacité d'induction du NO• de l'extrait, des fractions ou sous-fractions dans des macrophages RAW 264.7 après 24 h ($n = 6$ ou 12).

^c % d'effet sur la viabilité cellulaire de l'extrait, des fractions ou sous-fractions dans des macrophages RAW 264.7 traités avec 10 µg/ml de LPS après 24 h ($n = 6$ ou 12).

Abréviations : NS : pas de changement significatif ($P > 0,05$) ; (+), (++) et (+++) : diminution significative ($0,01 < P < 0,05$, $0,001 < P < 0,01$ et $P < 0,001$) ; (-), (--) et (---) : augmentation significative ($0,01 < P < 0,05$, $0,001 < P < 0,01$ et $P < 0,001$).

L'extrait Vt1 (36,3 g) a ensuite été redissous dans 1 L d'eau distillée et partitionné entre 300 mL de *n*-butanol (Vt2 ; 13,4 g) et de l'eau distillée (Vt3 ; 22,2 g). Les résultats du test pratiqué sur ces deux fractions (Fig. 10) ont révélé que les composés actifs étaient présents seulement dans la fraction Vt2 qui montra une forte activité inhibitrice du NO• ($41,1 \pm 6,2\%$ à 500 µg/mL).

Par la suite, la fraction *n*-butanolique (Vt2 ; 2,1 g) fut sujette à une séparation préliminaire par colonne de chromatographie (L : 32,5 cm, D : 3,74 cm) sur gel de silice 60 (Merck, 200,7 g, 230-400 µm mesh size) avec comme gradient d'élution : C₆H₆-CH₂Cl₂-EtOAc-MeOH (100:0:0:0 → 50:50:0:0 → 0:100:0:0 → 0:50:50:0 → 0:80:20:0 → 0:0:100:0 → 0:0:99:1 → 0:0:95:5 → 0:0:90:10 → 0:0:80:20 → 0:0:60:40 → 0:0:40:60 → 0:0:20:80 → 0:0:0:100). Les éluions obtenues ont été combinées selon leur profil chimique sur CCM pour donner les sous-fractions Vt2a-1 à Vt2a-8. Ces sous-fractions ont ensuite été testées (Fig. 11).

Les plus fortes activités inhibitrices du NO• ont été observées avec les sous-fractions Vt2a-2 et Vt2a-3 à 50 µg/mL et une activité plus faible a été enregistrée dans les sous-fractions Vt2a-6 et Vt2a-7 ~~mais~~ à une concentration de 500 µg/mL. Vt2a-2 et Vt2a-3 ont également manifesté une forte cytotoxicité à 500 µg/mL. Par ailleurs, la dernière sous-fraction a entraîné une induction spontanée du NO• ou des interférences à la concentration de 500 µg/mL.

A l'examen des CCM des 8 sous-fractions de Vt2, on observe que Vt2a-6 et Vt2a-7 admettent un profil chimique similaire et semblent relativement pures. Ainsi, ces sous-fractions ont été soumises à l'analyse structurale par spectroscopie de masse (Annexe 5).

Le composé majoritaire a été identifié comme étant l'agnuside (**3** ; > 500 mg) par comparaison des données de spectre de masse avec celles d'un échantillon standard et celles de la littérature. L'agnuside (**3** ; 1S,4aS,5R,7aR)-1-(beta-D-glucopyranosyloxy)-1,4a,5,7a-tetrahydro-5-hydroxycyclopenta[c]pyran-7-yl)methyl ester) est un composé glycoside iridoïde, de masse moléculaire 466,4 et de formule chimique C₂₂H₂₆O₁₁ (Fig. 9).

L'agnuside commercial a finalement été évalué pour son potentiel inhibiteur dans le TG (Fig. 16). Dans notre bioessai, l'agnuside testé à 10, 50, 100 et 500 µg/mL n'a pas démontré

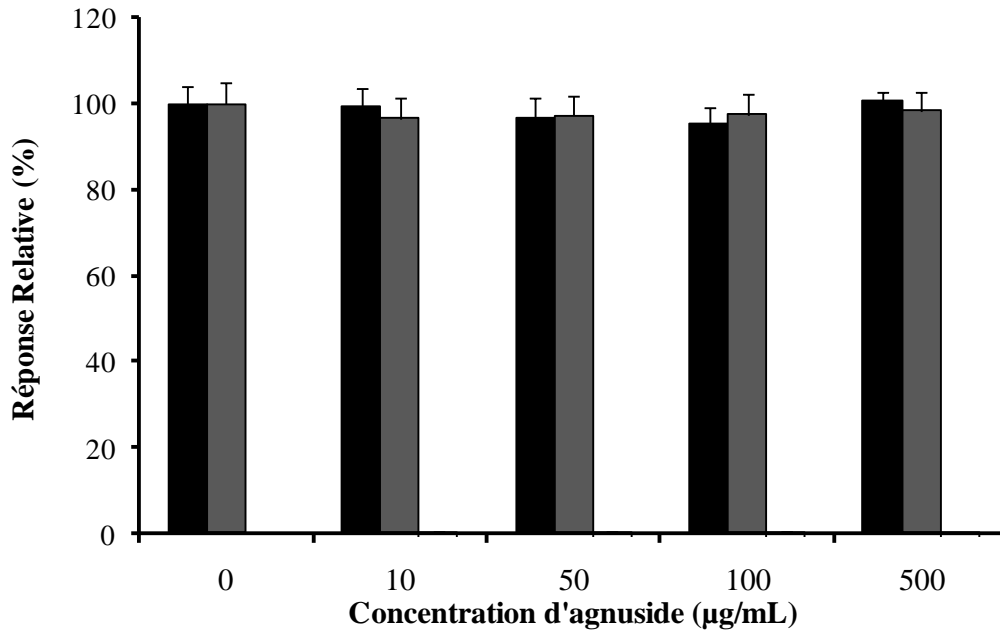


Figure 16 : Effets de l'agnuside (**3**) sur l'accumulation de nitrite dans les surnageants cellulaires et sur la viabilité cellulaire de macrophages RAW 264.7 (5×10^4 cellules/puits) stimulées ou non avec du LPS.

■ % de la capacité d'inhibition du NO• de l'agnuside à 0, 10, 50, 100 et 500 µg/mL dans des macrophages RAW 264.7 après 24 h de traitement au 10 mg/mL de LPS. Pourcentages d'activité calculés par rapport à la production de NO• observée avec le LPS ($n = 12$).

■ % d'effet sur la viabilité des cellules RAW 264.7 traitées avec 10 µg/ml de LPS et de l'agnuside à 0, 10, 50, 100 et 500 µg/mL après 24 h. Pourcentages d'activité calculés par rapport à la viabilité cellulaire observée avec le LPS ($n = 12$).

□ % de la capacité d'induction du NO• de l'agnuside à 0, 10, 50, 100 et 500 µg/mL dans des macrophages RAW 264.7 après 24 h. Pourcentages d'activité calculés par rapport à la production de NO• observée avec le LPS à 10 µg/mL ($n = 12$).

d'activité inhibitrice sur l'accumulation de nitrite dans les surnageants de cellules RAW 264.7 activées au LPS.

III. Discussion et conclusion

En utilisant différentes techniques de séparation (partition liquide-liquide, chromatographies sur colonne, sur couche mince, sur plaque épaisse, et flash chromatographie) ainsi que deux tests biologiques de bioguidage (test de Griess et d'interaction ligand-récepteur), nous avons pu isoler les molécules **1-3** à partir des extraits aqueux de la plante entière d'*E. hirta* et de feuilles d'*H. foertherianum* et de *V. trifolia*.

Il convient de noter que nous n'avons pas identifié toutes les molécules présentes dans les sous-fractions actives sélectionnées. Par conséquent, la bioactivité mesurée avec les composés purs **1-3** peut ne pas correspondre avec celle des sous-fractions.

Il faut également souligner que l'extrait brut de feuilles d'*H. foertherianum* (Hf1) qui n'avait pas démontré d'activité inhibitrice du NO•, après simple séparation liquide-liquide a conduit à une remarquable activité dans la fraction butanolique (Hf2). Cela met en évidence les effets de la concentration lors du processus de séparation selon laquelle la proportion des principes potentiellement actifs a été largement amplifiée par rapport à celle de l'extrait brut. De même, l'activité inductrice du NO• a été amplifiée lorsque l'extrait brut d'*E. hirta* (Eh1) a été fractionné pour donner Eh2. D'autres séparations menées sur la fraction Eh2 ont conduit à l'apparition de cytotoxicité dans certaines sous-fractions, activité qui n'avait pas été observée dans la fraction de départ ni dans l'extrait brut. Similairement, certaines sous-fractions de l'extrait de feuilles de *V. trifolia* montrèrent une forte cytotoxicité non observée préalablement.

Les trois produits, la quercitrine (**1**), l'acide rosmarinique (**2**) et l'agnuside (**3**), sont déjà bien définis et sont même commercialement disponibles. La quercitrine est une forme hétéroside de quercétine, un flavonoïde alimentaire majeur et reconnue comme un excellent antioxydant (Materska, 2008). La quercitrine est présente dans plusieurs préparations de remèdes utilisées traditionnellement dans le traitement des dysfonctionnements gastro-intestinaux, dont la préparation connue sous le nom de Dysentral® fait à partir des parties

aériennes d'*E. hirta* au Mali (Gálvez et al., 1993 ; Maiga et al., 2005). Plusieurs études scientifiques ont mis en évidence son activité antioxydante, antidiarrhéique et son action bénéfique sur les pathologies inflammatoires intestinales (Camuesco et al., 2004 ; 2006 ; Gálvez et al., 1993 ; 1995 ; Sanchez de Medina et al., 1996 ; Wagner et al., 2006). La quercitrine présente dans l'extrait aqueux d'*E. hirta* pourrait donc jouer un rôle prépondérant dans l'amélioration des symptômes gastro-intestinaux durant la phase aiguë de la ciguatera.

L'agnuside a été isolé de plusieurs espèces de *Vitex* (Sharma et al., 2009 ; Kuruüzüm-Uz et al., 2003 ; Suksamrarn et al., 2002). C'est également un constituant majeur de la préparation médicinale à base de ces plantes utilisée dans le traitement de la fertilité ou pour soigner diverses pathologies de l'appareil reproductif chez la femme (Barceloux, 2008). Les propriétés anti-inflammatoires de ce composé ont été étudiées (Suksamrarn et al., 2002).

L'acide rosmarinique est un flavonoïde présent en grande quantité dans les plantes de la famille des Lamiacées, ou Labiataées (plus de 3% du poids sec) et a aussi été reporté dans de nombreuses plantes de la famille des Borraginacées (Petersen, 1999). Parmi ses principaux effets biologiques, on recense son caractère antioxydant et ses propriétés bactéricide, fongicide et anti-inflammatoire, agissant sur le système cardiovasculaire, lui conférant un rôle préventif à l'égard des maladies dégénératives (Sroka et al., 2005 ; Qiao et al., 2005 ; Kim et al., 2005 ; Psotova et al., 2005 ; Makino et al., 2000 ; Zelić et al., 2005 ; Iuvone et al., 2006 ; Petersen, 1999 ; Petersen et Simmonds, 2003 ; Zou et al., 1993). L'acide rosmarinique fait partie du régime alimentaire de l'homme et est également utilisé aujourd'hui en cosmétique en tant qu'antioxydant et apaisant pour la peau (Eggenesperger et al., 1998). Plusieurs brevets à vocation sanitaire dans le domaine de l'allergie, du cancer et de l'inflammation ont été déposés.¹²

De nos trois composés, c'est l'acide rosmarinique qui a démontré la plus forte activité de réduction de l'accumulation de nitrite. Il a également été actif dans notre étude neuropharmacologique avec le TILR et pour lequel nous avons déposé un brevet (N° 0903781) en août 2009 (Annexe 1). Bien que cette inhibition ne soit pas très forte (K_i 1000 fois supérieure à celle du brevenal), cette bioactivité de l'acide rosmarinique mérite d'être

¹² Les références de ces brevets sont WO/2005/074959, WO/2005/072723, WO/2002/094301 et US4329361 et sont extraits des sites de l'WIPO (<http://www.wipo.int>) et free patent online (<http://www.freepatentsonline.com>)

étudiée davantage pour les raisons qui seront discutées dans la section suivante réservée aux perspectives de notre étude.

**Discussion générale,
conclusion et
perspectives**

I. Discussion générale

Touchant essentiellement les pays insulaires tropicaux, la ciguatera est du fait de sa forte incidence dans le Pacifique d'un intérêt particulier pour les pays et territoires insulaires du Pacifique (PICTs). En effet, dans la mesure où les produits de la mer provenant des lagons constituent la source principale voire parfois la seule source de protéines et de revenus pour ces petites nations insulaires, l'intoxication par la ciguatera est difficilement évitable.

Bien que la ciguatera soit rarement fatale, les victimes dans la zone pacifique peuvent présenter un état morbide sévère et durable pouvant évoluer vers la chronicité. La ciguatera a ainsi un impact socio-économique non négligeable pour les PICTs.

Or, jusqu'à présent la médecine occidentale ne propose aucun traitement efficace. Parmi la myriade de médicaments prescrits, tous sont symptomatiques et de soutien et avec une efficacité irrégulière.

La possibilité d'avoir recours à la médecine traditionnelle pour traiter la ciguatera est une connaissance acquise et transmise depuis des générations dans les populations insulaires du Pacifique. Elles y ont recours fréquemment, plaçant plus de foi, par expérience personnelle ou collective dans le système traditionnel que le système occidental. En effet, de nombreuses anecdotes et témoignages sont venus et viennent encore à notre attention, attestant de l'effet bénéfique de l'utilisation de tels remèdes.

Dans notre quête thérapeutique, après les diverses études réalisées (Section II, Introduction générale), l'étape suivante était d'adopter un test biologique nous permettant de passer du niveau cellulaire au niveau moléculaire. Une telle approche pouvait nous apporter une meilleure compréhension du mécanisme par lequel une plante est capable de contrecarrer l'action nocive des CTXs.

Pour cela, nous avons choisi de développer deux approches biologiques basées sur deux modes d'action différents des CTXs. Le premier mécanisme concerne la liaison des CTXs sur le site 5 des CSDP, dont le rôle est bien défini dans la pathogénèse de la ciguatera. Le

deuxième s'appuie sur la récente découverte de la réponse inflammatoire aux CTXs, bien que le rôle du système immunitaire dans la ciguatera reste encore à préciser.

Lors de l'étude mécanistique de l'augmentation du volume des érythrocytes de grenouille, notre groupe de recherche a souligné, pour la première fois, une action possible de la P-CTX-1B sur la voie NO•/NOS. Notamment, il a été montré que le gonflement induit par la P-CTX-1B était prévenu et inhibé par le N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), un inhibiteur de la NOS (Boydron-Le Garrec, 2005 ; Sauviat et al., 2006).

Durant nos études bibliographiques sur la ciguatera, notre attention a été attirée par le fait que certains auteurs évoquaient les un lien possible entre les mécanismes pathogéniques des CTXs et le système immunologique (Bagnis and Kaeuffer, 1974; Kaeuffer et al., 1976; Ruff et Lewis, 1994). Des études de cas plus récentes ont également mis en évidence des troubles inflammatoires auto-immuns aigus et chroniques comme le syndrome de Guillain-Barré et les polymyosites (Angibaud et Rambaud, 1998 ; Gatti et al., 2008 ; Oehler et al., 2009 ; Stommel et al., 1991 ; 1993).

Dernièrement, un petit nombre d'études expérimentales ont commencé à confirmer ces observations. Par exemple, Ryan et collaborateurs (2007) ont montré la modulation de l'expression de facteurs immunologiques chez la souris exposée à la P-CTX-1B. De leurs côtés, les équipes de Tsumoto (2008) et d'Ui (2008) ont mis en évidence les propriétés antigéniques des CTXs en décrivant le mécanisme par lequel les antigènes CTX-3C sont spécifiquement reconnus par des anticorps anti-CTX isolés de souris.

Ainsi, en se basant sur les études antérieures et en gardant à l'esprit la nature symptomatique complexe de l'empoisonnement ciguatérique qui révélerait une composante inflammatoire aiguë et chronique, nous avons émis l'hypothèse du rôle initiateur de médiateurs inflammatoires (tels l'iNOS, le NO• et les cytokines pro-inflammatoires) dans la physiopathologie de la ciguatera.

Nous nous sommes attachés dans un premier temps à mettre en évidence la surproduction du NO• *via* l'activation de l'enzyme iNOS par la P-CTX-1B. Dans un deuxième temps, nous avons adapté cette technique pour mettre au point un test de sélection des plantes et poursuivre leur étude pharmacochimique jusqu'à l'isolement des molécules potentiellement bioactives.

Notre deuxième hypothèse de travail fut l'apport possible du test d'interaction ligand-récepteur et de son adaptation à notre problématique. Etant donné que les CTXs sont connues pour activer principalement les CSDP, il est très probable que le déplacement des CTXs ou l'inhibition de la liaison des CTXs aux CSDP dûs à des agents thérapeutiques agissant sur cette cible, puissent, au moins en théorie, aider dans le traitement ou la prévention de la ciguatera.

Ces deux tests biologiques se complètent car ils représentent l'aspect polymorphe de la ciguatera qui peut être dû à deux mécanismes pathogéniques distincts, l'un d'ordre pharmacologique et l'autre très probablement d'ordre immunologique (Bagnis et al., 2006).

II. Conclusion

Dans un premier temps, nous avons démontré, *in vitro*, la modulation de l'expression de l'iNOS et de la production de NO• par la P-CTX-1B dans les macrophages murins RAW 264.7 par le test de Griess et la qPCR (Partie 1).

Ces deux méthodologies ont été ensuite utilisées pour un criblage des plantes.

Pour chaque extrait de plante, l'évaluation de l'inhibition du NO• (mesurée par le TG) sur macrophages RAW 264.7 activés au LPS, a été couplée à une mesure de sa capacité propre à induire le NO• (test en absence de LPS) et de son potentiel cytotoxique (test au MTT, en présence de LPS). L'activité antioxydante de ces extraits par le test au DPPH a également été évaluée. Ceci nous a conduit à confirmer les activités anti-inflammatoires des extraits de plantes entières d'*E. hirta*, de feuilles et d'écorce de *S. malaccense*, de feuilles de *S. terebenthifolius* et de *V. trifolia*, de fruit de *P. granatum*, de latex de *C. manghas*, de racines de *X. americana* et de racines aériennes de *P. tectorius* (Partie 2, Chapitre 1).

Le test d'interaction ligand-récepteur nous a permis d'observer l'activité inhibitrice des extraits de racines aériennes de *P. tectorius* et de feuilles d'*H. foertherianum* et de *V. trifolia*, vis-à-vis de la fixation de [³H]-PbTx-3 à son récepteur spécifique sur les synaptosomes de cerveaux de rats de façon dose-dépendante. Pour l'extrait d'*H. foertherianum*, nous avons pu

observer que cette activité inhibitrice provenait de l'affinité de cet extrait pour le site de liaison du ligand empêchant ainsi l'accès de [³H]-PbTx-3 au site (Partie 2, Chapitre 2).

Pour démontrer l'applicabilité de ces deux tests, quelques travaux de phytochimie ont ensuite été menés sur l'extrait de plantes entières d'*E. hirta*, et les extraits de feuilles d'*H. foertherianum* et *V. trifolia*. Ceci a conduit à l'isolement et à l'identification de 3 molécules, la quercitrine, l'acide rosmarinique et l'agnuside, à partir respectivement d'*E. hirta*, d'*H. foertherianum* et de *V. trifolia*. Suite à cela, nous avons testé ces produits commercialisés et l'acide rosmarinique a démontré des propriétés intéressantes dans nos deux tests (Partie 3).

Ces travaux ont collectivement conduit à 4 publications (dont 2 en premier auteur) dans des revues internationales à comité de lecture. Une revue a été soumise et deux autres sont en préparation. Un brevet a été également déposé sur la bioactivité de l'acide rosmarinique (Annexe 1).

III. Perspectives

Nous avons démontré que l'acide rosmarinique inhibait la fixation de la [³H]-PbTx-3 au site 5 des CSDP. Ainsi, cette molécule peut servir de composé modèle pour le développement de thérapies pour prévenir ou soigner l'intoxication liée à l'exposition aux marées rouges dues aux efflorescences de dinoflagellé, *K.brevis*, et impliquant les PbTxs.

Néanmoins, gardant en mémoire que les PbTxs et les CTXs agissent sur les CSDP à travers le même mécanisme et le même site, il est possible que l'acide rosmarinique (ou un autre produit similaire) puisse être aussi utilisé dans le traitement de la ciguatera.

L'acide rosmarinique a l'avantage d'être déjà utilisé en cosmétique et dans des ingrédients alimentaires. Aucune allégation ni contre-indication n'a été répertoriée (voir Fiche Ingrédient de Nutrialpha, 2007)¹³. L'acide rosmarinique ne présente qu'une faible toxicité avec une DL₅₀ de 561 mg/kg en *i.v.* chez la souris. Ce composé est reconnu pour un bon nombre d'activités fortes intéressantes et suscite beaucoup d'enthousiasme. Plusieurs

¹³ Fiche Ingrédient : Acide Rosmarinique de NutriAlpha (www.nutrialpha.com), mise à jour le 10 octobre 2007

études se sont portées sur les possibilités de production industrielle par des approches biotechnologiques (Park et al., 2008 ; Petersen, 1999).

Son extraction à partir d'*H. foertherianum* ou d'autres herbes culinaires de la famille des Lamiaceae dont le romarin, est également envisageable et sans doute à faible prix, ce qui est un avantage non négligeable pour la région du Pacifique. Cependant, des études plus poussées sont nécessaires pour confirmer l'activité détoxifiante de ce produit contre les CTXs et son innocuité pour un usage humain.

Aussi, pour valoriser l'acide rosmarinique en vue d'un traitement de la ciguatera, certaines expériences sont envisagées dans le futur proche, telles que :

- des essais *in vivo* sur souris pour étudier son innocuité et ses effets bénéfiques sur l'action néfaste des CTXs,
- des essais électrophysiologiques et neurophysiologiques pour étudier ses effets contre les dysfonctions électriques et osmotiques engendrées par les CTXs,
- des tests sur neuroblastomes pour étudier son effet contre la cytotoxicité induite par les CTXs et
- des études de relation structure-activité de ce composé avec le test d'interaction ligand-récepteur en vue d'améliorer la faible valeur de K_i (1,43 mM), reflet de son faible degré d'affinité vis à vis des CSDP.

Références

Bibliographiques¹⁴

¹⁴ Hors articles (les références des articles figurent au sein de ceux-ci).

Références

- Al-Sabi, A., McArthur, J., Ostroumov, V., French, R.J., **2006**. Marine toxins that target voltage-gated sodium channels. *Marine Drugs*, 4, 157-192.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G., **2001**. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357, 593-615.
- Amade, P., Laurent, D., **1992**. Screening of traditional remedies used in ciguatera fish poisoning treatment. In: Gopalakrishnakone, P., Tan, C.K. (Eds.), *Recent Advances in Toxinology Research*, vol 2, National University of Singapore, Singapore, pp. 503-508.
- Ameziane, N., Bogard, M., Lamoril, J., 2005. *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique*. Elsevier SAS, Paris, France, pp. 232.
- Angibaud, G., Rambaud, S., 1998. Serious neurological manifestations of ciguatera: is the delay unusually long? *Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry*, 64, 688-694.
- Aktan, F., **2004**. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, 75, 639-653.
- Archer, S., **1993**. Measurement of nitric oxide in biological models. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 7, 349-360.
- Archer, S.L., Shultz, P.J., Warren, J.B., Hampl, V. DeMaster, E.G., **1995**. Preparation of standards and measurement of nitric oxide, nitroxyl and related oxidation products. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 7, 21-34.
- Baden, D.G., Fleming, L.E., Bean, J.A., **1995**. Marine toxins. In: DeWolf, F.A. (Ed.), *Handbook of Clinical Neurology: Intoxications of the Nervous Systems, Part H. Natural Toxins and Drugs*, Elsevier Press, Amsterdam, pp. 141-175.
- Bagasra, O., Michaels, F.H., Zheng, Y.M., Bobroski, L.E., Spitsin, S.V., Fu, Z.F., Tawadros, R., Koprowski, H., **1995**. Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 12041-12045.
- Bagnis R., Kaeuffer H., **1974**. Perspectives immunologiques en matière de ciguatera. *Médecine Tropicale*, 34, 25-27.
- 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 Hygiene* 28, 1067-1073.
- Bagnis, R., Chanteau, S., Chungue, E., Hurtel, J.M., Yasumoto, T., Inoue, A., **1980**. Origins of ciguatera fish poisoning: a new flagellate, *Gambierdiscus toxicus* Adachi and Fukuyo, definitively involved as a causal agent. *Toxicon*, 18, 199-208.

Bagnis, R., Chinain, M., Legrand, A.M., **2006**. Résumé des travaux de Raymond Bagnis, Mireille Chinain, Anne-Marie Legrand et coll. sur la ciguatera. Mémoire pour l'obtention du Prix Albert Sézary 2006, Académie Nationale de Médecine, Paris, France, 18 pp.

Barceloux D.G., **2008**. Medical Toxicology of natural substances: foods, fungi, medicinal herbs, plants and venomous animals. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA, pp. 435.

Bécherel, P.A., Chosidow, O., Le Goff, L., Francès, C., Debré, P., Mossalayi, M.D. Arock, M., **1997**. Inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokine expression by human keratinocytes during acute urticaria. *Molecular Medicine*, 3, 686-694.

Benoit, E., Legrand, A.M., Dubois, J.M., **1986**. Effects of ciguatoxins on current and voltage clamped frog myelinated nerve fibre. *Toxicon*, 24, 357-364.

Benoit, E., Juzans, P., Legrand, A.M., Molgó, J., **1996**. Nodal swelling produced by ciguatoxins-induced selective activation of 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 agent used in ciguatera treatment. *Cybium* 24, 33-40.

Billiar, T.R., **1995**. Nitric oxide: novel biology with clinical relevance. *Annals of Surgery*, 221, 339-349.

Bö, L., Dawson, T.M., Wesselingh, S., Möurk, S., Choi, S., Kong, P.A., Hanley, D. Trapp, B., **1994**. Induction of nitric oxide Synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. *Annals of Neurology*, 36, 778-786.

Bogdan, C., **2001**. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends in Cell Biology*, 11, 66-75.

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.

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, R., Laurent, D., Sauviat, M.P., **2001a**. Un test biologique destiné à identifier les principes actifs des plantes utilisées comme remèdes traditionnels contre l'intoxication ciguatérique en Nouvelle-Calédonie. In: Bon, C., Goudey-Perrière, F., Poulain, B., Puiseux-Dao, S. (Eds.), *Rencontres en toxicologie : Explorer, exploiter les toxines et maîtriser les organismes producteurs*, Editions scientifiques et médicales Elsevier, Paris, pp. 63-66.

Boydron, R., Sauviat, M.P., Benoit, E., Molgó, J., **2001b**. L'hémolyse des érythrocytes humains par la P-CTX-1 : une méthode pour évaluer le potentiel thérapeutique des remèdes traditionnels utilisés en Nouvelle-Calédonie pour traiter la ciguatera. In: Goudey-Perrière, F.,

Bon, C., Puiseux-Dao, S., Sauviat, M.P. (Eds.), *Rencontres en toxicologie : Toxines et recherches biomédicales*, Editions scientifiques et médicales Elsevier, Paris, pp. 101-104.

Boydron-Le Garrec, R., Benoit, E., Sauviat, M.P., Lewis, R.J., Molgó, J., Laurent, D., **2005a**. Ability of some plant extracts, traditionally used to treat ciguatera fish poisoning, to prevent *in vitro* neurotoxicity produced by sodium channel activators. *Toxicon* 46, 625-634.

Boydron-Le Garrec, R., Benoit, E., Sauviat, M.P., Laurent, D., **2005b**. Détection des ciguatoxines : avantages et inconvénients des différentes méthodes biologiques utilisées. *Journal de la Société de Biologie*, 199, 115-25.

Boydron-Le Garrec, R., **2005**. Evaluation du potentiel thérapeutique de plantes traditionnellement utilisées dans le Pacifique pour traiter l'intoxication ciguaterique. Thèse de Doctorat, Université de la Nouvelle-Calédonie (Nouvelle-Calédonie), 258 p.

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.

Brunet, A., Privat, C., Stepien, O., David-Dufilho, M., Devynck, J., Devynck, M.A., **2000**. Advantages and limits of the electrochemical method using Nafion and Ni-porphyrin-coated microelectrode to monitor NO release from cultured vascular cells. *Analisis*, 28, 469-474.

Bustin, S.A., **2000**. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 169-193.

Caballero-George, C., Vanderheyden, P.M., Solis, P.N., Pieters, L., Shahat, A.A., Gupta, M.P., Vauquelin, G., Vlietnick, A.J., **2001**. Biological screening of selected medicinal Panamanian plants by radioligand-binding techniques. *Phytomedicine*, 8, 59-70.

Camuesco, D., Comalade, M., Rodriguez-Cabezas, M., Nieto, A., Lorente, M.D., Concha, A., Zarzuelo, A., Gálvez, J., **2004**. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *British Journal of Pharmacology*, 143, 908-918.

Camuesco, D., Comalada, M., Concha, A., Nieto, A., Sierra, S., Xaus, J., Zarzuelo, A., Gálvez, J., **2006**. Intestinal anti-inflammatory activity of combined quercitrin and dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, in rats with DSS-induced colitis. *Clinical Nutrition*, 25, 466-476.

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), 414-421.

Catterall, W.A., **1986**. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annual Review of Biochemistry*, 55, 953-985.

Catterall, W.A., Gainer, M., **1985**. Interaction of brevetoxin A with a new receptor site on the sodium channel. *Toxicon*, 23, 497-504.

Chandler, H.L., Colitz, C.M., **2006**. Molecular biology for the clinician: understanding current methods. *Journal of American Animal Hospital Association*, 42, 326-335.

Chateau-Degat, M.L., Huin-Blondey, M.O., 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.

Chinain, M., Faust, M.A., Pauillac, S., **1999**. 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., Cruchet, P., Wang, Z., Ponton, D., Laurent, D., Pauillac, S., **2009a**. Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (Dinophyceae) in culture. *Toxicon*, doi:10.1016/j.toxicon.2009.06.013.

Chinain M, Darius HT, Ung A, Fouc MT, Revel T, Cruchet P, Pauillac S, Laurent D., **2009b**. Ciguatera risk management in French Polynesia : the cas 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.

Crabbé, F., Laga, M., **1999**. Piot, P., Epidemiology and Prevention. In: Root, K.R., Waldvogel, F., Corey, L., Stamm, W.E. (Eds.), In: Clinical Infectious Diseases: A Practical Approach, Oxford University Press, New York, p. 907.

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.

Dechraoui-Bottein, M.Y., **1999**. Etude du mode d'action des ciguatoxines, biotoxines marines responsables de la ciguatera : comparaison aux brévétoxines et application à la détection des poissons toxiques. Thèse de doctorat, Université française du Pacifique (Polynésie française), 115 p.

Dickey, R.W., **2008**. Ciguatera toxins: chemistry, toxicology and detection. In: Botana, L.M. (Ed.), Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection, Edition 2, CRC Press, Florida, USA, pp. 479-500.

Eggensperger, H., Wilker, M., Bauer, P., **1998**. Rosmarinic acid: a natural multiactive ingredient for cosmetic and dermatology. I: Rosmarinic acid. *SÖFW. Seifen, Öle, Fette, Wachse*, 124, 634-642.

Feihl, F., Liaudet, L., **2002**. Surproduction d'oxyde nitrique dans le choc septique : une cible thérapeutique. *Revue Médicale Suisse*, 591.

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.E., Fernandez, M., Bienfang, P., Shrank K., Dickey, R., Bottein, M.Y., Backer, L., Ayyar, R., Weisman, R., Watkins, S., Granade, R. and Reich, A., **2008**. Ciguatera fish poisoning: Treatment, prevention and management. *Marine Drugs*, 6, 456-479.

Förstermann, U., Boissel, J.P., Kleinert, H., **1998**. Expressional control of the constitutive isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 12, 773-790.

Gálvez, J., Zarzuelo, A., Crespo, M.E., Lorente, M.D., Ocete, M.A., Jiménez, J., **1993**. Antidiarrhoeic activity of *Euphorbia hirta* and isolation of an active flavonoid constituent. *Planta Medica*, 59, 333-336.

Gálvez, J., Sánchez de Medina, F., Jiménez, J., Torres, M.I., Fernández, M.I., Núñez, M.C., Ríos, A., Gil, A., Zarzuelo, A., **1995**. Effects of quercitrin on lactose-induced chronic diarrhea in rats. *Planta Medica*, 61, 302-306.

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.V., Holmes, M.J., Bourke, J.B., Shields, W.J., **1986**. Ciguatera in Australia: Occurrence, clinical features, pathophysiology and management. *Medical Journal of Australia*, 145, 584-590.

Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L.F.C., **2006**. Use of fluorescence probes for detection of reactive nitrogen species: a review. *Journal of Fluorescence*, 16, 119-139.

Grisham, M.B., Jour'd'heil, D., Wink, D.A., **1999**. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*, 276, 315-321.

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.

Guzmán-Perez, S.E., Park, D.L., **2000**. Ciguatera toxins: chemistry and detection. In: Botana L.M., (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. Marcel Dekker, New York, pp. 401–418.

Hetrick, E.M., Schoenfisch, M.H. **2009**. Analytical chemistry of nitric oxide. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2, 409-433.

Hokama, Y., Uto, G.A., Palafox, N.A., Enlander, D., Jordan, E., Cocchetto, A., **2003**. Chronic phase lipids in sera of chronic fatigue syndrome (CFS), chronic ciguatera fish poisoning (CCFP), hepatitis B and cancer with antigenic epitope resembling ciguatoxin, as assessed with Mab-CTX. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 17, 132-139.

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.

Ito, E., Suzuki-Toyota, F., Toshimori, K., Fuwa, H., Tachibana, K., Satake, M., Sasaki, M., **2003**. Pathological effects on mice by gambierol, possibly one of the ciguatera toxins. *Toxicon*, 42, 733-740.

Iuvone, T. De Filippis, D., Esposito G., D'Amico, A., Izzo A. A., **2006**. The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid- β peptide-induced neurotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317, 1143-1149.

Ivanov, V.M., **2004**. The 125th anniversary of the Griess reagent. *Journal of Analytical Chemistry*, 59, 1002-1005.

Kaeuffer H., Bagnis R., Chanteau S., Chungue E., Drollet J.H., Plichart R., Thévenin S., **1976**. L'hypersensibilité dans l'ichthyosarcotisme de type ciguatérique. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 69, 446-449.

Kim, D.S., Kim, H.R., Woo, E.R., Hong, S.T., Chae, H.J., Chae, S.W., **2005**. Inhibitory effects of rosmarinic acid on adriamycin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells by inhibiting reactive oxygen species and the activations of c-Jun N-terminal kinase and extracellular signalregulated kinase. *Biochemical Pharmacology*, 70, 1066-78.

Kimura, L.H., Hokama, Y., Abad, M.A., Oyama, M., Miyahara, J.T., **1982**. Comparison of three different assays for the assessment of ciguatoxin in fish tissues: radioimmunoassay, mouse bioassay and in vitro guinea pig atrium assay. *Toxicon*, 20, 907-912.

Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., Moilanen, E., **2005**. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current Drug Targets – Inflammation and Allergy*, 4, 471-479.

Kröncke, K.D., Feshel, K., Kolb-Bachofen, V. **1998**. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clinical and Experimental Immunology*, 113, 147-156.

Kuruüzüm-Uz A, Ströch K, Demirezer LO, Zeeck A., **2003**. Glucosides from *Vitex agnus-castus*. *Phytochemistry*, 63, 959-954.

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. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutic*, 323, 174-179.

Laurent, D., Bourdy, G., Amade, P., Cabalion, P., Bourret, D., **1993**. La gratte ou ciguatera : ses remèdes traditionnels dans le Pacifique Sud. ORSTOM Editions, Paris, pp. 51-116.

- Laurent, D., Yeeting B., Labrosse, P., Gaudechoux, J.P., **2005**. Ciguatera: A field reference guide. Secretariat of the Pacific Community, Noumea, New Caledonia, 88 pp.
- Lehane, L., Lewis, R.J., **2000**. Ciguatera: recent advances but the risk remains. *International Journal Food Microbiology*, 61, 91-125.
- Lewis, R.J., Molgó, J., Adams, D.J., **2000**. Ciguatera toxins: pharmacology of toxins involved in ciguatera and related fish poisonings. Diversity of marine and freshwater algal toxins. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, L.M. Botana (Ed), Marcel Dekker, New York, 419-445.
- Lowenstein, C.J., Dinerman, J.L., Synder, S.H., **1994**. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Annals of Internal Medicine*, 120 (3), 227-237.
- Maiga, A., Diallo, D., Fane, S., Sanogo, R., Paulsen, B. S., Cisse, B., **2005**. A survey of toxic plants on the market in the district of Bamako, Mali: traditional knowledge compared with a literature search of modern pharmacology and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, (1-2), 183-193.
- Makino, T., Ono, T., Muso, E., Yoshida, H., Honda, G., Sasayama, S., **2000**. Inhibitory effects of rosmarinic acid on the proliferation of cultured murine mesangial cells. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 15, 1140-1145.
- Matsui, M., Kumar-Roiné, S., Darius, H.T., Chinain, M., Laurent, D., Pauillac, S., **2009a**. Pacific ciguatoxin 1B-induced modulation of inflammatory mediators in a murine macrophage cell line. *Toxicon* (this issue).
- Matsui, M., Kumar-Roiné, S., Chinain, M., Laurent, D., Pauillac, S., **2009b**. Evaluation of the anti-inflammatory potential of plants extracts traditionally used for the treatment of ciguatera fish poisoning in the South Pacific. Actes des Doctoriales conjointes UPF/UNC, 02 au 06 mars, Tahiti, no pagination.
- Matsui, M., Kumar-Roiné, S., Darius, H. T., Chinain, M., Laurent, D., Pauillac, S., **2009c**. Characterisation of the anti-inflammatory potential of *Vitex trifolia* L. (Labiatae), a plant traditionally used in the treatment of ciguatera fish poisoning. Submitted.
- Materska, M., **2008**. Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity – a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58, 407-413.
- Mayer, B., Hemmens, B., **1997**. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends in Biochemical Science*, 22, 477-481.
- Meert, A.P., Berghmans, T., Mascaux, C., Sculier, J.P., **2003**. Réponse immunitaire dans les cancers bronchopulmonaires. *Revue des Maladies Respiratoires*, 20, 566-579.
- Michel, T., **1999**. Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32, 1361-1366.
- Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A., **2001**. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 62-71.

- Moncada, S., Higgs, A., **1993**. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England Journal of Medicine*, 329, 2002-2012.
- Moncada, S., Higgs, E.A., **2006**. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*, 147, S193-S201.
- Moshage, H., **1997**. Nitric oxide determinations: much ado about NO-thing? *Clinical Chemistry*, 43, 553-556.
- Nagano, T., **1999**. Practical methods for detection of nitric oxide. *Luminescence*, 14, 283-290.
- Nathan, C., **1992**. Nitric oxide as a secretory product in mammalian cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 6, 3051-3064.
- Nicholson, G.M., Blanche, T., Mansfield, K., Tran, Y., **2002**. Differential blockade of neuronal voltage-gated Na⁺ and K⁺ channels by antidepressant drugs. *European Journal of Pharmacology*, 452, 35-48.
- Nicholson, G.M., Lewis, R.L., **2006**. Ciguatoxins: Cyclic polyether modulators of voltage-gated ion channel function. *Marine Drugs*, 4, 82-118.
- Nims; R.W., Darbyshire, J.F., Saavedra, J.F., Christodoulou, D., Hanbauer, I., Cox, G.W., Grisham, M.B., Laval, F., Cook, J.A., Krishna, M.C., Wink, D.A., **1995**. Colorimetric methods for the determination of nitric oxide concentration in neutral aqueous solutions. *Methods: A companion to Methods in Enzymology*, 7, 48-54.
- Nussler, A.K., Billiar, T.R., **1993**. Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide Synthase. *Journal of Leukocyte Biology*, 54, 171-178.
- Ojeda , M.C.L., Otero, E.C., Yotsu-Yamashita, M., Sasaki, M., **2008**. Polycavernosides and gambierol: chemistry, pharmacology, toxicology and detection. In: Botana, L.M. (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, Edition 2, CRC Press, Florida, USA, pp. 597-691.
- Oberholzer, A., Oberholzer, C., Moldawer, L.L., **2000**. Cytokine signalling-regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Critical Care Medicine*, 28, N3-N12.
- Oehler, E., Gatti, C., Legrand, A.M., Ghawche, F., **2009**. Ciguatera et polyradiculonévrite aiguë à propos de deux cas en Polynésie française : hypothèse immuno-allergique ? *Médecine tropicale : revue du Corps de sante colonial*, 69, 75-77.
- Park, S.U., Uddin, M.R., Xu, H., Kim, Y.K., Lee, S.Y., **2008**. Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. *African Journal of Biotechnology*, 7, 4959-4965.
- Petersen M., **1999**. Biosynthesis and accumulation of rosmarinic acid in plant cell cultures. In: Fu, T.J., Singh, G., Curtis, W.R. (Eds.), *Plant cell and Tissue Culture for the production of Food Ingredients*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA, pp. 61-74.
- Petersen, M., Simmonds, M.S., **2003**. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62, 121-125.

- 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.
- Psotova, J. Chlopcikova, S., Miketova, P., Simanek, V., **2005**. Cytoprotectivity of *Prunella vulgaris* on doxorubicin-treated rat cardiomyocytes. *Fitoterapia*, **76**, 556-561.
- Qiao, S., Li, W., Tsubouchi, R., Haneda, M., Murakami, K., Takeuchi, F., Nisimoto, Y., Yoshino, M., **2005**. Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW 264.7 macrophages. *Free Radical Research*, **39**, 995-1003.
- Racciatti, D., Vecchiet, J., Ceccomancini, A., Ricci, F., Pizzigallo, E., **2001**. Chronic fatigue syndrome following a toxic exposure. *Science of the Total Environment* **270**, 27-31.
- Ramsdell, J.S., **2008**. The molecular and integrative basis to brevetoxin toxicity. In: Botana, L.M. (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, Edition 2, CRC Press, Florida, USA, pp. 519-550.
- Ridnour, L.A., Sim, J.E., Hayward, M.A., Wink, D.A., Martin, S.M., Buettner, G.R., Spitz, D.R., **2000**. A spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite, nitrate in cell culture media. *Analytical Biochemistry*, **281**, 223-229.
- Ruff, T.A., Lewis, R.J., **1994**. Clinical aspects of ciguatera: an overview. *Memoirs of the Queensland Museum*, **34**, 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 ciguatoxins-1. *Neurotoxicology*, **28**, 1099-1109.
- Sanchez de Medina, F., Gálvez, J., Romero, J.A., Zarzuelo, A., **1996**. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **278**, 771-779.
- Sauviat, M.P., Boydrón-Le Garrec, R., Masson, J.B., Lewis, R.L., Vernoux, J.P., Molgó, J., **2006**. Mechanisms involved in the swelling of erythrocytes caused by Pacific and Caribbean ciguatoxin. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, **36**, 1-9.
- Sharma, R.L., Prabhakar, A., Dhar, K.L., Sachar, A., **2009**. A new iridoid glycoside from *Vitex negundo* Linn (Verbenaceae). *Natural Product Research*, **23**, 1201-1209.
- Singh, S., Evans, T.W., **1997**. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *European Respiratory Journal*, **10**, 699-707.
- Sroka, Z., Fecka, I., Cisowski, W., **2005**. Antiradical and anti-H₂O₂ properties of polyphenolic compounds from an aqueous peppermint extract. *Zeitschrift für Naturforschung*, **60**, 826-832.
- 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, 571.
- Suksamrarn, A., Kumpun, S., Kirtikara, K., Yingyongnarongkul, B., Suksamrarn, S., **2002**. Iridoids with anti-inflammatory activity from *Vitex peduncularis*, 68, 72-73.
- Tarpey, M.M., Wink, D.A., Grisham, M.B., **2004**. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286, R431-R444.
- 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.
- Torreilles, J., **2001**. Nitric oxide: one of the more conserved and widespread signaling molecules. *Front Bioscience*, 1, 1161-1172.
- Tse, C., Capeau, J., **2003**. Quantification des acides nucleiques par PCR quantitative en temps reel. *Annales de Biologie Clinique*, 61, 279-293.
- Tsumoto, K., Yokota, A., Tanaka, Y., Ui, M., Tsumuraya, T., Fujii, I., Kumagai, I., Nagumo, Y., Oguri, H., Inoue, M., Hiramata, M., **2008**. Critical contribution of aromatic rings to specific recognition of polyether rings. The case of ciguatoxins CTX-3C-ABC and its specific antibody 1 C49. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 12259-12266.
- Tuteja, N., Chandra, M., Tuteja, R., Misra, M.K., **2004**. Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 4, 227-237.
- Ui, M., Tanaka, Y., Tsumuraya, T., Fujii, I., Inoue, M., Hiramata, M., Tsumoto, K., **2008**. How protein recognizes ladder-like polycyclic ethers. Interactions between ciguatoxins (CTX3C) fragments and its specific antibody 10C9. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 19440-19447.
- Ulbricht, W., **2005**. Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation. *Physiological Reviews*, 85, 1271-1301.
- van Dolah, F. M., **2000**. Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspectives*, 108, 133-141.
- Vlietinck, A.J., Apers, S., **2001**. Biological screening methods in the search for pharmacologically active natural products. In: Tringali, C. (Ed.), *Bioactive compounds from natural sources: isolation, characterisation and biological properties*, Taylor and Francis, New York, USA.
- Wang, D.Z. **2008**. Neurotoxins from marine dinoflagellates: a brief review. *Marine Drugs*, 6, 349-371.
- Wagner, C., Fachinetto, R., Dalla Corte, C.L., Brito, V.B., Severo, D., de Oliveira Costa Dias, G., Morel, A.F., Nogueira, C.W., Rocha, J.B., **2006**. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation *in vitro*. *Brain Research*, 1107, 192-198.

- Wink, D.A., Mitchell, J.B., **1998**. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 25, (4-5), 434-456.
- Wink, D.A., Miranda, K.M., Espey, M.G., **2001**. Cytotoxicity related to oxidative and nitrosative stress by nitric oxide. *Experimental Biology and Medicine*, 226, 621-623.
- Xie, Q.W., Nathan, C., **1994**. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *Journal of Leukocyte Biology*, 56, 576-582.
- Yao, D., Vlessidis, A.G., Evmiridis, N.P., **2004**. Determination of nitric oxide in biological samples. *Microchimica Acta*. 147, 1-20.
- Yasumoto, T., Nakajima, I., Bagnis, R.A., Adachi, R., **1977**. Finding of a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 43, 1021-1026.
- Zaccaroni, A., Scarvelli, D., **2008**. Toxicity of sea algal toxins to humans and animals. In: V. Evangelista, L. Barsanti, A.M. Frassanito, V. Passarelli, P. Gualtieri (Eds), *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*, NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology, Springer Science, Pisa, Italy, pp. 91-158.
- Zelić, B., Hadolin, M., Bauman, D., Vasić-Rački, D., **2005**. Recovery and purification of rosmarinic acid from rosemary using electrodialysis. *Acta Chimica Slovenica*, 52, 126-130.
- Zhang, X., **2004**. Real time and *in vivo* monitoring of nitric oxide by electrochemical sensors – from dream to reality. *Frontiers in Bioscience*, 9, 3434-3446.
- Zou, Z.W., Xu, L.N., Tian, J.Y., **1993**. Antithrombotic and antiplatelet effects of rosmarinic acid, a water-soluble component isolated from radix *Salviae miltiorrhizae* (danshen). *Yao Xu Xue Bao*, 28, 241-245.

Annexes

ANNEXE 1 : DIFFUSION DE L'INFORMATION SCIENTIFIQUE

ARTICLES (REVUES À COMITÉ DE LECTURE)

Kumar-Roiné, S., Matsui, M., Pauillac, S., Laurent, D. Ciguatera fish poisoning and other seafood intoxication syndromes. A revisit and a review of the existing treatment employed in ciguatera fish poisoning. *South Pacific Journal of Natural Science*, soumis.

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

Kumar-Roiné, S., Matsui, M., Reybier, K., Darius, H.T., Chinain, M., Pauillac, S., Laurent, D., **2009**. Ability of certain plant extracts traditionally used to treat ciguatera fish poisoning to inhibit nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 123, 369-377.

Kumar-Roiné, S., Darius H. T., Matsui, M., Molgó, J., Chinain, M., Pauillac, S., Laurent, D. Traditional Remedies Employed in the Treatment of Ciguatera Fish Poisoning: Examples of Use of Three Plants in the Pacific. *Toxicon*, en préparation.

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

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

Matsui, M., Kumar-Roiné, S., Laurent, D., Pauillac, S. Ciguatera therapy : the relevance of *in vitro* models for natural products based drug discovery. *Toxicology In Vitro*, en préparation.

COMMUNICATIONS, POSTERS, AUTRES (COLLOQUES, CONGRÈS, DOCTORIALES)

Kumar-Roiné, S., Matsui, M., Reybier-Vuattoux, K., Darius, H.T., Chinain, M., Pauillac, S., Laurent, D., **2008**. Assessment of therapeutic efficacy of medicinal plants used against Ciguatera Fish Poisoning through inhibition of nitric oxide production. *Ciguatera and Associated Biotoxins Workshop*, 27-31, October, 2008, Noumea, New Caledonia

Kumar-Roiné S., Pauillac S., Laurent D., **2006**. Studies on the efficacy of the traditional remedies in the treatment of ciguatera through the inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS). *4^{ème} Colloque International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales des Régions d'Outre-Mer*, 10-13 juillet 2006, Tahiti, Polynésie Française.

Pauillac S., Vernel-Pauillac F., Kumar-Roiné S., Sauviat M.P., Benoit E., Chinain M., **2006**. First evidence of the implication of nitric oxide in a mouse model for Ciguatera Fish Poisoning. *12th International Conference on Harmful Algae*, 4-8 septembre 2006, Copenhagen, Danemark.

Kumar-Roiné, S., **2008**. Etude de l'efficacité thérapeutique des plantes médicinales utilisées dans le traitement de la Ciguatera. *Doctoriales de Nouvelle-Calédonie*, 7 et 8 octobre, 2008, Nouville.

Kumar-Roiné, S., Matsui, M., Reybier-Vuattoux, K., Darius, H.T., Chinain, M., Pauillac, S., Laurent, D., **2008**. Therapeutic efficacy of plants traditionally used to treat Ciguatera Fish Poisoning via nitric oxide inhibition. *5ème CIPAM, Colloque International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales des régions d'outre-mer*, 3 au 6 novembre, 2008, Nouméa, Nouvelle-Calédonie (Poster)

Matsui, M., Kumar-Roiné, S., Chinain, M., Laurent, D., Pauillac, S., **2009**. Evaluation of the anti-inflammatory potential of plants extracts traditionally used for the treatment of ciguatera fish poisoning in the South Pacific. Actes des Doctoriales conjointes UPF/UNC, 02 au 06 mars, Tahiti, no pagination.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Nitric Oxide

journal homepage: 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^a, Mariko Matsui^{a,b}, Mireille Chinain^c, Dominique Laurent^a, Serge Pauillac^{b,*}

^a 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

^b Laboratoire des Biotoxines, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, 9-11 Avenue Paul Doumer, BP 61, 98845 Noumea, New Caledonia

^c 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 μ M range after 48 h of RAW 264.7 cells exposure to LPS and P-CTX-1B (0.05 μ 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*_ω-nitro-L-arginine methyl ester (ω -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 μ 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⁺ 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⁺ and Ca²⁺ concentrations [17]. The blockade of voltage-gated K⁺ channels [18] and activation of L-type Ca²⁺ 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, pauillac_serje@hotmail.com (S. Pauillac).



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: 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^{a,b,c}, Mariko Matsui^{a,b,c}, Karine Reybier^a, Hélène Taiana Darius^d, Mireille Chinain^d, Serge Pauillac^c, Dominique Laurent^{a,b,*}

^a 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

^b Institut de Recherche pour le Développement (IRD); UMR-152; F-98 848 Nouméa, New Caledonia

^c Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Laboratoire des Biotoxines, F-98845 Nouméa, New Caledonia

^d Institut Louis Malaré, 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 5 April 2009

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 Ca²⁺-dependence (eNOS and nNOS) or Ca²⁺-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

ARTICLE IN PRESS

Toxicol xxx (2009) 1–9



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicol

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

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

Mariko Matsui^{a,b,c}, Shilpa Kumar-Roine^{a,b,c}, H. Taiana Darius^d, Mireille Chinain^d,
Dominique Laurent^{b,c}, Serge Pauillac^{a,*}

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

^b 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

^c IRD, UMR-152, BPAS, 98848 Noumea, New Caledonia

^d 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 xxx

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 β , IL-6, IL-10, tumor necrosis factor- α 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; Lehane 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 (Lehane and Lewis, 2000).

The marine neurotoxins named ciguatoxins (CTXs) are responsible for CFP and belong to a class of lipophilic thermostable 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 μ 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 (S. Pauillac).

0041-0101/\$ – see front matter © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.toxicol.2009.05.039

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, *Toxicol* (2009), doi:10.1016/j.toxicol.2009.05.039



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

Journal homepage: 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^{a,b,c}, Shilpa Kumar-Roine^{b,c}, H. Taiana Darius^d, Mireille Chinain^d, Dominique Laurent^{b,c}, Serge Pauillac^{a,*}

^a Laboratoire des Biotoxines, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, BP31, 98845 Noumea, New Caledonia

^b Université de Toulouse, UPS, UMR 152 (Laboratoire de Pharmacochimie des substances naturelles et pharmacopores redox), 118, rue de Narbonne, F-31 062 Toulouse cedex 9, France

^c IRD, UMR 152, BP45, 98848 Noumea, New Caledonia

^d Laboratoire des Microalgues Toxiques, Institut Louis Pasteur, 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 xxx

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 2647 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 β , IL-6 and iNOS mRNA synthesis, but slight effect on tumor necrosis factor (TNF)- α , 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- α .

Conclusion: The anti-inflammatory effects of *Vitex trifolia* could validate its utilization as a traditional remedy against CFP and emphasizes 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 Published by Elsevier Ireland Ltd.

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 (S. Pauillac).

CABINET**O R E S**conseils en
propriété industriellebrevets d'invention
marques - modèles
copyright - logiciels
contrats - consultations
procès en contrefaçon36, RUE DE ST PÉTERSBOURG
75008 PARIS
☎ (33) 01 53 21 11 00FACSIMILE : (33) 01 53 21 08 88
FACSIMILE : (33) 01 53 21 08 63
E-mail : ores@cabinet-ores.com

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION EN FRANCE

N° 09 03781

Déposée le 31 JUILLET 2009

Au nom de : INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT

Invention : LAURENT Dominique, PAUILLAC Serge,
CHINAIN Mireille, DARIUS Taiana, KUMAR-ROINE ShilpaTitre : UTILISATION DE L'ACIDE ROSMARINIQUE ET DE SES
DERIVES POUR TRAITER LA CIGUATERA

ANNEXE 2 : RÉSULTATS DE CRIBLAGE (TESTS BIOCHIMIQUES)

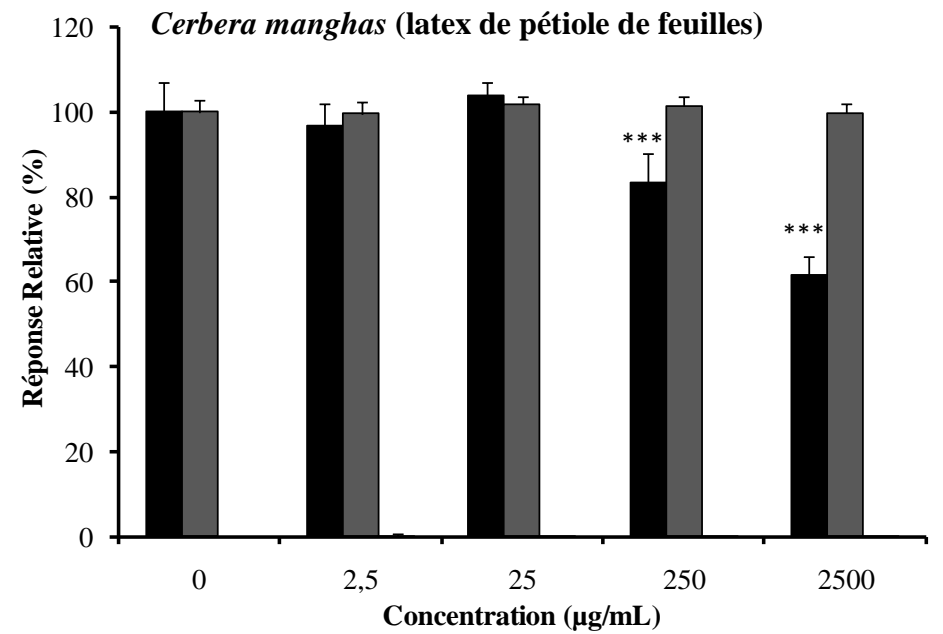
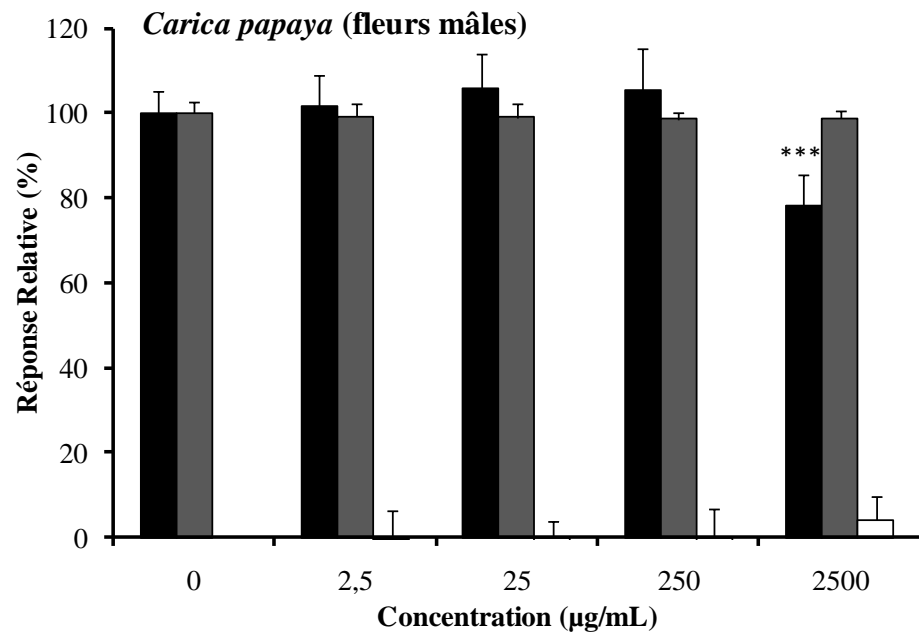
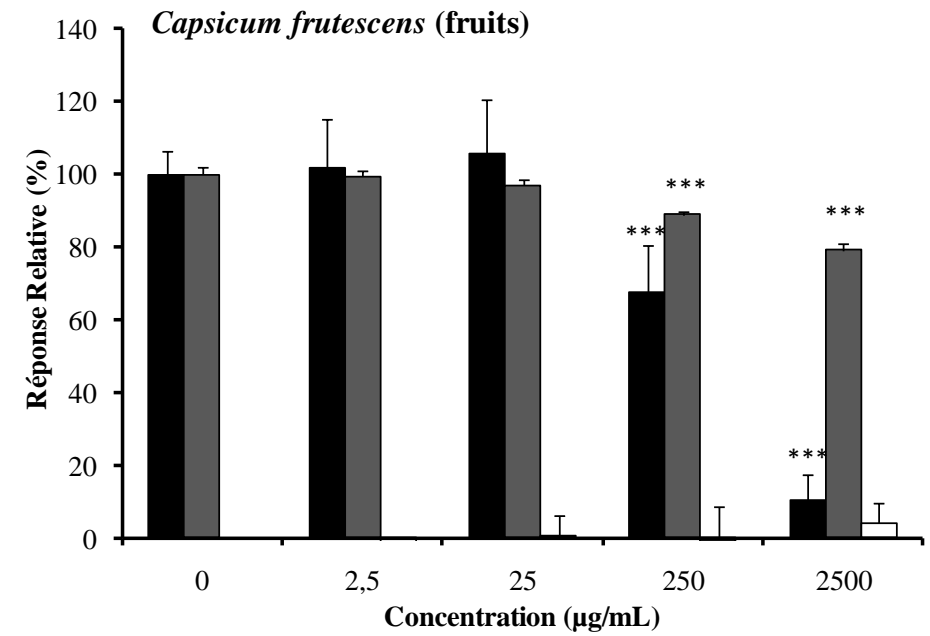
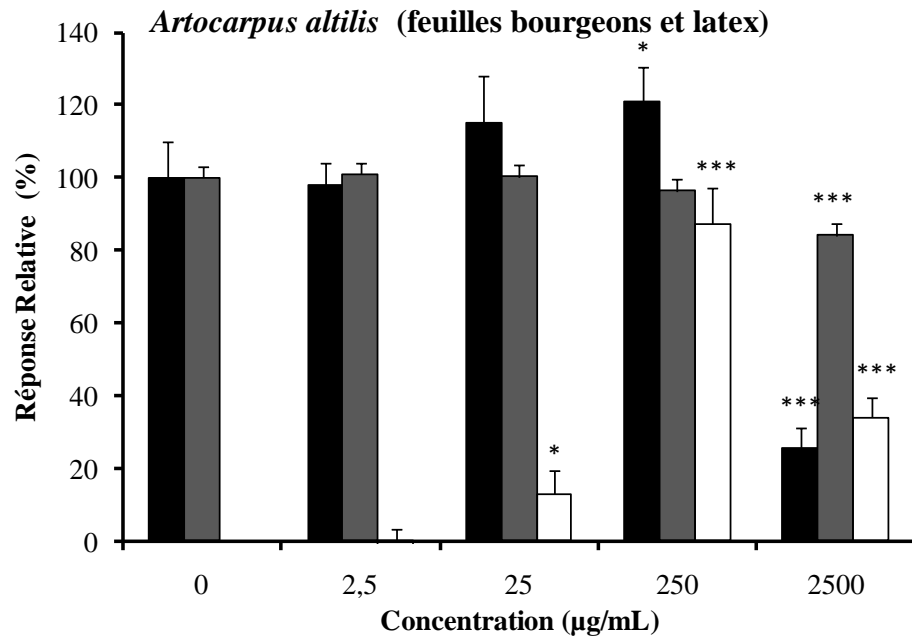
Annexe 2: Effets des extraits de plantes sur l'accumulation de nitrite dans les surnageants de cellules et sur la viabilité cellulaire des macrophages RAW 264.7 (5×10^4 cellules/puits) stimulés ou non avec du LPS.

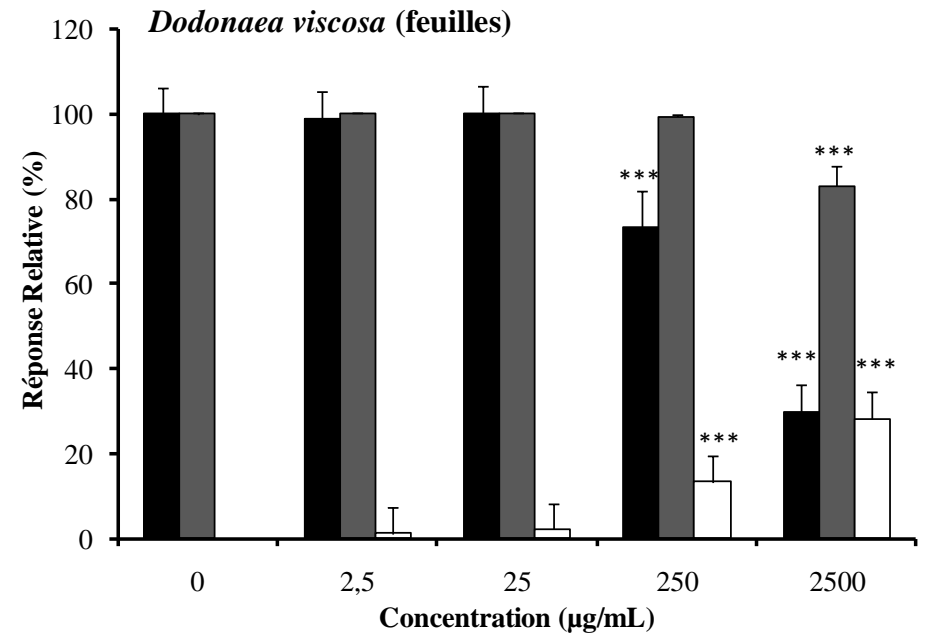
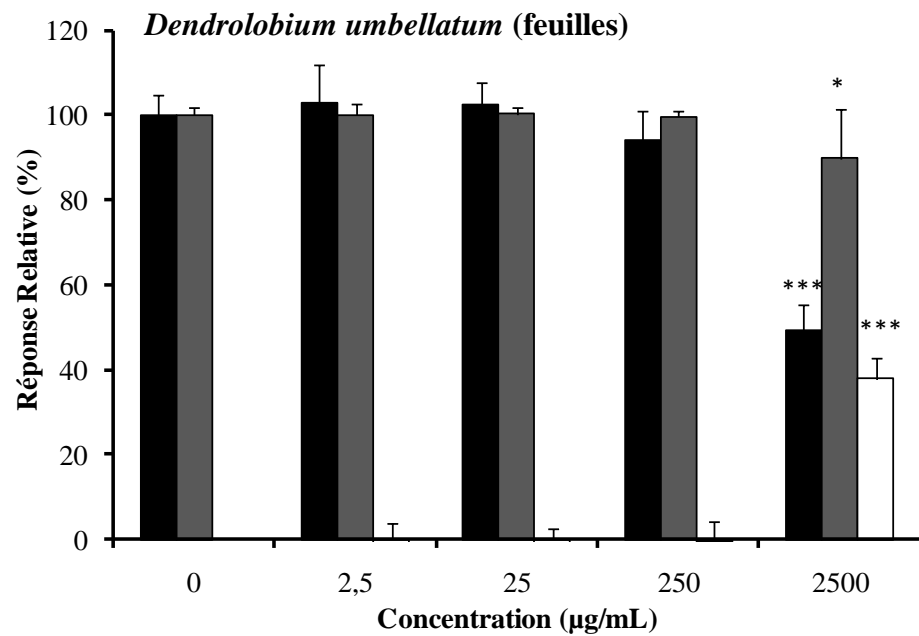
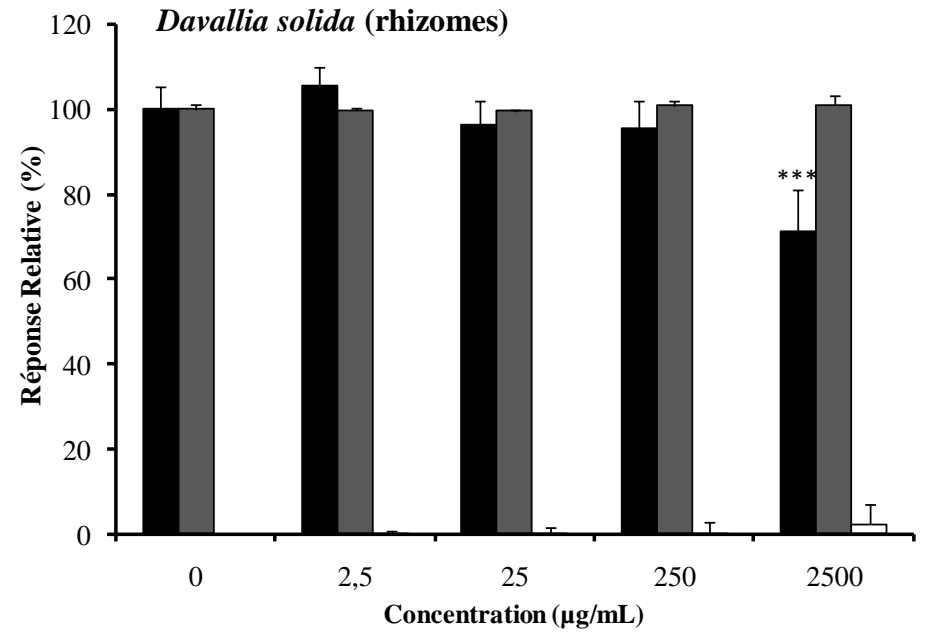
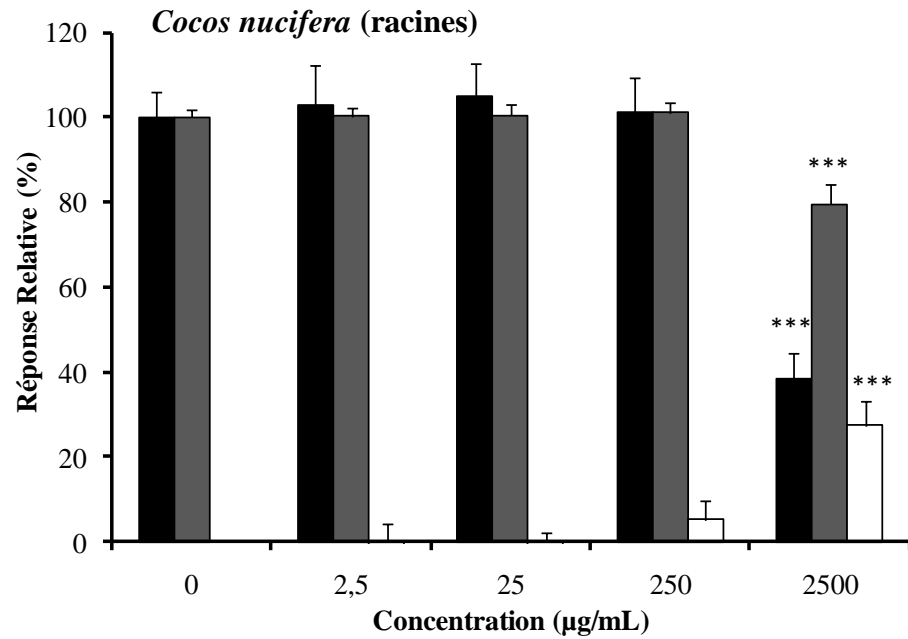
Abréviations : (+), (++) et (+++): augmentation ou diminution significative ($0.01 < P < 0,05$, $0,001 < P < 0,01$ et $P < 0,001$).

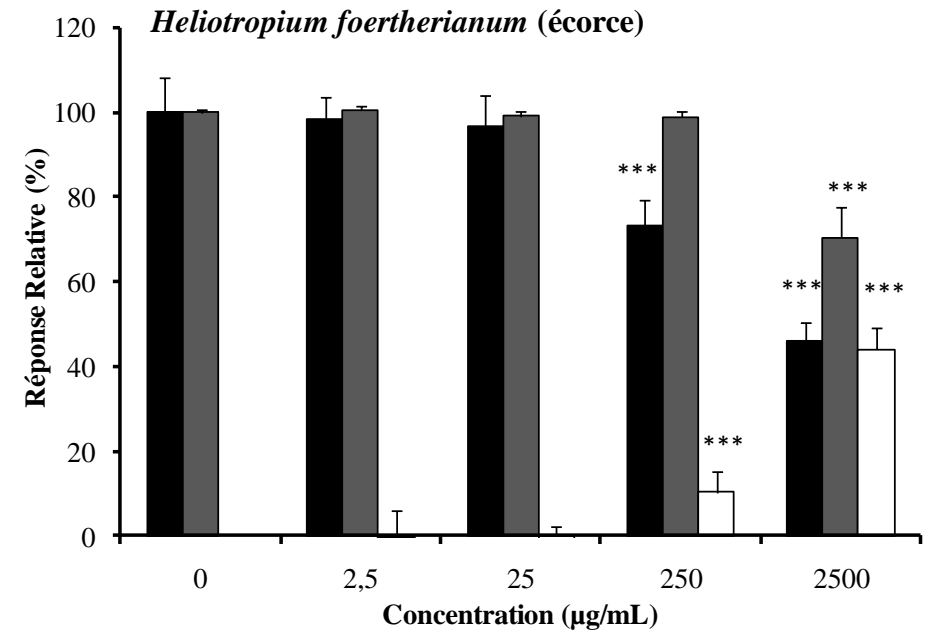
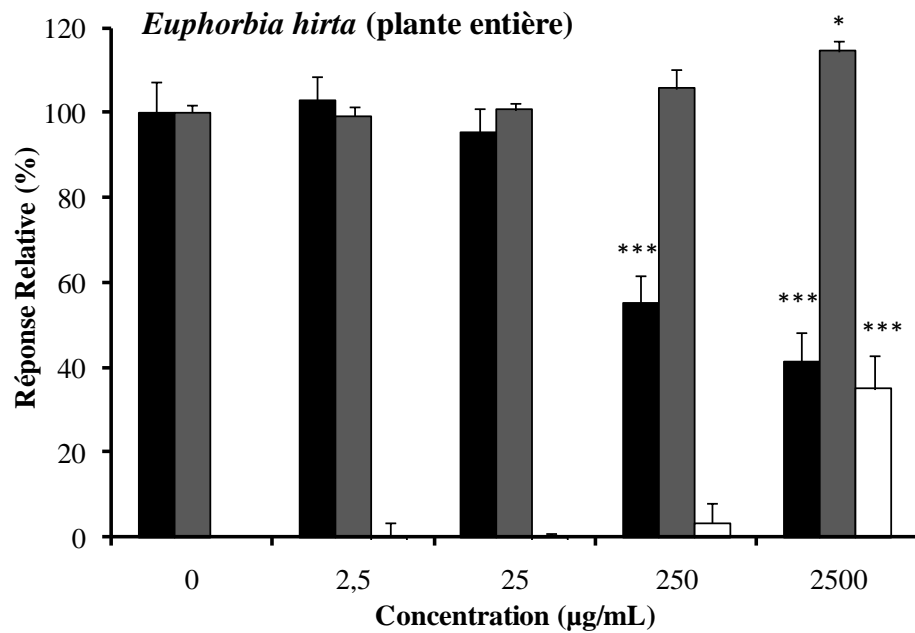
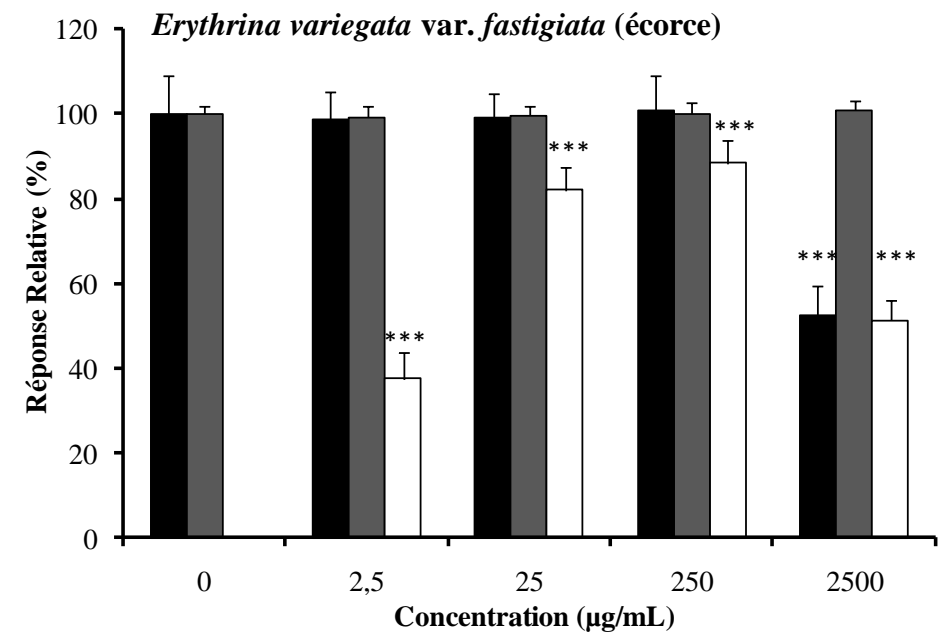
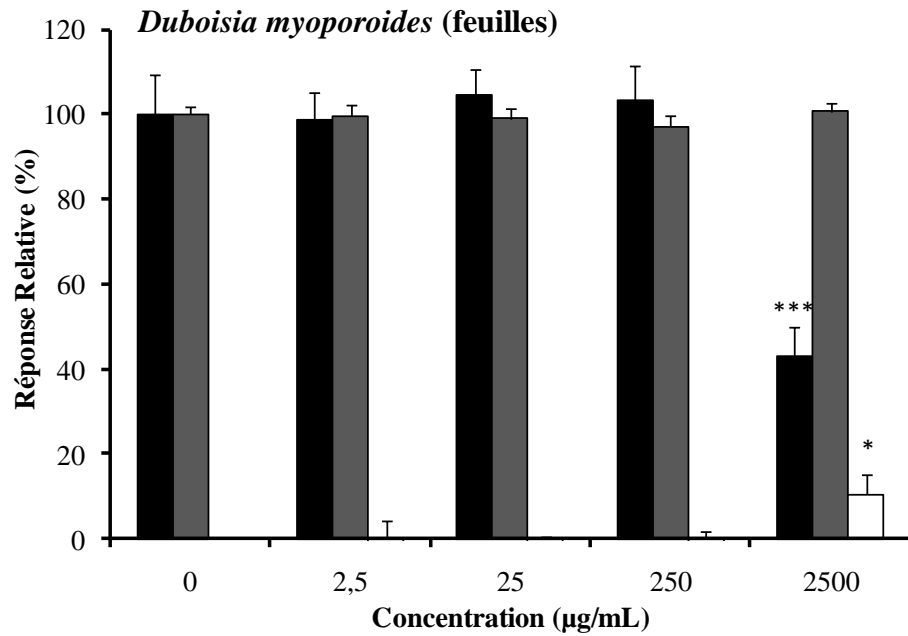
■ % de la capacité d'inhibition du NO• des extraits à 0, 2,5, 25, 250 et 2500 µg/mL dans des macrophages RAW 264.7 après 24 h de traitement avec 10 µg/ml de LPS. Pourcentages d'activité calculés par rapport à la production de NO• observée avec le LPS ($n = 12$).

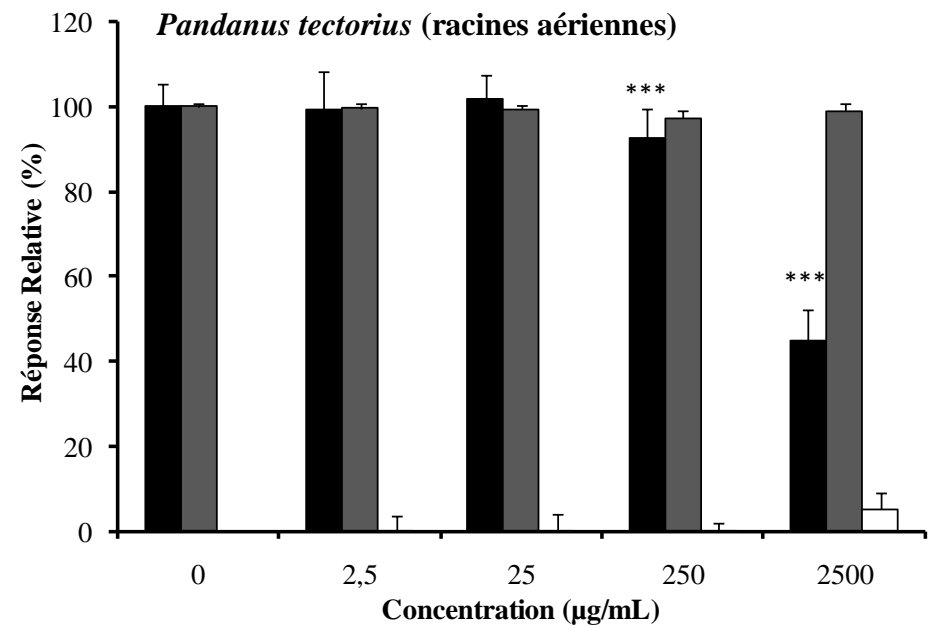
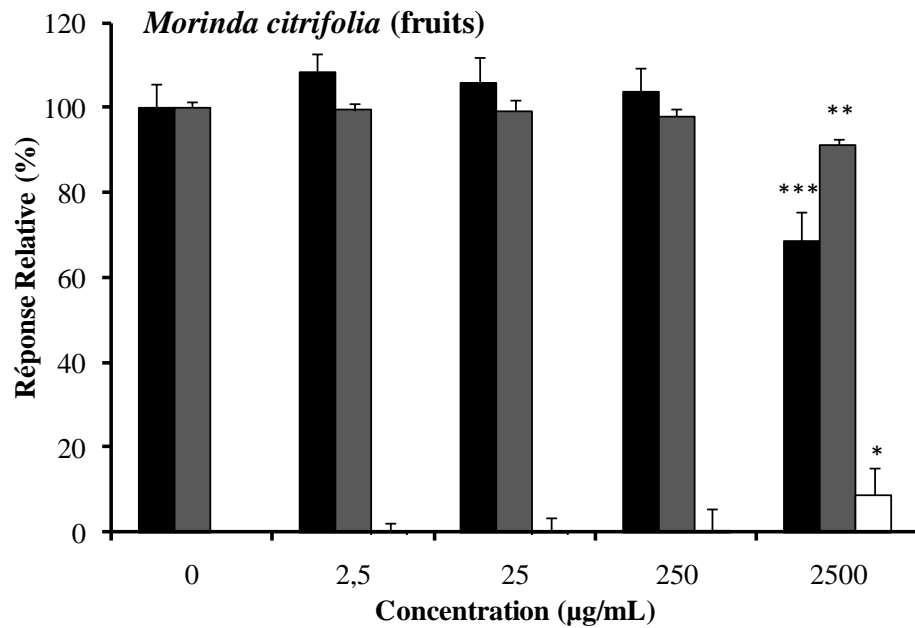
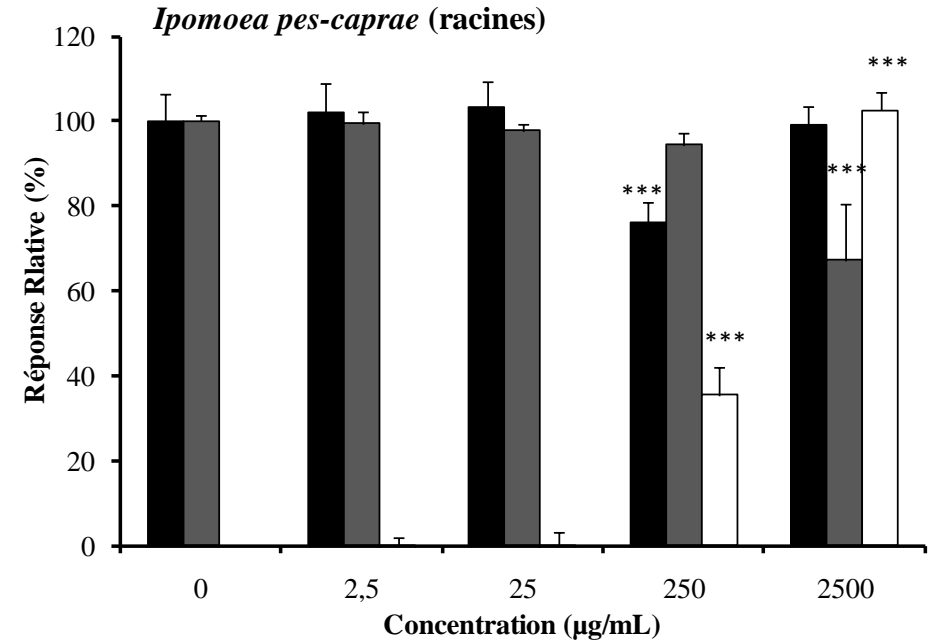
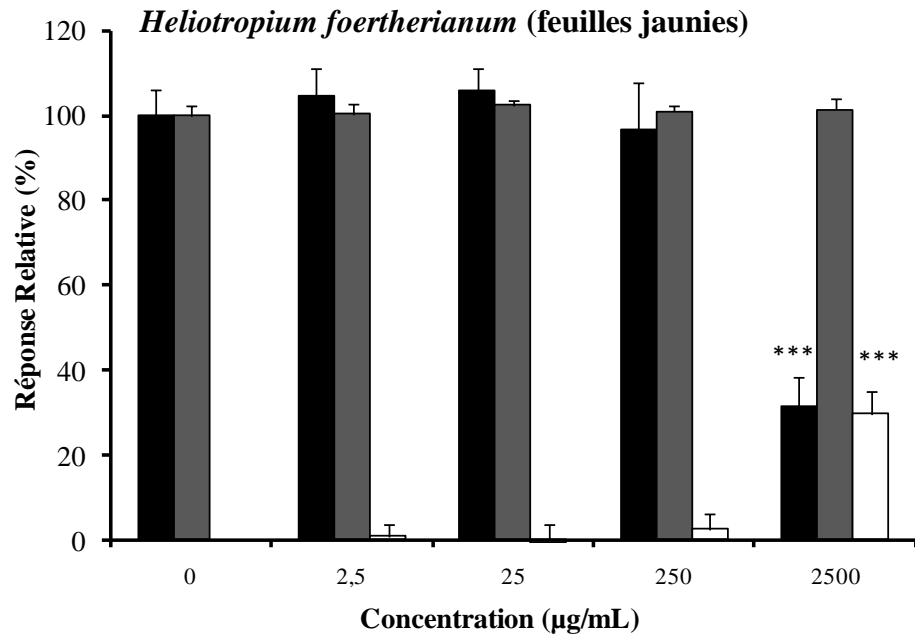
■ % d'effet sur la viabilité des cellules RAW 264.7 traitées avec 10 µg/ml de LPS et des extraits à 0, 2,5, 25, 250 et 2500 µg/mL après 24 h. Pourcentages d'activité calculés par rapport à la viabilité cellulaire observée avec traitement au LPS ($n = 12$).

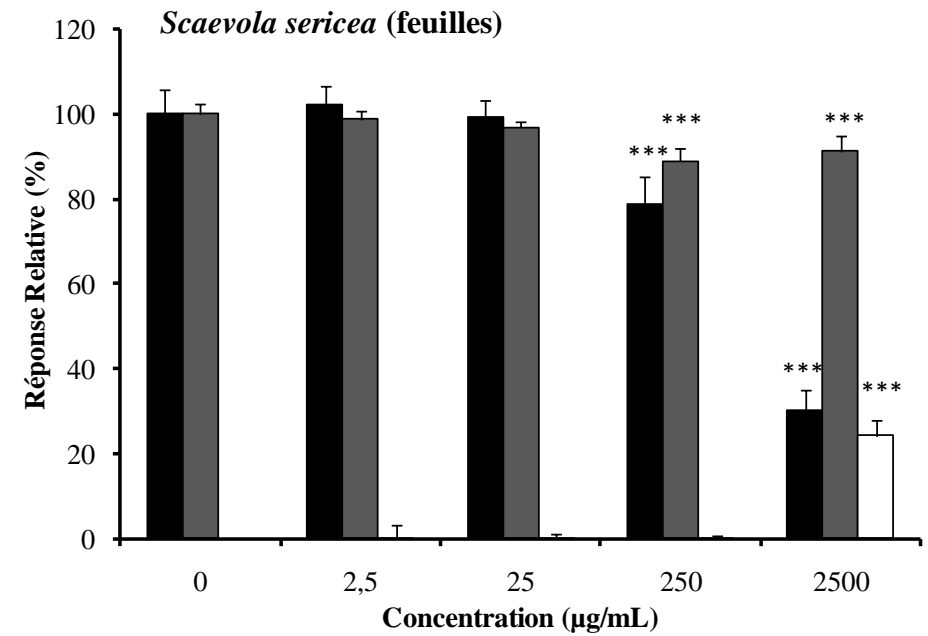
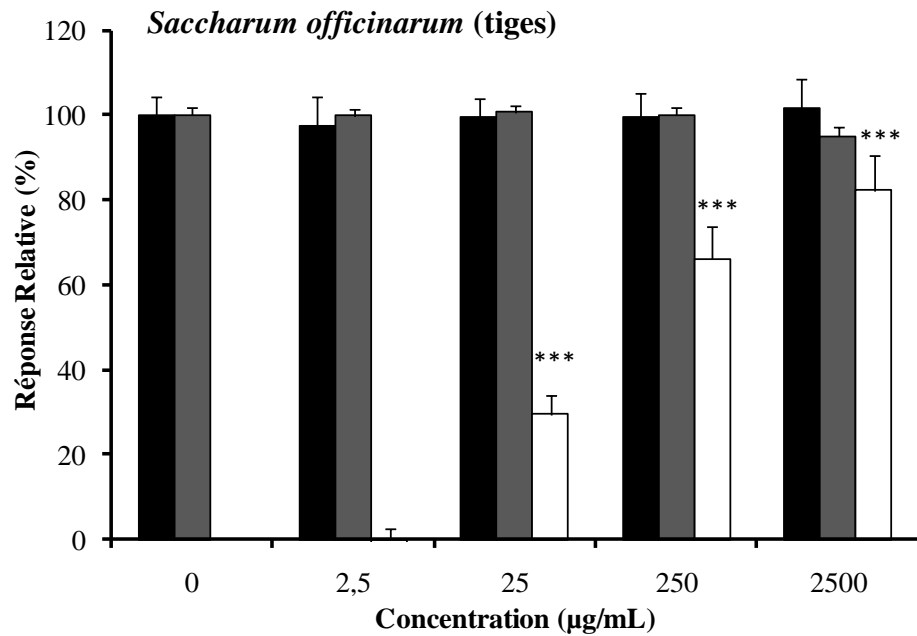
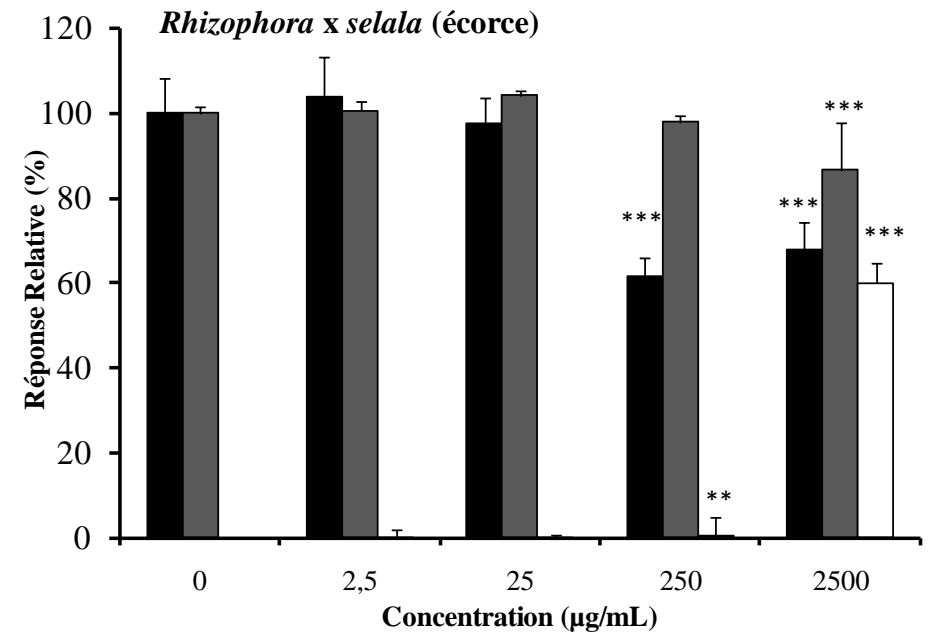
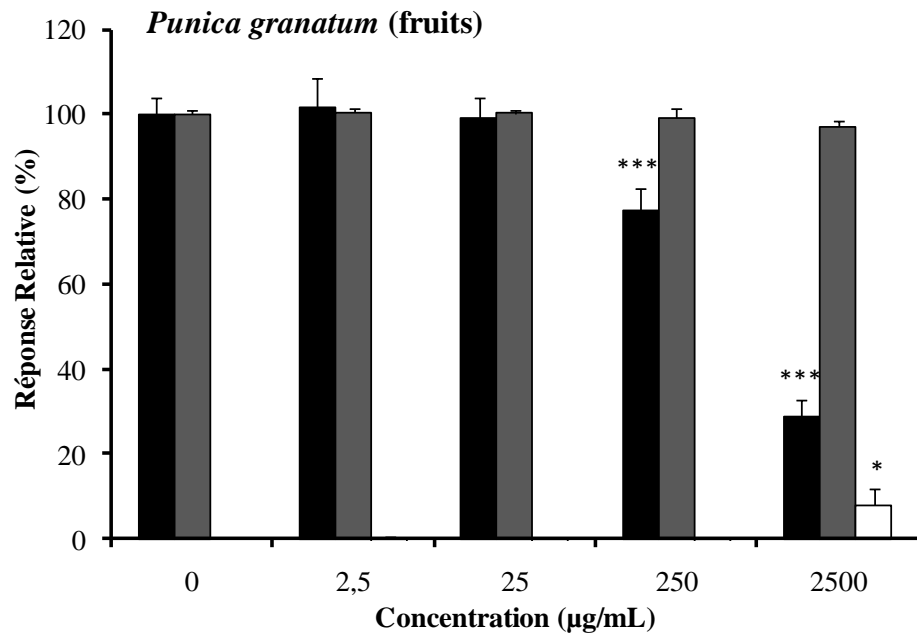
□ % de la capacité d'induction du NO• des extraits à 0, 2,5, 25, 250 et 2500 µg/mL dans des macrophages RAW 264.7 après 24 h. Pourcentages d'activité calculés par rapport à la production de NO• observée avec le LPS à 10 µg/mL ($n = 12$).

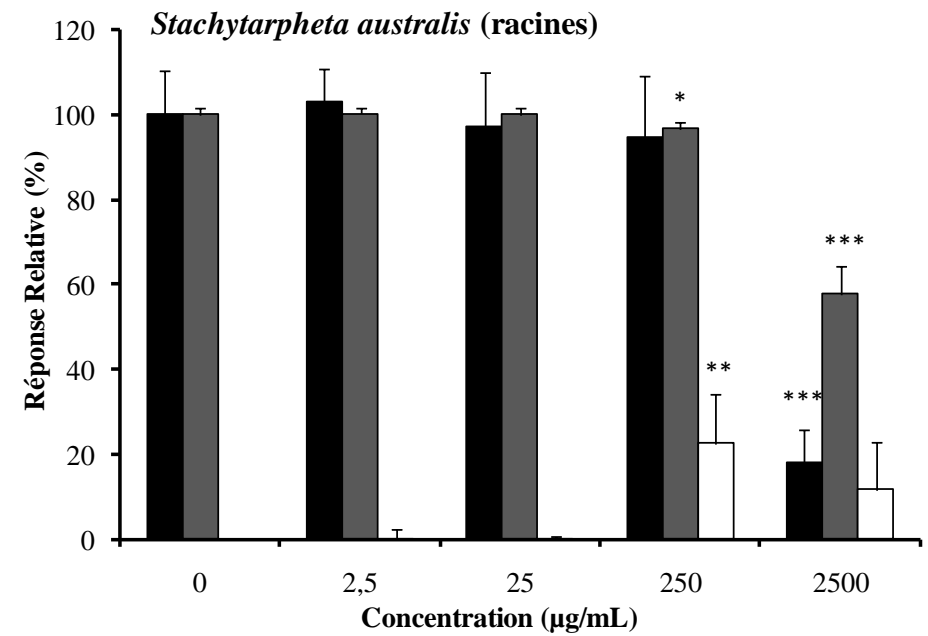
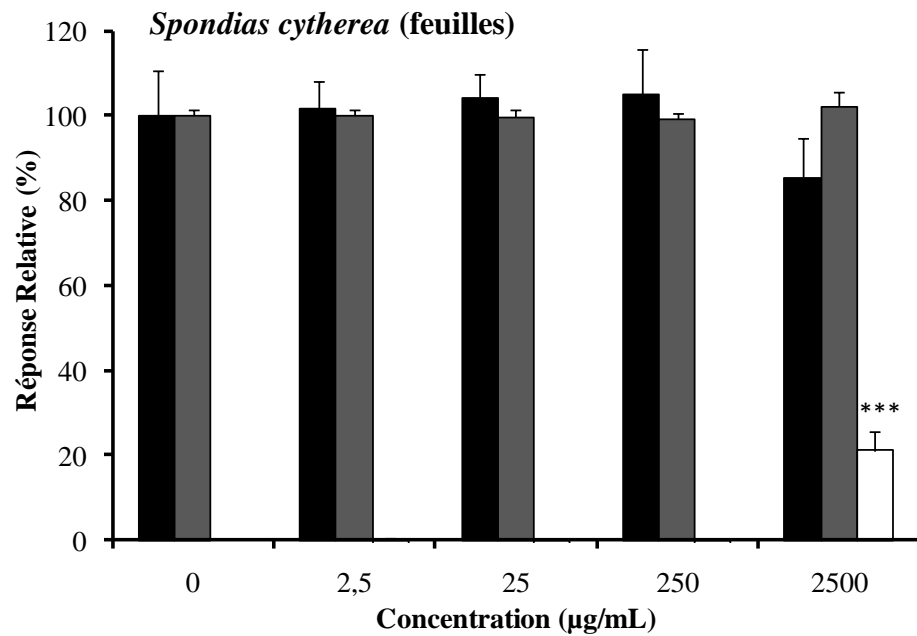
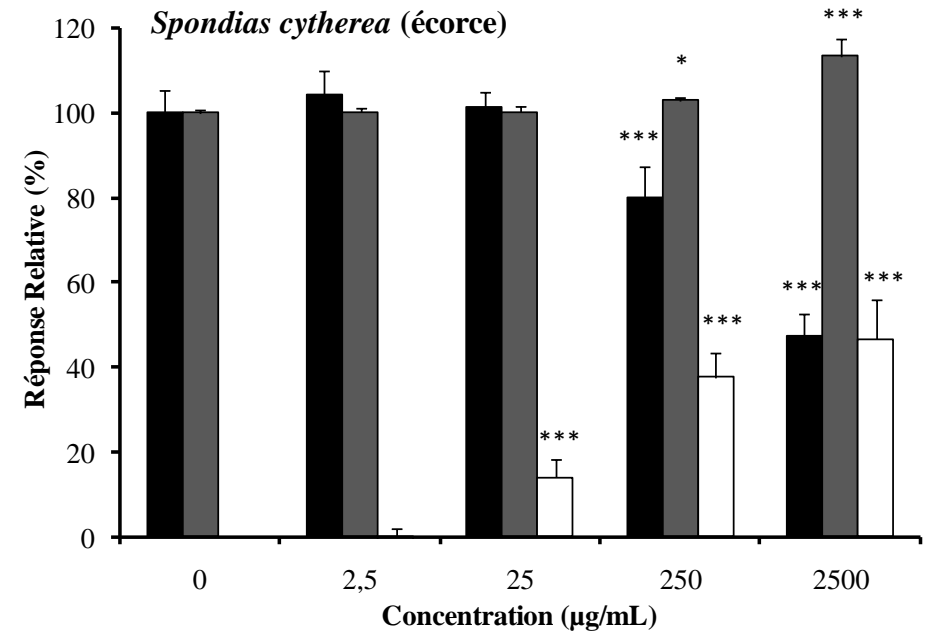
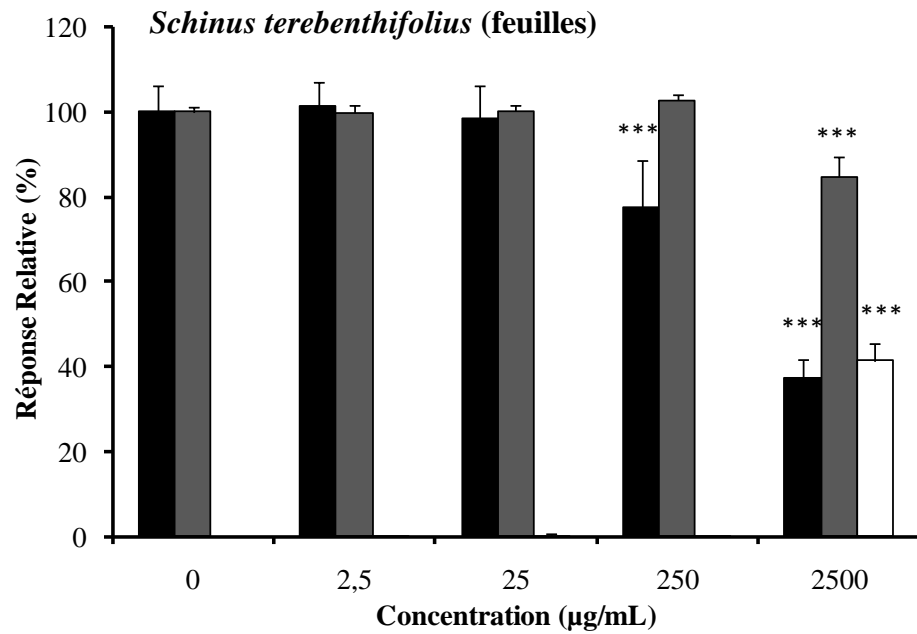


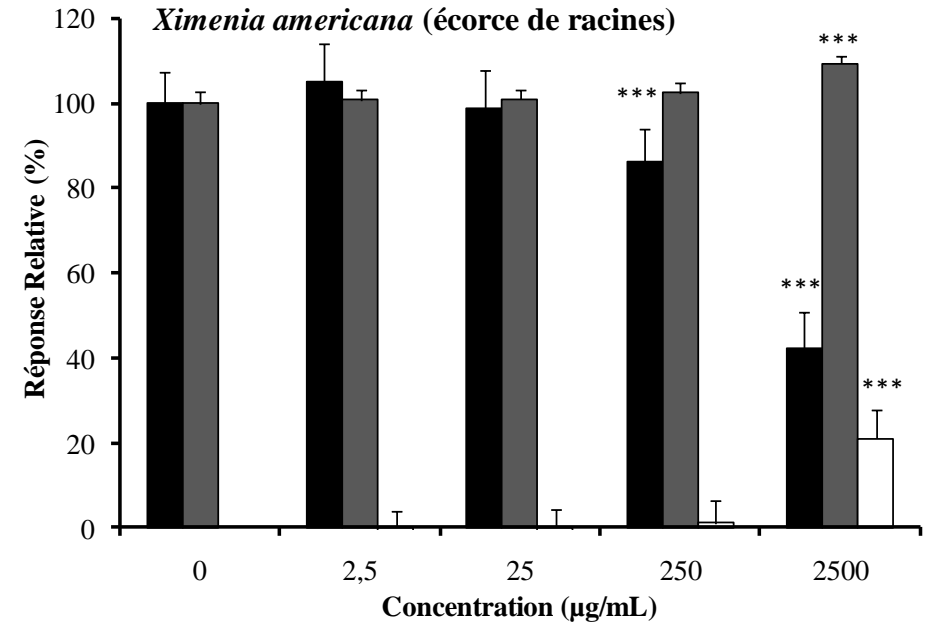
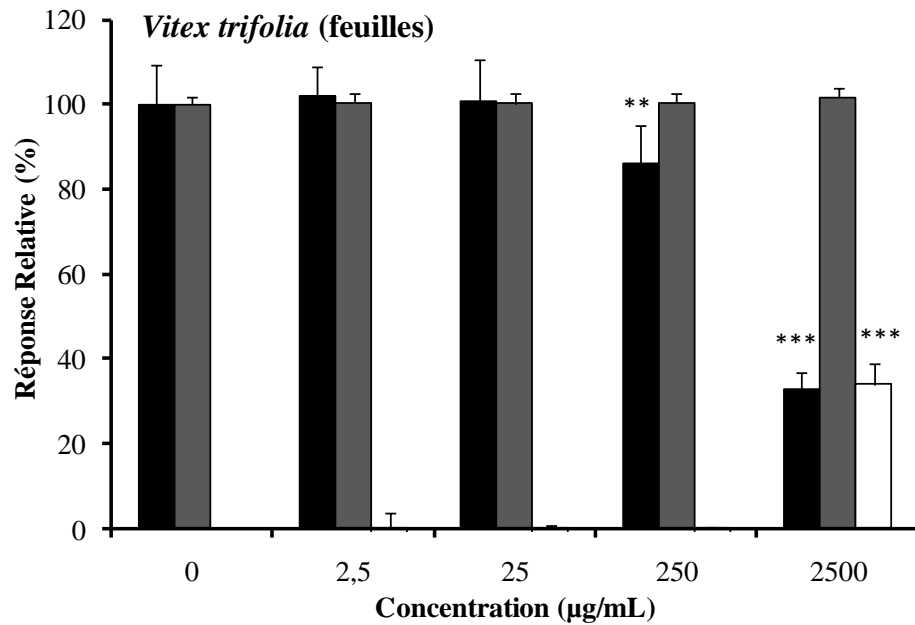
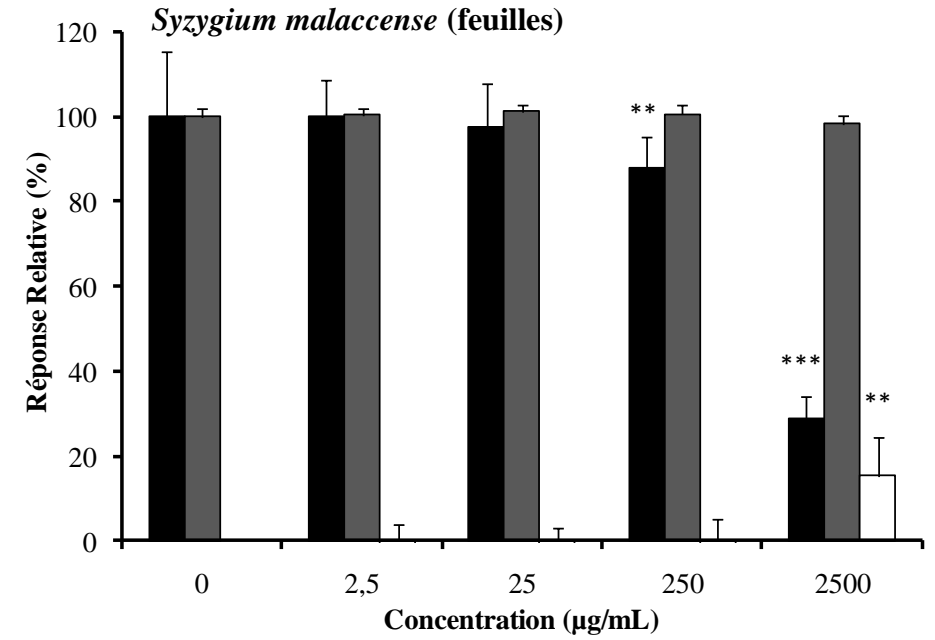
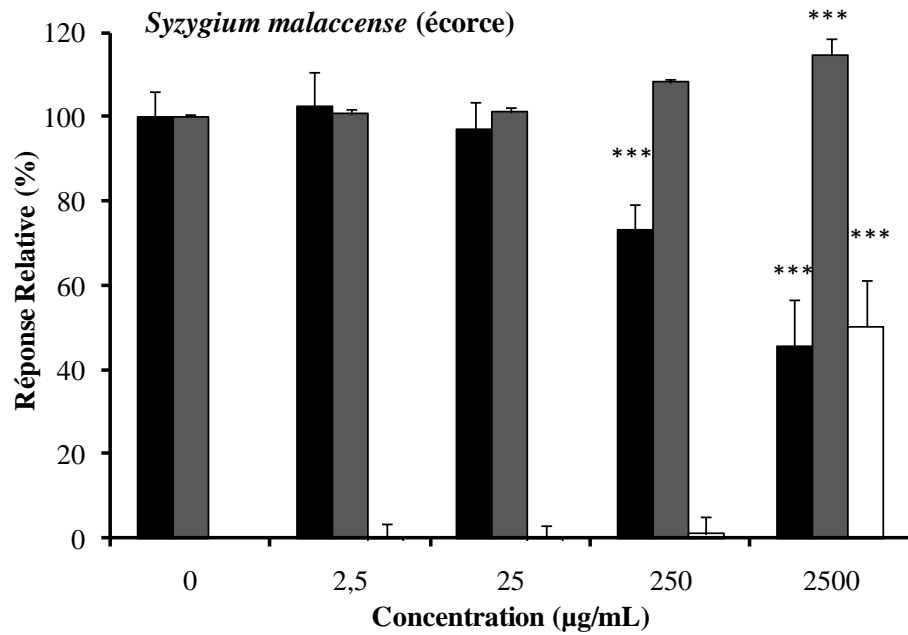




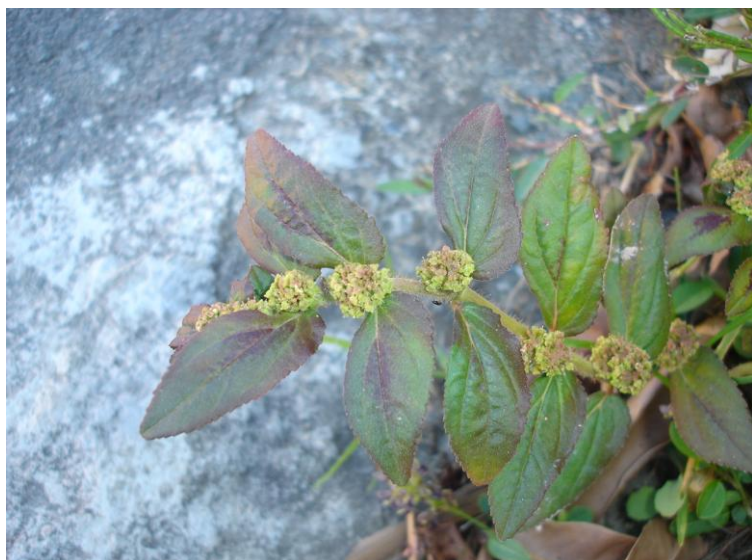








ANNEXE 3 : PHOTOS DES PLANTES SÉLECTIONNÉES



Euphorbia hirta L.
(Euphorbiaceae)



Heliotropium foertherianum
Diane & Hilger
(Boraginaceae)



Vitex trifolia L. (Labiatae)

ANNEXE 4 : RÉSULTATS DE FRACTIONNEMENT BIOGUIDÉ (TESTS BIOCHIMIQUES)

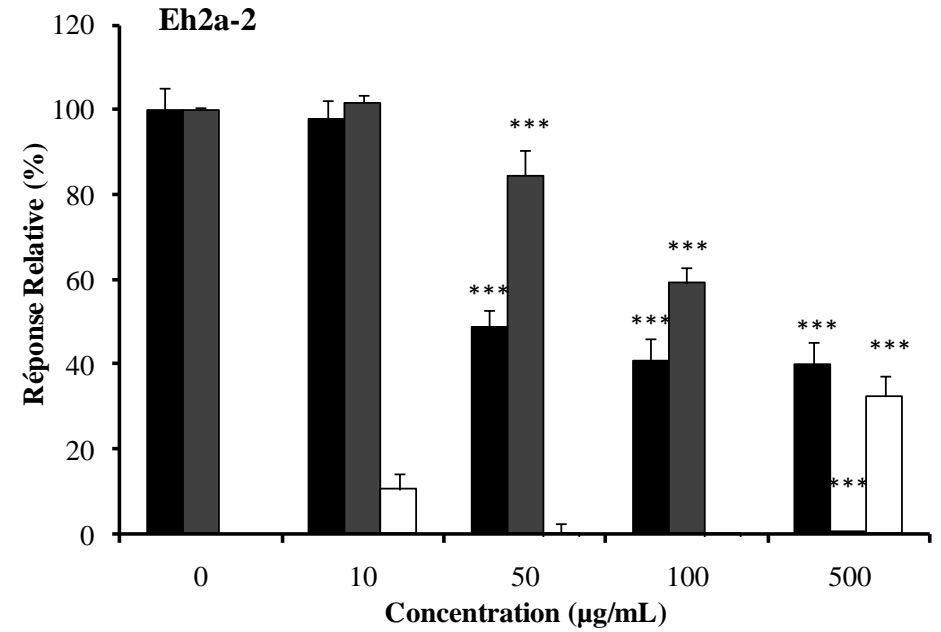
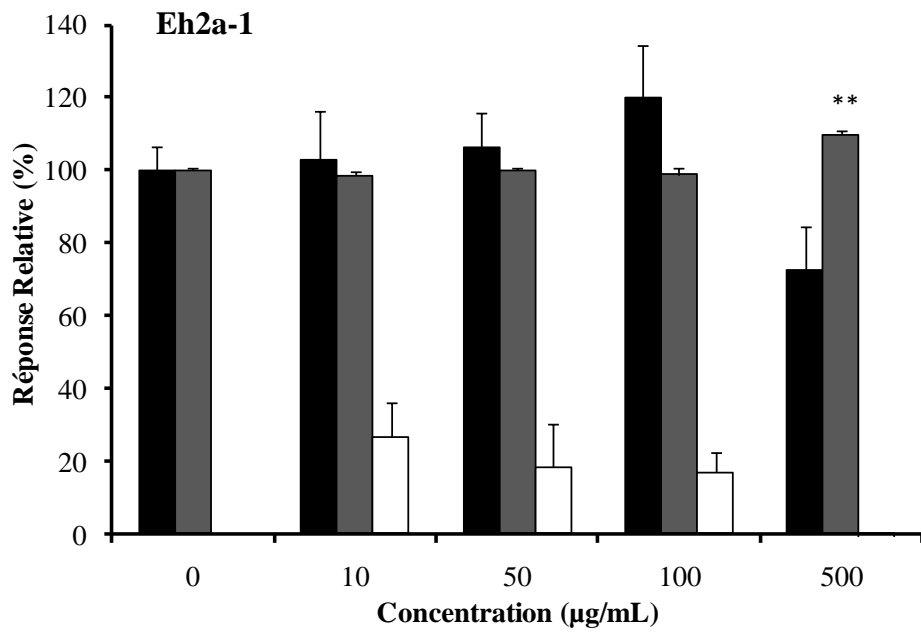
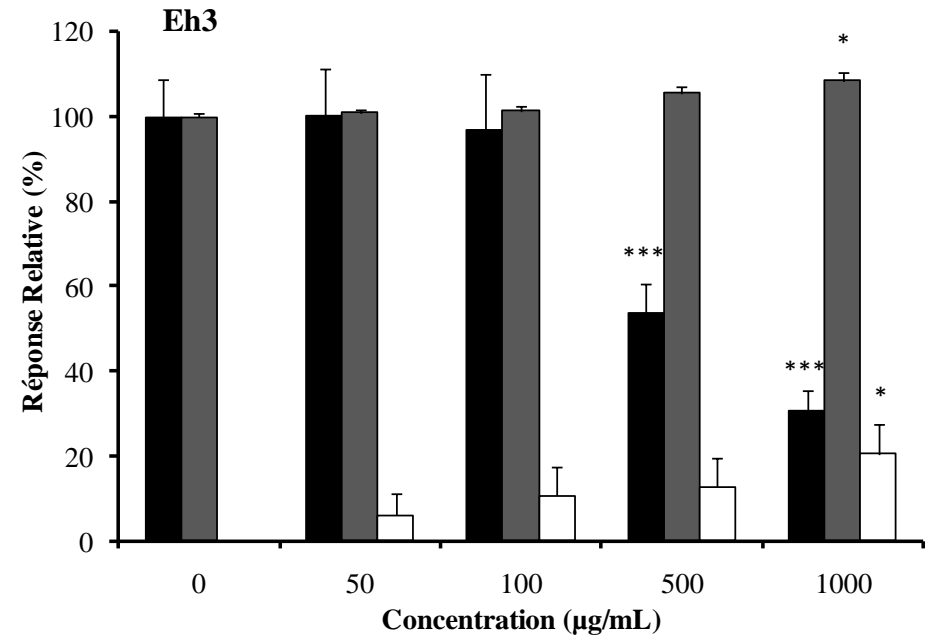
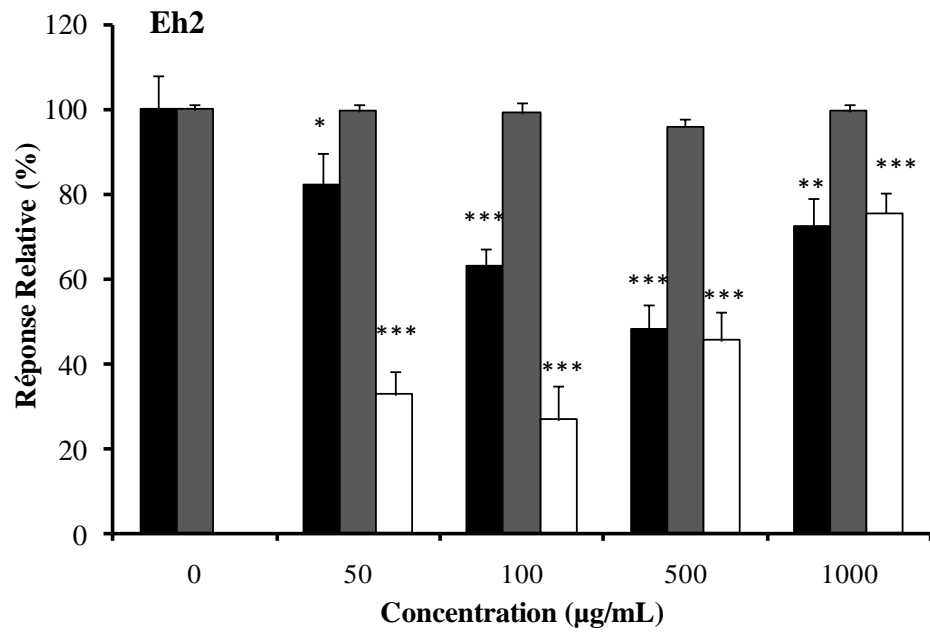
Effets des fractions et des sous fractions d'*Euphorbia hirta* (Eh), d'*Heliotropium foertherianum* (Hf) et de *Vitex trifolia* (Vt) sur l'accumulation de nitrite dans les surnageants cellulaires et sur la viabilité cellulaire de macrophages RAW 264.7 (5×10^4 cellules/puits) stimulés ou non avec du LPS.

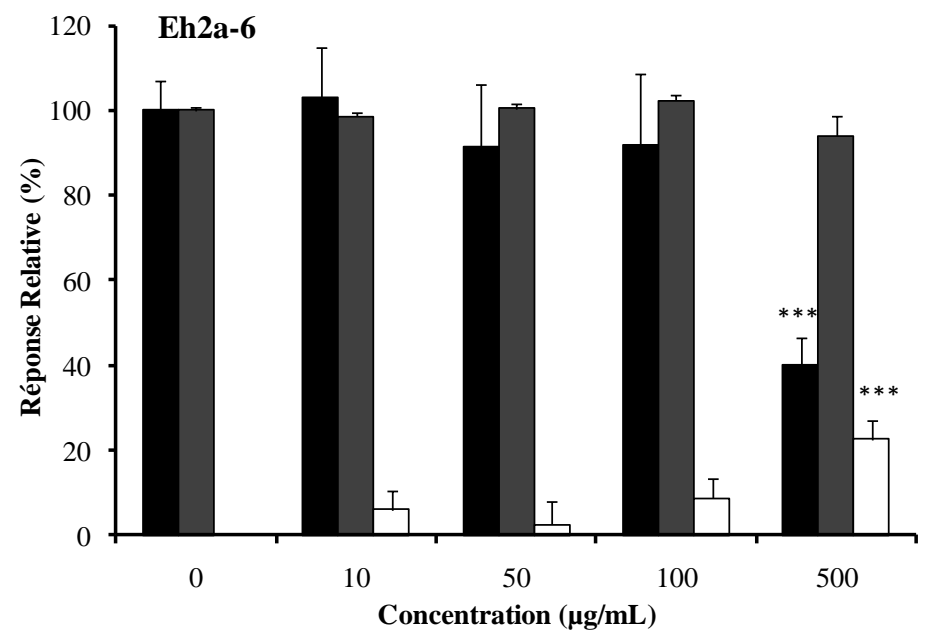
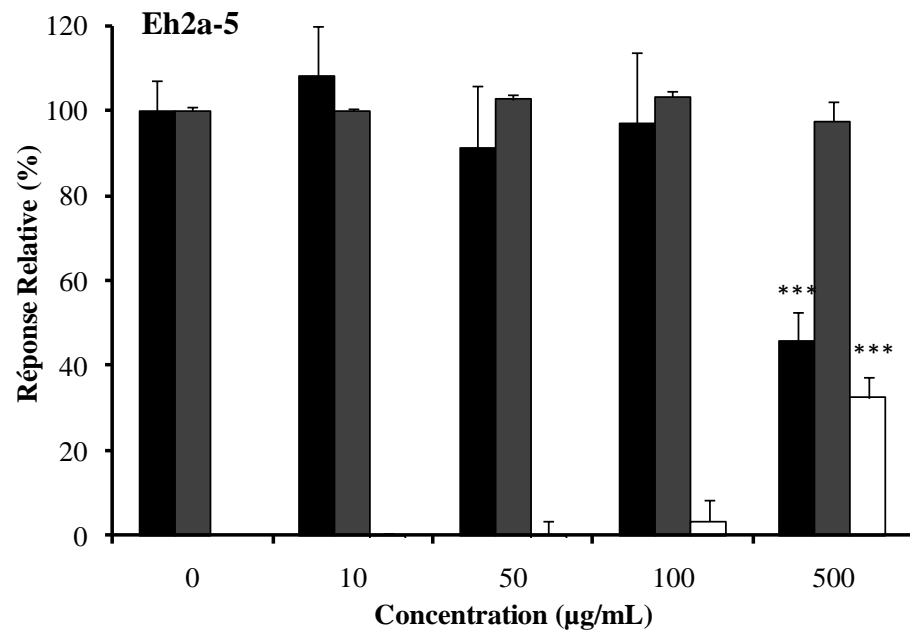
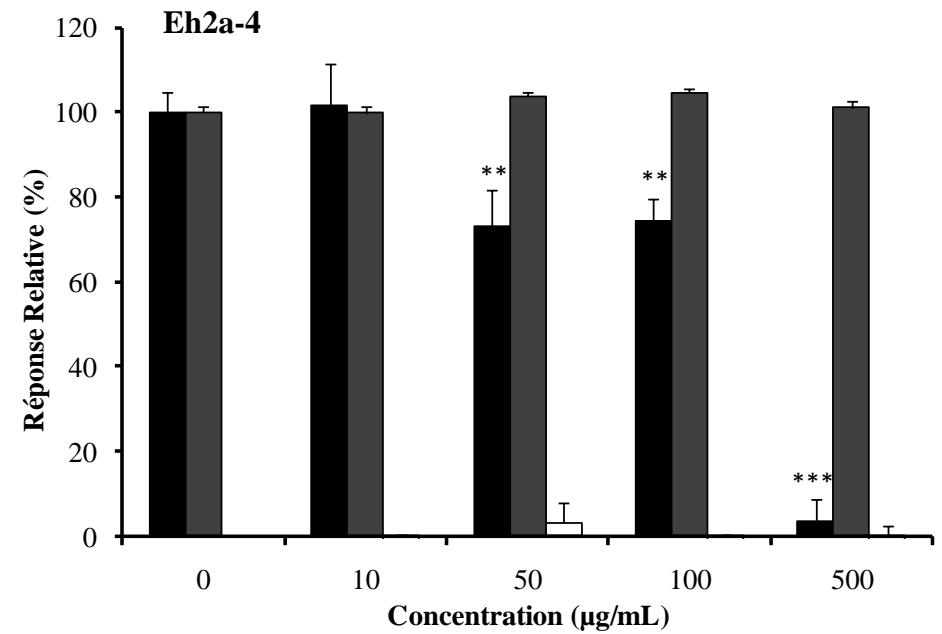
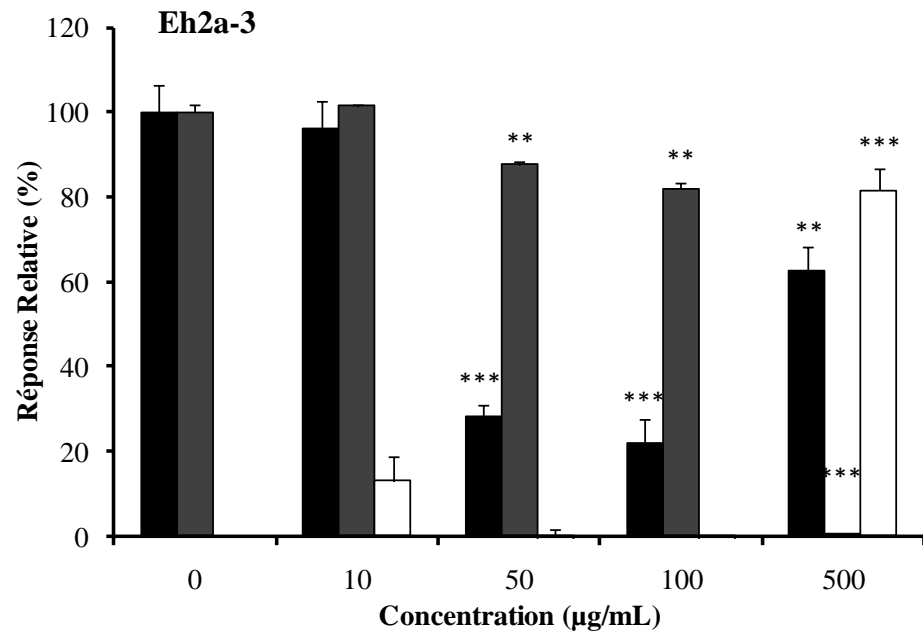
Abréviations : (+), (++) et (+++): augmentation ou diminution significative ($0,01 < P < 0,05$, $0,001 < P < 0,01$ et $P < 0,001$).

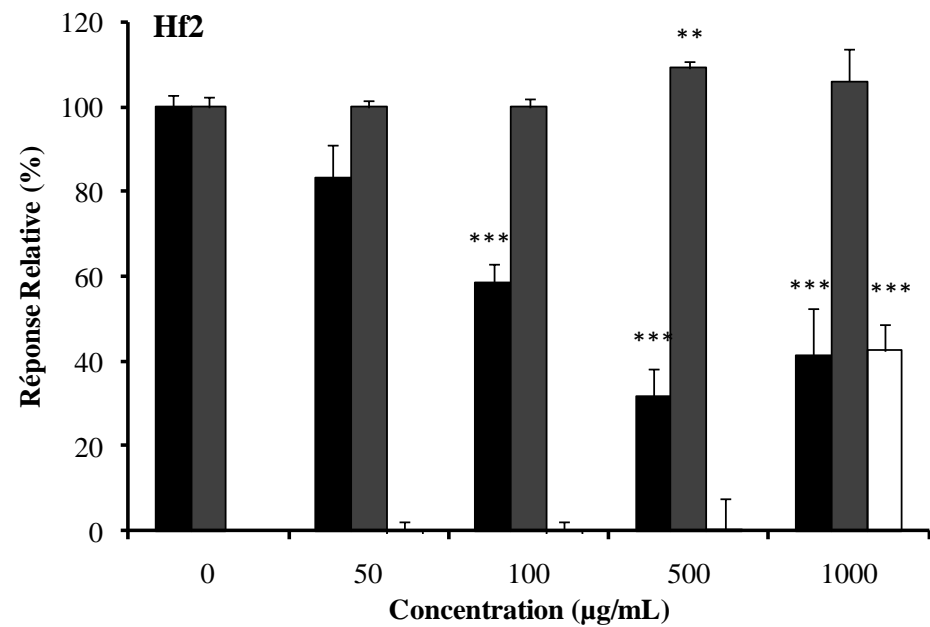
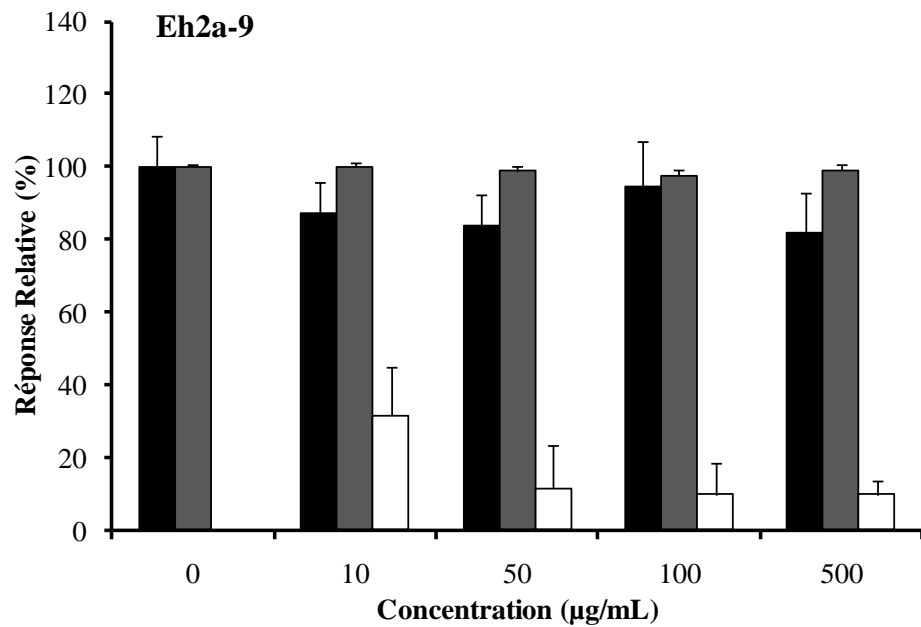
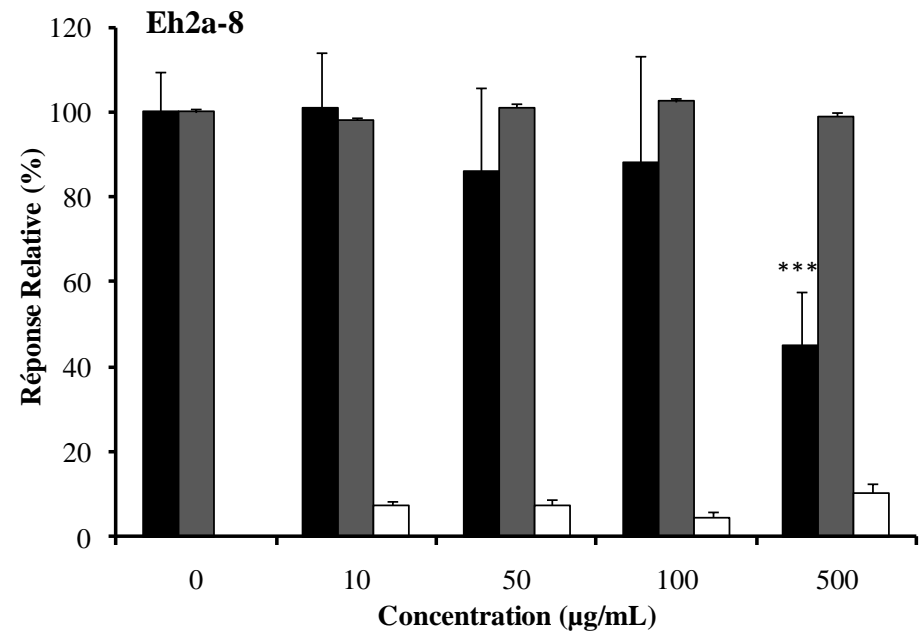
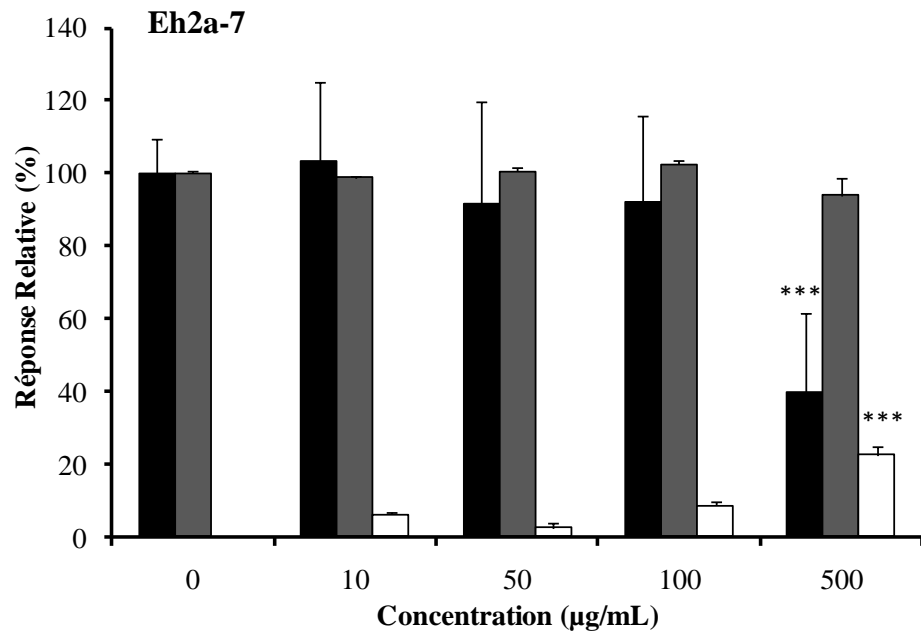
■ % de la capacité d'inhibition du NO• des fractions à 0, 50, 100, 500 et 1000 µg/mL ou des sous fractions à 0, 10, 50, 100 et 500 µg/mL dans des macrophages RAW 264.7 après 24 h de traitement avec 10 µg/mL de LPS. Pourcentages d'activité calculés par rapport à la production de NO• observée avec le LPS ($n = 12$).

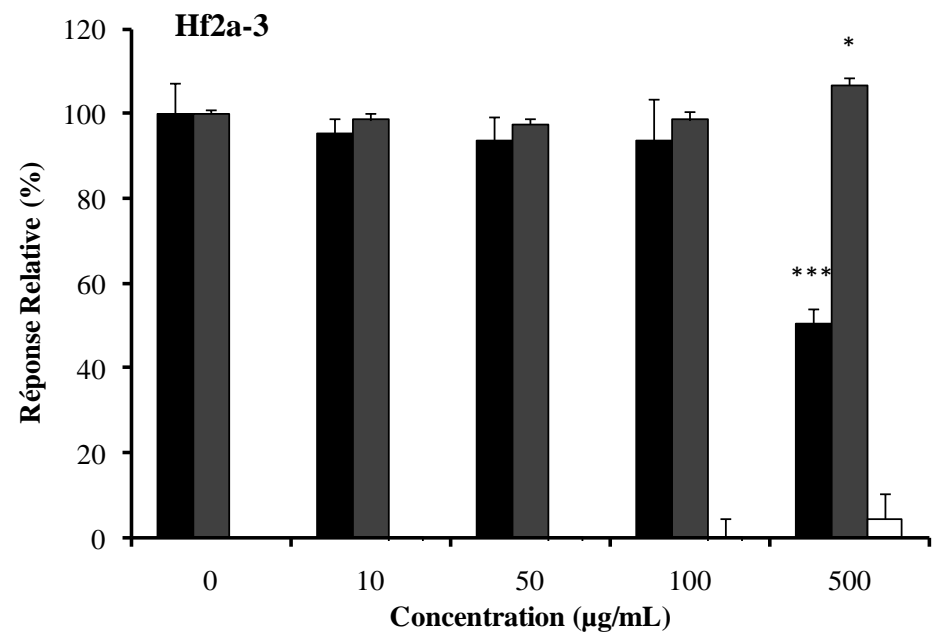
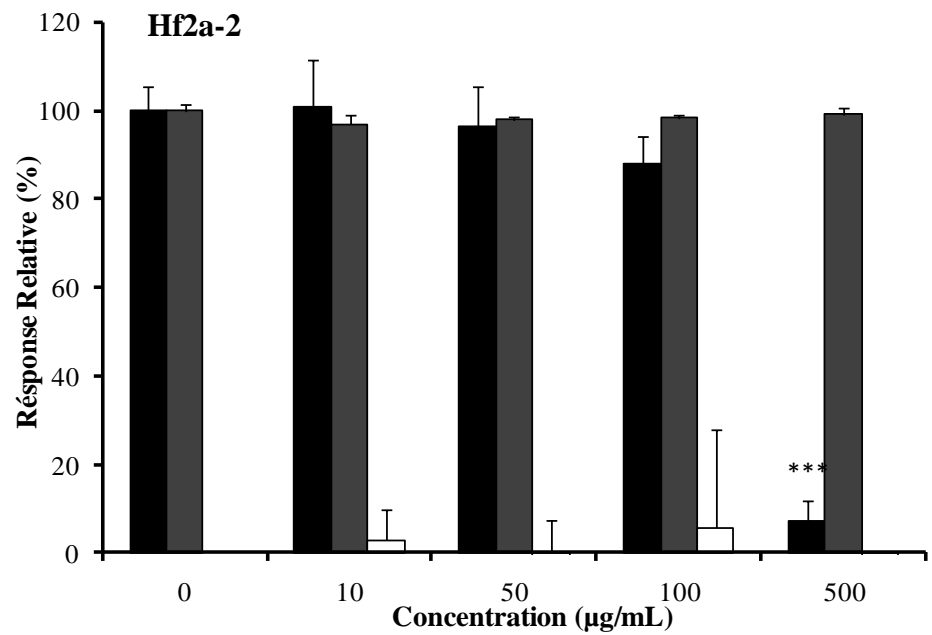
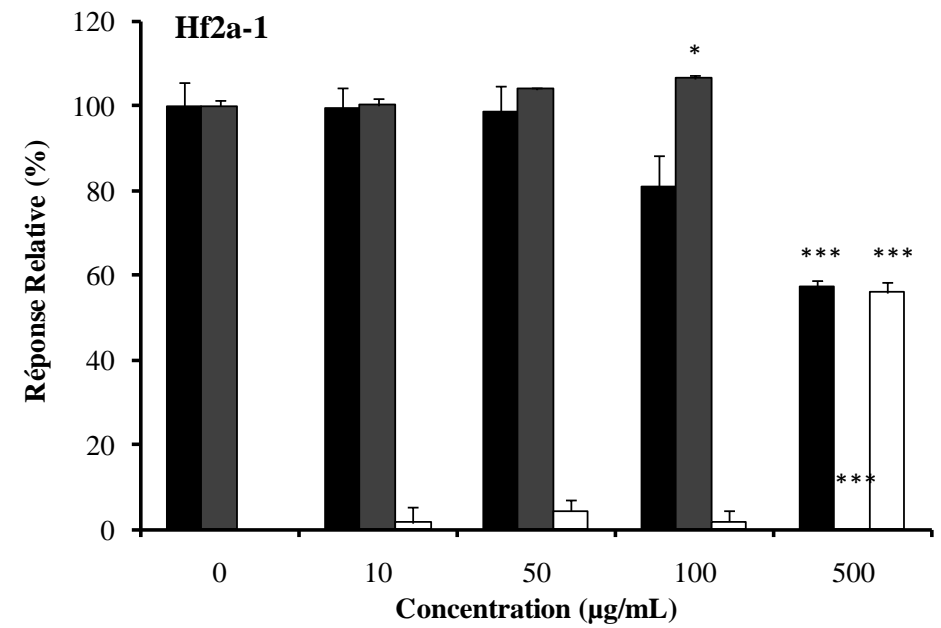
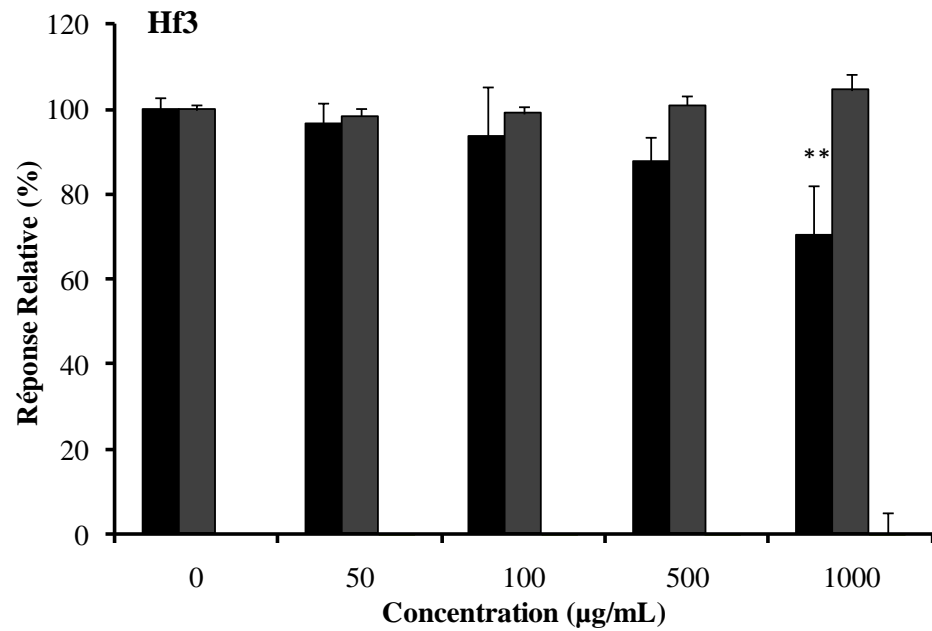
■ % d'effet sur la viabilité des cellules RAW 264.7 traitées avec 10 µg/mL de LPS et des fractions à 0, 50, 100, 500 et 1000 µg/mL ou des sous fractions à 0, 10, 50, 100 et 500 µg/mL après 24 h. Pourcentages d'activité calculés par rapport à la viabilité cellulaire observée avec traitement au LPS ($n = 12$).

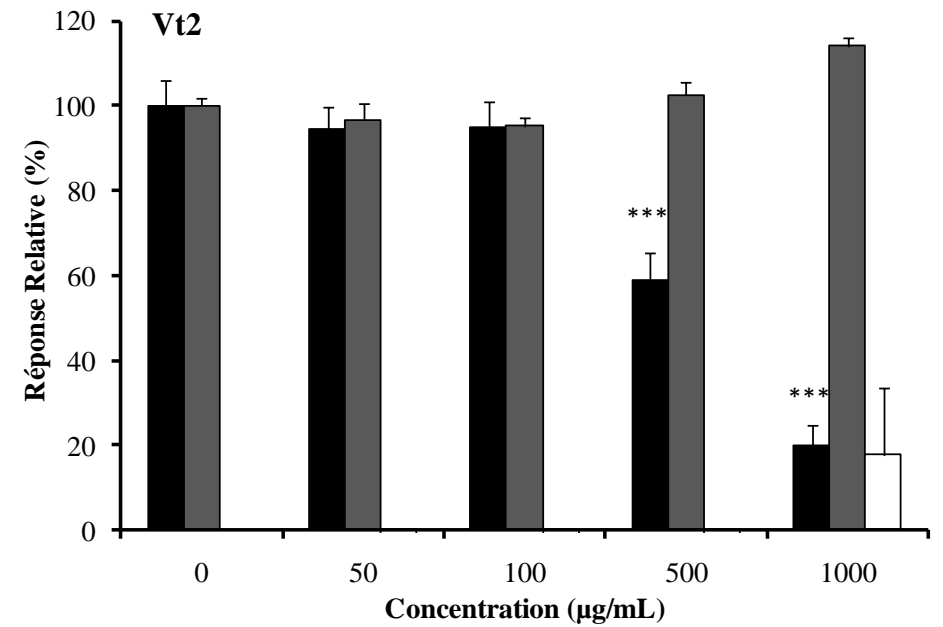
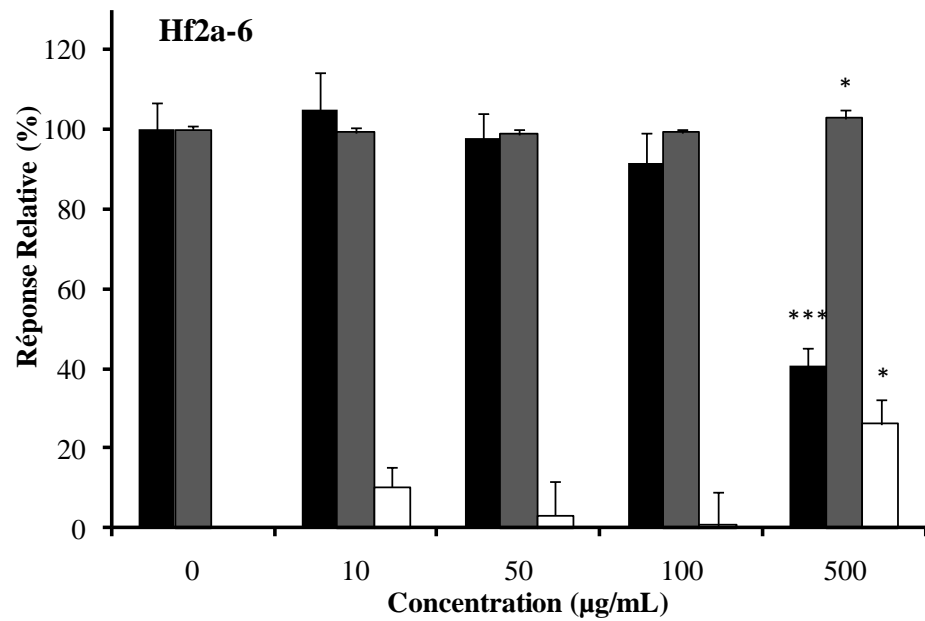
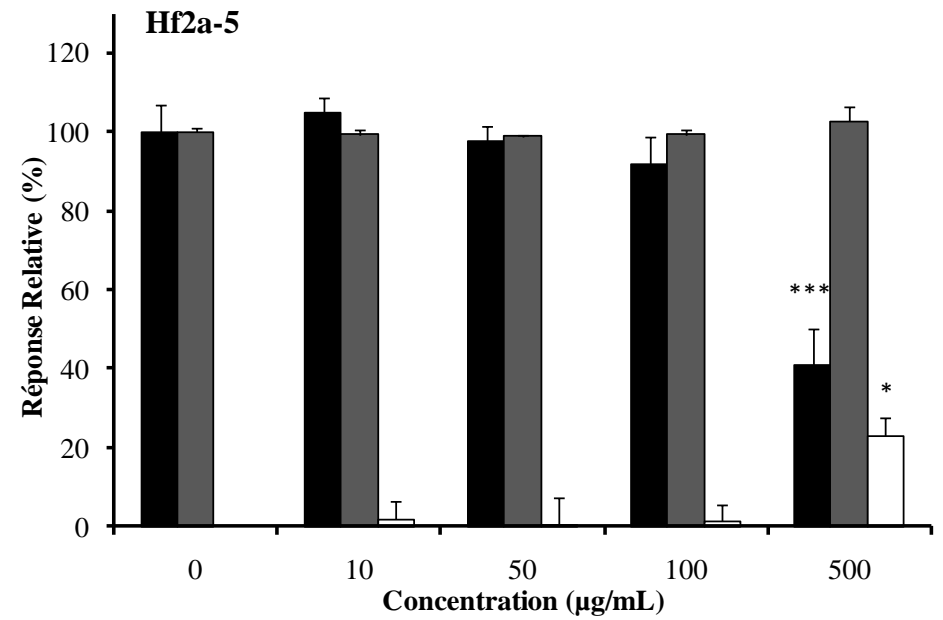
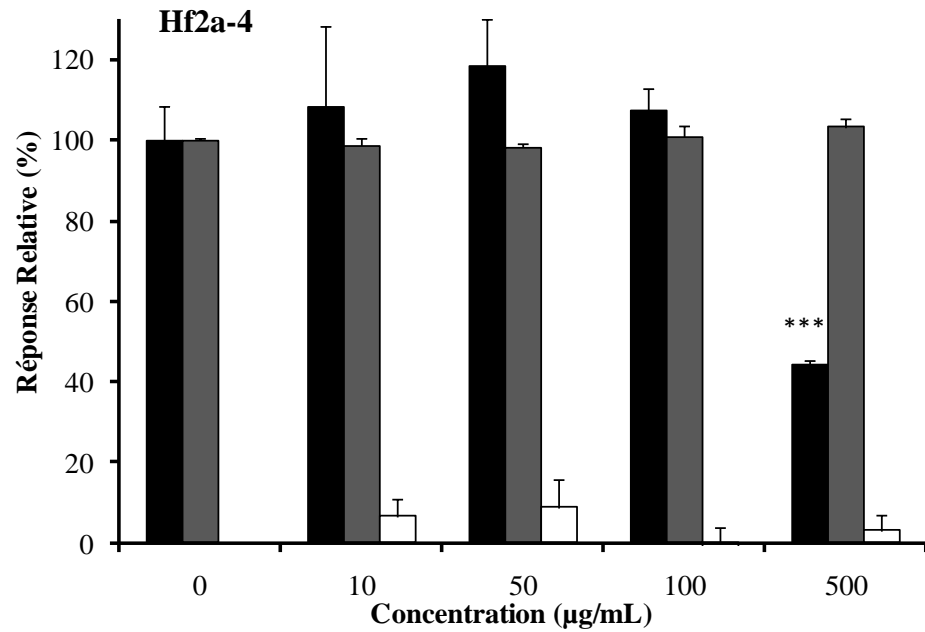
□ % de la capacité d'induction du NO• des fractions à 0, 50, 100, 500 et 1000 µg/mL ou des sous fractions à 0, 10, 50, 100 et 500 µg/mL dans des macrophages RAW 264.7 après 24 h. Pourcentages d'activité calculés par rapport à la production de NO• observée avec le LPS à 10 µg/mL ($n = 12$).

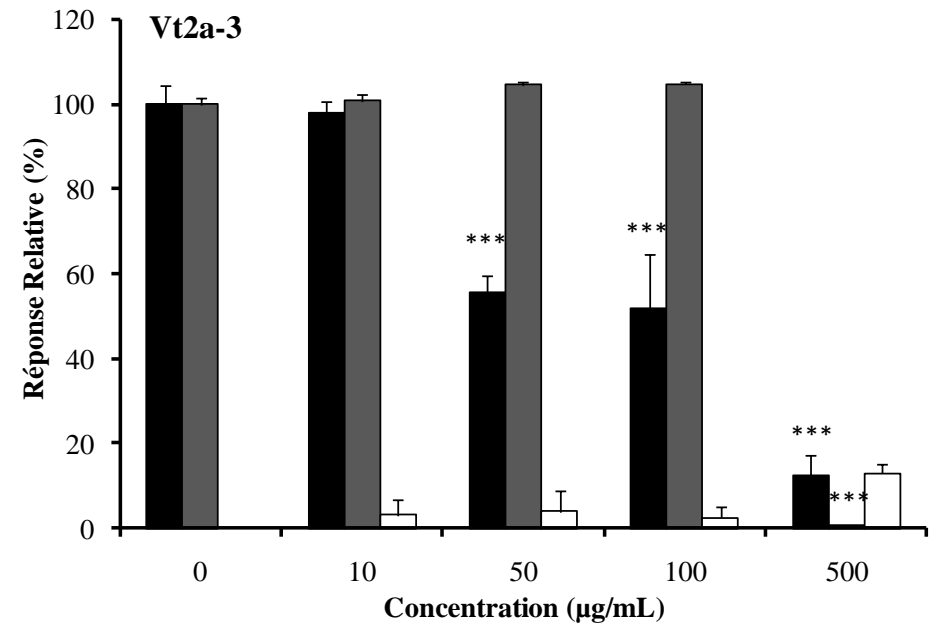
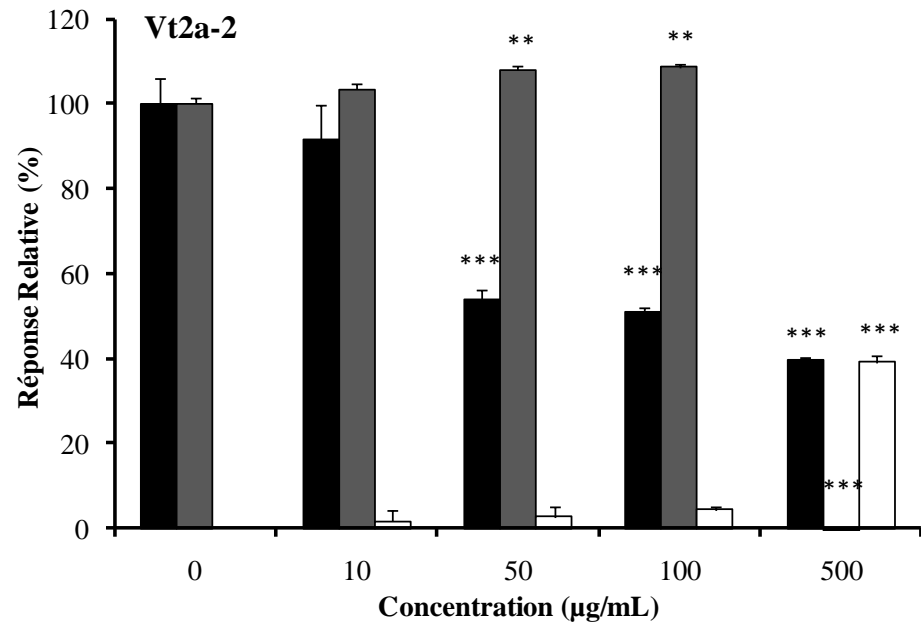
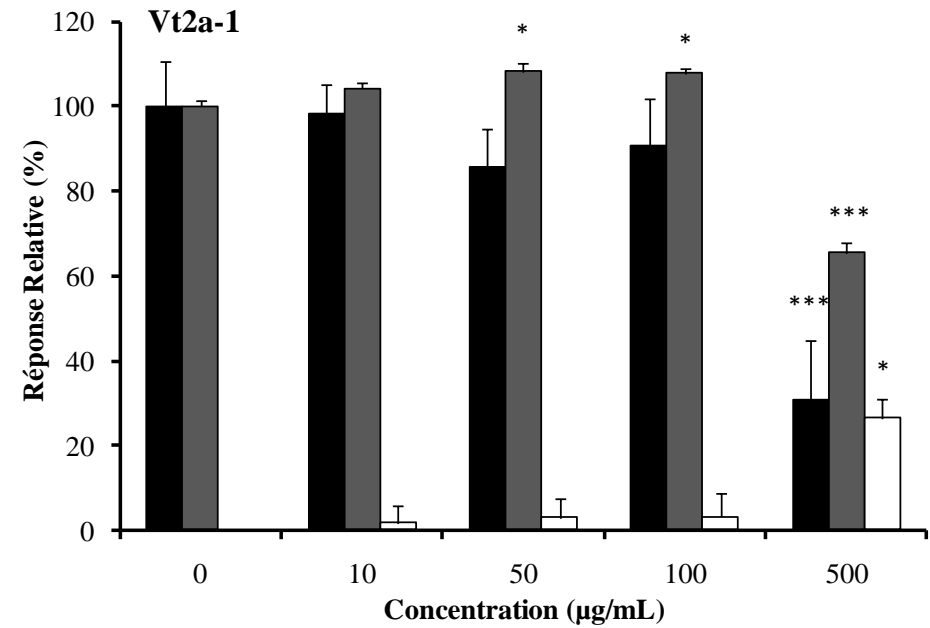
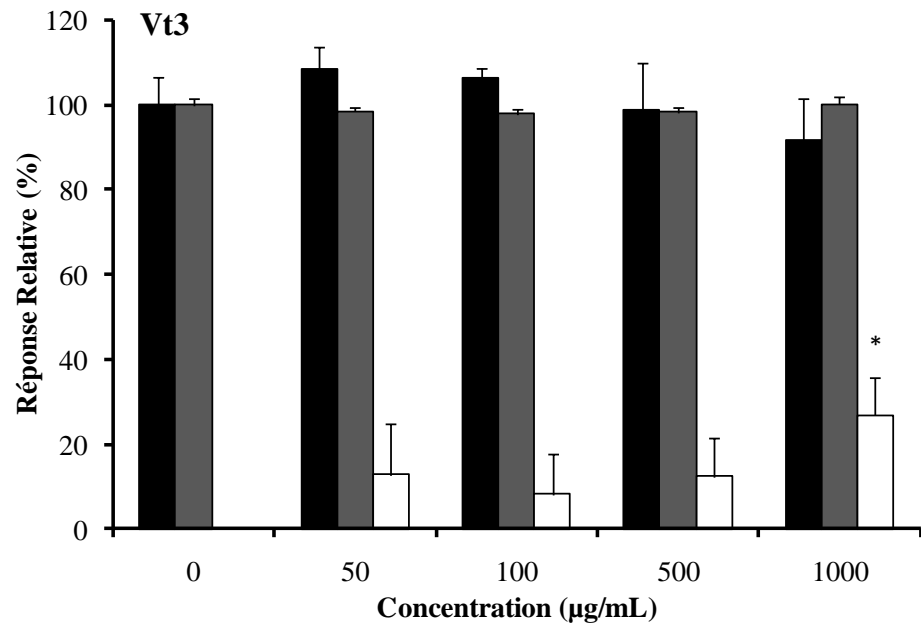


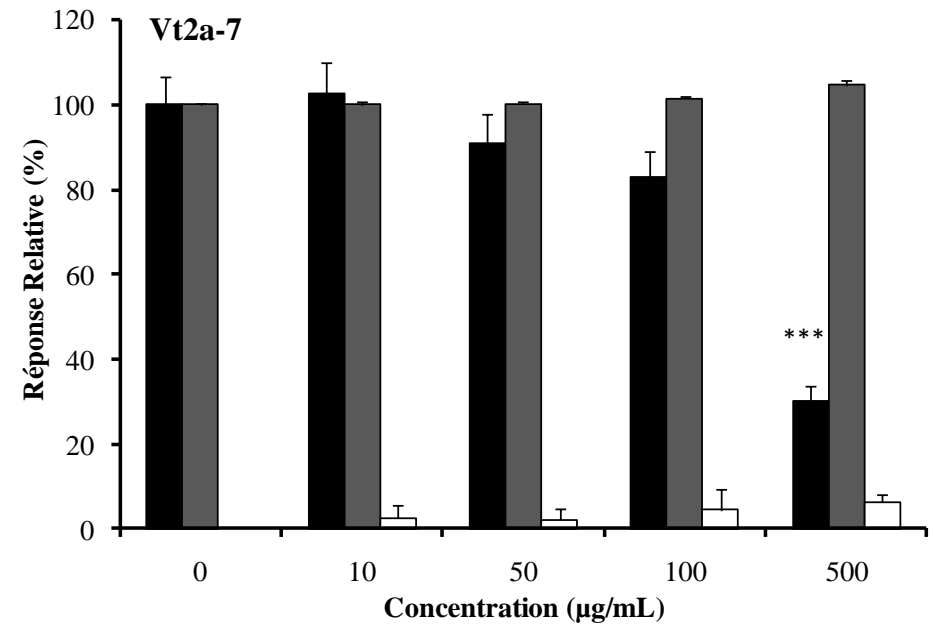
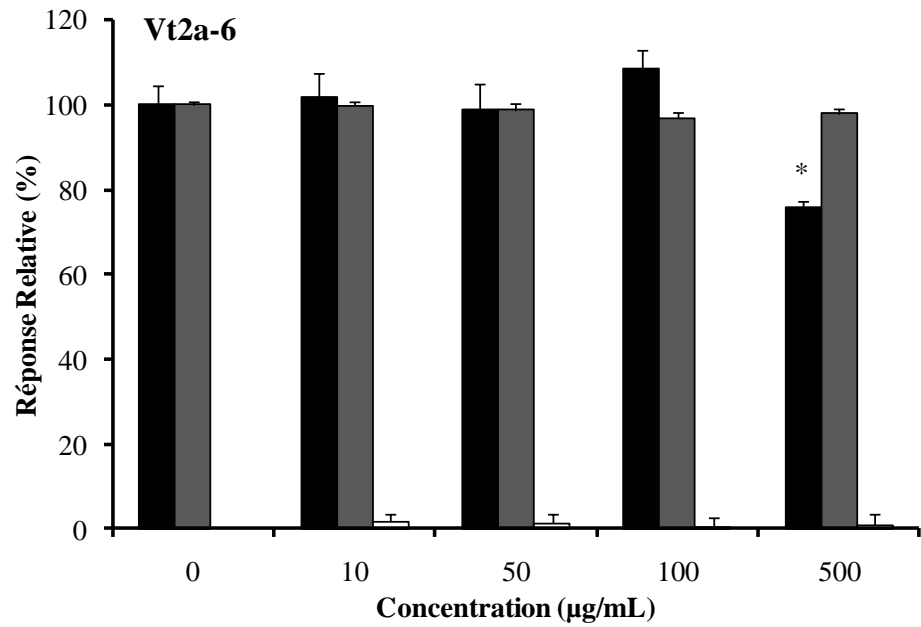
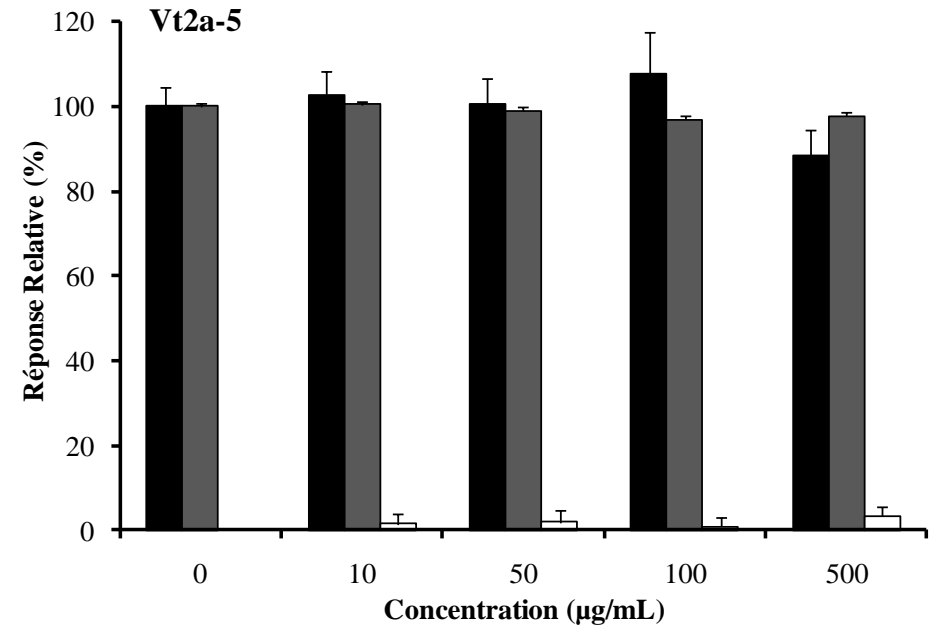
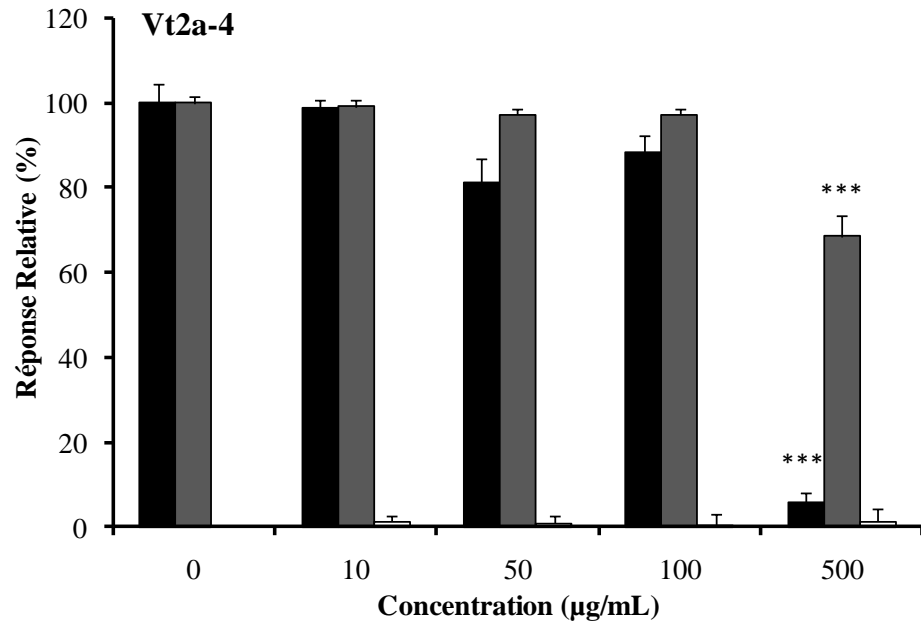


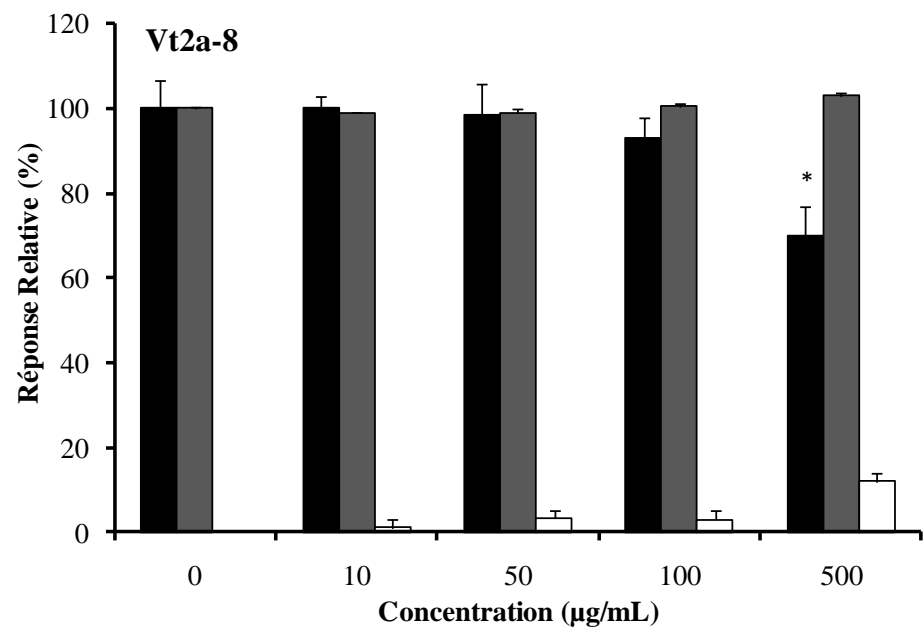






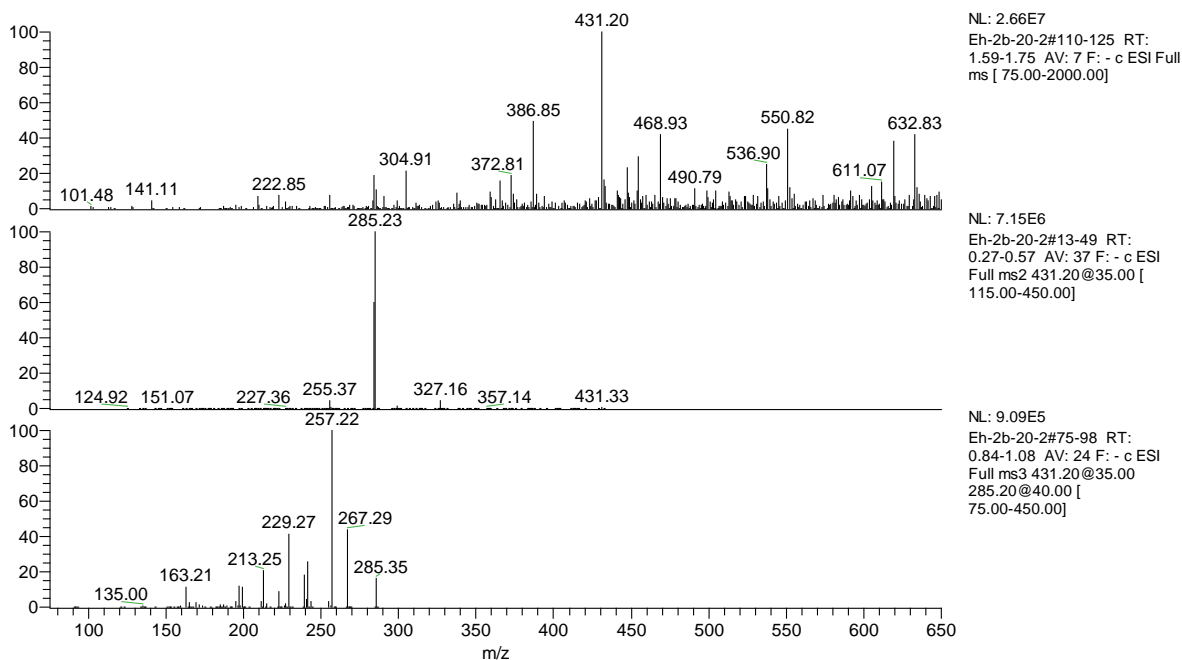




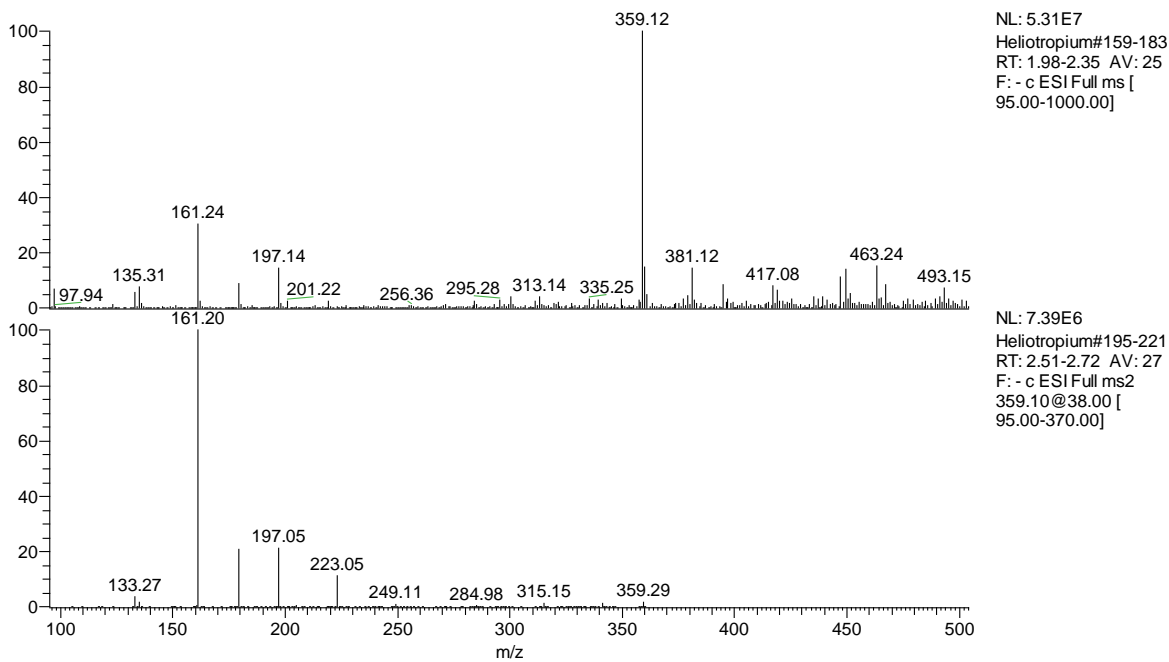


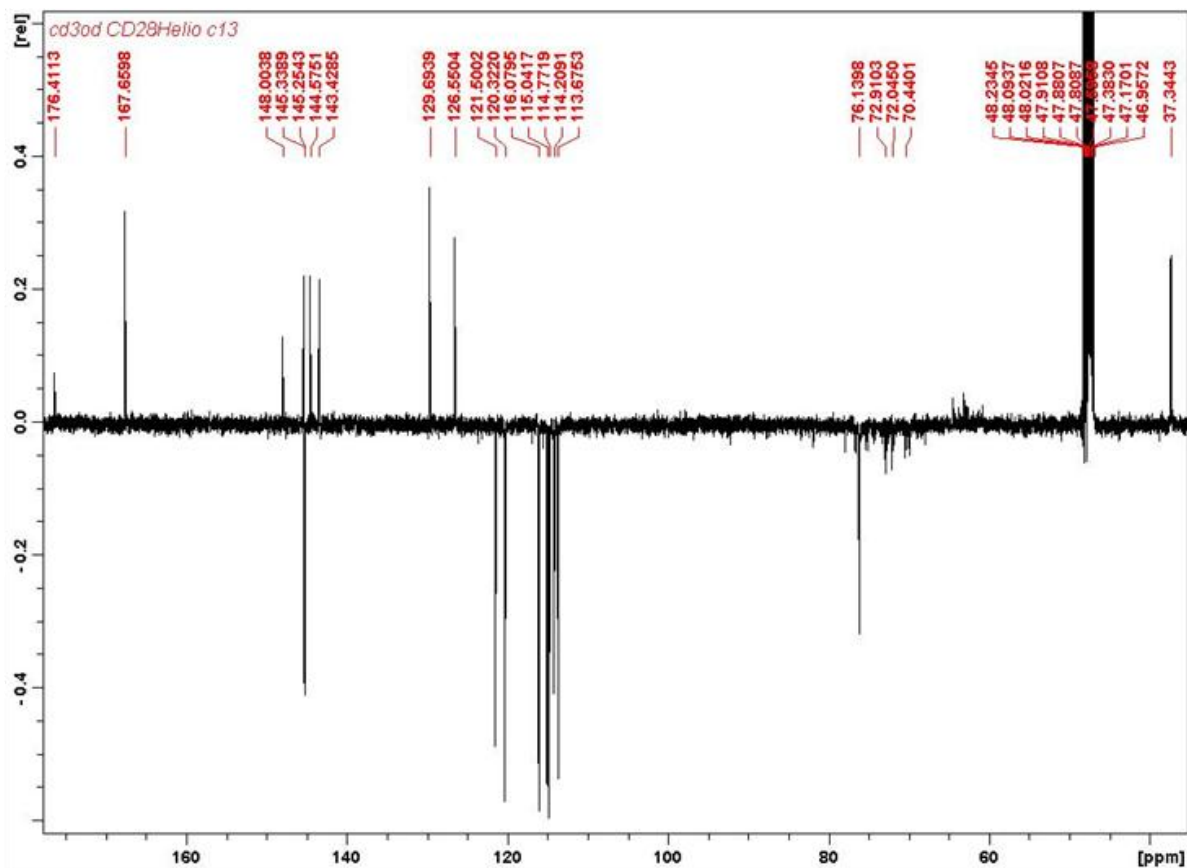
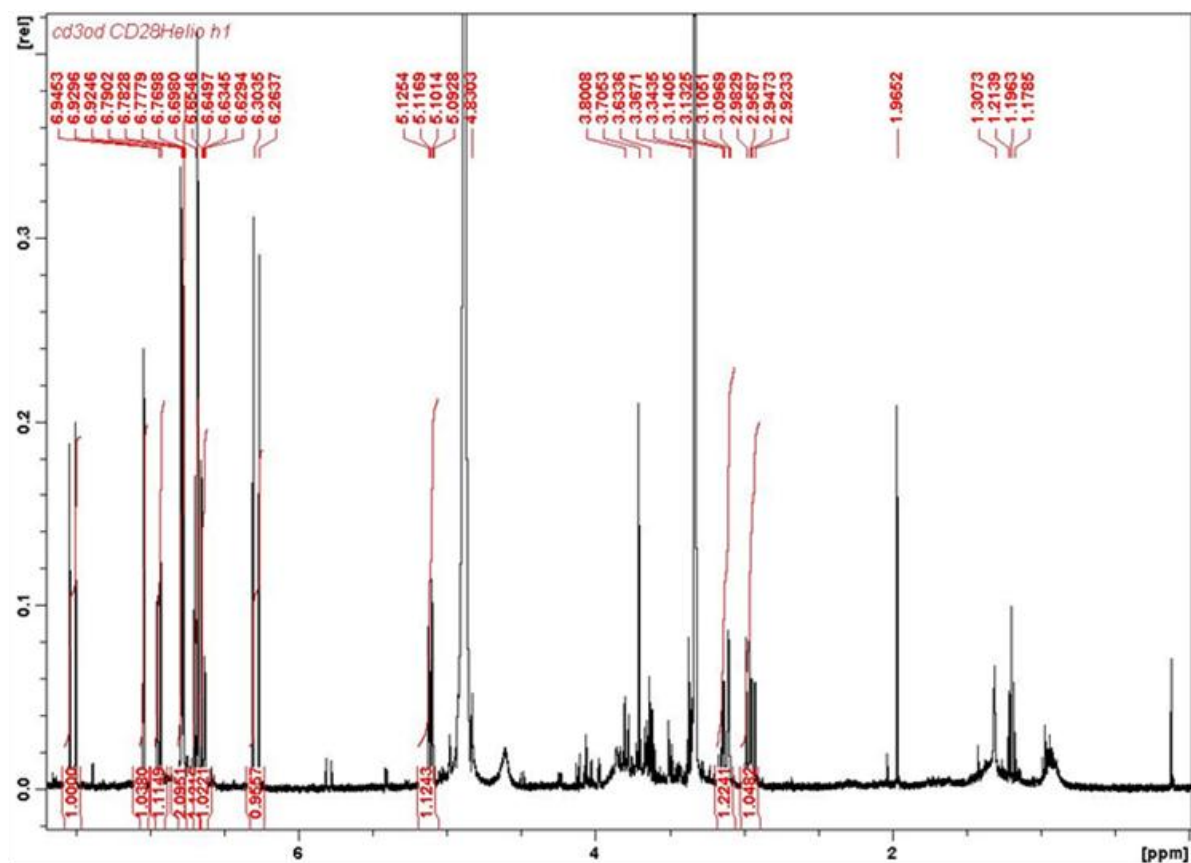
ANNEXE 5 : SPECTRES DE RMN ET DE MASSE

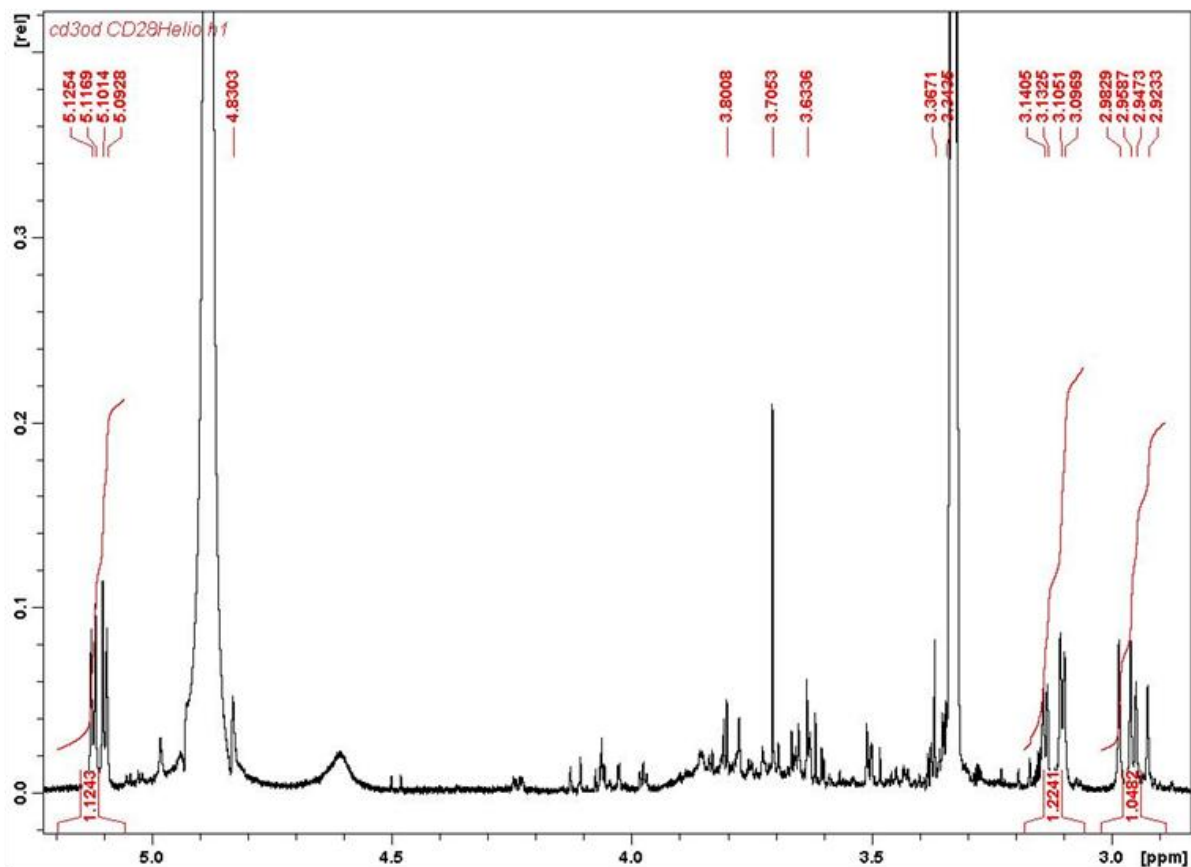
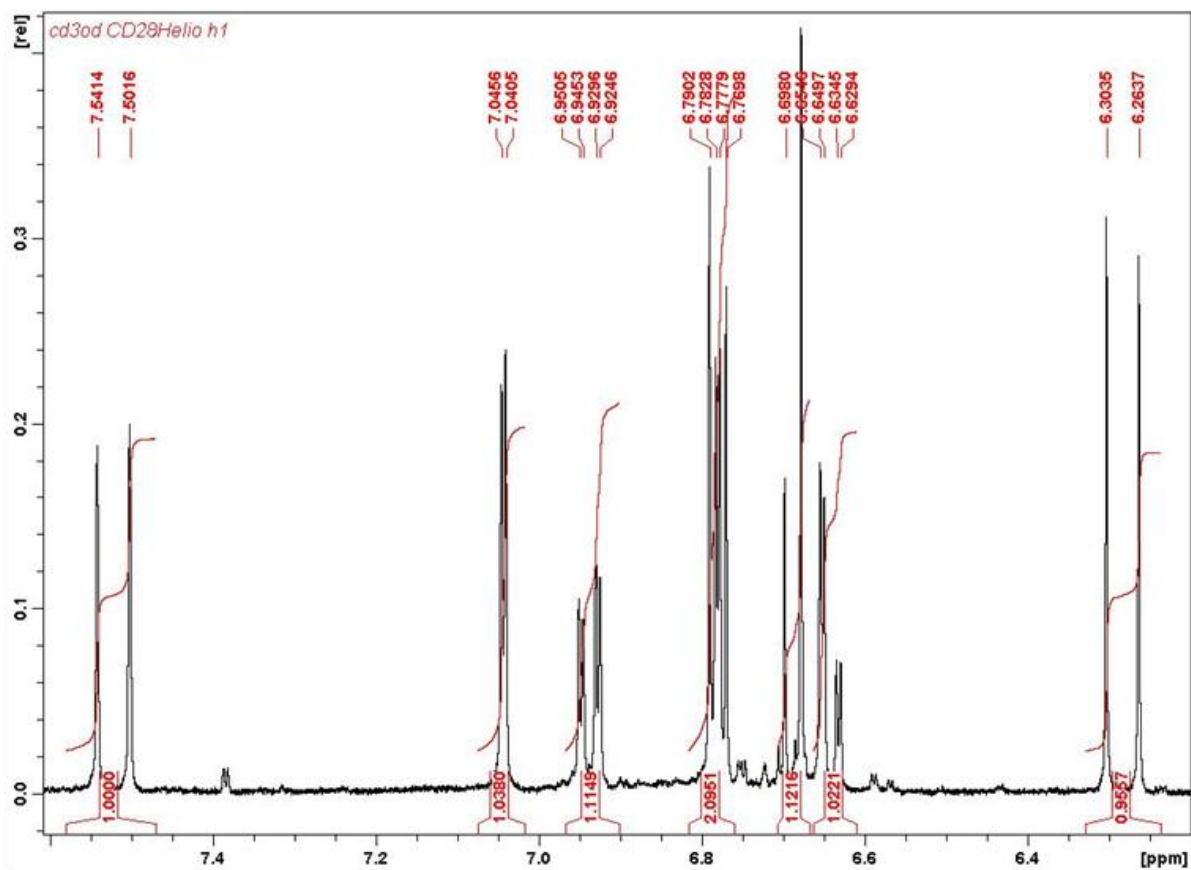
Spectres MS, MS/MS et MS de la quercitrine (1)



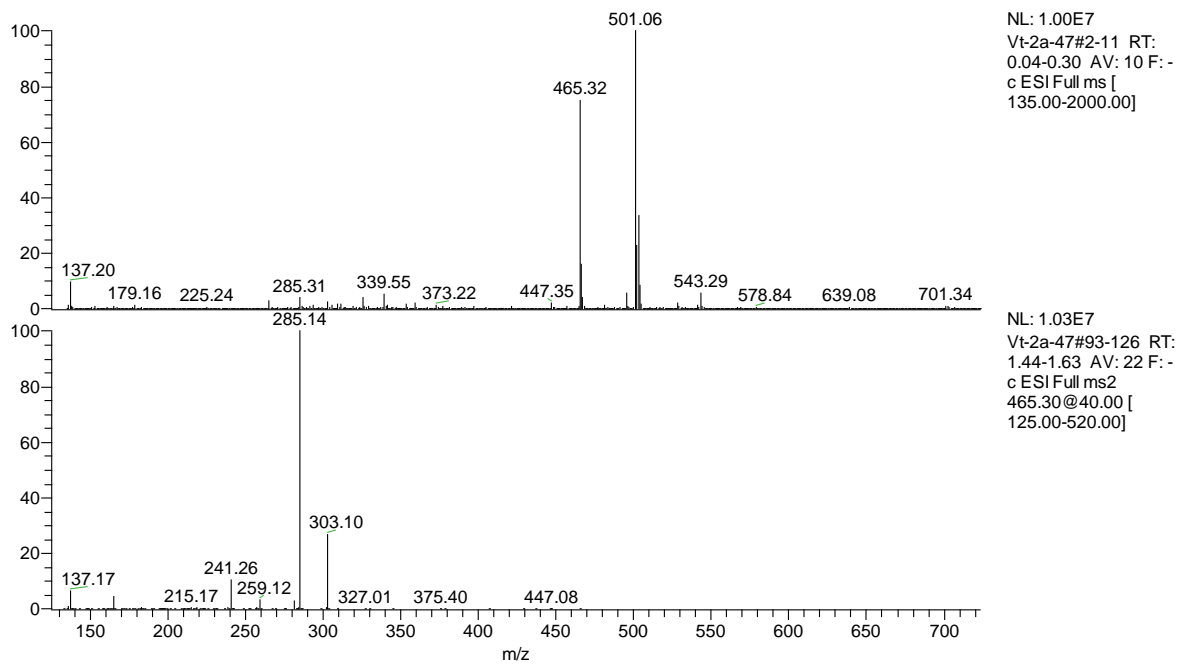
MS et MS/MS de l'acide rosmarinique (2)



Spectre ^{13}C de l'acide rosmarinique (2)Spectre ^1H général de l'acide rosmarinique (2)

Spectre ^1H zone des H aliphatiques de l'acide rosmarinique (2)Spectre ^1H zone des aromatiques de l'acide rosmarinique (2)

MS et MS/MS de l'agnuside (3)



L'ion à m/z 501 correspond à un adduit Cl sur l'agnuside.

KUMAR-ROINÉ Shilpa

Valorisation de remèdes traditionnels utilisés dans le traitement de la ciguatera dans le Pacifique

Résumé :

La ciguatera est une intoxication liée à l'ingestion de poissons de récif corallien devenus toxiques par l'accumulation d'une ou plusieurs neurotoxines d'origine dinflagellaire. Cet ichtyosarcotoxisme représente une des formes parmi les plus fréquentes d'intoxication dans les régions tropicales et subtropicales et se manifeste par une cohorte de symptômes complexes chez l'homme. Malgré les nombreuses connaissances acquises ces dernières dizaines d'années, la ciguatera, par ses aspects et conséquences multiples, reste à l'origine des fortes préoccupations environnementales, socio-économiques, sanitaires et nutritionnelles des populations insulaires du Pacifique. En effet, bien que la mortalité due à la ciguatera reste faible, la persistance et la récurrence de certains symptômes comme le prurit et l'évolution possible de la maladie vers une forme de fatigue chronique entraîne une importante morbidité chez les patients atteints. L'agent causal de la ciguatera, identifié comme étant une micro-algue du genre *Gambierdiscus*, produit les toxines incriminées, les ciguatoxines (CTXs) qui agissent principalement par fixation directe au site 5 du canal sodium voltage dépendant. Cependant, ce mode d'action n'explique pas tous les symptômes de la ciguatera, plus particulièrement les signes d'ordre inflammatoire.

La première partie de cette étude a ainsi consisté à mettre en évidence, l'action de la CTX-1B du Pacifique (P-CTX-1B) sur la surproduction d'oxyde nitrique (NO) via la modulation de son enzyme de synthèse, la NO synthétase inductible (iNOS), impliquant ainsi pour la première fois ce mécanisme pathogénique inflammatoire dans la ciguatera.

La deuxième partie concerne les travaux de l'évaluation de potentiel thérapeutique d'une trentaine d'extraits de plantes. En effet, la médecine occidentale reste peu efficace et symptomatique pour traiter durablement les patients souffrant de ciguatera. En Nouvelle-Calédonie où elle est dénommée « gratte », la ciguatera y est communément traitée par divers remèdes à base de plantes. Cette riche pharmacopée traditionnelle propose alors une alternative intéressante. La nécessité d'enrichir l'arsenal thérapeutique dans le traitement de la ciguatera nous a conduit à caractériser, d'une part, le potentiel anti-inflammatoire et d'autre part, le potentiel détoxifiant des extraits de plantes traditionnellement employées dans le Pacifique. Ainsi deux tests, test de Griess et test d'interaction ligand-récepteur, pratiqués sur cellules de macrophage de souris et les synaptosomes de cerveaux de rat ont été adaptés aux conditions matérielles du laboratoire et exploités pour les études de l'évaluation thérapeutique de plantes. Huit plantes ont été ainsi identifiées comme ayant des propriétés intéressantes.

La troisième partie décrit la sélection de trois de ces plantes et les études phytochimiques menées. Ces travaux ont conduit à l'identification de trois molécules : la quercitrine, l'acide rosmarinique et l'agnuside à partir respectivement des plantes *Euphorbia hirta* L., *Heliotropium foertherianum* Diane & Hilger et *Vitex trifolia* L. Cette thèse a abouti au dépôt d'un brevet sur l'activité détoxifiante de l'acide rosmarinique.

Mots clés :

Ciguatera, Ciguatoxine, Médecine traditionnelle, Plantes, Macrophage, Synaptosome, Oxyde nitrique, Oxyde nitrique synthétase inductible, Test, Lipopolysaccharide, Brévétaxine tritiée
