



**HAL**  
open science

# Clitocybe amœnolens : plusieurs enquêtes et toujours un mystère

Cécile Chauvin

► **To cite this version:**

Cécile Chauvin. Clitocybe amœnolens : plusieurs enquêtes et toujours un mystère. Sciences pharmaceutiques. 2006. dumas-01738386

**HAL Id: dumas-01738386**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01738386v1>**

Submitted on 20 Mar 2018

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

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

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :  
[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



1<sup>er</sup> exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2006

N° 7021

**CLITOCYBE AMÆNOLENS : PLUSIEURS ENQUETES  
ET TOUJOURS UN MYSTERE !**

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE  
- DIPLOME D'ETAT -

**CHAUVIN CECILE**

[Données à caractère personnel]

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

**Le 19 Mai 2006**

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

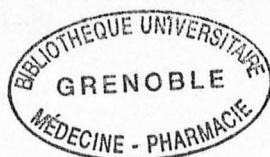
Président du Jury : Mr Vincent DANEL, Professeur de Toxicologie

Membres : Mme Anne-Marie MARIOTTE, Professeur de Pharmacognosie

Mme Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA, Maître de conférence en Pharmacognosie

Mr Philippe SAVIUC, Médecin hospitalier

*La faculté de pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2006

N° :

**CLITOCYBE AMÆNOLENS : PLUSIEURS ENQUETES  
ET TOUJOURS UN MYSTERE !**

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE  
DIPLOME D'ETAT

**CHAUVIN CECILE**

[Données à caractère personnel]

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le 19 Mai 2006

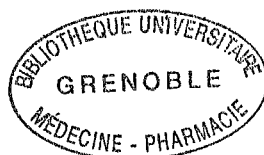
DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Président du Jury : Mr Vincent DANEL, Professeur de Toxicologie

Membres :

- Mme Anne-Marie MARIOTTE, Professeur de Pharmacognosie
- Mme Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA, Maître de conférence en Pharmacognosie
- Mr Philippe SAVIUC, Praticien hospitalier

*La faculté de pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : M. le Professeur P. DEMENGE  
Vice-Doyenne : Mme A. VILLET

**PROFESSEURS DE PHARMACIE**

|                       |            |  |
|-----------------------|------------|--|
| <b>BAKRI</b>          | Abdelaziz  | Pharmacie Galénique                          |
| <b>BURMEISTER</b>     | Wilhelm    | Biophysique                                  |
| <b>CALOP</b>          | Jean       | Pharmacie Clinique et Bio-Technique          |
| <b>DANEL</b>          | Vincent    | Toxicologie                                  |
| <b>DECOUT</b>         | Jean-Luc   | Chimie Bio-Inorganique                       |
| <b>DEMENGE</b>        | Pierre     | Physiologie / Pharmacologie                  |
| <b>DROUET</b>         | Emmanuel   | Immunologie / Microbiologie / Biotechnologie |
| <b>FAVIER</b>         | Alain      | Biochimie / Biotechnologie                   |
| <b>GOULON</b>         | Chantal    | Biophysique                                  |
| <b>GRILLOT</b>        | Renée      | Parasitologie                                |
| <b>LECLERC</b>        | Gérard     | Chimie Organique                             |
| <b>MARIOTTE</b>       | Anne-Marie | Pharmacognosie                               |
| <b>PEYRIN</b>         | Eric       | Chimie Analytique                            |
| <b>RIBUOT</b>         | Christophe | Physiologie / Pharmacologie                  |
| <b>ROUSSEL</b>        | Anne-Marie | Biochimie                                    |
| <b>SEIGLE-MURANDI</b> | Françoise  | Botanique et Cryptogamie                     |
| <b>STEIMAN</b>        | Régine     | Biologie Cellulaire                          |
| <b>WOUESSIDJEW</b>    | Denis      | Pharmacie Galénique                          |

**PROFESSEUR ASSOCIE (PAST)**

|                |         |                    |
|----------------|---------|--------------------|
| <b>CHAMPON</b> | Bernard | Pharmacie Clinique |
|----------------|---------|--------------------|

## MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE

|                                 |                 |  |
|---------------------------------|-----------------|--|
| <b>ALDEBERT</b>                 | Delphine        | Parasitologie                              |
| <b>ALLENET</b>                  | Benoit          | Pharmacie Clinique                         |
| <b>BARTOLI</b>                  | Marie-Hélène    | Pharmacie Clinique et Biotechn.            |
| <b>BOUMENDJEL</b>               | Ahcène          | Pharmacognosie                             |
| <b>BRETON</b>                   | Jean            | Parasitologie                              |
| <b>CHOISNARD</b>                | Luc             | Pharmacotechnie et génie de la formulation |
| <b>DELETRAZ</b>                 | Martine         | Droit Pharmaceutique Economie              |
| <b>DEMEILLERS</b>               | Christine       | Biochimie                                  |
| <b>DESIRE</b>                   | Jérôme          | Chimie Bioorganique                        |
| <b>DIJOUX-FRANCA</b>            | Marie-Geneviève | Pharmacognosie                             |
| <b>DURMORT-MEUNIER</b>          | Claire          | Virologie                                  |
| <b>ESNAULT</b>                  | Danielle        | Chimie Analytique                          |
| <b>FAURE</b>                    | Patrice         | Biochimie                                  |
| <b>FAURE-JOYEUX</b>             | Marie           | Physiologie-Pharmacologie                  |
| <b>FOUCAUD-GAMEN</b>            | Jacqueline      | Immunologie                                |
| <b>GEZE</b>                     | Annabelle       | Pharmacotechnie Galénique                  |
| <b>GERMI</b>                    | Raphaële        | Bactériologie                              |
| <b>GILLY</b>                    | Catherine       | Chimie Thérapeutique                       |
| <b>GODIN-RIBUOT</b>             | Diane           | Physiologie – Pharmacologie                |
| <b>GROSSET</b>                  | Catherine       | Chimie Analytique                          |
| <b>GUIRAUD</b>                  | Pascale         | Biologie Cellulaire et Génétique           |
| <b>HININGER-FAVIER</b>          | Isabelle        | Biochimie                                  |
| <b>KRIVOBOK</b>                 | Serge           | Botanique – Cryptogamie                    |
| <b>MORAND</b>                   | Jean-Marc       | Chimie Thérapeutique                       |
| <b>NICOLLE</b>                  | Edwige          | Chimie Organique / Chimie Thérapeutique    |
| <b>PINEL</b>                    | Claudine        | Parasitologie                              |
| <b>RAVEL</b>                    | Anne            | Chimie Analytique                          |
| <b>RAVELET</b>                  | Corinne         | Chimie Analytique                          |
| <b>RIONDEL</b>                  | Jacqueline      | Physiologie - Pharmacologie                |
| <b>SEVE</b>                     | Michel          | Ens. Physique / Rech. Biochimie            |
| <b>TARBOURIECH</b>              | Nicolas         |  |
| <b>VANHAVERBEKE</b>             | Cécile          | Chimie Bio-Inorganique                     |
| <b>VILLEMAIN</b>                | Danielle        | Mathématiques / Informatique               |
| <b>VILLET</b>                   | Annick          | Chimie Analytique                          |
| <b>PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG)</b> |                 |  |
| <b>ROUTABOUL</b>                | Christel        | Chimie Générale                            |

# Table des Matières

|   |           |
|---|-----------|
| <b>REMERCIEMENTS</b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>1 INTRODUCTION</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>2 HISTOIRE DE L'INTOXICATION</b> .....                                 | <b>10</b> |
| <b>3 ACROSYNDROMES VASCULAIRES ET ÉRYTHERMALGIE</b> .....                 | <b>14</b> |
| <b>4 PREMIÈRE ENQUÊTE : CHERCHER LA CAUSE DE L'INTOXICATION</b> .....     | <b>16</b> |
| <b>5 SECONDE ENQUÊTE : INVESTIGATION MYCOLOGIQUE</b> .....                | <b>21</b> |
| 5.1 Description mycologique du champignon savoyard .....                  | 22        |
| 5.2 Toxicité de <i>Clitocybe amœnolens</i> .....                          | 25        |
| 5.2.1 <i>Expérimentation chez le rat</i> .....                            | 25        |
| 5.2.2 <i>Développement d'un modèle animal</i> .....                       | 26        |
| <b>6 TROISIÈME ENQUÊTE : MOLÉCULE(S) COUPABLE(S) ?</b> .....              | <b>28</b> |
| 6.1 Etude de l'Acide Acromélique A (AAA).....                             | 31        |
| 6.1.1 <i>Etude chimique</i> .....   | 31        |
| 6.1.1.1 <i>Obtention d'extraits de Clitocybe Amœnolens</i> .....          | 31        |
| 6.1.1.2 <i>Dosage de l'Acide Acromélique A (AAA) par CLHP-SM</i> .....    | 33        |
| a) Matériel et Méthode.....   | 33        |
| b) Résultats.....   | 39        |
| 6.1.1.3 <i>Purification et dosage de l'AAA à partir du dialysat</i> ..... | 40        |
| a) Matériel et Méthode.....   | 41        |
| b) Résultats.....   | 45        |
| 6.1.2 <i>Etude toxicologique</i> .....                                    | 46        |
| a) Matériel et Méthode.....   | 46        |
| b) Résultats.....   | 50        |
| 6.2 Etude chimique de la $\beta$ -cyano-L-alanine.....                    | 52        |
| a) Matériel et Méthode.....   | 52        |
| b) Résultats.....   | 57        |
| <b>7 DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....                                | <b>59</b> |
| <b>8 CONCLUSION</b> .....   | <b>61</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....  | <b>65</b> |
| <b>ANNEXES</b> .....  | <b>72</b> |
| <b>SERMENT DES APOTHICAIRES</b> .....                                     | <b>83</b> |

## Liste des Figures

|   |    |
|---|----|
| Figure 1: Photographie des champignons savoyards.....   | 22 |
| Figure 2 : Formules chimiques des acides acroméliques A et B .....  | 31 |
| Figure 3 : Schéma d'extraction de <i>C. amœnolens</i> .....   | 32 |
| Figure 4 : Schéma d'un montage de CLHP .....  | 33 |
| Figure 5 : Principe de l'ionisation par une source de type TurboIonSpray®.....  | 35 |
| Figure 6 : Analyseur de masse quadripolaire.....  | 36 |
| Figure 7 : Structure de l'acide kaïnique et de l'acide domoïque.....  | 38 |
| Figure 8 : Chromatogrammes de l'ion de quantification $[M-H]^-$ m/z 309, correspondant à l'AAA enregistré pour le surnageant, le dialysat et le retentat..... | 39 |
| Figure 9 : Le mécanisme d'adsorption .....  | 41 |
| Figure 10 : Le mécanisme de l'exclusion / diffusion .....   | 43 |
| Figure 11 : Mécanisme de l'échange d'ions.....  | 44 |
| Figure 12 : Schéma d'un montage de CPG .....  | 53 |
| Figure 13 : Schémas d'extraction d' <i>Agaricus bisporus</i> et de <i>Lepista inversa</i> .....   | 57 |

## Liste des Tableaux

|   |    |
|---|----|
| Tableau I: Concentration d'AAA calculée dans les différents extraits.....   | 40 |
| Tableau II : Concentration en AAA dans les différentes fractions purifiées obtenues par les différentes méthodes..... | 45 |
| Tableau III: Ions de quantification et de confirmation de la norvaline, de la norleucine et de la BCLA.....           | 56 |
| Tableau IV: Dosage de la BCLA dans différentes espèces.....   | 57 |



## **REMERCIEMENTS**

Je remercie le Professeur Vincent Danel, chef de l'unité de Toxicovigilance du CHU de Grenoble et le Docteur Philippe Saviuc pour avoir proposé ce sujet passionnant, coordonné cette étude, ainsi que pour leur rôle de médiateurs entre les différents laboratoires.

Je remercie le Pr Anne-Marie Mariotte, responsable du laboratoire de Pharmacognosie au sein du Département de Pharmacochimie Moléculaire, pour m'avoir chaleureusement accueillie au sein de son équipe.

Je remercie tout particulièrement le Dr Marie-Geneviève Dijoux-Franca pour sa disponibilité, sa gentillesse et son encadrement scientifique tout au long de cette étude.

Je remercie le Pr Germain Bessard, chef du laboratoire de Pharmacologie et d'analyse toxicologiques du CHU de Grenoble, pour m'avoir accueillie dans son service et permettre à de tels travaux d'être effectués au sein de son laboratoire.

Je remercie vivement le Dr Jeannine Bessard, pour ses connaissances et sa rigueur scientifique, sa bonne humeur et son enthousiasme vis-à-vis de cette étude.

Je remercie le Pr François Coudoré, responsable du laboratoire de Toxicologie de l'UFR de Pharmacie de Clermont-Ferrand, pour m'avoir accueillie en tant qu'observatrice au sein de son équipe. Je tiens à remercier le Dr Nicolas Authier pour avoir supervisé les tests biologiques et Bing, Isabelle et Sébastien pour les avoir effectués tout en m'initiant à l'expérimentation animale. Un grand merci à tous pour leur accueil convivial.

Merci à ma famille : à tous mes parents, à mes frères et mes grand-mères pour leur soutien dans mes études et dans ma vie. Merci également à eux pour m'avoir initiée à la cueillette des champignons, depuis mon plus jeune âge !

Merci à Raphaël pour son amour (et pour la mise en page !).

Merci à mes amis pour... leur amitié !

Merci à toutes les personnes qui m'on soutenu et aidé durant mes études :

Merci à Florence Grillot, sans qui je n'aurais sans doute pas « fait pharma » !

Merci à Christine Lefournier, pour son enthousiasme vis à vis de la pharmacie, enthousiasme qu'elle transmet lors des stages !

Merci à Marc Desgagné, durant mon année à Québec et... à mon retour !

Merci à Claude Andary, au cours de mon DESS à Montpellier.

Merci à Bernard Fabre et surtout un grand Merci à Christelle Fiorini-Puybaret, au cours de mon stage de fin d'études ainsi que pour leur aide lors de mon embauche.

Merci à Sergio Bessaye pour mes voyages en Afrique passés... et futurs !

*« Le tout est plus grand que la somme des parties »*

Blaise Pascal

(et Jean-Marie Pelt !)

# **1 INTRODUCTION**

Au cours de ma cinquième année hospitalo-universitaire, j'ai suivi la filière Recherche. Le sujet d'étude qui m'a été confié s'intègre à plusieurs autres enquêtes menées suite à une intoxication ayant eu lieu il y a maintenant dix ans, en Savoie.

Une première enquête avait fait suite à cette intoxication et concluait que c'était la consommation d'un champignon qui entraînait le syndrome rare observé: l'érythermalgie.

Une seconde et laborieuse enquête avait permis d'identifier formellement ce champignon : *Clitocybe amœnolens*.

Mon sujet d'étude visait à définir la nature chimique des molécules responsables du syndrome observé lors de l'ingestion de *C. amœnolens*.



## **2 HISTOIRE DE L'INTOXICATION**

Tout a commencé en septembre 1996 à Lanslebourg (Vallée de la Maurienne, Haute Savoie) (*Saviuc P., 2003*). Un « vacancier » un peu étrange fréquente depuis de nombreuses années le centre international de séjour de Val-Cenis. Il a pour habitude de partir le matin, de se promener dans les environs, de ramasser des champignons puis de regagner le centre le soir. Le 9 septembre 1996, lors d'une promenade en lisière de forêt de mélèzes, à 1500 mètres d'altitude, il ramasse plusieurs kilos de champignons « qu'il connaît bien ». Il offre ensuite sa cueillette de « clitocybes renversés » et de « rosés des prés » à trois familles du centre :

- La première famille, méfiante ne consomme que les champignons qu'elle connaît, c'est à dire les « rosés des prés ». Personne ne présente de symptôme.

- La deuxième famille fait deux repas de champignons des deux espèces.

- Le père, un homme de 40 ans présente le jour suivant, au niveau des pieds, des fourmillements qui vont régresser en quelques jours ; il va tout de même travailler durant quelques jours à son bureau, en baignant ses pieds dans une cuvette d'eau glacée : le seul moyen d'atténuer ses symptômes.

- Sa femme, âgée de 32 ans ressent des picotements et fourmillements des pieds, avant que n'apparaissent des douleurs nocturnes intenses, résistantes aux antalgiques et aux analgésiques (Dafalgan® : paracétamol ; Lamaline® : paracétamol + opium + caféine), qui vont diminuer en 8 jours. Cette patiente est admise à l'hôpital de Saint-Jean-de-Maurienne.

L'un des médecins contacte le centre anti-poison de Grenoble et le Docteur Philippe Saviuc a, compte tenu des connaissances d'alors, écarté la possible relation entre les signes présentés et l'éventuelle responsabilité d'un champignon : « Cherchez une autre cause ! ».

Cette patiente est ensuite vue en consultation au CHU par un médecin interniste et spécialiste des maladies des vaisseaux : il va conclure à une érythermalgie. Ces symptômes vont persister jusqu'en janvier 1997 soit 5 mois après l'ingestion des champignons.

- Leur enfant de 3 ans « ne sent plus ses pieds », présente quelques douleurs et guérit plusieurs jours après. Il va rester très marqué et va se déplacer sur ses coudes et ses genoux pendant quelques semaines.

- Leur petite fille de 4 mois est nourrie au sein. Le sevrage est décidé à la 24<sup>ème</sup> heure, donc après plusieurs tétées : elle n'a présenté aucun symptôme.

• La troisième famille a aussi consommé les deux espèces.

- La femme âgée de 32 ans se plaint d'engourdissement des orteils ; ces derniers sont douloureux à la pression. La symptomatologie persiste plusieurs semaines, en partie contrôlée par le Rivotril® (clonazépan). Une approche homéopathique est également initiée avec *Mercurius* car l'on sait que l'intoxication chronique par le mercure, notamment chez l'enfant, est responsable d'une « acrodynie mercurielle » (douleur des extrémités).

- Sa fille de deux ans n'a pas consommé de champignons : elle n'a présenté aucun symptôme.

- Son mari âgé de 35 ans a dégusté deux pleines assiettes des deux espèces. C'est lui qui a consommé la plus grande quantité de champignons et c'est lui qui va avoir les symptômes les plus importants et les plus durables. Il présente 24 heures après l'ingestion des fourmillements puis des brûlures douloureuses au niveau des membres supérieurs et surtout inférieurs. Des douleurs nocturnes intenses, paroxystiques se manifestent dans un deuxième temps. Elles sont

aggravées par la chaleur et la mobilisation, et sont diminuées par le froid (il trempe ses membres douloureux dans une bassine d'eau glacée). Elles empêchent le sommeil et durent deux à trois heures. Un œdème les accompagne. Les médicaments successivement prescrits sont sans effet : Sermion® (nicergoline), Vasobral® (dihydroergocryptine + caféine), Tégrétol® (carbamazépine), Minipress® (prazosine). L'aspirine conseillée n'a pas été prise.

Après trois semaines d'évolution, l'aggravation des symptômes (douleurs intenses toutes les trente minutes !) nécessite l'hospitalisation au CHU de Grenoble. A l'admission, l'intoxiqué présente un œdème remontant jusqu'au dessus des chevilles, dur, rouge, chaud avec une hypersudation, sans trouble trophique. Le bilan biologique ne montre rien d'autre qu'un syndrome inflammatoire modéré : il n'y a pas de signe biologique d'une maladie systémique.

Les analyses toxicologiques suivantes réalisées à la troisième semaine s'avèrent négatives :

- Recherche de plomb, d'arsenic et de mercure dans le sang et les cheveux ;
- Recherche de mercure dans les urines après provocation par le DMSA (Succicaptal®) qui est un chélateur de métaux utilisé pour provoquer la mobilisation de métal éventuellement stocké dans l'organisme ;
- L'analyse en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse n'a permis d'identifier que les molécules relatives du traitement en cours.

La symptomatologie était très partiellement contenue par l'association d'aspirine, d'Anafranil® (clomipramine) et morphine. Le patient est sorti lorsque l'œdème et les douleurs ont diminué, après onze jours d'hospitalisation. Le diagnostic retenu était une érythermalgie d'origine probablement toxique. Le même traitement médicamenteux a été poursuivi en ambulatoire. Une électromyographie effectuée à la 11<sup>ème</sup> semaine montre une discrète polyneuropathie périphérique, atteignant la fibre sensitive et motrice, et prédominante sur les muscles suraux.

Le neurologue a conclu que la symptomatologie était probablement en rapport avec une atteinte des fibres neurovégétatives qui ne pouvait pas être objectivée avec l'électromyographie. Au troisième mois d'évolution, le patient a encore recours aux antalgiques majeurs. Au sixième mois, des sensations douloureuses sont encore présentes, augmentées au contact de la chaleur, en avion, et lors du port de chaussures serrées. Avec dix ans de recul, des sensations de fourmillements douloureux persistent.



### **3 ACROSYNDROMES VASCULAIRES ET** **ÉRYTHERMALGIE**

Le terme « acrosyndromes vasculaires » regroupe l'ensemble des tableaux cliniques intéressant les extrémités et consécutifs à une anomalie de la microcirculation distale. Ces acrosyndromes se manifestent par des modifications de la couleur, de la température ou de la trophicité des téguments (*Guerville V., 2000*).

On retrouve deux types d'acrosyndromes vasculaires :

Les acrosyndromes dystoniques (dont le syndrome de Raynaud et l'érythermalgie) induits par une réactivité inadaptée à l'environnement thermique, ils sont réversibles.

Les acrosyndromes trophiques (nécroses distales et engelures) qui s'accompagnent de signes de souffrance tissulaire, conséquences de perturbations circulatoires distales ischémiques.

L'érythermalgie (du grec : *ery-* : rouge, *thermo-* : chaleur, *algos-* : douleur) est un acrosyndrome vasculaire paroxystique rare, primitif ou secondaire, qui s'oppose point par point au phénomène de Raynaud (*Lazareth I et al., 1988*). L'érythermalgie s'observe à tout âge, y compris chez l'enfant. C'est sans doute le plus douloureux des acrosyndromes vasculaires. Le plus souvent déclenchée par l'exposition au chaud (repos sous une couverture, port de chaussures ou de gants, proximité d'une source de chaleur), l'érythermalgie est la conséquence d'une vasodilatation de l'artériole distale, accompagnée d'une augmentation du flux sanguin capillaire.

L'érythermalgie évolue par crises douloureuses touchant plus souvent les pieds que les mains, l'hyperhémie se traduit cliniquement par l'apparition d'extrémités rouges, chaudes, œdémateuses et douloureuses à type de brûlures intenses ou de sensation de broiement. Les crises douloureuses sont de durée variable, allant de plusieurs minutes à quelques heures, elles sont calmées par l'exposition au froid (bains d'eau glacée).

Entre les crises, les extrémités sont normales en dehors de fissures ou de crevasses, qui peuvent apparaître lorsque les immersions en eau froide sont répétées.

Les formes primitives d'érythermalgie sont sporadiques ou familiales. L'érythermalgie secondaire, encore plus rare et accompagne le plus souvent une thrombocytose.

L'érythermalgie peut également avoir une origine toxique. Des érythermalgies ont en effet été rapportées avec plusieurs médicaments : inhibiteurs calciques (nifédipine (Adalate®), nicardipine (Loxen®), vérapamil (Isoptine®)), avec la bromocriptine (Parlodel®) et le pergolide.

## **4 PREMIÈRE ENQUÊTE :** **CHERCHER LA CAUSE DE L'INTOXICATION**

Reprenons :

Cinq intoxications : tous ont consommé des «*Lepista inversa*» et présentent les mêmes symptômes : le délai entre l'ingestion et l'apparition des symptômes est identique, la symptomatologie est identique et semble être dose-dépendante, l'évolution est comparable...

Et tous ceux qui n'ont pas consommé cette espèce sont indemnes !

MAIS, les signes caractéristiques d'une intoxication par les champignons sont absents (troubles digestifs, troubles hépato-rénaux). De plus, les espèces supposées ingérées ne sont pas connues comme toxiques et les symptômes observés n'étaient pas connus comme pouvant être mis en relation avec une intoxication par des champignons !! (*Saviuc P et al., 2001*)

**« Nous voici devant un beau mystère ! »**

L'enquête étiologique initiale avait été confiée au Dr Anne Claustre (*Claustre A. et al., 1998*).

Diverses hypothèses avaient été avancées :

- Mise en cause du mastic utilisé lors des travaux engagés dans les habitations mitoyennes des deux familles intoxiquées ;
- Contamination de l'eau de distribution publique (plomb) ;
- Contamination de l'environnement par un insecticide concentré dans les champignons ;
- Contamination de l'alimentation par de l'ergot de seigle.

Les enquêtes environnementales, toxicologiques et cliniques s'étaient révélées négatives : contrôle de la qualité de l'eau auprès de le DDASS, teneur en plomb notamment, toxicité des composants du mastic, mesure des cholinestérases...

En dehors de certains médicaments et du mercure, aucune substance toxique ne pouvait provoquer un acrosyndrome. Nombreux sont ceux qui ont pensé à l'ergot de seigle. En fait, les symptômes de l'érythermalgie correspondent à une vasodilatation de la microcirculation avec comme conséquence une hyperhémie qui s'exprime par la rougeur locale et la sensation de chaud, alors que les alcaloïdes vasoconstricteurs de l'ergot de seigle sont eux responsables d'une hypoperfusion tissulaire qui s'exprime par une coloration blanche de la peau, en réponse à l'ischémie.

L'une des parties de l'enquête a concerné le ramasseur lui-même. Au centre de séjour de Lanslebourg, il était uniquement en contact avec l'ancien directeur décédé accidentellement par noyade l'année précédente...

Il correspondait toujours par téléphone et réglait ses frais de séjour en argent liquide.

En résumé : il n'était pas localisable.

Au moins deux reprises cependant, des contacts téléphoniques ont été possibles. Le ramasseur s'est présenté alors comme berger ou comme employé ONF, disait résider dans les Pyrénées. Pour atténuer sa responsabilité, le ramasseur avait impliqué la proximité d'une décharge voire une contamination de l'environnement par des phytosanitaires... D'ailleurs ce type d'intoxication avait déjà été décrit justement après l'ingestion de *Lepista inversa* (**Becker G., 1975**). Ces hypothèses n'ont pas été retenues, car le lieu de la cueillette n'était pas connu avec précision du fait des versions divergentes proposées par le ramasseur.

Il aurait en outre été aperçu à quelques réunions de la Société Mycologique de France à Paris et peut-être même au stage de mycologie alpine qui s'était déroulé à Lanslebourg quelques jours avant le début de cette histoire.

### **Le tournant de cette enquête**

L'hypothèse de la responsabilité d'un champignon dans l'apparition de symptômes aussi particuliers a été renforcée par deux événements :

- L'infirmière qui réalisait les soins à domicile nécessités par l'état de l'intoxiqué le plus sévèrement atteint a eu le souvenir d'une situation analogue, à Bessans (à 15 kms dans la même vallée) : une mère et sa fille avaient été intoxiquées en 1979 après avoir consommé deux repas consécutifs de « Clitocybes » gelés non déterminés. Elles avaient été hospitalisées à Lyon. La mère, âgée de 58 ans, avait présenté 24 heures après l'ingestion, une sensation de brûlure (comme « un ongllet ») des mains et des pieds, évoluant par paroxysmes, empêchant la marche (sensation d'aiguilles plantées dans la plante des pieds) avec un discret oedème. Cette symptomatologie était résistante aux antalgiques. L'électromyographie réalisée à la troisième semaine, montrait une discrète atteinte axonale. Sa fille, âgée de 35 ans s'était plainte de fourmillements très douloureux des mains et des pieds évoluant par paroxysmes douloureux avec une hyperesthésie gênant toute mobilisation. Il existait aussi une discrète atrophie neurogène périphérique à l'électromyographie. Le bilan réalisé était resté négatif en dehors de la présence de taux urinaires de phénol et de crésol augmentés, observation qui avait été reliée à l'utilisation répétée d'un désinfectant dans une étable, sans pour autant pouvoir expliquer la symptomatologie. L'amélioration des symptômes était nette à la troisième semaine. L'étiologie

toxique était probable, mais la responsabilité des champignons avait là aussi été écartée. La recherche de cas analogues conduite en 1997 n'a pas été probante. Les vingt médecins généralistes de la vallée ont reçu un questionnaire ; les sociétés mycologiques locales et les centres antipoison français ont été contactés sans plus de succès.

- Un ami à qui le principal intoxiqué avait raconté son histoire lui montre un numéro du bulletin trimestriel de la Fédération Mycologique Dauphiné-Savoie (FMDS) dans lequel Daniel Guez, un mycologue français émigré au Japon, avait publié un court article sur un champignon japonais : *Clitocybe acromelalga* Ichimura (*Guez D., 1990*). Cette espèce est connue depuis la fin du 20ème siècle pour occasionner une érythermalgie (*Nakamura K et al., 1987*). Il est dénommé localement Dokou-sassako , « champignon aux brûlures » ou « champignon vénéneux du bambou ». Parmi les éléments significatifs, le délai d'apparition des symptômes mentionné ici est de cinq à quinze jours et quelques décès ont été rapportés en relation avec l'importante altération de l'état général (amaigrissement, insomnie, surinfection...). Ce qui distingue cette intoxication de celles dues aux différentes substances pouvant entraîner une érythermalgie est d'une part la non réversibilité des symptômes observés et d'autre part, l'étroite corrélation entre la quantité de champignon ingérée et l'intensité des symptômes. On évoque donc dans cette toxicité une origine plus nerveuse que vasculaire : c'est le système nerveux autonome des capillaires qui serait atteint et non le capillaire en lui même.

En fait, à deux reprises, Henri Romagnesi avait mentionné ce syndrome dans le bulletin de la SMF (*Romagnesi H., 1987 et 1989*), mais toutes ces informations semblaient être tombées dans l'oubli.

Dès lors, la cause de l'intoxication apparaissait clairement être la consommation des champignons - non identifiés - ramassés en Maurienne. Plusieurs hypothèses peu crédibles ont alors été générées : celle de la mutation en une espèce toxique sous l'effet des radiations de Tchernobyl, celle de l'importation de spores de *Clitocybe acromelalga* du fait de la proximité d'un centre de vacances de la compagnie Air France, celle de l'arrivée aéroportée de spores en provenance de l'étranger....

## **5 SECONDE ENQUÊTE :** **INVESTIGATION MYCOLOGIQUE**

En ce qui concerne l'enquête mycologique, les tentatives initiales de détermination de l'espèce supposée consommée par les intoxiqués n'avaient rien apporté de probant. L'un des médecins traitants avait récupéré semble-t-il dans une poubelle quelques restes de champignons et un mycologue avait identifié *Clitocybe subinvoluta* W.G. Smith ss J.E Lange (espèce mexicaine). A partir de spécimens en mauvais état, un autre mycologue évoque macroscopiquement un *Clitocybe* peut être du groupe *Candicantes*. Enfin, à partir d'exemplaires ramassés quelques jours après l'intoxication et a priori au même endroit (?) un autre mycologue reconnaît *Lepista inversa*.

Dans le but d'identifier le champignon responsable des intoxications de Lanslebourg, un an après l'intoxication, en septembre 1997, un groupe de médecins et de mycologues grenoblois s'est rendu sur les lieux présumés de la cueillette de 1996. Ce groupe a été conduit par une des personnes intoxiquées, le (généreux !) ramasseur ayant disparu...

Les champignons non identifiés ont été ramassés sous des épicéas, des mélèzes et des genévriers, sur une litière d'aiguilles. Ils étaient groupés en colonies de plusieurs dizaines d'exemplaires. Une quantité importante de champignons a ainsi pu être ramassée et une description détaillée réalisée (*Moreau PA et al., 2001*) :



## 5.1 Description mycologique du champignon savoyard



*Figure 1: Photographie des champignons savoyards*

Le chapeau, de 4-7 cm de diamètre, est convexe à plan-convexe ou bombé chez les jeunes exemplaires, puis nettement déprimé mais jamais franchement infundibuliforme. La marge est franchement enroulée, crénelée à très courtement cannelée-costulée. Il est teinté en jaune ocre clair, à brun jaunâtre, puis roussit fortement à partir du disque pour devenir parfois brun rougeâtre chez les exemplaires âgés. Il est subtomenteux à franchement squamuleux, au moins au niveau du disque, orné de minuscules écailles plus ou moins dressées et à pointes roussâtres au moment de la cueillette, puis apprimées et entièrement rousses, plus foncées que le fond. Il est un peu visqueux à l'humidité.

Les lames sont moyennement serrées (10 grandes lames par centimètre à la marge) avec lamellule entre chaque grande lame, décurrentes. Elles sont subconcolores au chapeau ou plus pâles et terminées nettement sur le pied par un liseré blanc. Elles sont séparables quelques heures après la cueillette. L'arête est entièrement concolore. La sporée semble rosée jaunâtre.

Le stipe de 2-5 x 0,4-1,2 cm est subcylindrique, parfois un peu renflé à la base. Il est subconcolore au chapeau et aux lames, tâché de roussâtre à la fin. Il est prumineux sur toute sa longueur sauf à la base qui est cotonneuse et agglomère fortement les aiguilles de la litière.

La chair est relativement épaisse dans le chapeau, fibreuse dans le pied, un peu élastique. Elle est pâle, crème à jaunâtre sale ou isabelle. Sa saveur est plutôt agréable au début puis un peu âpresente après mastication. Son odeur (savonnette parfumée, racine de seringa, poire....) est agréable, forte, nettement aromatique puis écœurante.

Les spores, de 4-5 x 2,5-3,5-4 µm sont elliptiques et guttulées. Le caractère cyanophile de la sporée (*Harmaja H. 1969*), la couleur de la sporée en masse et l'éventuelle présence de verrues font l'objet de discussions dont l'enjeu est la détermination du genre : *Clitocybe* ou *Lepista*.

Les basides sont bouclées. L'épicutis est constitué d'hyphes plus ou moins enchevêtrées et bouclées. Le pigment pariétal (lisse) ou mixte, vacuolaire jaune dans les articles terminaux.

Suite à cette description, des comparaisons ont été effectuées avec différents champignons très proches. Des exsiccata ont été envoyés au Japon et analysés par Shinnosuke Miyauchi (*Miyauchi S., 1998*), un mycologue en relation avec Daniel Guez : ce n'était pas *C. acromelalga*.

Après la proposition de Régis Courtecuisse et la suggestion de Pierre Neville qui n'a pas eu l'occasion de voir l'espèce (*Neville P et al., 1998*), c'est finalement Pierre-Arthur Moreau

(*Moreau PA et al., 2001*), qui accepte d'examiner l'espèce et la position taxonomique du champignon savoyard, alors que plusieurs mycologues s'étaient déjà prononcés sur le sujet, un sujet « empoisonné » !

Ses investigations l'ont notamment amené à lire les notes inédites de Malençon déposées à l'Herbarium de Montpellier : l'espèce suspectée est bien *Clitocybe amœnolens*, espèce thermophile décrite pour la première fois dans les cédraies du moyen-Atlas marocain par Malençon et Bertault, en 1975 (*Malençon G et al., 1975*). Le centre antipoison du Maroc alors interrogé n'avait pas enregistré de cas, mais la consommation de champignons est extrêmement réduite dans ce pays.

A cette étape, nous étions donc en présence d'une espèce maintenant identifiée, dont la toxicité n'était pas connue, mais qui pouvait être mise en cause avec un syndrome mycotoxicologique tout à fait inhabituel, des cas analogues d'intoxication n'étant connus qu'au Japon et en Corée du Sud avec une autre espèce : *Clitocybe acromelalga*.

Il restait à établir la toxicité de cette espèce et tout d'abord à constituer un stock de champignons. Dans la perspective d'essais chez l'animal, Philippe Saviuc est retourné tous les ans dans la vallée de la Maurienne, à Lanslebourg notamment, découvrant ainsi de nouvelles stations. Ces visites ont également permis une meilleure caractérisation de l'environnement dans lequel poussait *Clitocybe amœnolens* : il a été retrouvé le long de la vallée sur environ 35 km (la vallée de la haute Maurienne en étant la limite septentrionale), selon l'altitude, sous des mélèzes et sous des pins uniquement : la constante étant l'épaisseur de la litière d'aiguilles au sol.

Il est intéressant de noter que trois autres espèces morphologiquement proches ont été retrouvées de façon concomitante : *Lepista lentiginosa*, *Lepista gilva* et *Lepista inversa*. Le moyen le plus fiable pour distinguer *Clitocybe amœnolens* des trois autres est son odeur aromatique tout à fait caractéristique qui est d'ailleurs à l'origine de son nom d'espèce : *amœnolens* = à odeur agréable (*Fons F. et al, 2006*).

Enfin, ces escapades ont permis de constituer un stock de plusieurs kilogrammes de champignons, qui a permis de débiter l'investigation chimique.

Fort heureusement d'ailleurs, car lorsque j'ai commencé mon travail de recherche, à l'automne 2003 (après la fameuse canicule) aucun spécimen n'avait pu être trouvé cette année là !

A l'automne suivant, à la fin de mon année de recherche et pour mon plus grand bonheur, nous sommes retournés avec Philippe arpenter les stations de Haute Maurienne, pour ramener un seul minuscule spécimen, inexploitable, mais quelle joie de pouvoir sentir, enfin, cette « odeur aromatique caractéristique », rappelant la poire chez certains, voire la racine de seringa !!

## **5.2 Toxicité de *Clitocybe amœnolens***

### **5.2.1 Expérimentation chez le rat**

En février 2000, quatre rats ont reçu par gavage des doses croissantes de champignons séchés et réduits en poudre, puis mis en suspension dans de l'eau tiède (*Saviuc P et al., 2003a*). Les doses ont été estimées à partir de la quantité ingérée par le patient le plus sévèrement atteint soit environ 300 g de champignons frais pour un poids de 75 kg (environ 0,4 g de champignon sec par kg de poids corporel avec l'hypothèse d'un champignon composé à 90% d'eau). Les rats devaient recevoir après tirage au sort 1, 10, 25 ou 50 fois cette dose, compte tenu de la relative

résistance du modèle animal (et du rat en particulier). Du fait des contraintes de volume liées à la difficile administration de cette suspension, ils ont effectivement reçu 0,3 ; 2,9 ; 4,4 et 5,5 g/kg. Les rats ayant reçu les deux doses les plus fortes ont présenté les deux premiers jours une prostration et des difficultés à la locomotion du train arrière à la différence des deux autres qui avaient un comportement normal. Ces deux mêmes rats ont subi une semaine plus tard un deuxième gavage soit une dose cumulée de 10,2 et 9,6 g/kg. Les lésions se sont alors aggravées : les rats déambulaient avec leurs pattes arrières écartées et en abduction ainsi qu'avec leurs orteils repliés. Au repos, une attitude en extension de ces pattes arrières était parfois notée ; les orteils étaient en griffe. Un érythème cutané est alors apparu au niveau des orteils pendant plusieurs jours. Les anomalies de la locomotion ont persisté jusqu'au sacrifice. Les deux rats les moins dosés n'ont jamais présenté le moindre trouble. Des coupes de nerfs sciatiques ont été observées au microscope électronique. La coupe du nerf sciatique du rat le moins dosé (0,3 g/kg) avait toutes les caractéristiques d'un nerf normal. Celle du rat le plus dosé (10,2 g/kg) montrait une déstructuration de l'architecture de la fibre avec disparition des fibres myélinisées.

Malgré son caractère limité (absence de vrai témoin, nombre de rats réduit, dose maximale non atteinte) ce test a permis de confirmer la toxicité de *C.amœnolens*. Les résultats étaient en cohérence avec les symptômes des intoxications humaines, mais pour des doses environ 25 fois supérieures.

### 5.2.2 Développement d'un modèle animal

En 2002, la toxicité du champignon entier sec (*Authier N et al, 2002*) a été étudiée par l'équipe du Pr F. Coudoré au laboratoire de toxicologie de l'UFR de pharmacie de Clermont-Ferrand qui axe une partie de ses recherches vers la neurotoxicité périphérique douloureuse.

Le calcul des concentrations administrées a été fait de la même manière que précédemment : des doses 5, 10 et 20 fois plus importantes de champignon ont été administrées aux rats, soit 2 g/kg, 4 g/kg, 8 g/kg.

Les rats ayant ingéré la dose la plus importante sont morts au bout de 4 jours, après avoir présenté les symptômes suivants : paralysies du train arrière, difficultés à la marche, mutilation des membres postérieurs. Pour les autres rats, des tests ont été effectués afin d'étudier la toxicité générale, la sensibilité douloureuse, mécanique et thermique, et l'activité motrice.

Les résultats des tests ont mis en évidence des différences significatives au niveau de la prise de poids des animaux (*Annexe 3 – Figure 1*), de l'activité motrice (*Annexe 3 – Figure 2*) et de la sensibilité thermique au froid (*Annexe 3 – Figures 3 et 4*) et au chaud (*Annexe 3 – Figures 5 et 6*). De plus une relation dose-effet est constatée pour chacun des tests.

## **6 TROISIÈME ENQUÊTE :** **MOLÉCULE(S) COUPABLE(S) ?**

Nous voici donc arrivés dans le vif du sujet : la cause de l'intoxication est déterminée, l'espèce coupable identifiée et les stocks de champignons sont suffisants pour approfondir l'enquête chimique afin de mettre enfin en évidence la substance toxique.

L'investigation a commencé par l'étude bibliographique de *Clitocybe acromelalga*. Dans les années 1980-90, ce champignon japonais qui produit les mêmes types de symptômes a fait l'objet de nombreuses études analytiques : extraction, purification et synthèse de 24 substances dont certaines étaient alors inconnues (*Annexe 1 - Tableau I*).

Parmi ces substances, les acides acroméliques (A à E) (*Konno et al, 1983*), des analogues structuraux de l'acide kaïnique se sont révélés être de puissants agonistes des récepteurs du glutamate (*Satelle D et al., 1994*).

La toxicité de l'acide acromélique A (AAA) a été évaluée par voie intrathécale chez le rat, mettant ainsi en évidence des lésions du système nerveux central (*Ishida M et al., 1988 ; Kwak S et al., 1992*). La toxicité de l'AAA par voie orale n'a par contre jamais été étudiée chez l'animal.

Les études sur *Clitocybe amœnolens* ont, quant à elles, permis l'identification et le dosage de l'AAA par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-SM) (*Bessard J et al., 2004*) : On retrouve 325 ng d'AAA / mg de champignon sec.

Malgré toutes les connaissances acquises, la ou les molécules responsables par voie orale de l'érythermalgie n'étaient toujours pas identifiées, de même et *a fortiori* que leur mécanisme d'action toxique. Bien que de fortes suspicions pèsent sur les acides acroméliques en raison de leur interaction avec le système glutamatergique, leur rôle dans la toxicité lors de l'ingestion de champignon n'était pas démontré.

Le travail qui m'a été confié au cours de ma cinquième année hospitalo-universitaire (filiale Recherche) était « l'inculpation » des acides acroméliques par voie orale, sans pour autant exclure la possibilité qu'une autre molécule puisse intervenir.

Suspect n°1. L'AAA, car cette molécule a été découverte au Japon dans un champignon (*Clitocybe acromelalga*), qui engendre le même syndrome rare : l'érythermalgie. Cette même molécule n'a été retrouvée que dans un seul autre champignon : *Clitocybe amoenolens*.

Elle n'a pas été retrouvée dans des espèces témoins (*Agaricus bisporus*, *Amanita pantherina*), ni dans des espèces morphologiquement proches, appartenant à des sections contiguës (*Lepista inversa*, *Lepista gilva*), ni dans des espèces taxonomiquement proches (*Clitocybe gibba*, *Clitocybe sinopica* ; *Clitocybe gracilis* et *Clitocybe paropsis*) (Bessard J *et al*, 2003). A ce jour, seuls *C. acromelalga* et *C. amoenolens* engendrent ce syndrome.

Circonstance aggravante : Des tests *in vitro* ont montré que l'AAA est un puissant agoniste du récepteur du glutamate et qu'il engendre une toxicité neurologique lorsqu'il est administré par voie intrathécale chez le rat.

Circonstance atténuante : Son implication dans le développement de l'érythermalgie n'est pas formellement démontrée.



Témoin : Quelques milligrammes d'AAA de synthèse ont été gracieusement offerts par K. Konno, le chimiste qui a identifié l'AAA. C'est ce qui a permis de suivre précisément cette molécule dans les extraits, ce qui n'aurait pas été possible sans ce témoin.

Autres suspects :

- Les autres membres de sa famille : acides acroméliques B, C, D, E moins étudiés...
- La  $\beta$ -cyano-L-alanine (BCLA), car c'est une autre molécule potentiellement toxique, retrouvée chez *Clitocybe acromelalga*, mais également présente dans d'autres espèces végétales n'engendrant par contre pas d'érythermalgie.

→ → Il restait donc « simplement » à démontrer que c'est bien l'AAA qui est responsable de l'érythermalgie, lorsqu'il est absorbé par voie orale

***Objectifs de cette étude***

L'objectif principal du sujet qui m'est proposé, est de confirmer la responsabilité de l'AAA dans l'apparition des signes liés à la consommation de *Clitocybe amœnolens*.

De cet objectif principal découlent des objectifs secondaires :

- L'obtention d'un extrait enrichi en AAA à partir de *Clitocybe amœnolens*.
- L'administration des extraits obtenus à l'animal, par voie orale, selon le protocole mis en place avec le champignon entier (*Authier N. et al., 2002*).

Par ailleurs, il était intéressant de rechercher d'autres molécules présentes dans le champignon, en particulier la BCLA, comme l'a suggéré dans un article T. Stijve (*Stijve T., 2001*).

## 6.1 Etude de l'Acide Acromélique A (AAA)

### 6.1.1 Etude chimique

#### 6.1.1.1 Obtention d'extraits de *Clitocybe Amaenolens*

Les acides acroméliques sont des molécules de faible masse moléculaire (M = 310) portant 3 fonctions carboxyliques et 2 fonctions amines secondaires, leur conférant un caractère polaire.

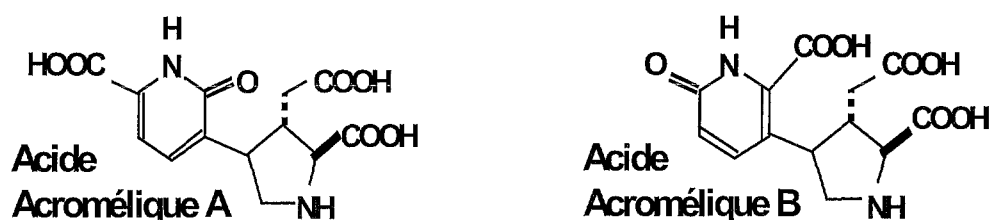
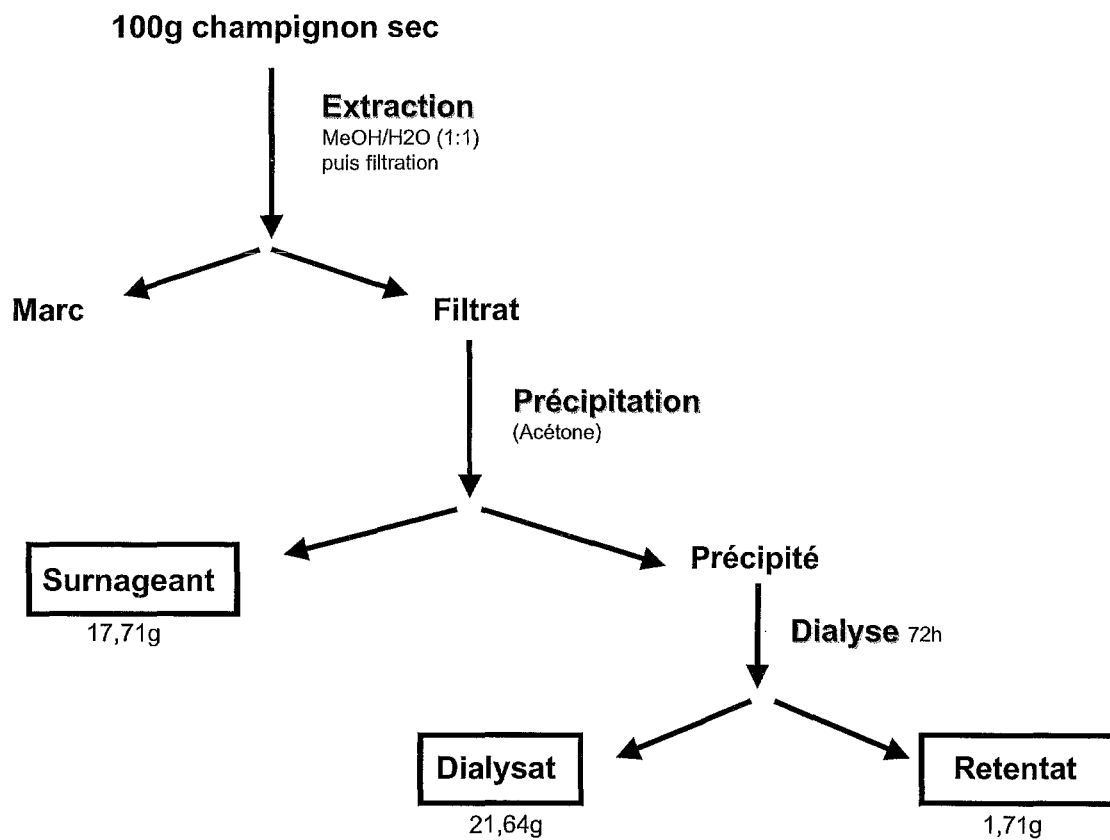


Figure 2 : Formules chimiques des acides acroméliques A et B

- 100 g de champignons secs (provenant de Lanslebourg et de Modane, cueillis en 2000, 2001 et 2002 par Philippe Saviuc et déshydratés dans un four ventilé à 35/45°C puis conservés à l'abri de la lumière, à température ambiante) sont extraits (sur agitateur magnétique, 7 heures, à température ambiante) avec un mélange méthanol/eau (1:1), solvant polaire, classiquement utilisé (Figure 3).
- Après filtration et concentration de cet extrait, on procède à une précipitation à l'acétone, en large excès. Ce solvant moins polaire que le mélange méthanol/eau est utilisé pour provoquer la précipitation des substances les plus polaires. On obtient un précipité dense, adhérant au fond du becher, et une phase supérieure, le surnageant, qui est lyophilisée.

- Enfin, une dialyse contre l'eau (14 000 Daltons, Roth) a été effectuée sur le précipité remis en solution dans l'eau. Il en résulte deux solutions : un dialysat, contenant des molécules de faible masse moléculaire et un retentat contenant des molécules plus volumineuses. Ces deux solutions sont elles aussi lyophilisées, afin d'en doser la teneur en AAA.



*Figure 3* : Schéma d'extraction de *C. amœnolens*

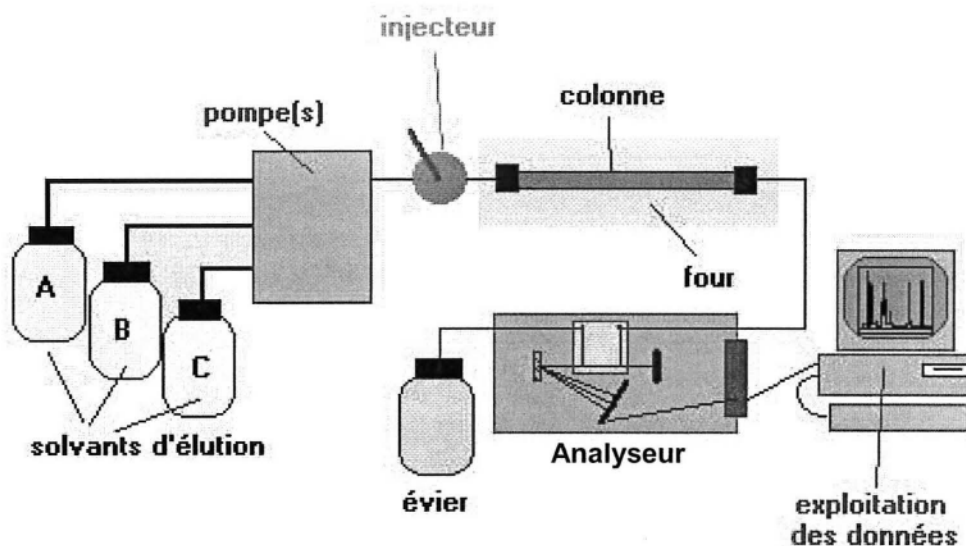
### 6.1.1.2 Dosage de l'Acide Acromélique A (AAA) par CLHP-SM

#### a) Matériel et Méthode

La méthode de quantification a été élaborée et validée par J. Bessard (*Bessard J et al., 2004*) : l'AAA est quantifié en Chromatographie Liquide Haute Performance (*Figure 4*) couplée à la Spectrométrie de Masse (*Figure 6*) en ionisation de type ElectroSpray (Electro Spray Ionisation) (CLHP/ESI/SM) avec une source de type TurboIonSpray® en mode négatif (*Figure 5*).

#### ▪ La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP ou CL)

La CLHP est utilisée pour séparer des composés polaires, thermolabiles ou ayant un poids moléculaire élevé.



*Figure 4 : Schéma d'un montage de CLHP*

La colonne que nous avons choisi d'utiliser contient une phase de carbone graphite poreux (*Hypercarb*). Elle est constituée de particules sphériques poreuses composées de feuillets plans de cycles hexagonaux de carbone. Le mécanisme de rétention mis en jeu fait intervenir une interaction de charge induite du composé polaire avec la surface polarisable du graphite. La rétention est augmentée par rapport à une colonne C18, utilisée plus classiquement, on peut donc séparer des composés très polaires (comme les acides acroméliques) non retenus en C18.

#### ▪ La spectrométrie de masse (SM)

Parmi les méthodes analytiques, la SM occupe une place privilégiée grâce à ses caractéristiques : sensibilité inégalée et surtout spécificité. Elle permet une analyse chimique qualitative et quantitative de molécules ayant préalablement été ionisées.

La spectrométrie de masse permet de déterminer la masse d'une molécule en mesurant son rapport  $m/z$  ( $m$ , masse de la molécule ;  $z$ , nombre de charge). Elle nécessite un système d'introduction de l'échantillon à analyser, une source pour ioniser les molécules de cet échantillon ; un analyseur de masse pour séparer les différents ions en fonction de leur rapport  $m/z$  ; un détecteur pour compter ces ions et enfin un système informatique avec un logiciel spécifique pour l'acquisition et le traitement des données.

La CLHP utilise des échantillons liquides alors que la SM utilise des échantillons gazeux. Il faut donc volatiliser l'échantillon lors du passage de CLHP à la SM. L'ElectroSpray constitue une méthode de choix pour résoudre ce problème. Cette méthode d'ionisation s'effectue à pression atmosphérique par application d'un fort champ électrique sur le capillaire contenant la solution à examiner. Ce champ électrique provoque l'accumulation de charges à la surface du liquide qui va se rompre pour former des gouttelettes hautement chargées. Ces gouttelettes vont

subir deux phénomènes : l'évaporation du solvant et l'explosion coulombienne. La densité de charges dans la gouttelette augmente avec l'évaporation du solvant jusqu'à un point critique où les charges, toutes de même signe se repoussent : il se produit alors l'explosion coulombienne. Ce processus d'ionisation à faible énergie ne provoque pas ou peu de fragmentation.

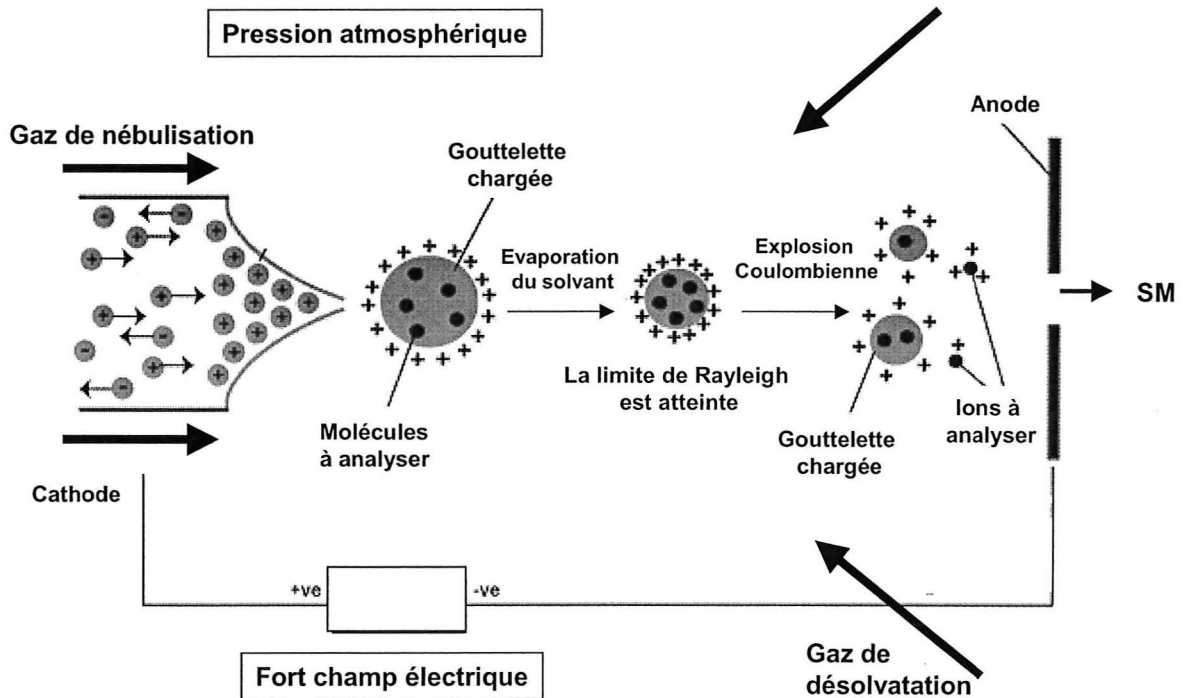


Figure 5 : Principe de l'ionisation par une source de type TurboIonSpray®

Quant il n'y a aucune aide à l'évaporation du solvant, la technique a pour nom Electrospray. L'ajout d'un gaz de nébulisation (azote ou air) au niveau de l'aiguille d'Electrospray permet de faciliter l'évaporation du solvant et d'obtenir un spray plus stable: la méthode est alors appelée IonSpray. Le TurboIonSpray est caractérisé par l'ajout dans la source d'un second gaz (de désolvation) qui peut être chauffé pour augmenter l'efficacité du système. L'augmentation de la vitesse d'évaporation permet alors de travailler à des débits de phase mobile plus élevés.

L'analyseur de masse choisi est un quadripôle. Il est constitué de 4 électrodes chargées positivement et négativement et opposées deux à deux.

La variation de tension entre les électrodes influe sur la trajectoire des ions. La tension ayant une composante sinusoïdale, les ions changent de direction dans le temps. La séparation s'effectue en fonction de la stabilité de la trajectoire de l'ion, cette trajectoire étant directement liée à la charge et à la masse de l'ion.

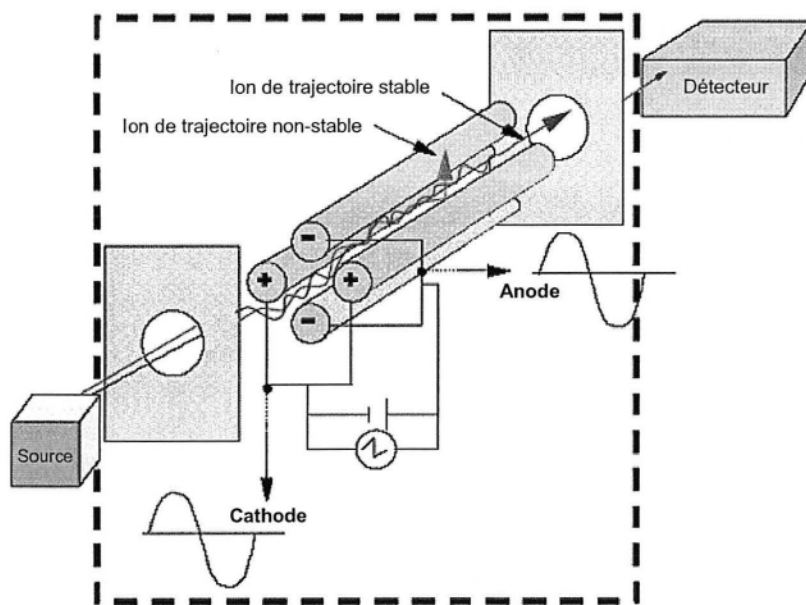


Figure 6 : Analyseur de masse quadripolaire

## Matériel et conditions expérimentales utilisées

- Le système chromatographique est constitué de:
  - deux pompes Perkin-Elmer series 200MS (*Perkin-Elmer*)
  - un injecteur automatique Perkin-Elmer series 200
  - un four colonne Perkin-Elmer
- La séparation chromatographique est obtenue sur une colonne de Carbone Graphite Poreux Hypercarb® (100 x 2.1mm, 5µm). (*ThermoHypersil*) maintenue à 30°C

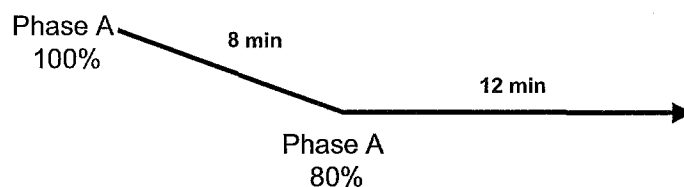
dans les conditions opératoires suivantes:

- La phase mobile utilisée est constituée de deux phases :

Phase A : Eau - Acide formique, 99,5:0,5, v/v

Phase B : Acétonitrile - Acide formique, 99,5:0,5, v/v

- On effectue un gradient :



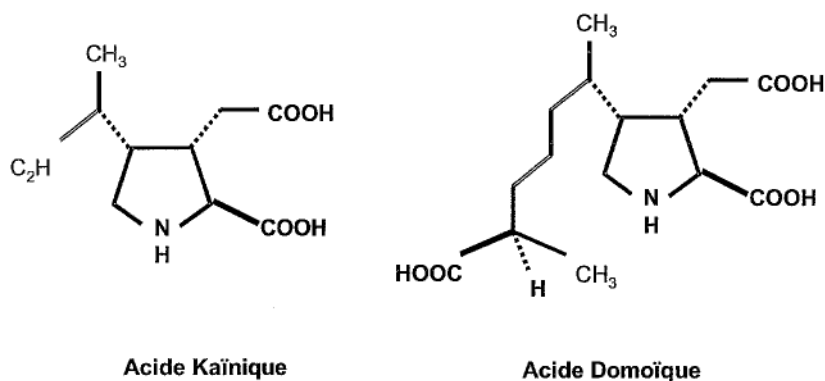
- Le débit est de 200 µL/min
- Le volume d'échantillon injecté est de 5 µL.

- Les analyses SM sont réalisées sur un Spectromètre de masse : API 150EX (*PESciex*) équipé d'une source TurboIonSpray® en mode négatif. L'acquisition et le traitement des données sont réalisés avec le logiciel *MassChrom*. Les analyses quantitatives sont effectuées en mode Selected Ion Monitoring (SIM).



L'ion de quantification pour l'acide acromélique est suivi à  $m/z$  309, les ions de confirmation sont à  $m/z$  265 (correspondant à  $[M-H-CO_2]^-$ ) et à  $m/z$  221 (correspondant à  $[M-H-2CO_2]^-$ ). Pour l'acide kaïnique, l'ion de quantification est suivi à  $m/z$  212 et l'ion de confirmation à  $m/z$  168 (correspondant à  $[M-H-CO_2]^-$ ) (*Annexe 2 – Figure 1*).

Le dosage a pu être effectué à partir d'AAA de synthèse (*Konno K et al., 1983*), servant de témoin fourni gracieusement par K. Konno. L'acide kaïnique (AK), de structure proche de l'AAA est utilisé comme standard interne. Ce choix a été inspiré par l'étude de l'acide domoïque, un autre agoniste du glutamate (*Lawrence J et al., 1994*).



*Figure 7 : Structure de l'acide kaïnique et de l'acide domoïque*

Une gamme d'étalonnage d'AAA est effectuée avec ces deux molécules afin de vérifier la linéarité de la méthode (C= 10, 20, 50, 100, 200, 300 et 500 ng/mg).

Les concentrations en AAA des extraits sont calculées à partir de la droite d'étalonnage, en calculant le rapport (aire du pic d'AAA / aire du pic d'AK), en fonction du rapport (concentration en AAA des points de gamme / concentration en AK). Elles sont données en ng d'AAA par mg d'échantillon.

Limite de quantification (LOQ) = 10 ng/mg, elle correspond au premier point de gamme.

Limite de détection (LOD) = 1 ng/mg

## b) Résultats

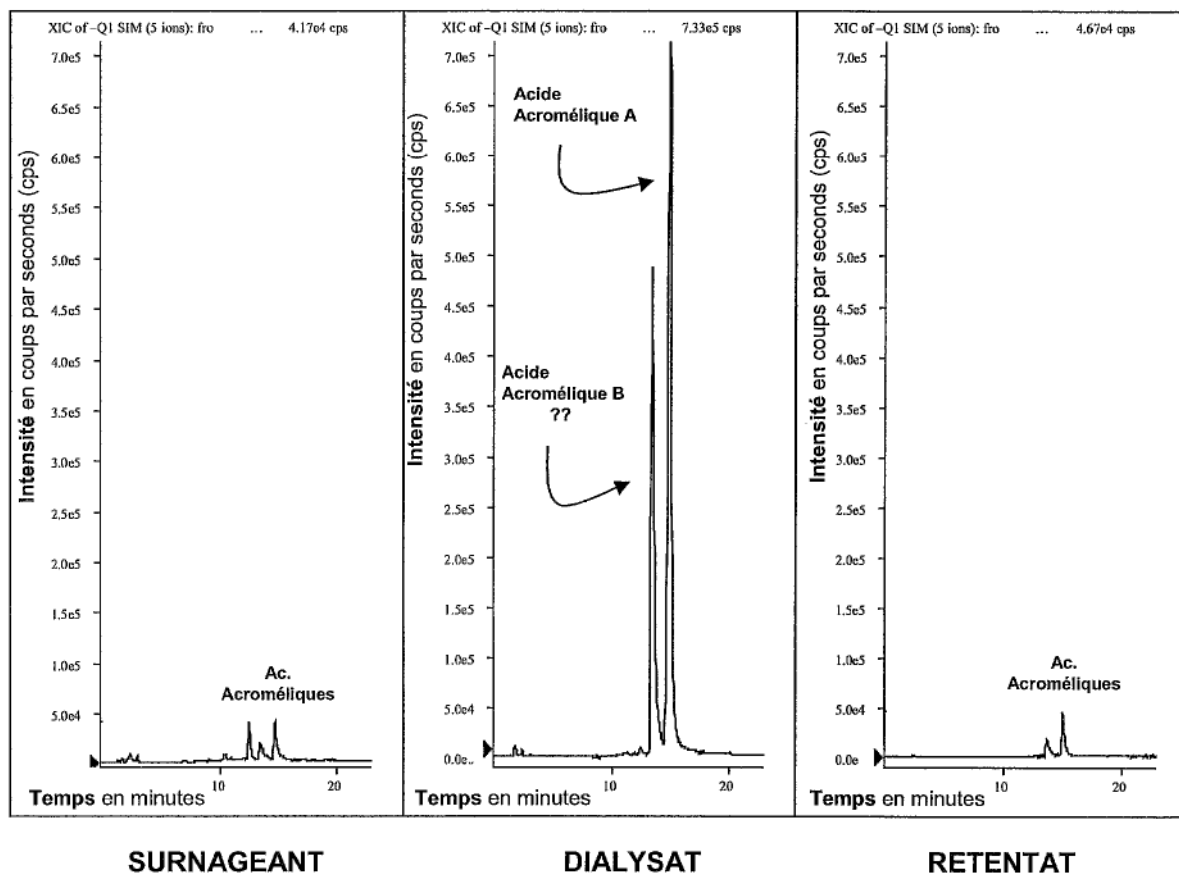


Figure 8 : Chromatogrammes de l'ion de quantification  $[M-H]^-$   $m/z$  309, correspondant à l'AAA enregistré pour le surnageant, le dialysat et le retentat.

Bien que l'on ne possède pas d'acide acromélique B (AAB, une isomère de position de l'AAA) comme témoin, on peut raisonnablement faire l'hypothèse que le premier des deux pics  $m/z$  309 correspond à l'AAB (Figure 2). Les deux pics possèdent les mêmes caractéristiques: ion moléculaire  $m/z$  309, ion de confirmation  $m/z$  265.

| Extrait    | Concentration calculée en ng/mg |
|------------|---------------------------------|
| Surnageant | 90                              |
| Dialysat   | 1419                            |
| Retentat   | 312                             |

*Tableau I: Concentration d'AAA calculée dans les différents extraits*

Ces résultats montrent que le protocole d'extraction (*Figure 3*) mis en place a bien permis de concentrer l'AAA dans un seul des extraits (le dialysat). C'est cet extrait sera administré aux rats par voie orale.

### **6.1.1.3 Purification et dosage de l'AAA à partir du dialysat**

Les résultats du dosage de l'AAA dans le dialysat ont encouragé la poursuite de la purification de cet extrait, afin de concentrer davantage cet acide supposé toxique.

Pour cela, ont été testées différentes techniques de chromatographie sur colonne, basées sur des principes physico-chimiques différents. Les fractions obtenues ont ensuite été lyophilisées et dosées par CLHP-SM.

## a) Matériel et Méthode

### ▪ Chromatographie d'adsorption

Ce mode de chromatographie met en jeu un mécanisme d'adsorption du soluté sur la phase stationnaire solide (adsorbant) et un mécanisme d'élution par la phase mobile liquide (éluant).

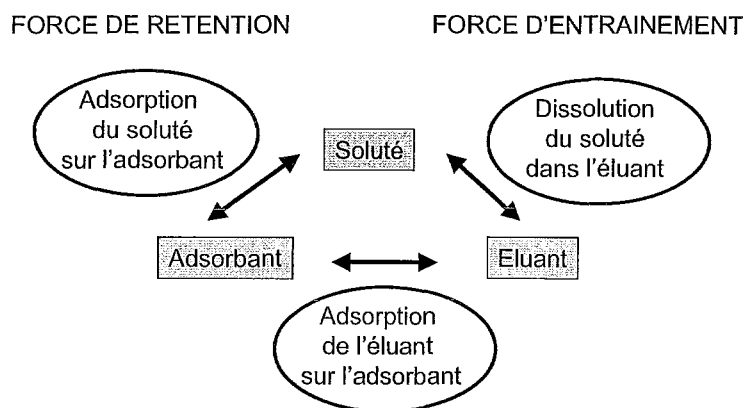


Figure 9 : Le mécanisme d'adsorption

La phase solide choisie est constituée de charbon activé, c'est un adsorbant doté d'une forte capacité d'adsorption et d'une faible polarité, classiquement utilisé en extraction car il retient pigments et molécules odorantes.

La phase mobile liquide doit avoir une polarité proche de celle de la molécule à éluer. La polarité doit donc ici être importante.

#### Protocole :

- 500 mg de dialysat sont mis en solution dans 1mL de méthanol
- La colonne (H = 5 cm ; Ø = 2 cm) contenant le charbon (*Chimie plus*, ref : 80075) est activée par trois fois son volume de méthanol.

- On utilise alors successivement trois phases mobiles différentes, de polarité décroissante : eau (100%), éthanol/eau (50:50) et éthanol (100%), chacune d'un volume triple de celui de la colonne.
- On obtient trois fractions qui sont lyophilisées.

#### ▪ Chromatographie de partage en phase inverse

La chromatographie de partage, également appelée chromatographie liquide/liquide, met en jeu un mécanisme de partition entre solvants qui constituent respectivement la phase stationnaire et la phase mobile, en fonction de la polarité du produit à isoler et de celles des deux phases.

On sait que l'AAA est une molécule très polaire, ceci est confirmé par le fait que l'AAA soit concentré dans le dialysat. On travaille donc ici en phase inverse, c'est-à-dire en utilisant une phase stationnaire apolaire : une silice greffée avec un groupement alkyl composé de 18 atomes de carbones. La phase mobile doit être polaire, les composés les plus polaires seront donc élués en premier.

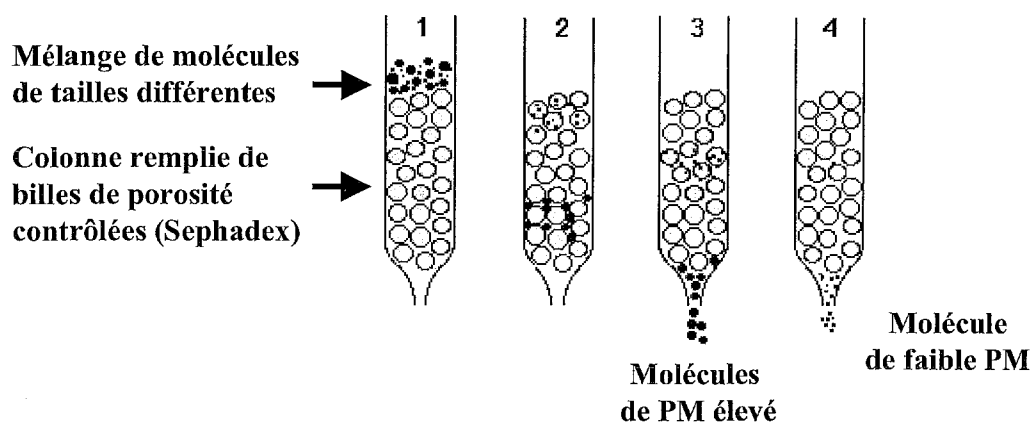
#### Protocole :

- 500 mg de dialysat sont dissous dans 1mL d'eau
- La colonne (H = 4cm ; Ø = 2cm) contenant la silice greffée C18 (LiChroprem® RP-18, Merck) est activée par trois fois son volume d'eau.
- On utilise ensuite deux phases mobiles de polarité décroissante : eau 100%, puis méthanol/eau (1:1), chacune d'un volume triple de celui de la colonne.
- On obtient deux fractions qui sont lyophilisées.

## ▪ Chromatographie d'exclusion/diffusion

La chromatographie d'exclusion est aussi appelée tamisage moléculaire. Cette technique utilise le Sephadex, qui est un gel de dextrane auquel on fait subir une réticulation, il se présente sous forme de billes poreuses, dont la porosité dépend du degré de réticulation.

C'est une technique permettant la séparation des molécules d'un mélange en fonction de leur masse moléculaire (MM), les plus grosses étant éluées en premier.



*Figure 10. : Le mécanisme de l'exclusion / diffusion*

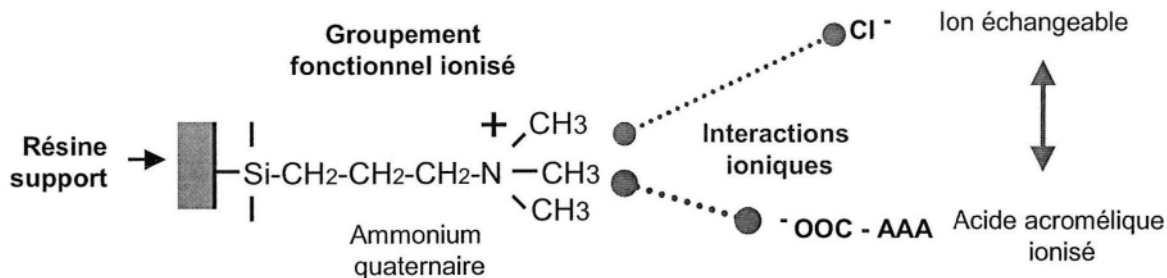
### Protocole :

- On prépare le gel de dextrane en mélangeant 5g de Sephadex LH20 (*Pharmacia*) à une quantité suffisante d'un mélange méthanol/eau (1:1). On laisse gonfler le gel une heure.
- 500 mg de dialysat sont ensuite dissous dans 1 ml de méthanol/eau (1:1).
- La colonne (H = 16cm ; Ø = 0.5cm) est remplie avec le gel.
- L'éluant utilisé est un mélange méthanol/eau (1:1).
- Les différentes fractions sont récupérées à raison de 50 gouttes par tube, à l'aide d'un collecteur automatique.

- Un contrôle CCM (Support : RP-18, *Merck*, Solvant : méthanol/eau (90:10), révélé par un réactif à la ninhydrine) est effectué, afin de regrouper certaines fractions.
- On obtient ainsi 7 fractions qui sont lyophilisées et dosées.

### ▪ Chromatographie d'échange d'ions

Dans la chromatographie d'échange d'ions, la phase stationnaire comporte des groupements ionisés fixes, des ions mobiles de charge opposée assurent l'électroneutralité. Les ions retenus au voisinage des charges fixes sont échangeables avec les ions présents dans la phase mobile.



*Figure 11 : Mécanisme de l'échange d'ions*

A partir de l'étude bibliographique de l'extraction de l'acide domoïque (*Wright J et al., 1989*), une résine *Strong Anion Exchange (SAX)* a été choisie pour extraire l'AAA.

#### Protocole :

- 10 mg de dialysat sont dissous dans 7 ml d'un mélange méthanol/eau (1:1)
- Une cartouche SAX (Isolute® SAX chez *International Sorbent Technology*) contenant 500 mg de phase est activée par successivement : 2 mL de méthanol, 2 mL d'eau puis 2 mL d'un mélange méthanol/eau (1:1).

- Après dépôt de l'échantillon et séchage de la colonne, la phase est lavée par 4 mL d'un mélange méthanol/eau/acétonitrile (45:45:10), puis séchée.
- L'éluion est effectuée par 2 ml d'un mélange méthanol/acide formique (97:3), un solvant acide qui refait passer l'AAA à l'état moléculaire, ce qui rompt l'interaction ionique.
- Cette seule fraction éluée est récupérée.

### b) Résultats

Les résultats sont donnés en ng d'AAA/mg d'échantillon et les rendements en pourcentages.

| Champignon entier sec → 325 ng d'AAA / mg |  |                                   |   |
|---|--|-----------------------------------|---|
| DIALYSAT → 1419 ng d'AAA / mg             |  |                                   |   |
| Charbon activé                            | C18                                    | Sephadex                          | SAX                                     |
| Eau 100% (6%)<br>→ 324 ng/mg              | Eau 100% (94%)<br>→ 1645 ng/mg         | Fraction 1 (0.2%)<br>→ ND*        | 1 seule fraction (9%)<br>→ 10 769 ng/mg |
| Ethanol/Eau (1:1) (29%)<br>→ 42 ng/mg     | Méthanol/Eau (1:1) (3.6%)<br>→ 1 ng/mg | Fraction 2 (3.4%)<br>→ 622 ng/mg  |   |
| Ethanol 100% (41.8%)<br>→ 224 ng/mg       |  | Fraction 3 (56%)<br>→ 2029 ng/mg  |   |
|   |  | Fraction 4 (24.4%)<br>→ 462 ng/mg |   |
|   |  | Fraction 5 (3.8%)<br>→ ND*        |   |
|   |  | Fraction 6 (1.4%)<br>→ ND*        |   |
|   |  | Fraction 7 (0.2%)<br>→ ND*        |   |

\*ND : Non Dosé, car ces fractions ont subi un phénomène de surfusion lors de la lyophilisation empêchant l'obtention d'extraits parfaitement anhydres, pouvant être pesés et dosés.

*Tableau II: Concentration en AAA dans les différentes fractions purifiées obtenues par les différentes méthodes*

Les résultats en gras correspondent aux fractions dans lesquelles l'AAA a été concentré par rapport au dialysat.

Ces résultats nous montrent que la chromatographie d'échange d'ions est la plus efficace pour concentrer l'AAA.



## 6.1.2 Etude toxicologique

Pour vérifier l'hypothèse selon laquelle les effets toxiques de *Clitocybe amœnolens* sont liés à la présence d'AAA, on décide d'administrer le dialysat *per os* à l'animal.

En effet, le dosage de l'AAA, a mis en évidence une importante concentration de cet acide dans le dialysat. De plus, le dialysat présente l'avantage d'être lyophilisé, donc soluble dans l'eau, ce qui permet, à la différence du champignon entier, une administration aisée, par gavage de faibles quantités de cet extrait concentré mis en solution.

### *a) Matériel et Méthode*

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avec le champignon entier (*Authier N., 2002*), le protocole mis en place reprend les éléments de celui de 2002, au sein du même laboratoire : le Laboratoire de Toxicologie de la faculté de pharmacie de Clermont-Ferrand.

### Conditions expérimentales

#### ▪ **Doses administrées**

Les concentrations d'AAA mesurées dans le champignon entier sec et dans le dialysat étaient respectivement de 320 ng/mg (*Bessard J et al., 2004*) et de 1419 ng/mg, soit un rapport de concentration de 4,4 entre les deux. Or, on a obtenu 21,6 g de dialysat à partir de 100 g de champignon sec, soit un facteur 4,6 entre les deux. Le dialysat contient donc pratiquement tout l'AAA du champignon (93%).

La dose permettant d'objectiver un effet lorsque le champignon sec est administré *per os* est estimée à partir d'un travail antérieur à 4 g/kg de poids corporel, ce qui correspond à 0,8 g de dialysat /kg de poids corporel.

Trois doses de dialysat ont donc été administrées p/o, par gavage : **0,4 – 0,8 – 1,2 g/kg**, ce qui équivaut à : 2 – 4 – 6 g/kg équivalent champignon sec par kilogramme de poids corporel.

Un groupe contrôle a également été gavé, avec une solution contenant du NaCl 0,9%.

#### ▪ Animaux

32 rats mâles Sprague-Dawley (*Charles River, France*) pesant 240 grammes en moyenne en début d'étude ont été divisés en quatre groupes homogènes, correspondants aux trois doses et au témoin. Ils disposent de nourriture et d'eau à volonté pendant toute la durée de l'expérimentation, et sont stabulés dans une pièce climatisée (22 +/- 1°C) à hygrométrie contrôlée, en cycle jour-nuit 12h/12h.

Afin que les expérimentateurs puissent travailler en aveugle vis à vis des traitements, ceux ci sont randomisés d'abord par tirage au sort de la répartition des rats dans les cages lors de la réception (4 rats / cage) puis en utilisant une table de permutation à 4 éléments (1 = témoin négatif; 2 = 0,4 g/kg; 3 = 0,8 g/kg; 4 = 1,6 g de dialysat /kg) pour attribuer les traitements à l'intérieur de chaque cage, après avoir réparti les rats dans les cages en fonction de leur poids, et numéroté les rats de 1 à 4.

Chaque test est réalisé par le même expérimentateur durant toute la durée de l'étude.

### ▪ Etude de la toxicité générale

Elle consiste à enregistrer une fois par semaine le poids des rats et à noter tous les signes cliniques évocateurs d'un effet indésirable ou d'une toxicité. Le poids est chez cette espèce qui tend à engraisser, un bon indicateur de l'état général de l'animal.

### ▪ Etude des troubles de la sensibilité douloureuse

Cette étude a pour but de mettre en évidence les modifications de la sensibilité douloureuse, observées à la suite d'application de stimuli de nature différente. La première mesure effectuée avant l'administration sert de valeur de base.

#### ❖ Stimuli mécaniques

→ *Test des filaments de Von Frey (Chaplan S et al., 1996)*

Les rats sont placés dans des boîtes en plexiglas (30x30x25cm) sans fond, posées sur un support grillagé. Après une période d'habituation de 10 à 15 minutes, on applique à travers la grille, des filaments en nylon de calibre croissant sur la face plantaire des pattes postérieures des rats jusqu'à courbure du filament. Chaque filament est appliqué cinq fois par patte à raison d'une application par seconde. La courbure des neufs filaments utilisés (références : 4,08 - 4,17 - 4,31 - 4,58 - 4,74 - 4,93 - 5,07 - 5,18 - 5,46) nécessite des forces respectives de 1,202 - 1,479 - 2,041 - 3,63 - 5,495 - 8,511 - 11,749 - 15,136 et 28,84 grammes.

La réaction de l'animal consiste en un retrait brusque de la patte. Plusieurs paramètres peuvent être utilisés pour quantifier le test : le filament seuil, la fréquence de retrait par filament, le seuil 50% de retrait. Pour cette étude, nous avons choisi la première méthode de quantification, le filament seuil, premier filament qui déclenche le retrait de la patte.

## ❖ Stimuli thermiques

### → *Test d'immersion de la queue (Necker P et al., 1978)*

Ce test consiste à mesurer la latence de retrait (en seconde) de la queue du rat, immergée dans un bain d'eau chaude à 42°C (non nociceptive) ou 46°C (nociceptive) ou un bain d'eau froide à 10°C (non nociceptive) ou 4°C (nociceptive). La durée maximale d'immersion (cut-off) est de 15 secondes.

L'animal doit être maintenu avec les deux mains immobilisant l'arrière-train et la partie antérieure du corps. Chaque rat doit être préalablement habitué à cette préhension de manière à ce qu'il ne manifeste aucune réaction d'aversion, de lutte ou de mouvement de la queue pendant 15 secondes, dans des conditions où n'est appliquée aucune stimulation.

## ▪ **Etude des troubles moteurs**

### → *Actimétrie*

L'activité motrice des rats est évaluée à l'aide d'un actimètre (*Apelex*) permettant de quantifier les déplacements verticaux et horizontaux d'un animal dans une cage placée sur un champ magnétique. Les mesures seront effectuées individuellement pour chaque rat, dans l'obscurité pendant 10 minutes.

### → *Test de force motrice : grip strength*

Les pattes antérieures de l'animal sont placées sur un grillage auquel il s'agrippe. Le manipulateur exerce une traction arrière sur la queue du rat jusqu'à que ce dernier lâche la grille. Ceci permet de mesurer la force d'agrippement maximale exprimée en Newton.

## ▪ Etude Statistique

L'analyse statistique des résultats des tests est effectuée à l'aide du test t de Student pour séries appariées (variabilité intra-traitement) après une analyse de variance à mesures répétées (Stat View 4) ou pour séries non appariées (variabilité inter-traitement). La significativité a été retenue pour un  $p < 0,05$ .

### *b) Résultats*

L'observation des rats ne montre aucune différence entre les rats témoins et les rats ayant ingéré du dialysat, quelle que soit la dose administrée.

Aucun symptôme n'est apparu chez aucun des rats !

Les tests effectués après administration de dialysat semblent moins standardisés que les tests effectués après administration de champignon entier (comparer les témoins dans les *annexes 3* et *4*).

L'analyse de variance à mesures répétées, montre qu'aucun des résultats des rats des groupes traités n'est significativement différent des résultats des rats témoins pour les huit tests effectués : L'effet traitement n'est significatif pour aucun des tests (*Annexe 4*).

→ Ces résultats montrent que le dialysat n'a pas reproduit chez les rats la toxicité du champignon entier.

Afin de vérifier les conditions expérimentales, de nouvelles administrations ont été testées sur les 8 rats témoins de la précédente expérience :

- Pour vérifier si la dose de dialysat administrée était suffisante :
  - 2 rats ont été gavés avec 2 g/kg de dialysat (= 10 g/kg équivalent champignon)
  - 2 rats ont été gavés avec 4 g/kg de dialysat (= 20 g/kg équivalent champignon)
- Pour valider l'expérience avec des témoins positifs :
  - 2 rats ont reçu 10 g/kg de champignon entier sec en remplacement de leur alimentation
  - 2 rats ont reçu 20 g/kg de champignon en remplacement de leur alimentation

→ A J3, l'état général est bon pour tous les rats ayant reçu du dialysat, seulement quelques très légères parésies sont apparues chez les rats ayant reçu 4 g/kg de dialysat.

En revanche, tous les rats ayant consommé le champignon sont morts en 2 jours, après paralysie totale.

En parallèle, le dialysat restant à Clermont-Ferrand a été réacheminé au laboratoire de Pharmacologie et d'analyses Toxicologique du CHU de Grenoble afin de vérifier la concentration d'AAA.

→ La concentration obtenue est identique à celle trouvée précédemment (soit 1490 ng d'AAA / mg de dialysat).

**« L'absence de toxicité du dialysat dans les conditions de l'expérience est confirmée. »**

## 6.2 Etude chimique de la $\beta$ -cyano-L-alanine

En parallèle des travaux sur l'AAA, nous avons également étudié la BCLA. C'est un petit acide aminé neurotoxique présent dans *Clitocybe acromelalga* (Fushiya S et al., 1993) et dans *Vicia sativa* (Roy D et al., 1996). Son toxicité dans les végétaux nous a incité à rechercher sa présence dans *Clitocybe amœnolens*.

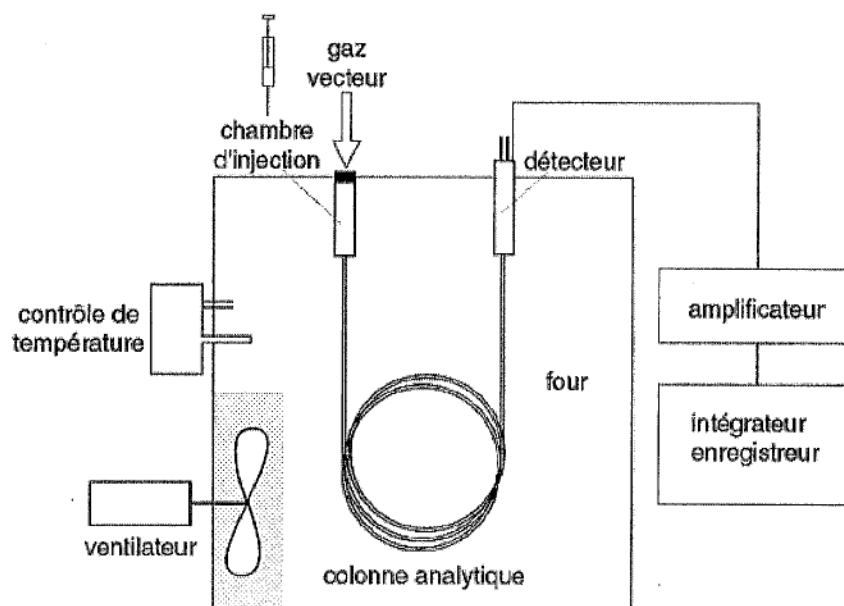
### a) Matériel et Méthode

Cette étude est possible car la BCLA, est disponible dans le commerce (*Sigma*).

La BCLA n'étant pas retenue en chromatographie liquide sur la colonne Hypercarb® dans les conditions de dosage de l'AAA, une autre technique chromatographique a donc été développée. Il s'agit de la Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG-SM).

### La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La CPG est utilisée pour séparer des composés volatils, apolaires, thermostables et de faible masse moléculaire.



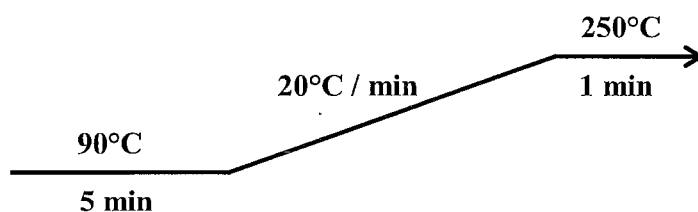
*Figure 12 : Schéma d'un montage de CPG*

### Matériel utilisé

- CPG et injecteur automatique : HP-6890 Series (HP)
- Colonne : DB-5MS (30m x 0,25mm, épaisseur de phase = 0,25µm) (JW)
- Spectromètre de masse : Mass Selective Detector 5973 (HP)
- Ordinateur PC équipé du logiciel *HpchemStation*

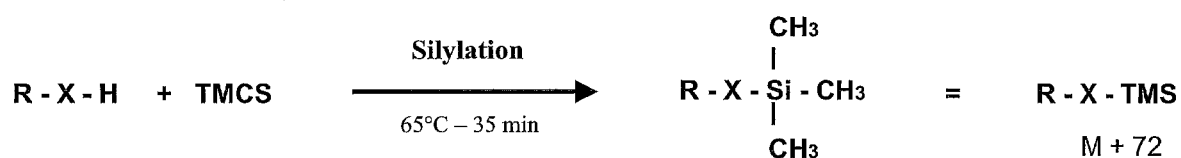


## Programme CPG



## Dérivatisation de l'échantillon

Afin d'obtenir des pics chromatographiques fins et bien résolus, les échantillons subissent préalablement une dérivation. Il s'agit d'une silylation des fonctions comportant un hydrogène labile : les produits polaires deviennent alors apolaires, plus volatils, et plus stables thermiquement.



Un aliquote de solution à analyser est évaporé à sec. Le résidu est repris par 40 $\mu$ L d'un agent de silylation : le bis(triméthyl-silyl)trifluoro-acétamide (BSTFA) contenant 1% de triméthylchlorosilane (TMCS) pendant 35 minutes, à 65°C.

Un  $\mu$ L de cette solution est injecté dans le système chromatographique.

## Recherche d'un étalon interne

Un étalon interne est une molécule qui doit avoir un comportement chromatographique voisin de celui de la molécule à doser. Ajouté, à une concentration donnée, à la solution à doser, il permet de corriger les erreurs liées aux écarts de volumes injectés.

La BCLA est un acide aminé. Notre recherche d'étalon interne s'est donc orientée vers d'autres acides aminés de structure chimique proche de la BCLA.

Des solutions mères de leucine, valine, phénylalanine (*Prolabo*), norleucine et norvaline (*Nutritional Biochemicals Corporation*) à une concentration de 100 mg/l dans du méthanol ont été préparées. Après silylation et injection en CG-SM d'aliquotes de solution mère, le spectre de masse de chaque molécule a été enregistré.

L'analyse d'extraits de champignon dans les mêmes conditions a permis de mettre en évidence la présence de valine, de leucine et de phénylalanine chez *Clitocybe amoenolens* (identification d'un pic par son temps de rétention et son spectre de masse). Ces trois acides aminés ne pourront donc pas servir d'étalon interne.

En revanche, la norleucine et la norvaline n'ont été retrouvées ni dans le dialysat, ni dans le surnageant. La norvaline et la norleucine ont donc été ajoutées afin de déterminer laquelle des ces deux dernières molécules avait le temps de rétention le plus voisin de la BCLA et donnait le moins d'interférences dans les conditions de l'analyse du champignon.

Il s'est alors avéré que ces deux molécules répondaient chacune très bien à ces critères. Elles seront donc toutes les deux utilisées en tant qu'étalon interne, afin d'ajuster au mieux les courbes d'étalonnage.

## Quantification de la BCLA

La quantification a été réalisée en mode Selected Ion Monitoring (SIM). Après dérivation la BCLA porte deux groupements silylés, sa masse moléculaire M est égale à 258. L'ion de quantification choisi,  $m/z$  141, est l'ion le plus intense (pic de base), il correspond à la perte du radical COOTMS. Les ions M-15 et M-43 ont été choisis comme ions de confirmation (Annexe 5 – Figures 1 et 2).

|  | Dérivés silylés  | Ion de quantification<br>M - 117 | Ions de confirmation |        |
|--|--|----------------------------------|----------------------|--------|
|  |  |                                  | M - 15               | M - 43 |
| <b>Norvaline</b><br>M = 117<br>$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$                | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COO-TMS} \\   \\ \text{NH-TMS} \end{array}$<br>M = 261               | 144                              | 218                  | 246    |
| <b>Norleucine</b><br>M = 131<br>$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COO-TMS} \\   \\ \text{NH-TMS} \end{array}$<br>M = 275 | 158                              | 232                  | 260    |
| <b>BCLA</b><br>M = 114<br>$\begin{array}{c} \text{CN} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$                       | $\begin{array}{c} \text{CN} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COO-TMS} \\   \\ \text{NH-TMS} \end{array}$<br>M = 258                 | 141                              | 215                  | 243    |

Tableau III: Ions de quantification et de confirmation de la norvaline, de la norleucine et de la BCLA

La linéarité de la méthode a été vérifiée de 10 ng/mg à 500ng/mg, avec deux étalons internes à 100 ng/mg. La limite de quantification (Limite Of Quantification : LOQ) est de 10 ng/mg.

## Recherche de BCLA dans d'autres champignons

On a choisi de commencer cette recherche dans deux espèces comestibles :

- *Agaricus bisporus*, le champignon de Paris, disponible facilement et en quantité importante (grande distribution) et totalement dépourvu de toxicité, même consommé cru.
- *Lepista inversa* (ramassé par P. Saviuc en 2001 et 2002) qui est un champignon non toxique, proche morphologiquement de *Clitocybe amoenolens*.

Des extraits ont été préparés à partir de ces deux espèces en suivant un protocole du même type que celui développé pour l'extraction de *C. amœnolens* :

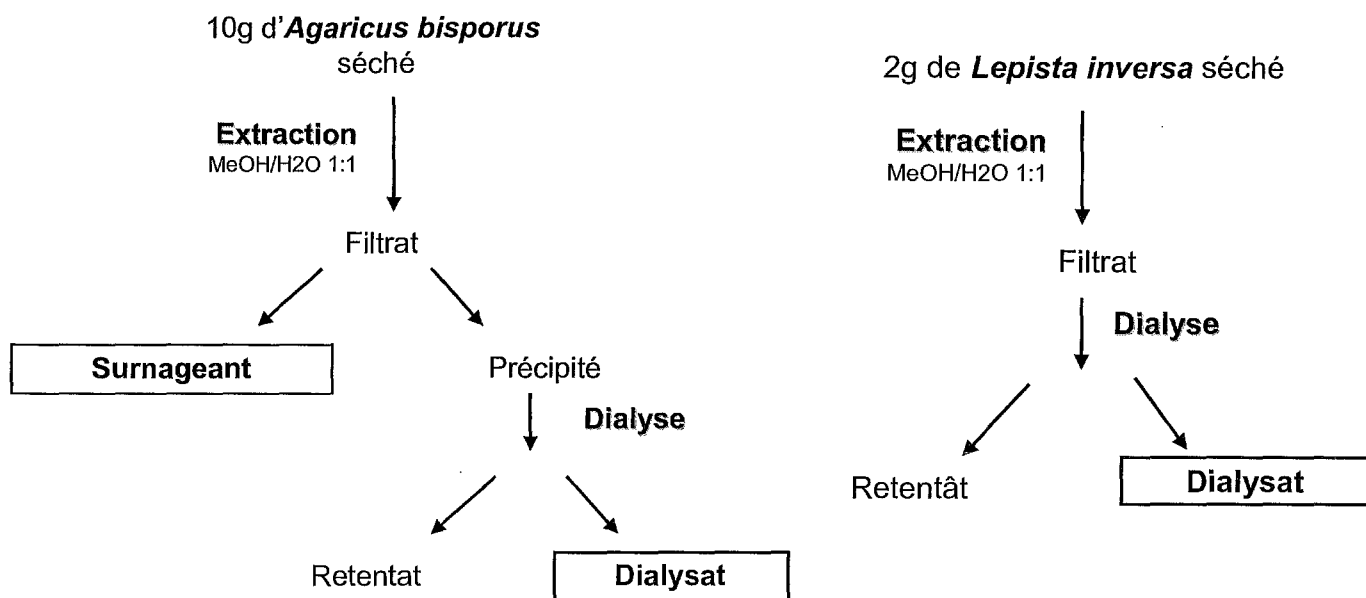


Figure 13 : Schémas d'extraction d'Agaricus bisporus et de Lepista inversa

### b) Résultats

| Champignon          | Concentration du Surnageant<br>ng/mg | Concentration du Dialysat<br>ng/mg |
|---------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| <i>A. bisporus</i>  | < LOQ                                | < LOQ                              |
| <i>L. inversa</i>   | ND*                                  | < LOQ                              |
| <i>C. amœnolens</i> | 600                                  | 470                                |

\*Non Déterminé : La trop faible quantité de *L. inversa* dont nous disposions ne nous a pas permis l'obtention de surnageant.

Tableau IV: Dosage de la BCLA dans différentes espèces

→ La BCLA n'a été retrouvée que chez *Clitocybe amœnolens*.

Le schéma d'extraction mis au point pour concentrer l'AAA (*figure 3*) n'est pas aussi efficace pour concentrer la BCLA. En effet, on retrouve sensiblement autant de BCLA dans le surnageant que dans le dialysat.

## **7 DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES**

Une technique a été mise au point pour permettre de concentrer l'AAA dans des extraits et d'obtenir une forme facilement assimilable par l'animal.

Les résultats des tests chez l'animal permettent de soulever la question de la présence d'un principe toxique dans le dialysat avec comme hypothèse :

- L'AAA est présent en concentration insuffisante : erreur de calcul de la concentration ? ou défaut d'homogénéité du dialysat lyophilisé ?

Cette hypothèse est peu probable dans la mesure où la quantité d'AAA a été vérifiée *a posteriori* et confirmée dans le dialysat restant et que les calculs ont été faits et refaits à plusieurs reprises, par des personnes différentes et expérimentées.

- L'AAA est présent, à bonne concentration et n'est pas toxique dans les conditions de cette expérience. (Le suspect est-il masqué ?)

- Plusieurs substances, dont l'AAA doivent être présentes et en quantité suffisantes pour manifester une toxicité. (Le suspect aurait un complice ?)

C'est l'hypothèse la plus séduisante. Il semble effectivement probable que plusieurs molécules puissent agir en synergie afin de provoquer un mécanisme d'action toxique. Des synergies entre différentes molécules présentes dans une même plante sont en effet observées au niveau du mécanisme d'action pharmacologique de certaines espèces utilisées en phytothérapie.

- L'AAA n'est peut être tout simplement pas toxique par voie orale : notre suspect n°1 serait alors disculpé ?!

## *Perspectives*

Devant ces résultats surprenants, il conviendrait de reprendre les investigations au commencement.

En effet, il faudrait repartir du champignon entier et recommencer le fractionnement en étudiant la toxicité de tous les extraits à chaque étape de purification. Ce « bioguidage » est une méthode qui permettrait de savoir à quelle étape de la purification on « perd la toxicité » et donc de déterminer la ou les molécules coupables.

Cependant le bioguidage demande des moyens humains, financiers et logistiques (!) difficiles à réunir à ce jour.

La poursuite de l'étude de la BCLA est quant à elle envisageable :

- Validation de la méthode de dosage de la BCLA par CG-SM;
- Mise au point d'un protocole d'extraction efficace pour isoler la BCLA ;
- Recherche de la BCLA dans un plus grand nombre d'espèces.

## 8 CONCLUSION

En 1996, en Savoie, cinq personnes furent intoxiquées et présentèrent un syndrome peu fréquent : une érythrmalgie. Une première enquête a permis d'attribuer la cause de cette intoxication à l'ingestion de champignons non identifiés.

Une seconde enquête a permis l'identification de cette espèce comme étant *Clitocybe amoenolens*. Cette espèce est proche de *Clitocybe acromelalga*, un champignon japonais produisant le même syndrome.

Parmi les nombreuses substances isolées dans *Clitocybe acromelalga*, les acides acroméliques sont des acides aminés neuro excitateurs, qui occupent une place particulière. Cependant, leur responsabilité dans la toxicité *per os* de *C. acromelalga* n'est pas démontrée à ce jour.

En ce qui concerne *C. amoenolens*, sa toxicité été démontrée chez l'animal, et l'acide acromélique A (AAA) a été également mis en évidence.

Dans ce contexte, l'objet de mon travail visait à déterminer si l'acide AAA était responsable de la toxicité *per os* du champignon savoyard. Le protocole de recherche a consisté à concentrer l'AAA dans un extrait puis à administrer cet extrait concentré par voie orale à l'animal.



Certains de ces objectifs ont été atteints :

- Le protocole d'extraction de l'AAA à partir de *Clitocybe amœnolens* a permis de concentrer environ cinq fois l'AAA dans un extrait : le dialysat.
- La chromatographie d'échange d'ions a ensuite permis de concentrer encore l'AAA à partir de ce dialysat (33 fois plus d'AAA que dans le champignon entier).
- Ce dialysat soluble dans l'eau et en quantité suffisante a pu être aisément administré aux rats.
- Une autre molécule, la  $\beta$ -cyano-L-alanine (BCLA) dont la présence connue dans *C. acromelalga* a également été détectée dans *C. amœnolens*.

Par contre, les tests biologiques n'ont pas donné les résultats attendus. En effet, ce dialysat administré *per os* chez le rat ne s'est pas avéré toxique.

Les hypothèses pour expliquer ce résultat sont aussi les pistes des recherches futures :

- Un biais expérimental a-t-il pu expliquer l'absence de toxicité chez le rat du dialysat concentré en acide acromélique A ?
- La toxicité *per os* du champignon entier pourrait-elle être liée à une autre substance ? Pourquoi pas la BCLA ?
- Pourrait-il exister une synergie d'action toxique entre l'AAA et une autre molécule, non présente dans le dialysat, ou présente mais en quantité insuffisante ? Et laquelle...

THESE SOUTENUE PAR : CECILE CHAUVIN

TITRE : CLITOCYBE AMÆNOLENS : PLUSIEURS ENQUETES ET TOUJOURS UN MYSTERE !

## CONCLUSION

En 1996, en Savoie, cinq personnes furent intoxiquées et présentèrent un syndrome peu fréquent : une érythermalgie. Une première enquête a permis d'attribuer la cause de cette intoxication à l'ingestion de champignons non identifiés.

Une seconde enquête a permis l'identification de cette espèce comme étant *Clitocybe amoenolens*. Cette espèce est proche de *Clitocybe acromelalga*, un champignon japonais produisant le même syndrome.

Parmi les nombreuses substances isolées dans *Clitocybe acromelalga*, les acides acroméliques sont des acides aminés neuro excitateurs, qui occupent une place particulière. Cependant, leur responsabilité dans la toxicité *per os* de *C. acromelalga* n'est pas démontrée à ce jour.

En ce qui concerne *C. amoenolens*, sa toxicité été démontrée chez l'animal, et l'acide acromélique A (AAA) a été également mis en évidence.

Dans ce contexte, l'objet de mon travail visait à déterminer si l'acide AAA était responsable de la toxicité *per os* du champignon savoyard. Le protocole de recherche a consisté à concentrer l'AAA dans un extrait puis à administrer cet extrait concentré par voie orale à l'animal.

Certains de ces objectifs ont été atteints :

- Le protocole d'extraction de l'AAA à partir de *Clitocybe amænoles* a permis de concentrer environ cinq fois l'AAA dans un extrait : le dialysat.

- La chromatographie d'échange d'ions a ensuite permis de concentrer encore l'AAA à partir de ce dialysat (33 fois plus d'AAA que dans le champignon entier).
- Ce dialysat soluble dans l'eau et en quantité suffisante a pu être aisément administré aux rats.
- Une autre molécule, la  $\beta$ -cyano-L-alanine (BCLA) dont la présence connue dans *C. acromelalga* a également été détectée dans *C. amoenolens*.

Par contre, les tests biologiques n'ont pas donné les résultats attendus. En effet, ce dialysat administré *per os* chez le rat ne s'est pas avéré toxique.

Les hypothèses pour expliquer ce résultat sont aussi les pistes des recherches futures :

- Un biais expérimental a-t-il pu expliquer l'absence de toxicité chez le rat du dialysat concentré en acide acromélique A ?
- La toxicité *per os* du champignon entier pourrait-elle être liée à une autre substance ? Pourquoi pas la BCLA ?
- Pourrait-il exister une synergie d'action toxique entre l'AAA et une autre molécule, non présente dans le dialysat, ou présente mais en quantité insuffisante ? Et laquelle...

#### VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 3 avril 2006

LE DOYEN  
P. DEMÉNGE



LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

V. DANIEL

A handwritten signature in black ink, appearing to read "V. Daniel".

## **BIBLIOGRAPHIE**

[1] **Allardin K.** Un *Clitocybe* peu connu en France responsable d'un syndrome acroméalgique.

*Thèse d'exercice. Faculté de pharmacie de l'Université Joseph Fourier.* 2001 ; 1-81.

[2] **Authier N, Balayssac D, Foucaud M et al.** Evaluation comportementale de la neurotoxicité périphérique de champignon *Clitocybe amœnolens*.

*Journées de la Société Française de Toxicologie, Paris, 20-21 novembre 2002 (abstract).*

[3] **Becker G.** Intoxications inattendues. In: *La vie privée des champignons.*

Maloine, Paris, 1975 ; 88.

[4] **Bessard J, Saviuc P, Moreau PA, Bessard G.** Acide acromélique A : screening de champignons proches de *Clitocybe amœnolens*.

Congrès de la Société Française de Toxicologie Analytique, Dinard, 11-13 juin 2003.

*Annales de Toxicologie Analytique.* 2003 ; **15** (3): 162-163.

[5] **Bessard J, Saviuc P, Chane-Yene Y, Monnet S, Bessard G.** Mass spectrometric determination of acromelic acid A from a new poisonous mushroom: *Clitocybe amœnolens*.

*Journal of Chromatography A.* 2004 ; **1055**: 99-107.

[6] **Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL.** Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw.

*Journal of Neuroscience Methods.* 1994 ; **53**: 55-63.

[7] **Claustre A, Saviuc P, Garcin R et al.** A la poursuite du champignon toxique.

Journée scientifique de la société de Toxicologie Clinique, Paris, 12 octobre 1998 (abstract).

[8] **Fons F, Rapior S, Fruchier A, Saviuc P, Bessière JM.** Volatile composition of *Clitocybe amoenolens*, *Tricholoma caligatum* and *Hebeloma radicosum*.

*Criptogamie, Mycologie.* 2006 ; **27(1)**: 1-11.

[9] **Fushiya S, Sato S, Kazasawa T, Kusano G, Nozoe S.** Acromelic acid C. A new toxic constituent of *Clitocybe acromelalga*: a efficient isolation of acromelic acids.

*Tetrahedron Letter.* 1990 ; **31(27)**: 3901-3904.

[10] **Fushiya S, Sato S, Kera Y, Nozoe S.** Isolation of acromelic acids D and E from *Clitocybe acromelalga*.

*Heterocycles.* 1992a ; **34(7)**: 1277-1280.

[11] **Fushiya S, Sato S, Nozoe S.** L-stizolobic acid and L-stizolobinic acid from *Clitocybe acromelalga* precursors of acromelic acids.

*Phytochemistry.* 1992b ; **31(7)**: 2337-2339.

[12] **Fushiya S, sato S, Kusano G, Nozoe S.** Beta-Cyano-L-alanine and N-(gamma-L-glutamyl)-beta-cyano-L-alanine, neurotoxic constituents of *Clitocybe acromelalga*.

*Phytochemistry.* 1993 ; **33(1)**: 53-55.

[13] **Fushiya S, Yamada S, Matsuda M, Nozoe S.** Three new amino acids from a poisonous mushroom, *Clitocybe acromelalga*.

*Tetrahedron Letter.* 1994 ; **35(44)**: 8201-8204.

[14] Fushiya S, Matsuda M, Yamada S, Nozoe S. New opine type amino acids from poisonous mushroom, *Clitocybe acromelalga*.

*Tetrahedron Letter*. 1996 ; **52(3)**: 877-886.

[15] Guerville V. Les acrosyndromes vasculaires d'origine toxique : étude bibliographique.

*Thèse d'exercice. Faculté de médecine de l'Université Joseph Fourier*. 2000. 1-88.

[16] Guez D. Aperçu sur la flore mycologique du Japon.

*Bulletin trimestriel de la Fédération Mycologique Dauphiné-Savoie*. 1990 ; **116**: 12-14.

[17] Harmaja H. A revision of the generic limit between, *Clitocybe* and *Lepista*.

*Karstenia*. 1974 ; **14**: 82-92.

[18] Hirayama F, Konno K, Shirahama H, Matsumoto T. 4-aminopyridine-2,3-dicarboxylic acid from *Clitocybe acromelalga*.

*Phytochemistry*. 1989 ; **28(4)**: 1133-1135.

[19] Ishida M, Shinozaki H. Acromelic acid is a much more potent excitant than kainic or domoic acid in the isolated rat spinal cord.

*Brain Research*. 1988 ; **474(2)**: 386-389.

[20] Konno K, Hayano K, Shirahama H, Saito H, Matsumoto T. Clitidine, a new toxic pyridine nucleoside from *Clitocybe acromelalga*.

*Tetrahedron Letter*. 1982 ; **38(22)**: 3281-3284.

[21] Konno K, Shirahama H, Matsumoto T. Isolation and structure of acromelic acid A and B. New kainoids of *Clitocybe acromelalga*.

*Tetrahedron Letter*. 1983 ; **24(9)**: 939-942.

[22] **Konno K, Shirahama H, Matsumoto T.** Clithioneine, an amino acid betaine from *Clitocybe acromelalga*.

*Phytochemistry*. 1984 ; **23**: 103-106.

[23] **Kwak S, Aizawa H, Ishida M, Shinozaki H.** Acromelic acid, a novel kainate analogue, induces long-lasting paresis with selective degeneration of interneurons in the rat spinal cord.

*Experimental Neurology* .1992 ; **116(2)**: 145-155.

[24] **Lazareth I, Fiessenger JN, Priolet P.** L'érythrealgie, un acrosyndrome rare. Treize cas. *Presse Medicale* .1988 ; **17**: 2235-2239.

[25] **Lawrence J, Lau B, Cleroux C, Lewis D.** Comparison of UV absorption and electrospray mass spectrometry for the high-performance liquid chromatographic determination of domoic acid in shellfish and biological samples.

*Journal of Chromatography A*. 1994 ; **659**: 119-126.

[26] **Malençon G, Bertault R.** Flore des champignons supérieurs du Maroc.

*Institut Scientifique Chérifien et Faculté des Sciences de Rabat, Série Botanique et Biologie Végétale*. 1975 ; tome 2, n°33, 1-540.

[27] **Miyauchi S.** Comparison *Clitocybe acromelalga* with *Clitocybe sp.* collected in France.

Nagaoka University of Technology, Section of Bio-engineering Kamitomioka 1603-1, Nagaoka 94021-88 Japan. 1998.

[28] **Moreau PA, Courtecuisse R, Guez D, Garcin R, Neville P, Saviuc P, Seigle-Murandi F.** Analyse taxinomique d'une espèce toxique : *Clitocybe amoenolens* Malençon. *Cryptogamie, Mycologia*.

2001 ; **22(2)**: 95-117.

- [29] Nakamura K, Shoyama F, Toyama J, Tateishi K. Empoisonnement par le Dokou-sassako. *Japanese Journal of Toxicology*. 1987 ; **33**: 1079-1085.
- [30] Necker P, Hellon RF. Noxious thermal input from the rat tail: modulation by descending inhibitory influences. *Pain*. 1978 ; **4**: 231-242.
- [31] Neville P, Poumarat S. A propos de *Clitocybe amœnolens* Malençon. *Bulletin de la Fédération de Mycologie Dauphiné-Savoie*. 1998 ; **151**: 5-8.
- [32] Romagnesi H. Curiosité mycologique : un champignon tortionnaire japonais : *Clitocybe acromelalga* Ichimura. *Bulletin de la Société Mycologique. France*. 1989 ; **105**: 131-132.
- [33] Romagnesi H. *Clitocybe acromelalga*. *Bulletin de la Société Mycologique. France*. 1987 ; **103(2)**: 25.
- [34] Roy D, Sabri M, Kayton J, Spencer P.  $\beta$ -Cyano-L-alanine toxicity: evidence for the involvement of an excitotoxic mechanism. *Natural Toxins*. 1996 ; **4**: 247-253.
- [35] Satelle D, Sepulveda M, Shinozaki H, Ishida M. Action of acromelic acid on neuron system L-glutamate receptors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 1994 ; **25**: 87-94.
- [36] Saviuc P, Danel V, Moreau P *et al.* Erythromelalgia and mushroom poisoning. *Clinical Toxicology*. 2001a ; **39(4)**: 403-407.



[37] Saviuc P, Dematteis M, Mezin P, Danel V. Toxicity of the *Clitocybe amoenolens* mushroom in the rat.

*Veterinary and Human Toxicology*. 2003a ; **45(4)**: 180-182.

[38] Saviuc P. Toxicité de *Clitocybe amœnolens* Malençon ou l'intoxication par *Clitocybe amœnolens* Malençon jusqu'au bout des doigts !

*Association Entrevalaise Mycologique et Botanique Appliquée*. 2003b ; **40**: 39-46.

[39] Stijve T. Beware of those brown clitocybes! A new poisonous mushroom in Europe.

*Field Mycology*. 2001 ; **2(3)**: 77-79.

[40] Wright J, Boyd R, Defrietas A *et al.* 1989. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern P.I.E.

*Canadian Journal of Chemistry*. 1989 ; **67**: 481-490.

[41] Yamano K, Shirahama H. New amino acids from the poisonous mushroom *Clitocybe acromelalga*.

*Tetrahedron Letter*. 1992 ; **48(8)**: 1457-1464.

[42] Yamano K, Konno K, Shirahama H. A novel neuroexcitatory amino acid from *Clitocybe acromelalga*. A possible intermediate in the biogenesis of acromelic acid A.

*Heterocycles*. 1993a ; **35(1)**: 125-128.

[43] Yamano K, Shirahama H. Isolation of L-N-[2-(3-pyridyl)ethyl]-glutamic acid from the poisonous mushroom *Clitocybe acromelalga*. A possible intermediate in the biogenesis of acromelic acids.

*Chemistry Letter*. 1993b: 21-23.

[44] Yamano K, Shirahama H. A piperidine amino acid, 2,4,5-piperidinetricarboxylic acid from *Clitocybe acromelalga*.

*Zeitschrift für Naturforschung*. 1994a ; **49c (11-12)**: 707-711.

[45] Yamano K, Shirahama H. Clitidine 5'-mononucleotide, a toxic pyridine nucleotide from *Clitocybe acromelalga*.

*Phytochemistry*. 1994b ; **35(4)**: 897-899.

[46] Yamano K, Shirahama H. The structure of a new dipeptide from the mushroom *Clitocybe acromelalga*.

*Zeitschrift für Naturforschung*. 1994c ; **49c (3-4)**: 157-162.

## **ANNEXES**

### **- Annexe 1 -**

**Tableau 1** : Substances isolées de *Clitocybe acromelalga*

### **- Annexe 2 -**

**Figure 1** : Spectres de masse de l'acide kaïnique et de l'AAA

### **- Annexe 3 -**

#### **Résultats des tests effectués après administration de champignons entiers**

*(Authier N et al., 2002)*

**Figure 1** : Evolution du poids corporel

**Figure 2** : Activité motrice (actimétrie)

**Figure 3** : Test de sensibilité thermique (T°C froide non-nociceptive : 10°C)

**Figure 4** : Test de sensibilité thermique (T°C froide nociceptive : 4°C)

**Figure 5** : Test de sensibilité thermique (T°C chaude non-nociceptive : 42°C)

**Figure 6** : Test de sensibilité thermique (T°C chaude nociceptive : 46°C)

### **- Annexe 4 -**

#### **Résultats des tests effectués après administration de dialysat**

**Figure 1** : Evolution du poids corporel

**Figure 2** : Activité motrice (actimétrie)

**Figure 3** : Test d'agrippement (grip strenght)

**Figure 4** : Test de sensibilité mécanique (filaments de Von Frey)

**Figure 5** : Test de sensibilité thermique (T°C froide non-nociceptive : 10°C)

**Figure 6** : Test de sensibilité thermique (T°C froide nociceptive : 4°C)

**Figure 7** : Test de sensibilité thermique (T°C chaude non-nociceptive : 42°C)

**Figure 8** : Test de sensibilité thermique (T°C chaude nociceptive : 46°C)

### **- Annexe 5 -**

**Figure 1** : Chromatogramme de la norvaline, de la norleucine et de la BCLA

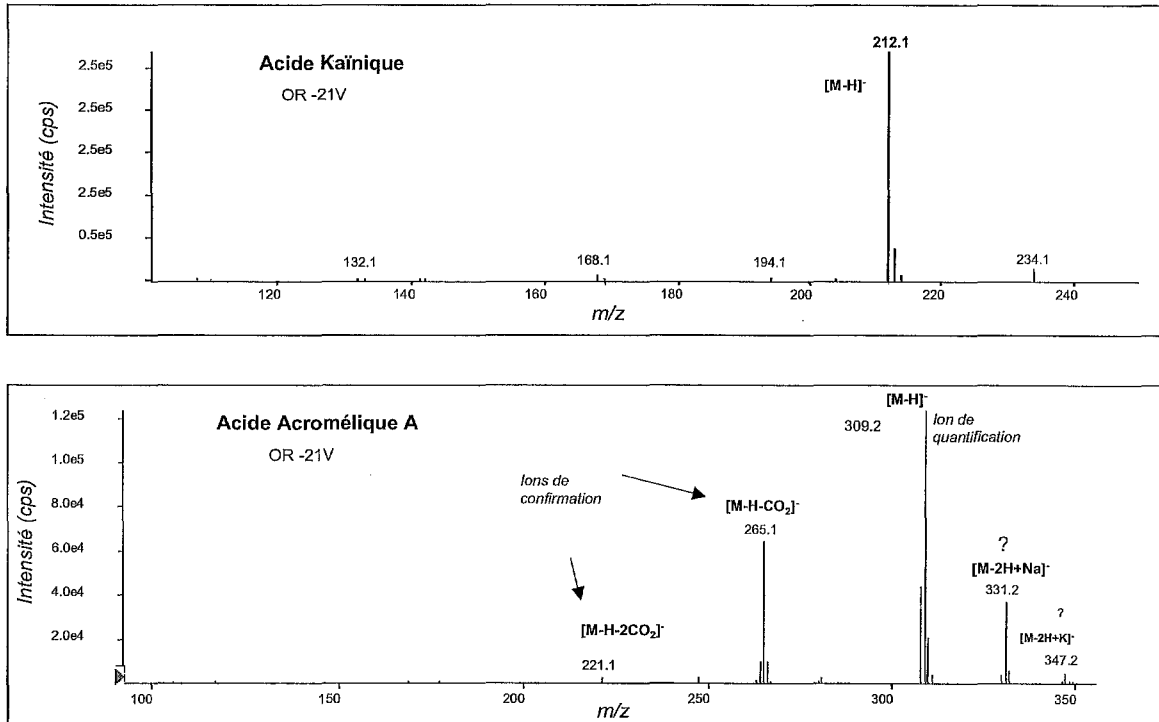
**Figure 2** : Spectres de masse de la norvaline, de la norleucine et de la BCLA

- Annexe 1 -

| <b>Substances</b>                         | <b>Auteurs, année de parution</b> |
|---|-----------------------------------|
| 3-(6-carboxy-2-oxo-3-pyridyl)-L-alanine   | YAMANO & SHIRAHAMA, 1993a         |
| 3-(6-carboxy-2-oxo-4-pyridyl)-L-alanine   | YAMANO & SHIRAHAMA, 1993a         |
| acide 2,4,5 piperidine carboxylique       | YAMANO & SHIRAHAMA, 1994a         |
| acide 3-(2-carboxy-4-pyrrolyl)-alanine    | YAMANO & SHIRAHAMA, 1992          |
| acide 3-(2-oxo-5-pyridyl)-alanine         | YAMANO & SHIRAHAMA, 1992          |
| acide 4-aminopyridine-2-3-dicarboxylique  | HIRAYAMA <i>et al.</i> , 1989     |
| acide acromélique A                       | KONNO <i>et al.</i> , 1988        |
| acide acromélique B                       | KONNO <i>et al.</i> , 1988        |
| acide acromélique C                       | FUSHIYA <i>et al.</i> , 1990      |
| acide acromélique D                       | FUSHIYA <i>et al.</i> , 1992a     |
| acide acromélique E                       | FUSHIYA <i>et al.</i> , 1992a     |
| acide N-(2-(3(pyridylethyl)glutaminique   | YAMANO & SHIRAHAMA, 1993b         |
| acide N-(gamma-aminobutyryl)-L-glutamique | YAMANO & SHIRAHAMA, 1994c         |
| acide stizolobinique                      | FUSHIYA <i>et al.</i> , 1992b     |
| acide stizolobique                        | FUSHIYA <i>et al.</i> , 1992b     |
| beta-cyano-L-alanine                      | FUSHIYA <i>et al.</i> , 1993      |
| Clithioneine                              | KONNO <i>et al.</i> , 1984        |
| clitidine-5'-nucleoside                   | KONNO <i>et al.</i> , 1982        |
| clitidine-5'-nucleotide                   | YAMANO & SHIRAHAMA, 1994b         |
| épi-leucinopine                           | FUSHIYA <i>et al.</i> , 1994      |
| gamma-glutamyl-B-cyano-L-alanine          | FUSHIYA <i>et al.</i> , 1993      |
| Isoleucinopine                            | Fushiya <i>et al.</i> , 1994      |
| Phénylalaninopine                         | FUSHIYA <i>et al.</i> , 1996      |
| Valinopine                                | FUSHIYA <i>et al.</i> , 1994      |

*Annexe 1 - Tableau I : Substances isolées de Clitocybe acromelalga.*

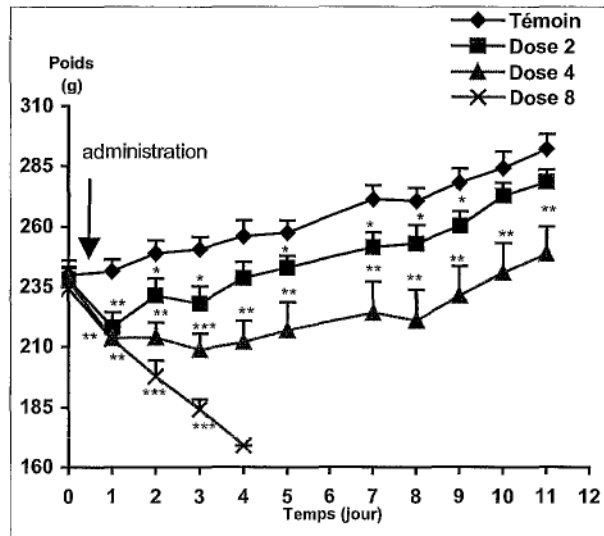
- Annexe 2 -



Annexe 2 - Figure 1 : Spectres de masse de l'acide kaïnique et de l'AAA (Bessard J et al., 2004)

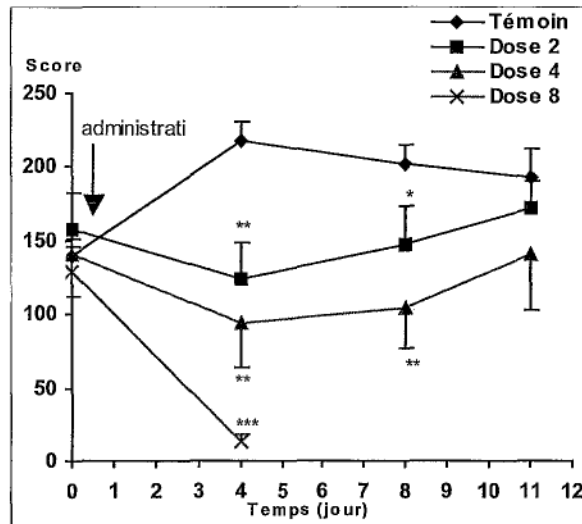
- Annexe 3 -

**Tests précédemment effectués après administration de champignon entier**  
(Authier N et al., 2002)



*Annexe 3 - Figure 1 :*

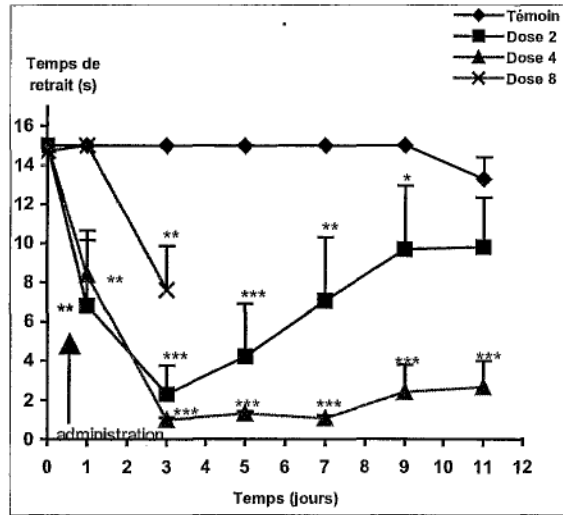
Evolution du poids corporel des rats témoins ( $n=7$ ) et des rats ayant ingéré différentes doses de *Clitocybe amoenolens* (dose 2 g/kg,  $n=5$ ), (dose 4 g/kg,  $n=5$ ), (dose 8 g/kg,  $n=3$ ). Le poids (exprimé en moyenne  $\pm$  ESM) a été mesuré avant l'administration (j jour 0), puis pendant 11 jours. ( $p < 0,05$  [\*],  $p < 0,01$  [\*\*],  $p < 0,001$  [\*\*\*]; ANOVA et test t de Student pour séries non appariées).



*Annexe 3 - Figure 2 :*

Actimétrie : Evolution de l'activité motrice des rats témoins ( $n=7$ ) et des rats ayant ingéré différentes doses de *Clitocybe amoenolens* (dose 2 g/kg,  $n=5$ ), (dose 4 g/kg,  $n=5$ ), (dose 8 g/kg,  $n=3$ ). L'activité motrice (exprimée en score moyen  $\pm$  ESM) a été mesurée avant l'administration (jour 0), puis aux jours 4, 8 et 11. ( $p < 0,05$  [\*],  $p < 0,01$  [\*\*],  $p < 0,001$  [\*\*\*]; ANOVA et test t de Student pour séries non appariées).

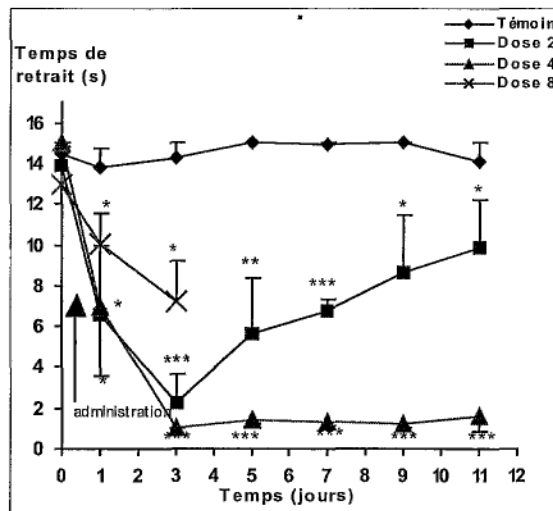
## Tests de sensibilité thermique (T°C froides)



*Annexe 3 - Figure 3*

Evolution des délais de retrait de la queue immergée dans l'eau à 10°C des rats témoins (n=7) et des rats ayant ingéré différentes doses de *Clitocybe amoenolens* (dose 2 g/kg, n=5), (dose 4 g/kg, n=5), (dose 8 g/kg, n=3). Les délais (exprimés en temps moyens  $\pm$  ESM) ont été mesurés avant le gavage (jour 0), puis pendant 11 jours.

( $p < 0,05$  [\*],  $p < 0,01$  [\*\*),  $p < 0,001$  [\*\*\*]; ANOVA et test t de Student pour séries non appariées).

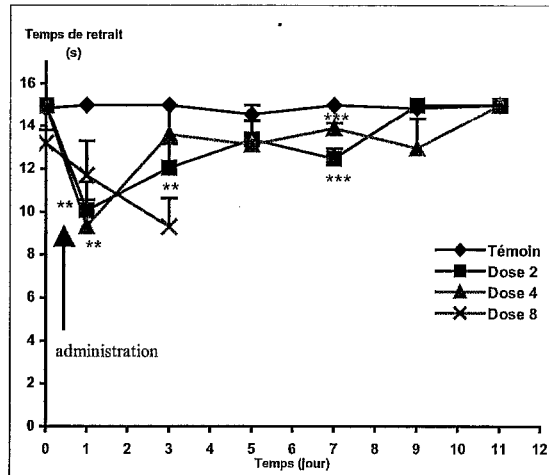


*Annexe 3 - Figure 4 :*

Evolution des délais de retrait de la queue immergée dans l'eau à 4°C des rats témoins (n=7) et des rats ayant ingéré différentes doses de *Clitocybe amoenolens* (dose 2 g/kg, n=5), (dose 4 g/kg, n=5), (dose 8 g/kg, n=3). Les délais (exprimés en temps moyens  $\pm$  ESM) ont été mesurés avant le gavage (jour 0), puis pendant 11 jours.

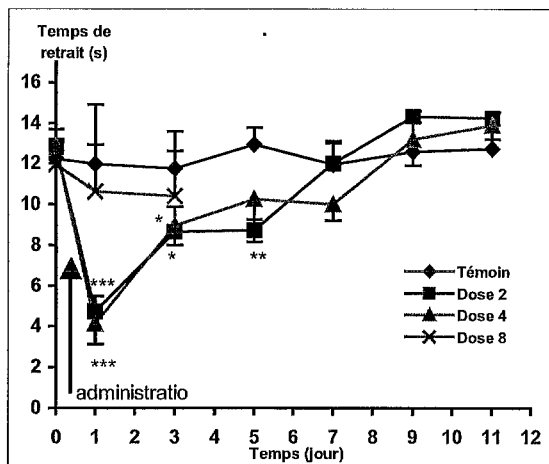
( $p < 0,05$  [\*],  $p < 0,01$  [\*\*),  $p < 0,001$  [\*\*\*]; ANOVA et test t de Student pour séries non appariées).

## Tests de sensibilité thermique (T°C chaudes)



*Annexe 3 - Figure 5 :*

Evolution des délais de retrait de la queue immergée dans l'eau à 42°C des rats témoins (n=7) et des rats ayant ingéré différentes doses de *Clitocybe amoenolens* (dose 2 g/kg, n=5), (dose 4 g/kg, n=5), (dose 8 g/kg, n=3). Les délais (exprimés en temps moyens  $\pm$  ESM) ont été mesurés avant le gavage (jour 0), puis pendant 11 jours. ( $p < 0,05$  [\*],  $p < 0,01$  [\*\*),  $p < 0,001$  [\*\*\*]; ANOVA et test t de Student pour séries non appariées).



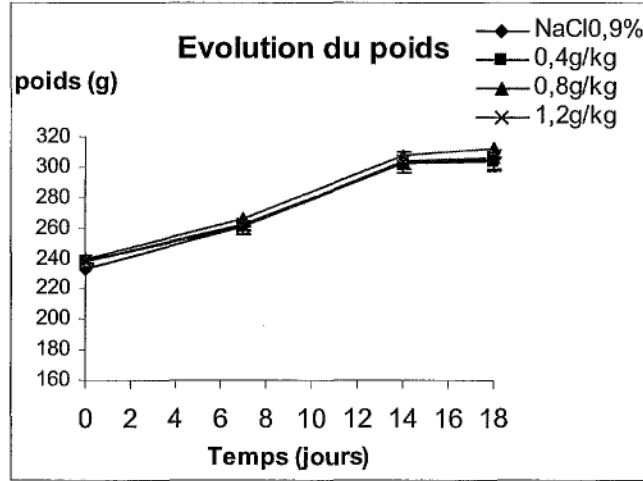
*Annexe 3 - Figure 6 :*

Evolution des délais de retrait de la queue immergée dans l'eau à 46°C des rats témoins (n=7) et des rats ayant ingéré différentes doses de *Clitocybe amoenolens* (dose 2 g/kg, n=5), (dose 4 g/kg, n=5), (dose 8 g/kg, n=3). Les délais (exprimés en temps moyens  $\pm$  ESM) ont été mesurés avant le gavage (jour 0), puis pendant 11 jours. ( $p < 0,05$  [\*],  $p < 0,01$  [\*\*),  $p < 0,001$  [\*\*\*]; ANOVA et test t de Student pour séries non appariées).



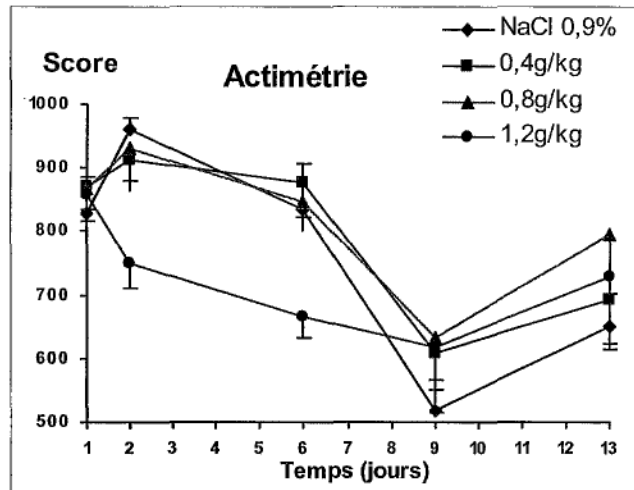
- Annexe 4 -

**Tests effectués après administration de dialysat**



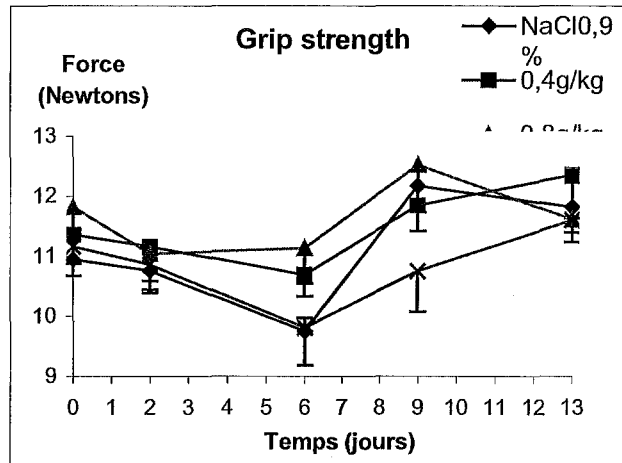
Annexe 4 - Figure 1

Evolution du poids corporel des rats témoins ( $n=8$ ) et des rats ayant ingéré différentes doses de dialysat (dose 0.4 g/kg,  $n=8$ ), (dose 0.8 g/kg,  $n=8$ ), (dose 1.2 g/kg,  $n=8$ ). Le poids (exprimé en moyenne  $\pm$  ESM) a été mesuré avant l'administration (jour 0), puis pendant 18 jours.



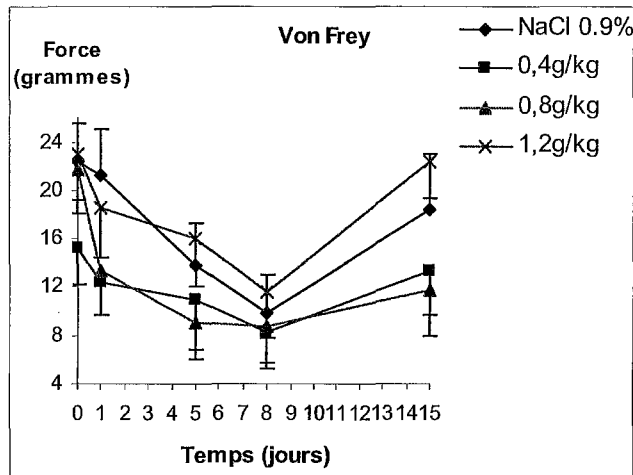
Annexe 4 - Figure 2 :

Evolution de l'activité motrice des rats témoins ( $n=5$ ) et des rats ayant ingéré différentes doses de dialysat (dose 0.4 g/kg,  $n=5$ ), (dose 0.8 g/kg,  $n=5$ ), (dose 1.2 g/kg,  $n=5$ ). L'activité motrice (exprimée en score moyen  $\pm$  ESM) a été mesurée avant l'administration (jour 0), puis aux jours 2, 6, 9 et 13. ( $p < 0,05$  [\*],  $p < 0,01$  [\*\*] ; ANOVA et test t de Student pour séries non appariées).



*Annexe 4 - Figure 3 :*

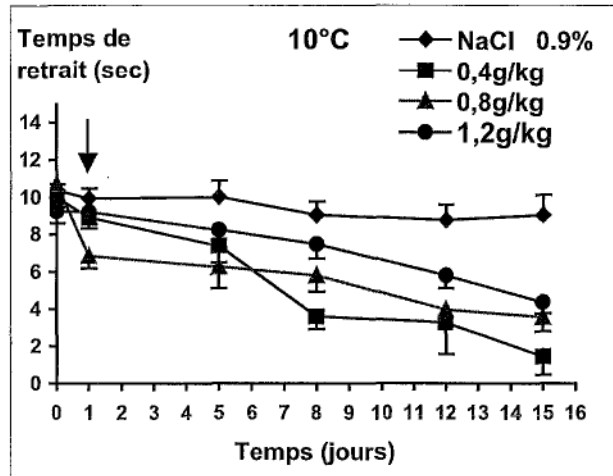
*Evolution de la force d'agrippement des rats témoins (n=8) et des rats ayant ingéré différentes doses de dialysat (dose 0.4 g/kg, n=8), (dose 0.8 g/kg, n=8), (dose 1.2 g/kg, n=8). La force d'agrippement (exprimé en force moyenne en Newtons  $\pm$  ESM) a été mesuré avant l'administration (jour 0), puis pendant 13 jours.*



*Annexe 4 - Figure 4 :*

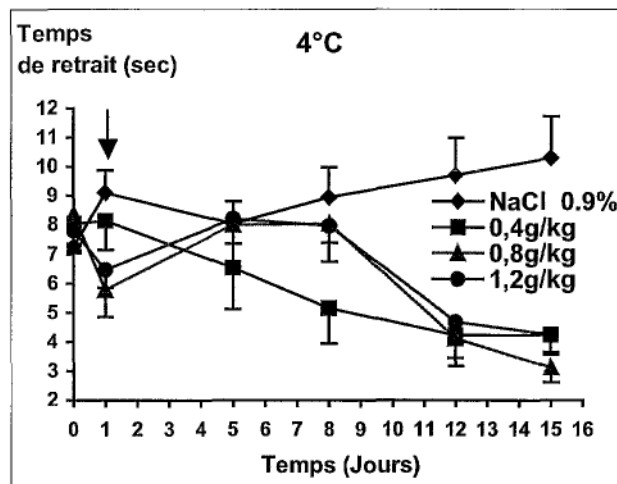
*Evolution de la force correspondant au premier filament déclenchant le retrait de la patte des rats témoins (n=7) et des rats ayant ingéré différentes doses de dialysat (dose 0.4 g/kg, n=8), (dose 0.8 g/kg, n=8), (dose 1.2 g/kg, n=8). Cette force (exprimée en force moyenne en grammes  $\pm$  ESM) a été mesuré avant l'administration (jour 0), puis pendant 15 jours.*

**Tests de sensibilité thermique effectués après administration de dialysat  
(T°C froides)**



*Annexe 4 - Figure 5 :*

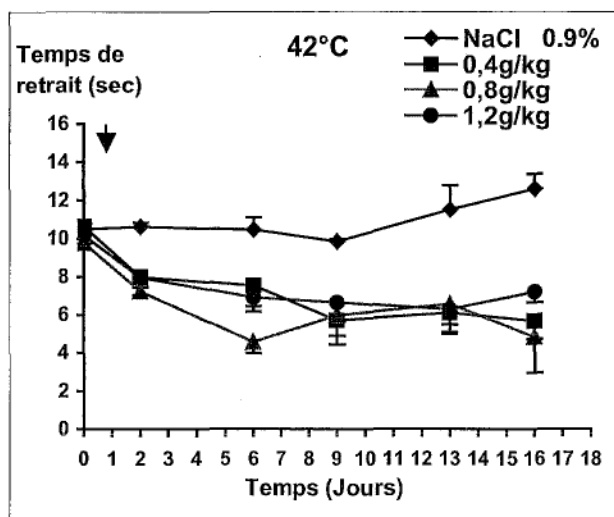
*Evolution des délais de retrait de la queue immergée dans l'eau à 10°C des rats témoins (n=7) et des rats ayant ingéré différentes doses de dialysat (dose 0.4 g/kg, n=7), (dose 0.8 g/kg, n=7), (dose 1.2 g/kg, n=7). Les délais (exprimés en temps moyens ± ESM) ont été mesurés avant le gavage (jour 0), puis pendant 15 jours.*



*Annexe 4 - Figure 6 :*

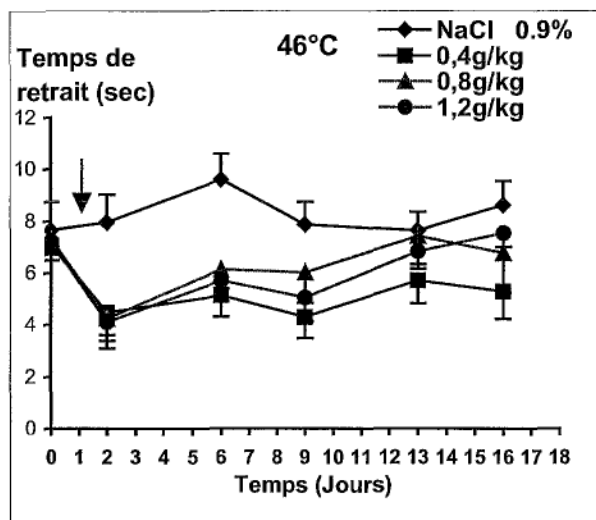
*Evolution des délais de retrait de la queue immergée dans l'eau à 4°C des rats témoins (n=6) et des rats ayant ingéré différentes doses de dialysat (dose 0.4 g/kg, n=7), (dose 0.8 g/kg, n=7), (dose 1.2 g/kg, n=7). Les délais (exprimés en temps moyens ± ESM) ont été mesurés avant le gavage (jour 0), puis pendant 15 jours.*

**Tests de sensibilité thermique effectués après administration de dialysat  
(T°C chaudes)**



*Annexe 4 - Figure 7 :*

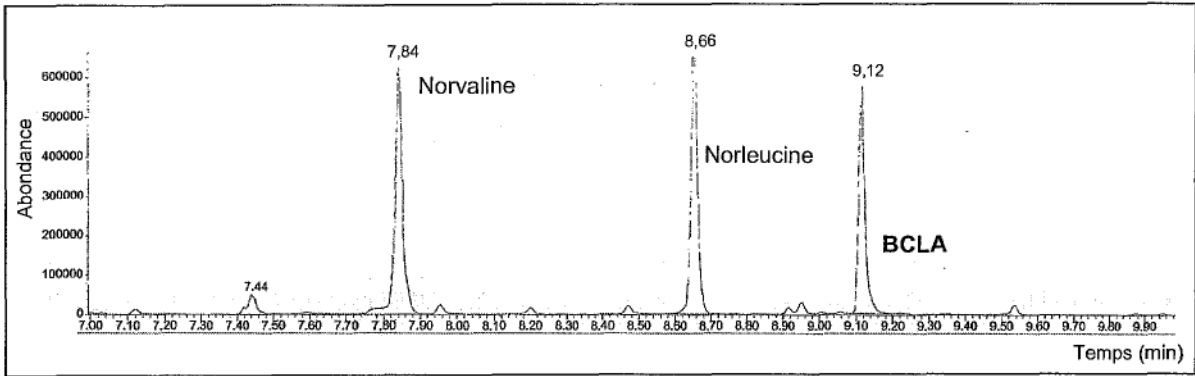
*Evolution des délais de retrait de la queue immergée dans l'eau à 42°C, des rats témoins (n=6) et des rats ayant ingéré différentes doses de dialysat (dose 0.4 g/kg, n=8), (dose 0.8 g/kg, n=7), (dose 1.2 g/kg, n=8). Les délais (exprimés en temps moyens ± ESM) ont été mesurés avant le gavage (jour 0), puis pendant 16 jours.*



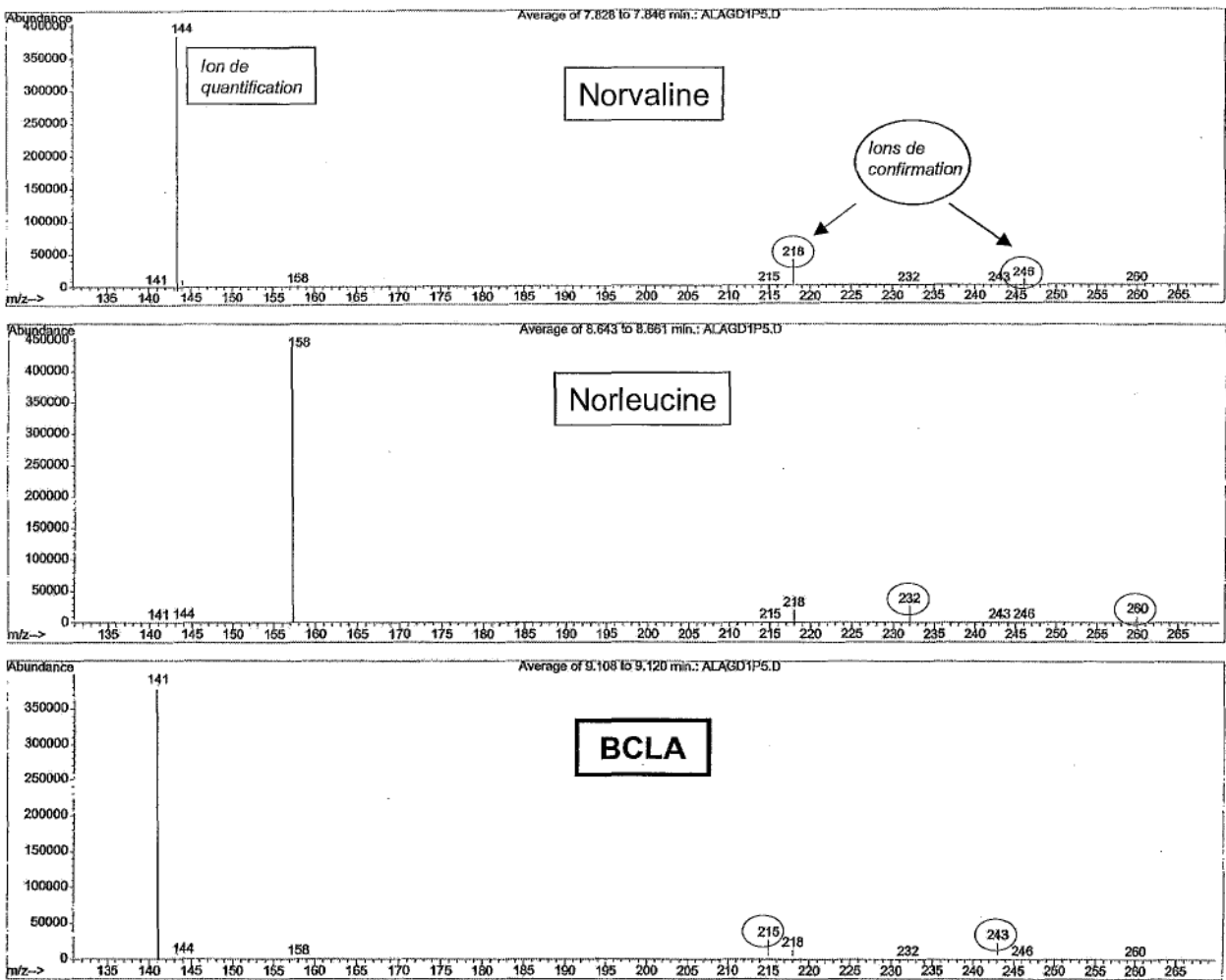
*Annexe 4 - Figure 8 :*

*Evolution des délais de retrait de la queue immergée dans l'eau à 46°C, des rats témoins (n=7) et des rats ayant ingéré différentes doses de dialysat (dose 0.4 g/kg, n=7), (dose 0.8 g/kg, n=7), (dose 1.2 g/kg, n=7). Les délais (exprimés en temps moyens ± ESM) ont été mesurés avant le gavage (jour 0), puis pendant 16 jours. ( $p < 0,05$  [\*],  $p < 0,01$  [\*\*]; ANOVA et test t de Student pour séries non appariées).*

- Annexe 5 -



Annexe 5 - Figure 1 :  
Chromatogramme TIC (Total Ion Current) de la Norvaline, de la Norleucine et de la BCLA en CPG-MS.



Annexe 5 - Figure 2 :  
Spectres de masse de la Norvaline, de la Norleucine et de la BCLA



# Serment des Apothicaire

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



## CHAUVIN Cécile

### Titre de la Thèse :

*CLITOCYBE AMÆNOLENS* : PLUSIEURS ENQUÊTES ET TOUJOURS UN MYSTÈRE !

### Résumé de la thèse :

En 1996, en Savoie, 5 personnes furent intoxiquées et présentèrent une érythermalgie.

Les deux premières enquêtes ont permis d'attribuer la cause de cette intoxication à l'ingestion de *Clitocybe amoenolens*.

Un champignon japonais (*Clitocybe acromelalga*) engendre le même syndrome et contient de l'acide acromélique A (AAA). Cette molécule est supposé être responsable de l'intoxication, bien que sa toxicité par voie orale n'ait jamais été démontrée.

En ce qui concerne *C. amoenolens*, sa toxicité a été démontrée chez l'animal et l'AAA a été mis en évidence et quantifié. L'objet de mon travail visait à déterminer quelle(s) molécule(s) était(ent) responsable(s) de la toxicité *per os* de *C. amoenolens*, de fortes suspicions pesant sur l'AAA.

Certains de ces objectifs ont été atteints :

- L'AAA a été concentré 5 fois dans un extrait qui a été administré à des rats.
- La  $\beta$ -cyano-L-alanine (présente dans *C. acromelalga*) a également été détectée dans *C. amoenolens*.

Par contre, les tests toxicologiques n'ont pas donné les résultats attendus : l'extrait enrichi en AAA administré *per os* chez le rat ne s'est pas avéré toxique...

Mots-clés : *Clitocybe amœnolens*, Erythermalgie, Acide acromélique A,  $\beta$ -cyano-L-alanine.

Thèse soutenue le 19 Mai 2006 devant le jury composé de :

Président du Jury : Mr Vincent DANIEL, Professeur de Toxicologie

### Membres :

- Mme Anne-Marie MARIOTTE, Professeur de Pharmacognosie
- Mme Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA, Maître de conférence (Pharmacognosie)
- Mr Philippe SAVIUC, Praticien hospitalier

Adresse Personnelle : [Données à caractère personnel]

Adresse internet : [Données à caractère personnel]