



**Méthode d'analyse en sécurité sanitaire des aliments**

**RÉFÉRENCE : ANSES / LSAiments / LSA-INS-0150 - Version 01**

**06/04/2016**

# Détection des ciguatoxines dans la chair de poisson par bioessai sur souris

**Laboratoire de Sécurité des Aliments de Maisons-Alfort**  
**Laboratoire National de Référence pour les Biotoxines Marines**

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété de l'Anses. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée, par exemple en faisant mention de sa référence (incluant sa version et année) et de son titre.



## Historique de la méthode

Une méthode peut être mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

*Une modification est considérée comme majeure* dès lors qu'elle concerne des parties clés ou le fond même de la méthode, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Une modification majeure induit en général des adaptations importantes. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation.

*Une modification est considérée comme mineure* si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Les caractéristiques de performance de la méthode ainsi améliorée ne sont pas modifiées; elle n'a pas fait l'objet d'une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode.

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
V00	-	28/06/2012	Version initiale de la Méthode Anses Maisons-Alfort CAT-NAT 10
V01	majeure	06/04/2016	Harmonisation au nouveau format de méthode ANSES Pesée du résidu liposoluble pouvant induire une étape de lavage supplémentaire (si > 150mg) Modification du tableau regroupant les résultats du bioessai souris et de l'interprétation du test



## **Avant-propos**

La présente méthode a été développée par :

**Anses - Laboratoire de Sécurité des Aliments de Maisons-Alfort**

Laboratoire National de Référence pour les Biotoxines Marines

Adresse : 14 rue Pierre et Marie Curie – 94701 Maisons-Alfort Cedex

Contact : [lnr.biotoxines.marines@anses.fr](mailto:lnr.biotoxines.marines@anses.fr)  
[marina.nicolas@anses.fr](mailto:marina.nicolas@anses.fr)



## Sommaire

<b>Avant-propos</b> .....	<b>3#</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>5#</b>
<b>Avertissements et précautions de sécurité</b> .....	<b>6#</b>
<b>1.# Objet et domaine d'application</b> .....	<b>7#</b>
<b>2.# Documents de référence</b> .....	<b>7#</b>
<b>3.# Termes, sigles et définitions</b> .....	<b>7#</b>
<b>4.# Principe de la méthode</b> .....	<b>8#</b>
<b>5.# Réactifs</b> .....	<b>9#</b>
<b>6.# Appareillage et matériels</b> .....	<b>10#</b>
<b>7.# Echantillons</b> .....	<b>11#</b>
<b>8.# Mode opératoire</b> .....	<b>11#</b>
<b>9.# Résultats</b> .....	<b>15#</b>
<b>10.# Caractéristiques de performance de la méthode</b> .....	<b>15#</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>16#</b>



## Introduction

La ciguatera est une intoxication alimentaire consécutive à la consommation de poissons coralliens ayant accumulé dans leur chair des ciguatoxines (CTX). Le syndrome clinique est dit polymorphe associant des signes cliniques à la fois digestifs, neurologiques, cutanés, cardio-vasculaires et respiratoires d'intensité variable. Il existe plusieurs groupes de CTX, classées en fonction des régions dans lesquelles elles sont présentes : P-CTX (Pacifique), C-CTX (Caraïbes) et I-CTX (Océan Indien).

Les ciguatoxines appartiennent à la famille des polyéthers. Elles ont pour cible le site 5 de la sous-unité alpha du canal sodium et leur fixation entraîne une augmentation de la perméabilité et de l'excitabilité membranaires, ce qui explique notamment les effets neurologiques qu'elles provoquent.

Les règlements (CE) N° 853/2004 et (CE) N° 854/2004/CE précisent que des contrôles doivent être effectués pour veiller à ce que les produits de la pêche contenant des biotoxines, telles que la ciguatera ou d'autres toxines dangereuses pour la santé humaine ne soient pas mis sur le marché. Toutefois, il n'existe pas de seuil réglementaire pour les ciguatoxines au niveau Européen.

L'Efsa a rendu un avis en 2010 mais n'a pas pu proposer de seuil de salubrité en raison du manque de données disponibles, aussi bien études toxicologiques chez l'animal que données épidémiologiques chez l'Homme.

La France est particulièrement touchée par la problématique de la ciguatera de par la présence de TIAC régulièrement rapportées dans certains DROM (notamment Réunion, Guadeloupe et Martinique).




## Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

Il est important :

- de porter une blouse, des lunettes de protection avec protections latérales et d'utiliser des gants adaptés à la manipulation de solvants.
- de manipuler sous une hotte ventilée : Les solvants utilisés sont toxiques et volatils.

 L'hexane est un CMR (risque H361f - Susceptible de nuire à la fertilité), il doit être utilisé avec précaution.

- de procéder à la décontamination à l'eau de javel à 3°C du matériel réutilisable ayant été en contact avec les échantillons ou les extraits. Le matériel à usage unique doit être éliminé dans les contenants pour Déchets issus des Activités de Soins à Risque Infectieux et Assimilés (DASRIA) appropriés.
- de bien informer le personnel ayant accès au laboratoire des risques et des précautions à prendre pour la manipulation des toxines.
- de bien identifier les zones du laboratoire où sont manipulés les échantillons toxiques. Ceux-ci doivent être étiquetés avec soin et stockés dans des enceintes thermostatées à accès limité.



## 1. Objet et domaine d'application

Cette méthode spécifie un protocole pour la détection des ciguatoxines dans la chair des poissons. Elle est applicable aux poissons à l'état frais, congelé ou cuisiné.

## 2. Documents de référence

- [1] Règlement (CE) N°854/2004 du parlement européen et du conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine Journal officiel de l'Union européenne L 139
- [2] Règlement (CE) N°853/2004 du parlement européen et du conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale
- [3] EFSA. Scientific Opinion of on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Ciguatoxin group. The EFSA Journal (2010), 8(6):1627
- [4] VERNOUX J.P., The mouse ciguatoxin bioassay : Directions for use to control fish for consumption. Memoirs of the Queensland Museum, 1994 08 01, 34(3): 625-629
- [5] Détection des ciguatoxines par bio essai sur souris, "Toxines d'algues dans l'alimentation" Editions AFSSA-IFREMER, p 456-458

## 3. Termes, sigles et définitions

DEE : DiethylEther  
RL : Résidu liposoluble  
CI : Contrôle interne



## 4. Principe de la méthode

Les ciguatoxines sont extraites par l'acétone à partir de 100 g d'homogénat de tissu. Après évaporation de l'acétone, la phase aqueuse résiduelle est extraite au diéthyléther. Une fois le diéthyléther évaporé, le résidu est solubilisé dans un mélange méthanol-eau. Une partition liquide-liquide avec l'hexane permet l'élimination des lipides non polaires. Enfin, le résidu obtenu après évaporation de la phase hydrométhanolique est repris dans de l'éthanol puis évaporé sous flux d'azote pour être repris dans 1 ml de solution de Tween 60 1% stérile.

La solution de Tween, contenant les ciguatoxines, est injectée à deux souris de 20g, recevant chacune 0,5 ml d'extrait en intra-péritonéal (soit l'équivalent de 50 g de chair). L'évaluation de la toxicité de l'échantillon est basée sur la mortalité des souris ou la perte de poids à 24 heures.





## 5. Réactifs

**Avertissement :** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Les réactifs et solvants utilisés sont au moins de qualité analytique.

**5.1.** Acétone 99,9 %

**5.2.** Diéthyléther DEE 99,9 %

**5.3.** Méthanol 80% (MeOH/H<sub>2</sub>O 80/20 v/v)

**5.4.** Hexane 99,4 %

**5.5.** Ethanol 96 % (v/v)

**5.6.** Solution stérile de Tween 60 à 1%

Il est recommandé de préparer la solution de Tween de la façon suivante :

- o préparer une solution à 1% de Tween 60 dans de l'eau distillée (poids/poids);
- o solubiliser sous agitation et sous chauffage doux le Tween;
- o aliquoter en flacons de petits volumes;
- o stériliser à 121°C pendant 15 min;
- o les aliquotes se conservent à 5° C ± 3°C pendant deux mois maximum.

Il convient de ramener le Tween à température ambiante avant solubilisation de l'extrait pour injection aux souris.

**5.7.** Souris blanches (souche Swiss) mâles d'une colonie standard pesant 20 ± 2 g

*Exemple:* IOPS OF1 18-20 g ou équivalent



## 6. Appareillage et matériels

**Avertissement :** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

- 6.1. Spatules, scalpel ou ciseaux ou couteau
- 6.2. Broyeur ménager ou homogénéiseur à couteaux (type Grindomix GM 200 <sup>TM</sup> [1])
- 6.3. Balance, avec une précision de 0,1 g
- 6.4. Homogénéisateur (Ultra Turrax <sup>TM</sup> [2] ou Polytron <sup>TM</sup> [3])
- 6.5. Centrifugeuse (pouvant atteindre 3000 g)
- 6.6. Pots à centrifuger de 50ml et 100 ml
- 6.7. Papier filtre Whatman n°114 ou équivalent
- 6.8. Erlenmeyers de 500 ml
- 6.9. Epruvettes graduées de 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml et 250 ml
- 6.10. Entonnoirs en verre borosilicaté de 7 cm et 12 cm de diamètre
- 6.11. Ballons de 100 ml, 250 ml, 500 ml et 1 l
- 6.12. Ampoules à décanter de 125 ml et 250 ml
- 6.13. Bêchers de 25 ml, 50 mL, 100 ml, 250 ml, 500 ml et 1 l
- 6.14. Fioles jaugées de 100 ml et 250 ml
- 6.15. Evaporateur rotatif
- 6.16. Pipettes automatique de précision (1000µl et 5000µl)
- 6.17. Billes de verre
- 6.18. Tubes en verre de 5 ml
- 6.19. Agitateur magnétique (type Vortex)
- 6.20. Bain sec chauffant à 40 ± 5°C, équipé d'une platine d'évaporation reliée à l'azote
- 6.21. Seringues stériles jetables de 1 ml avec aiguille courte

[1] [2] [3] Grindomix <sup>TM</sup>, Ultra Turrax <sup>TM</sup> et Polytron <sup>TM</sup> sont des exemples de matériel commercialement disponible. Cette information est donnée à titre d'exemple.



## 7. Echantillons

### 7.1. Conditions d'acceptation des échantillons

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou altéré lors du transport ou de l'entreposage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée.

### 7.2. Conservations des échantillons

Avant d'être analysés, les échantillons doivent être conservés à  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , si l'analyse est prévue dans les 48h. Sinon, les échantillons doivent être conservés à une température  $\leq -18^{\circ}\text{C}$ .

Les échantillons après analyse peuvent être conservés à une température  $\leq -18^{\circ}\text{C}$ . Les ciguatoxines sont stables dans le temps.

## 8. Mode opératoire

### 8.1. Préparation des échantillons pour analyse

Prélever les tissus à analyser en prenant soin d'éliminer le cartilage, la peau et les arrêtes et les broyer avec un mixeur ménager ou un homogénéiseur à couteaux jusqu'à obtention d'un broyat homogène.

#### 📄 Note 1

Les homogénats peuvent être conservés à une température  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse.

### 8.2. Extraction

Peser  $100,0 \pm 1,0$  g d'homogénat dans un erlen de 500 ml



### 8.2.1. Extraction à l'acétone

Ajouter 200 ml d'acétone à la prise d'essai puis homogénéiser à l'aide d'un homogénéisateur pendant 1 à 2 minutes.

Filtrer sur papier filtre (l'utilisation d'une pompe à vide est facultative) ou centrifuger à 3000g pendant 10 minutes.

Récupérer l'extrait acétonique dans un ballon d'évaporation de 1l.

Transférer le résidu dans l'erien initial de 500 ml et répéter l'extraction avec 200 ml d'acétone

Récupérer les 2 fractions acétoniques dans le même ballon.

#### 📖 Note 2

Pour éviter toute contamination croisée, changer de tige ou laver soigneusement la tige de l'Ultraturrax entre 2 échantillons.

### 8.2.2. Evaporation de l'acétone à $45 \pm 5^\circ\text{C}$

Evaporer les 400 ml d'acétone contenus dans le ballon. Pour cela, appliquer une pression permettant une évaporation régulière mais pas trop rapide de l'acétone (400 mbar environ) et diminuer progressivement la pression jusqu'à 70 mbar environ (Ne pas réduire d'avantage la pression pour éviter d'évaporer la phase aqueuse).



L'étape d'évaporation de l'acétone est délicate et exige une surveillance constante : le mélange d'acétone et d'eau est susceptible de mousser et former des jets de liquide qui refluent directement dans le ballon de condensation, ce qui induit des pertes conséquentes. D'où la nécessité de diminuer progressivement la pression.

## 8.3. Partition liquide-liquide DEE phase aqueuse

**8.3.1.** Si le volume de phase aqueuse est  $< 40$  ml, compléter jusqu'à 40 ml avec de l'eau distillée. Transférer la phase aqueuse dans une ampoule à décanter de 250 ml.

Ajouter 160 ml d'éther aux 40 ml de phase aqueuse (respecter un ratio DEE/phase aqueuse 4/1).

Réaliser la partition liquide-liquide et attendre la séparation nette des phases.

Récupérer la phase aqueuse (phase inférieure) dans un bécher de 100 ml pour la seconde partition au DEE.

Transférer la phase étherée obtenue (phase supérieure) dans un ballon de 500 ml.

Répéter la partition au DEE en lavant une seconde fois la phase aqueuse avec 160 ml de DEE.

Rassembler les 2 fractions DEE dans le ballon de 500 ml.



### 8.3.2 Evaporer la phase organique (DEE) à $45 \pm 5^\circ\text{C}$ à l'évaporateur rotatif.

Après obtention du résidu sec, il est important de vider le ballon de condensation et de descendre la pression à un niveau aussi bas que possible (quelques mbar) pendant 5 minutes environ afin d'éliminer toute trace de DEE.

## 8.4. Lavage à l'hexane

**8.4.1.** Reprendre le résidu sec dans 2 fois 10 ml de méthanol aqueux 80%. Transférer dans une ampoule à décanter de 125 ml.

Ajouter 40ml d'hexane.

Procéder au lavage en agitant doucement et attendre que la séparation entre l'hexane et la phase méthanolique 80% soit bien nette (en cas d'émulsion persistante, procéder à une centrifugation ou réfrigérer pour casser l'émulsion).

Récupérer la phase méthanolique 80% (phase inférieure) dans un bécher de 100 ml et éliminer la phase hexane supérieure.

Répéter le lavage à l'hexane en lavant une seconde fois la phase méthanolique 80% avec 40 ml d'hexane.

Recueillir la phase méthanolique 80% dans un ballon de 100 ml, préalablement taré.

### 8.4.2 Evaporer à sec la phase méthanolique à $45 \pm 5^\circ\text{C}$ à l'évaporateur rotatif

Evaporer la phase méthanolique 80% contenue dans le ballon. Pour cela, appliquer une pression permettant une évaporation régulière mais pas trop rapide du méthanol (280 mbar environ) et diminuer progressivement la pression jusqu'à 100 mbar environ (pression correspondant au début d'évaporation de la phase aqueuse). Il est recommandé d'ajouter quelques ml d'éthanol pour favoriser l'évaporation totale de l'eau.



L'étape d'évaporation de la phase méthanolique 80% est délicate et exige une surveillance constante : le mélange méthanol-eau est susceptible de mousser et former des jets de liquide qui refluent directement dans le ballon de condensation, ce qui induit des pertes conséquentes. D'où la nécessité de diminuer progressivement la pression.

Après obtention du résidu sec, il est important de vider le ballon de condensation et de descendre la pression à un niveau aussi bas que possible (quelques mbar) pendant 5 minutes environ afin d'obtenir un résidu le plus sec possible (un film translucide doit recouvrir la paroi du ballon).



#### 8.4.3 Peser le résidu sec obtenu, appelé Résidu Liposoluble (noté RL) ;

Si  $RL > 150$  mg, dissoudre le résidu dans 20 ml de méthanol à 80% et procéder à un autre lavage avec 2 fois 40 ml d'hexane, comme en 8. 4.

Evaporer de nouveau la phase méthanolique à  $45 \pm 5^\circ\text{C}$  à l'évaporateur rotatif

### 8.5. Reprise du résidu liposoluble

**8.5.1.** Le résidu est repris dans 3 à 5 ml d'éthanol à 96% (quantité suffisante pour reprendre la totalité du résidu) puis l'extrait éthanolique est transféré dans un tube en verre, préalablement taré. Le sécher sous flux d'azote dans un bain à sec chauffé à  $40 \pm 5^\circ\text{C}$ . Peser le tube contenant le résidu sec et calculer le poids de résidu sec.

#### 📄 Note 3

- L'utilisation de billes de verre ou d'un bain à ultrasons est recommandée pour favoriser la reprise du résidu.
- Au besoin, l'extrait éthanolique peut être stocké à une température  $\leq -18^\circ\text{C}$ .
- Il est conseillé de remplacer l'air par de l'azote avant de fermer le tube.

**8.5.2** Reprendre le résidu dans du Tween 60 à 1% stérile qsp 1 ml. Une fois solubilisé dans le Tween, l'extrait doit être injecté dans les 24 heures.

#### 📄 Note 4

Il est très important de laisser revenir l'extrait à température ambiante avant de l'injecter aux souris afin d'éviter la survenue de diarrhée.

### 8.6. Bio-essai sur souris

Afin de minimiser la variabilité inter-individuelle, il convient de respecter un délai d'acclimatation minimal de 12 heures avant injection (de préférence 24 heures avant injection). Pendant la durée de l'expérimentation, de l'eau et de la nourriture sont données ad libitum.

Noter le poids des souris.

Bien agiter l'extrait et injecter 0,5 ml d'extrait à chacune des 2 souris de  $20 \pm 2$  g. Observer les souris durant 24 heures. Il est recommandé d'observer si possible toutes les heures pendant les premières heures, puis de façon plus espacée ensuite.

Noter les symptômes observés tels que cyanose ou turgescence du pénis, dyspnées, diarrhées, piloérection, soubresauts,...

Noter l'heure de la mort dans le cas où des mortalités surviennent.

Peser les souris survivantes 24 heures après injection et calculer les pertes de poids (si observées)



## 9. Résultats

### 9.1. Contrôle de la validité des résultats

La validité des résultats est évaluée par l'analyse de contrôles internes. Les CI utilisés sont des échantillons non contaminés (CI négatif) ou naturellement contaminés (CI positif) dont la toxicité a été évaluée au préalable au laboratoire. Un contrôle interne (CI) au moins doit être intégré à chaque série d'analyses.

### 9.2. Evaluation de la toxicité

Le test par bioessai sur souris s'interprète suivant le tableau ci-dessous :

Nombre de souris morte(s) en 24 h	Perte de poids > 5% 24 h après injection (pour au moins 1 souris sur 2)	Conclusion
2/2	/	POSITIF Non comestible
1/2		POSITIF Non comestible
0/2	oui	POSITIF Limite de comestibilité
	non	NEGATIF Comestible

- La mort de 1 ou 2 souris dans les 24 heures est interprétée comme un résultat positif pour la présence de ciguatoxines (non comestible).
- En l'absence de mortalité, une perte de poids supérieure à 5% 24 heures après injection d'au moins une souris permet également de conclure à un échantillon positif (limite de comestibilité).
- Sans mortalité ni perte de poids, l'échantillon est déclaré négatif (comestible).

## 10. Caractéristiques de performance de la méthode

Cette méthode, par sa nature (qualitative et détection par bio essai) ne peut pas être caractérisée pour des performances telles que, par exemple, la spécificité, la justesse ou le rendement.

La fiabilité de la méthode a pu être contrôlée à partir de résultats obtenus sur des échantillons de poissons naturellement contaminés ou exempts de ciguatoxines dans des conditions de fidélité intermédiaire et de reproductibilité respectivement en intralaboratoire et interlaboratoires.



## Bibliographie

- 1 BOADA et al., Ciguatera fish poisoning on the West Africa Coast: An emerging risk in the Canary Islands (Spain). *Toxicon*. 2010 Dec; 56(8):1516-9
- 2 YASUMOTO T., MURATA M. Polyether toxins involved in seafood poisoning. *Am. Chem. Soc.* 1990; 120-132