

Méthode d'analyse en sécurité sanitaire des aliments

RÉFÉRENCE : ANSES / LSA aliments / LSA-INS-1618 – Version 0

Novembre 2024

Détermination des ciguatoxines dans la chair de poisson par test de cytotoxicité sur lignée cellulaire Neuro-2a

Laboratoire de Sécurité des Aliments de Maisons-Alfort

Laboratoire national de référence pour les Biotoxines Marines

Historique de la méthode

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

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

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

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
V0	-	Novembre 2024	Version initiale
v2			
vx			

Cette méthode a fait l'objet d'une consultation du 17/10/2024 au 31/10/2024 sur le site internet de l'agence.

Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de Sécurité des Aliments de Maisons-Alfort

Laboratoire National de Référence pour les Biotoxines Marines

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

Contact: Inr.biotoxines.marines@anses.fr

Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1. Objet et domaine d'application	7
2. Documents de référence	7
3. Termes, sigles et définitions	8
4. Principe de la méthode	9
5. Réactifs	10
6. Appareillage et matériels	13
7. Échantillons	15
7.1. Conditions d'acceptation des échantillons	15
7.2. Conservation des échantillons avant analyse	15
7.3. Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	15
8. Mode opératoire	16
8.1. Préparation des échantillons pour analyse	16
8.2. Extraction des ciguatoxines	16
8.3. Détection des ciguatoxines par test cellulaire Neuro-2a.....	19
9. Résultats	27
9.1. Calculs et expression des résultats	27
9.2. Interprétation des résultats	30
10. Caractéristiques de performance de la méthode	32
10.1. Critères de validité du test N2a.....	32
Annexe	33
Bibliographie	35

Introduction

La ciguatéra est une intoxication alimentaire consécutive à la consommation de poissons coralliens ayant accumulé dans leurs tissus des ciguatoxines (CTX). Elle est considérée comme l'intoxication d'origine non bactérienne la plus importante associée à la consommation de poisson dans le monde. Les ciguatoxines sont des polyéthers et sont produites par des dinoflagellés appartenant aux genres *Gambierdiscus* et *Fukuyoa* présentes dans des zones tropicales ou sub-tropicales. Le syndrome clinique est dit polymorphe associant des signes cliniques d'intensité variable à la fois gastro-intestinaux, cardio-vasculaires, neurologiques et notamment neuro-cutanés. Un signe caractéristique de cette intoxication est l'allodynie au froid, néanmoins, plus de 175 symptômes ont jusqu'ici été recensés. Elles ont pour cible le site 5 de la sous-unité alpha du canal sodique voltage-dépendant (Na_v). Leur fixation entraîne une augmentation de la perméabilité et de l'excitabilité membranaires, ce qui explique notamment les effets neurologiques qu'elles provoquent. Il existe trois groupes de CTX, classées en fonction des régions dans lesquelles elles sont présentes : P-CTX (Océan Pacifique), C-CTX (Mer des Caraïbes) et I-CTX (Océan Indien). La structure de certaines d'entre elles n'a toujours pas été élucidée. Ainsi, plusieurs analogues issus de régions éloignées pourraient être reliées.

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

Actuellement, il n'existe pas de limites réglementaires pour les toxines du groupe CTX dans les poissons en Europe, mais la réglementation exige qu'aucun produit de la pêche contenant des toxines du groupe CTX ne soit mis sur le marché. Dans un avis de 2010, l'Efsa a établi sur la base de rapports de cas d'intoxications humaines, qu'une concentration de 0,01 μg éq. P-CTX-1/kg de poisson ne produirait pas d'effet chez les individus les plus sensibles lors de la consommation d'un seul repas de poisson.

La France est particulièrement touchée par la problématique de la ciguatéra de par la localisation de ses départements et régions d'outre-mer (DROM) dans des zones d'endémie de la ciguatéra, notamment La Réunion, la Guadeloupe et la Martinique. La présence de toxi-infections alimentaires individuelles ou collectives (TIA ou TIAC) y est régulièrement rapportée.

Avertissements et précautions de sécurité

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

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

Cette méthode requiert l'utilisation de substances et de solvants toxiques, tel le méthanol mais aussi de solvants inflammables, comme le diéthyl éther ou encore l'hexane. Il convient de prendre les précautions de sécurité qui s'imposent lors de la manipulation de ces composés et notamment :

- Eviter tout contact avec ces substances et les maintenir éloignées d'une source de chaleur, d'étincelles ou de flammes.
- Porter une blouse, des lunettes de protection avec protections latérales et d'utiliser des gants adaptés à la manipulation de solvants.
- Manipuler sous une hotte ventilée : Les solvants utilisés sont toxiques et volatils.
- Utiliser avec précaution l'hexane (risque H361f  - Susceptible de nuire à la fertilité) classé CMR.
- Sensibiliser le personnel ayant accès au laboratoire des risques et des précautions à prendre pour la manipulation des toxines.

Il est important que le test cellulaire Neuro-2a mis en œuvre pour détecter les ciguatoxines s'effectue en milieu stérile :

- Travailler sous PSM.
- Porter des gants.
- Utiliser avec précaution la vératridine (risque H361f ) et le MTT (risque H341  - Mutagénicité sur les cellules germinales) classés CMR
- Utiliser du matériel stérile ou à usage unique (pipettes, tubes, plaques, flasques,...),
- Eliminer les déchets liquides et solides (pipettes, boîtes, ...) dans les poubelles réservées à cet effet.

1. Objet et domaine d'application

Cette méthode spécifie un protocole pour la détection et la quantification des ciguatoxines dans la chair de poisson constituée de tissus musculaires.

Elle est applicable aux poissons à l'état frais, congelé ou cuisiné.

Cette méthode permet d'obtenir un résultat global. Ce résultat tient compte de l'ensemble des analogues de ciguatoxines présents dans l'échantillon. Le résultat obtenu est rapporté en équivalent de la toxine utilisée pour l'étalonnage puisque chaque analogue a sa propre toxicité. A ce jour, une vingtaine d'analogues ont été rapportés dans la littérature.

Tout comme les autres méthodes mises en œuvre pour la recherche des ciguatoxines au niveau international, cette méthode n'a à ce jour pas fait l'objet d'une étude inter-laboratoires de validation (EILV).

2. Documents de référence

- AOAC Official Method 937.07 Fish and Marine Products. Treatment and Preparation of Test Sample procedure. 1996.
- COFRAC. LAB GTA 21. Dosage des mycotoxines et des phycotoxines dans les denrées alimentaires destinées à l'homme ou aux animaux.
- EFSA. Scientific Opinion of on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Ciguatoxin group. The EFSA Journal (2010), 8(6):1627
- Fiche technique de l'ATCC de la lignée Neuro-2a CCL-131:
<https://www.atcc.org/products/ccl-131>
- Règlement (CE) N°853/2004 du parlement européen et du conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale
- Règlement (CE) N°854/2004 du parlement européen et du conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine Journal officiel de l'Union européenne L 139

3. Termes, sigles et définitions

AO/PI	Colorant Acridine Orange/Prodidium Iodide
CI	Contrôle interne
DEE	Diéthyl éther
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
EC	Effective Concentration (en anglais) ou Concentration Efficace (en français)
EC ₅₀	Concentration d'une substance pour laquelle on obtient 50% de viabilité (ou 50% d'inhibition de la viabilité cellulaire).
EC ₈₀	Concentration d'une substance pour laquelle on obtient 80% de viabilité (ou 20% d'inhibition de la viabilité cellulaire).
HCl	Acide chlorhydrique
MeOH	Méthanol
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
N2a	Neuro-2a
O/V	Ouabaïne/Véradratine
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PP	Polypropylène
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
SVF (ou FBS)	Sérum de veau foetal (ou Fetal Bovine Serum)

4. Principe de la méthode

Les ciguatoxines sont extraites par l'acétone d'un homogénat de chair de poisson (tissus musculaires). Après évaporation de l'acétone, une partition liquide-liquide entre la phase aqueuse résiduelle et le DEE, permet d'extraire les CTX dans la phase organique. Une fois le DEE évaporé, le résidu est solubilisé dans un mélange MeOH/eau. Un lavage à l'hexane permet l'élimination des lipides non polaires. Le résidu obtenu après évaporation de la phase hydrométhanolique est repris dans du MeOH. Cet extrait est ensuite conservé sous froid négatif avant analyse.

Un test sur lignée cellulaire de neuroblastomes de souris, Neuro-2a, est mis en œuvre pour détecter et quantifier les CTX. Cette analyse repose sur la capacité des CTX à se fixer sur les canaux sodiques voltage-dépendants (Na_v), ce qui entraîne une augmentation de l'influx d'ions sodium (Na^+) dans la cellule. Deux inhibiteurs sont utilisés afin d'agir comme des potentialisateurs de l'action des CTX: la vératridine et l'ouabaïne. La vératridine induit une activation des Na_v (ils vont rester en position ouverte), tandis que l'ouabaïne bloque la pompe sodium/potassium (Na^+/K^+), empêchant ainsi la cellule de lutter contre l'effet toxique de la vératridine. La combinaison de ces deux molécules accentue l'influx de Na^+ pour conduire à la mort cellulaire.

Afin de mettre en œuvre ce test cellulaire, une portion de l'extrait méthanolique est évaporée puis reprise dans du milieu de culture cellulaire. Cet extrait est dilué successivement afin d'obtenir huit niveaux de concentration.

Ces extraits dilués sont mis en contact avec des cellules Neuro-2a. La moitié des extraits au contact des inhibiteurs ouabaïne et vératridine permet de déterminer la toxicité, l'autre moitié sans inhibiteur permet de garantir la spécificité du test et de vérifier l'absence d'effet matrice.

Après incubation et mise en contact des cellules avec du MTT, la viabilité cellulaire, et donc l'effet cytotoxique des CTX est quantifié par un dosage colorimétrique. Le sel de bromure du MTT coloré en jaune est converti par les mitochondries des cellules vivantes en cristaux de formazan violets.

Les cristaux sont dissous dans le DMSO avant lecture de l'absorbance. Plus la solution est colorée, plus le nombre de cellules métaboliquement actives est important, et donc plus la concentration en CTX est faible. L'utilisation d'un analogue de CTX pour l'étalonnage permet de relier, par régression logistique, la viabilité cellulaire à la teneur en CTX.

Un test de criblage permet d'identifier les échantillons négatifs, les échantillons positifs et ceux présentant un effet matrice. Ce test préliminaire permet également d'estimer le niveau de dilution de l'extrait pour une analyse complète. Elle est réalisée pour les échantillons positifs afin de déterminer leur toxicité et pour les échantillons négatifs présentant un effet matrice significatif afin de déterminer leur LQ.

5. Réactifs

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

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

➤ *Extraction*

5.1. Eau ultra-pure de résistivité 18,2 MΩ/cm (H₂O, par exemple: Milli-Q®)

5.2. Acétone

5.3. Diéthyl éther

5.4. Méthanol

5.4.1. Méthanol 80% : MeOH/H₂O 8/2 (v/v)

5.5. n-hexane

5.6. Ethanol absolu

➤ *Test cellulaire Neuro-2a*

5.7. Lignée cellulaire Neuro-2a ATCC CCL-131

Un descriptif complet de cette lignée cellulaire adhérente est fourni dans la fiche du fournisseur.

5.8. Sérum de veau fœtal (SVF)

Le SVF est inactivé en plaçant le flacon décongelé au bain marie pendant 30 minutes à 56°C.

5.9. Pyruvate de sodium à 100 mM

5.10. L-glutamine à 200 mM

5.11. Pénicilline-streptomycine à 10000 U/mL et à 10 mg/mL

5.12. Milieu de culture RPMI-1640

5.12.1 Milieu RPMI-1640 à 5% de SVF décomplémenté (test cellulaire)

Par exemple, pour 500 mL de RPMI-1640 (5.12) enlever 37,5 mL de milieu et ajouter les compléments suivants :

- 25 mL de SVF décomplémenté (5.8)
 - 5 mL de solution de pyruvate de sodium à 100 mM (5.9)
 - 5 mL de solution de L-glutamine à 200 mM (5.10)
 - 2,5 mL de solution de pénicilline-streptomycine à 10000 U/mL et à 10 mg/mL (5.11)
- Cette solution peut se conserver 1 mois à +4°C

5.13. Colorant de comptage (par exemple : AO/PI ou bleu de Trypan)

5.14. PBS 1X

5.15. Trypsine-EDTA 0,05%

5.16. HCl à 1 M

5.17. Eau ultra-pure à pH 2,0

Eau ultra-pure (5.1) ajustée à pH 2,0 avec du HCl 1M (5.16) au pH mètre

5.18. Ouabaïne

5.18.1. Solution stock d'ouabaïne à 10 mM

Par exemple : la totalité du flacon (250 mg) peut être reprise dans un petit volume d'eau (5.1). La solution est ensuite transférée dans une fiole de 25 mL (6.19). Répéter l'opération plusieurs fois afin de récupérer toute la poudre. Ajuster la fiole avec de l'eau (5.1) et la mettre dans un bain à ultrasons (6.3) durant au moins 2h jusqu'à dissolution complète. Transférer son contenu dans un tube (6.23) et compléter avec 9,3 mL d'eau (5.1) pour obtenir 34,3 mL de solution d'ouabaïne à 10 mM.

Cette solution, une fois filtrée sur filtre stérile de 0,22 µm en PTFE (6.34 et 6.43), est aliquotée. Elle peut se conserver 3 mois à + 4°C ou plus si vérification.

Note 1 : L'ouabaïne étant photosensible, la solution doit être protégée de la lumière lors de sa préparation et de sa conservation.

5.19. VÉRATRIDINE

5.19.1. Solution stock de vératridine à 1 mM

Par exemple : la totalité du flacon (25 mg) peut être reprise dans un petit volume d'eau à pH 2,0 (5.17). La solution est ensuite transférée dans une fiole de 25 mL (6.19). Répéter l'opération plusieurs fois afin de récupérer toute la poudre. Ajuster la fiole à 25 mL avec de l'eau à pH 2,0 (5.17) et transférer son contenu dans un tube (6.23), puis compléter avec 12,1 mL d'eau à pH 2,0 (5.17) pour obtenir 37,1 mL de solution de vératridine à 1 mM.

Cette solution, une fois filtrée sur filtre stérile de 0,22 µm en PTFE (6.34 et 6.43), est aliquotée. Elle peut se conserver 1 an à ≤ -18°C.

Note 2 : La vératridine en poudre est très volatile. Elle doit être manipulée avec précaution pour éviter toute perte lors de chaque reprise.

5.20. MTT

5.20.1 Solution stock de MTT à 5 g/L

Par exemple : dissoudre 250 mg de MTT avec du PBS (5.14) dans une fiole de 50 mL (6.19) et aliquoter dans des tubes à fond conique de 15 mL (6.23). Cette solution peut se conserver un an à $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

Note 3 : Le MTT étant photosensible, il doit être protégé de la lumière lors de sa préparation et de sa conservation.

5.21. DMSO

5.22. Solutions étalons

A l'aide de pipettes de précision (6.38), les solutions étalons mère, fille et de travail sont préparées comme suit à partir d'un étalon de CTX1B disponible dans le commerce . Elles sont conservées à $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

5.22.1. Solution étalon mère à 500 ng/mL

Une solution mère à 500 ng/mL est préparée dans du MeOH

Par exemple : reprendre les 500 ng contenus dans le flacon avec 1 mL de MeOH

5.22.2. Solution étalon fille à 50 ng/mL et solution de travail à 5 ng/mL

Par exemple : à partir de la solution mère à 500 ng/mL, une solution fille (50 ng/mL) puis une solution étalon de travail (5 ng/mL ou pg/ μL) peuvent être préparées de la manière suivante :

- Solution fille à 50 ng/mL : 30 μL de solution mère à 500 ng/mL dilués avec 270 mL MeOH
- Solution de travail à 5 ng/mL : 100 μL de solution fille à 50 ng/mL dilués avec 900 μL MeOH

Note 4 : D'autres étalons peuvent également être utilisés tel que CTX3C

6. Appareillage et matériels

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

➤ *Extraction*

- 6.1. Agitateur vibreur (type Vortex™)
- 6.2. Bain-marie à (70 ± 5) °C
- 6.3. Bain à ultrasons
- 6.4. Bain-marie ou bain sec chauffant à (40 ± 5) °C, équipé d'une platine d'évaporation reliée à l'azote
- 6.5. Balance analytique capable de peser avec une précision de 0,01 g
- 6.6. Balance analytique capable de peser avec une précision de 0,0001 g
- 6.7. Centrifugeuse (pouvant atteindre 3000 g)
- 6.8. Evaporateur rotatif (type Rotavapor® Buchi™) équipé d'un bain-marie chauffant à (45 ± 5) °C
- 6.9. Homogénéiseur à couteaux (type Grindomix GM 200™)
- 6.10. Homogénéiseur (type Ultra Turrax™ ou Polytron™)
- 6.11. Pipettes de précision de 1000 µL, 5000 µL et pointes associées
- 6.12. Sorbonne et extracteur d'air
- 6.13. Ampoules à décanter de 100 mL
- 6.14. Ballons de 100 mL
- 6.15. Bêchers de 25 mL, 50 mL, 100 mL et 250 mL
- 6.16. Eprouvettes graduées de 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL et 250 mL
- 6.18. Filtres de 0,22 µm en PTFE (diamètre de 13 et 25 mm)
- 6.19. Fioles jaugées de 25 mL et 50 mL
- 6.20. Pipettes pasteurs en verre et poires
- 6.21. Seringues de 20 mL

- 6.22. Tubes en verre de 5 mL avec bouchons
- 6.23. Tubes à fond conique en PP de 15 mL et 50 mL
- 6.24. Tubes en verre gradués de 25 mL avec bouchons

➤ **Test cellulaire Neuro-2a**

- 6.25. Bain-marie à (37 ± 2) °C
- 6.26. Compteur cellulaire ou microscope
- 6.27. Etuve à 37°C
- 6.28. Incubateur à 37°C et 5% de CO₂
- 6.29. Lecteur de plaque pouvant lire une absorbance à 570 nm
- 6.30. Microscope optique inversé
- 6.31. pH-mètre avec une précision d'au moins 0,01 unité pH
- 6.32. Pipeteur électrique (type pipetboy)
- 6.33. Poste de sécurité microbiologique (PSM)
- 6.34. Filtres stériles de 0,22 µm en PTFE (diamètre de 25 mm)
- 6.35. Flasques de culture cellulaire stériles de 25 cm², 75 cm² et 150 cm²
- 6.36. Lamelles de comptage ou hématimètres en verre (exemple : cellules de Neubauer)
- 6.37. Microtubes stériles en PP à fond conique de 1,5 mL
- 6.38. Pipettes de précision de 10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL et pointes stériles associées
- 6.39. Pipettes multicanaux (exemple : 30-300 µL et 10-100 µL) et pointes stériles associées.
- 6.40. Pipettes de sérologie stériles de 2, 5, 10, 25 et 50 mL
- 6.41. Plaques de 96 puits stériles à fond plat traitées pour la culture cellulaire
- 6.42. Réservoirs de pipetage de 5 et 55 mL stériles.
- 6.43. Seringues stériles de 50 mL
- 6.44. Tubes en verre avec bouchons d'un volume minimal de 1 mL.
- 6.45. Tubes stériles en PP à fond conique de 15 et 50 mL

7. Échantillons

7.1. Conditions d'acceptation des échantillons

Afin de garantir la fiabilité de l'analyse, il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif, ni endommagé ni altéré lors du stockage ou du transport, c'est-à-dire sans signe de dégradation apparent. Il est donc essentiel de maintenir l'échantillon dans des conditions qui permettent de le préserver.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode décrite dans ce protocole.

7.2. Conservation des échantillons avant analyse

Si le début d'analyse est prévu dans les 48h, les échantillons frais ou congelés doivent être conservés à (5 ± 3) °C. Dans le cas contraire, les échantillons doivent être conservés à une température ≤ -18 °C.

7.3. Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Les échantillons après analyse peuvent être conservés à une température ≤ -18 °C. Comme la plupart des biotoxines marines, les ciguatoxines sont connues pour être stables dans le temps [7].

8. Mode opératoire

8.1. Préparation des échantillons pour analyse

La quantité de chair minimale pour analyse est de 100 g. L'échantillon réceptionné pour analyse peut être un poisson entier ou une partie d'un poisson contenant de la chair.

D'une manière générale, la chair prélevée sur la totalité de l'échantillon reçu au laboratoire est utilisée pour la préparation d'un broyat homogène de l'échantillon. Ainsi, si l'échantillon réceptionné est :

- Un poisson entier : retirer les viscères (si le poisson n'a pas déjà été éviscéré à réception), rincer le poisson à l'eau puis prélever la totalité de la chair (tissus musculaires), en prenant soin d'éliminer le cartilage, la peau et les arrêtes.
- Une partie d'un poisson : rincer à l'eau puis prélever la totalité de la chair (tissus musculaires), en prenant soin, selon la nature de l'échantillon réceptionné, d'avoir éliminé au préalable le cartilage, la peau, et les arrêtes.

Dans les deux cas, broyer l'intégralité de la chair de l'échantillon avec un homogénéiseur à couteaux (6.9) jusqu'à obtention d'un broyat homogène (contrôle visuel).

Il est toutefois possible pour le laboratoire de réduire la taille de l'échantillon reçu afin de préparer un homogénat sur seulement une partie de l'échantillon réceptionné. Dans ce cas, il appartient au laboratoire de définir et de justifier le protocole de réduction de l'échantillon reçu de manière à montrer que ce protocole conduit bien à un échantillon réduit représentatif de l'échantillon de départ. Pour les poissons de grande taille, il est possible de s'inspirer de la méthode officielle de l'AOAC 937.07 relative au traitement et à la préparation d'échantillon de poissons et d'autres produits de la mer (AOAC, 1996).

Note 5 : les homogénats peuvent être conservés à une température $\leq -18^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'analyse.

Note 6 : dans certains cas, par exemple lors d'investigations de toxi-infections alimentaires individuelles ou collectives (TIA/TIAC), l'analyse pourra être réalisée même si la quantité de chair de l'échantillon réceptionné est inférieure à 100 g.

8.2. Extraction des ciguatoxines

8.2.1. Extraction à l'acétone

Peser ($10,0 \pm 0,1$) g d'homogénat sur une balance de précision (6.5), par exemple, dans un tube à fond conique de 50 mL (6.23).

Préchauffer un bain-marie (6.2) à 70°C . Une fois la température atteinte, procéder à la cuisson de l'échantillon en plaçant le tube 15 min dans le bain-marie. Sortir le tube et le laisser revenir à température ambiante.

Ajouter 20 mL d'acétone (5.2) à la prise d'essai avec une éprouvette (6.16) puis homogénéiser à l'aide d'un homogénéiseur (6.10) pendant 2 min à au moins 10000 rpm. Centrifuger (6.7) pendant

au moins 10 min à 3000 g. Filtrer le surnageant dans un ballon d'au moins 100 mL (6.14) à l'aide d'une seringue de 20 mL (6.21) et d'un filtre de 0,22 µm en PTFE (6.18) de Ø 25 mm.

Répéter cette extraction une seconde fois en ajoutant 20 mL d'acétone (5.2) au culot obtenu après centrifugation. Récupérer les deux fractions acétoniques filtrées dans le même ballon.

8.2.2. Evaporation de l'acétone

Evaporer les 40 mL d'acétone obtenus, à l'aide d'un évaporateur rotatif (6.9) à (45 ± 5) °C jusqu'à obtention d'environ 4 mL de phase aqueuse.

Note 7 : Cette étape d'évaporation exige une surveillance constante : le mélange acétone / eau étant susceptible de mousser, la pression doit être diminuée progressivement d'environ 400 mbar à environ 70 mbar.

8.2.3 Partition liquide-liquide phase aqueuse / diétyl éther

Transférer la phase aqueuse, dans une ampoule à décanter de 100 mL (6.13) préalablement graduée pour mesurer le volume de phase aqueuse ou un tube en verre gradué de 25 mL (6.24).

- Si le volume est inférieur à 4 mL, compléter jusqu'à 4 mL avec de l'eau (5.1) et ajouter 16 mL de DEE (5.3) avec une éprouvette (6.16), puis agiter.
- Si le volume est supérieur à 4 mL respecter le rapport phase aqueuse / DEE 4/1, puis agiter.

Attendre la séparation nette des phases.

- Dans le cas d'une partition dans une ampoule à décanter (6.13) : récupérer la phase aqueuse (phase inférieure) dans un bécher (6.15), pour la seconde partition au DEE puis la phase étherée (phase supérieure), dans un ballon de 100 mL (6.14).
- Dans le cas d'une partition dans un tube en verre gradué de 25 mL (6.24), le second lavage est directement effectué sur la phase aqueuse (phase inférieure) après récupération à l'aide d'une pipette en verre (6.20) de la phase étherée (phase supérieure) dans un ballon de 100 mL (6.14).

Répéter la partition en lavant une seconde fois la phase aqueuse avec 16 mL de DEE (5.3) et rassembler les 2 fractions dans le ballon (6.14).

8.2.4. Evaporation de la phase organique (diétyl éther)

Evaporer les 32 mL de DEE obtenus à l'aide d'un évaporateur rotatif (6.8) à (45 ± 5) °C jusqu'à obtention d'un résidu sec.

Note 8 : Après obtention du résidu sec, il est important de vider le ballon de condensation et de descendre la pression à un niveau aussi bas que possible (quelques mbar) pendant 5 minutes environ afin d'éliminer toute trace de DEE.

8.2.5 Lavage à l'hexane

Reprendre le résidu sec avec 1 mL de méthanol aqueux 80% (5.4.1) à l'aide d'une pipette de précision (6.11) puis transférer le solvant de reprise dans un tube de 15 mL (6.23). Reprendre le résidu avec 2 mL de n-hexane (5.5) à l'aide d'une pipette de précision (6.11) et transférer le solvant dans le même tube. Répéter les étapes précédentes 2 autres fois en alternant les deux solvants pour une meilleure reprise.

Agiter doucement et attendre jusqu'à séparation nette des phases ou centrifuger (6.7) pendant 5 min à 3000 g. Eliminer la phase hexane (phase supérieure) à l'aide d'une pipette en verre (6.20) et répéter ce lavage avec 6 mL de n-hexane (5.5) deux autres fois.

Transférer la phase méthanolique 80% après l'avoir filtrée sur filtre de 0,22 µm en PTFE de Ø 13 mm (6.18) dans un tube en verre de 5 mL (6.22) préalablement taré (6.6) ou transférer la phase méthanolique 80% dans un ballon d'évaporation de 100 mL (6.14).

Note 9 : Il est recommandé d'ajouter de l'éthanol absolu (5.6) pour bien reprendre le résidu du tube, de la seringue et du filtre et pour favoriser l'évaporation totale de l'extrait si des résidus aqueux persistent.

8.2.6 Evaporation de la phase méthanolique

En cas d'utilisation d'un tube en verre de 5 mL (6.22), la phase méthanolique 80% additionnée d'éthanol est évaporée sous azote à (40 ± 5) °C, dans un bain chauffant (6.4) jusqu'à obtention d'un résidu sec. Le tube est pesé (6.6) pour calculer le poids du résidu sec.

En cas d'utilisation d'un ballon (6.14), la phase méthanolique 80% est évaporée sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (6.8) à (45 ± 5) °C (pression initiale de 300 à 400 mbar progressivement diminuée à 70 mbar puis à quelques mbar). L'extrait sec obtenu est alors repris dans 5 mL de MeOH (5.4) à l'aide d'une pipette de précision (6.11), passé aux ultra-sons (6.3), puis transféré dans un tube (6.22) préalablement taré (6.6). Il est ensuite évaporé sous azote à (40 ± 5) °C, dans un bain chauffant (6.4) jusqu'à obtention d'un résidu sec. Le tube est pesé (6.6) pour calculer le poids du résidu sec.

8.2.7 Reprise du résidu liposoluble

A l'aide d'une pipette de précision (6.11), reprendre le résidu sec avec 1 mL de MeOH (5.4) pour avoir la concentration souhaitée de 10 g chair/mL. Passer 2 min aux ultrasons (6.3) pour favoriser la reprise du résidu puis agiter 30 s avec un agitateur vibreur (6.1).

Cet extrait méthanolique se conserve à une température ≤ -18 °C.

Note 10 : Il est recommandé de remplacer l'air par de l'azote avant de fermer chacun des tubes.

8.2.8 Purification SPE (étape optionnelle)

Il est possible de poursuivre l'extraction par une étape de purification sur une cartouche SPE tel que décrit dans la littérature. Des essais pourront être menés pour étudier la pertinence de cette étape complémentaire.

8.3. Détection des ciguatoxines par test cellulaire Neuro-2a

Le maintien de la lignée cellulaire N2a (5.7) doit être décrit dans les documents du système de management de la qualité du laboratoire (préparation du milieu RPMI à 10% SVF, l'étape de trypsinisation et des passages, le comptage, le test mycoplasmes et l'étape de congélation/décongélation,...).

8.3.1. Détermination de la concentration cellulaire optimale par puits

Pour déterminer les conditions expérimentales du laboratoire, un test de croissance doit être réalisé avant la réalisation des essais à chaque décongélation de cellules après les avoir repiquées au moins 5 fois pour optimiser leur croissance. Par exemple, sur une plaque déposer 2 colonnes avec une concentration de 25000, 30000, 35000, 40000 et 45000 cellules/puits.

Le nombre de cellules par puits doit être suffisant :

- Pour obtenir une confluence $\geq 80\%$ après 24 h d'incubation à 37°C avec 5% CO₂ (vérification au microscope).
- Pour atteindre une absorbance significative, avec une densité optique $> 0,8$, déterminée par un test MTT après 48 h d'incubation. La mesure doit se faire dans le domaine de linéarité du lecteur de plaque.

8.3.2. Jour 1 : Préparation des plaques avec les cellules

Toutes les solutions entrant en contact avec les cellules doivent être à 37°C. Placer les solutions (PBS (5.14), trypsine-EDTA 0,05% (5.15), milieu RPMI 5% SVF (5.12.1)) à 37°C dans une étuve dédiée (6.27) ou un bain-marie (6.25). Pour préparer les plaques 96 puits (6.41) qui serviront aux essais, s'assurer à l'aide d'un microscope (6.30) que la confluence dans la flasque est comprise entre 80 et 100 %. Les plaques sontensemencées la veille de l'exposition aux extraits afin que les cellules soient incubées à 37°C avec 5% CO₂ (6.28) pendant environ 24 h avant le début du test.

Note 11 : Selon le nombre de plaques nécessaires aux essais, réaliser la semaine qui précède un ensemencement d'une flasque de culture (6.35) de volume suffisant (75 cm² ou 150 cm²) avec un nombre de cellules/cm² fixé. Par exemple, si l'on ensemence une flasque de 75 cm² par 15000 cell/cm², on obtient après 72 h d'incubation un nombre de cellules permettant de préparer environ 4-5 plaques.

8.3.2.1 Trypsinisation

Réaliser une trypsinisation du tapis cellulaire de la flasque (6.35) afin de décoller les cellules puis les reprendre dans un volume suffisant de milieu de culture RPMI à 5% SVF (5.12.1). Par exemple, avec 2 mL de trypsine (5.15) et 12 mL de milieu RPMI à 5% SVF pour une flasque de 75 cm².

Prélever environ 200 µL dans un tube à fond conique de 1,5 mL (6.37) pour réaliser un comptage.

8.3.2.2 Comptage cellulaire

Déterminer la concentration cellulaire (cellules vivantes par mL), soit :

- Au microscope (6.26) sur cellule de Neubauer (6.36) à l'aide de bleu de Trypan (5.13)
- Ou avec un compteur cellulaire (6.26) sur lamelle de comptage (6.36) avec le colorant AO/PI (5.13).

8.3.2.3 Dilution de la solution cellulaire

Avec le reste de la suspension cellulaire, réaliser la dilution appropriée par exemple dans un tube en plastique à fond conique stérile (6.45) ou une flasque (6.35) afin d'obtenir le nombre de cellules par puits optimal déterminé dans les conditions du laboratoire (8.3.1). Par exemple, dans les conditions expérimentales de 45000 cellules/puits cela correspond à un dépôt de 200 µL d'une solution cellulaire diluée à une concentration de $2,25 \cdot 10^5$ cellules/mL.

8.3.2.4 Ensemencement et incubation des plaques

Placer la solution cellulaire diluée dans un réservoir de 55 mL (6.42). Après une bonne homogénéisation de la solution cellulaire à l'aide d'une pipette sérologique (6.40), distribuer 200µL de cette solution à l'aide d'une pipette multi canaux (6.39) dans tous les puits de chaque plaque (6.41) exceptés ceux du contour (soit 60 puits). Les puits en périphérie ne sont pas utilisés pour le test cellulaire (effet de bord). Des réactifs y sont distribués pour déterminer un blanc et pour limiter l'évaporation des puits contenant les cellules.

- Dans les 30 puits de la colonne 1 et les lignes A et H, placer 200 µL de PBS stérile (5.14).
- Dans les 6 puits de la colonne 12, placer du milieu RPMI à 5% SVF (5.12.1) pour la mesure du blanc, réalisé sur chaque plaque.

Incuber les plaques dans l'incubateur à 37°C avec 5% de CO₂ (6.28) pendant environ 24 h.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS
B	200 µL PBS	200 µL cellules	200 µL RPMI à 5% SVF									
C	200 µL PBS	200 µL cellules	200 µL RPMI à 5% SVF									
D	200 µL PBS	200 µL cellules	200 µL RPMI à 5% SVF									
E	200 µL PBS	200 µL cellules	200 µL RPMI à 5% SVF									
F	200 µL PBS	200 µL cellules	200 µL RPMI à 5% SVF									
G	200 µL PBS	200 µL cellules	200 µL RPMI à 5% SVF									
H	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS	200 µL PBS

Tableau 1 : Plan de la plaque lors de l'ensemencement le jour 1

8.3.3. Jour 2 : Exposition des cellules aux extraits

8.3.3.1 Vérification de la confluence

Au préalable, vérifier sous microscope (6.30) que la confluence des cellules dans les puits est proche de 90 à 100% avant le début de la préparation des extraits et de la solution étalon. Si la confluence des cellules est satisfaisante alors les dilutions des extraits à déposer peuvent-être exécutées selon les protocoles suivants :

8.3.3.2 Préparation des dilutions des extraits d'échantillon de poisson

Dans un tube en verre de 1 mL (6.44), ajouter la quantité d'extrait pour préparer la concentration D1 la plus forte ciblée. L'extrait est évaporé sous azote à (40 ± 5) °C dans un bain chauffant (6.4), repris dans 200 μ L du milieu RPMI à 5% SVF (5.12.1) puis agité suffisamment avec un agitateur vibreur (6.1)

Par exemple, pour obtenir le niveau D1 à 200 mg chair/mL par puits, évaporer sous azote 92 μ L d'extrait à 10 g chair/mL à (40 ± 5) °C dans un bain chauffant (6.4) et le reprendre dans 200 μ L de milieu RPMI à 5% SVF. Le dépôt de 10 μ L de cet extrait dans un puits correspond à une quantité de 46 mg chair soit une concentration de 200 mg chair/mL par puits d'un volume final de 230 μ L (200 μ L culture cellulaire, 20 μ L inhibiteurs ou PBS, et 10 μ L extrait)

Extrait de l'échantillon de contrôle interne négatif : A partir de l'extrait D1 du CI négatif, 7 dilutions au $\frac{1}{2}$ sont préparées en cascade avec du milieu RPMI à 5% SVF. Ces 8 niveaux de dilution sont numérotés de D1 à D8.

Concentration par puits (mg chair/mL)	Dilution	Niveau de dilution préparé Qté déposée dans puits (mg chair)
200	1/1	D1 10 μ L = 46,0 mg
100	1/2	D2 10 μ L = 23,0 mg
50,0	1/4	D3 10 μ L = 11,5 mg
25,0	1/8	D4 10 μ L = 5,75 mg
12,5	1/16	D5 10 μ L = 2,875 mg
6,25	1/32	D6 10 μ L = 1,438 mg
3,125	1/64	D7 10 μ L = 0,719 mg
1,563	1/128	D8 10 μ L = 0,359 mg

Tableau 2 : Exemple de dilutions d'un extrait d'échantillon à 200 mg chair/mL par puits.

Extrait d'un échantillon de contrôle interne positif : A partir de l'extrait D1 du CI positif, 7 dilutions au ½ sont préparées en cascade avec du milieu RPMI à 5% SVF. Ces 8 niveaux de dilution sont numérotés de D1 à D8. Le choix de la concentration la plus forte D1 du CI positif est défini à partir du niveau de toxicité mesuré préalablement.

Par exemple, pour un niveau D1 à 50 mg chair/mL par puits, évaporer sous azote 23 µL d'extrait à 10 g chair/mL à (40 ± 5) °C dans un bain chauffant (6.4) et reprendre dans 200 µL du milieu RPMI à 5% SVF (5.12.1).

Les 8 niveaux de dilutions permettent d'établir une courbe sigmoïdale et de calculer l'EC₅₀. Pour garantir une bonne détermination de la concentration EC₅₀ du contrôle positif, il convient de choisir D1 pour obtenir une courbe sigmoïdale équilibrée avec au moins trois niveaux de dilutions qui entraînent des taux de viabilité cellulaire supérieurs à 50 % et trois niveaux de dilutions avec des taux de viabilité cellulaire inférieurs à 50%.

Extrait des échantillons à tester : Un test préliminaire de criblage est réalisé à partir de deux concentrations à 200 et 100 mg chair/mL par puits numérotées D1 et D2.

En cas d'échantillon négatif, ne présentant pas d'effet matrice, cette première analyse permet de conclure et de calculer la LQ.

Dans les situations suivantes une seconde analyse complète sera réalisée :

- En cas d'échantillon positif, présentant ou non un effet matrice, 8 niveaux de dilution seront préparés lors d'une seconde analyse pour déterminer l'EC₅₀ suivant le protocole décrit pour le contrôle interne positif. Le niveau D1 choisi sera la concentration de l'extrait la plus forte ne présentant pas d'effet matrice.
- En cas d'échantillon négatif, présentant un effet matrice, 8 niveaux de dilution seront préparés lors d'une seconde analyse pour calculer la LQ. Le niveau D1 choisi sera la concentration de l'extrait la plus forte ne présentant pas d'effet matrice.

8.3.3.3 Préparation des dilutions de la solution étalon

L'étalon de CTX1B est utilisé pour l'étalonnage. Dans un tube en verre (6.44), ajouter la quantité d'étalon nécessaire pour préparer la concentration D1 la plus forte ciblée. L'étalon est évaporé sous azote à (40 ± 5) °C dans un bain chauffant (6.4) puis repris dans 200 µL de milieu RPMI à 5% SVF (5.12.1)

A partir de la solution D1 de la solution étalon, 7 dilutions au ½ sont préparées en cascade avec du milieu RPMI à 5% SVF dans des tubes (6.37). Ces 8 niveaux de dilution sont numérotés de D1 à D8. La concentration D1 dépend de la nature de l'étalon, de la sensibilité des cellules et des conditions expérimentales du laboratoire.

Concentration par puits (pg CTX1B/mL)	Dilution	Niveau préparé Quantité déposée par puits (pg CTX1B)
50,0	1/1	D1 10 µL = 11,5 pg
25,0	1/2	D2 10 µL = 5,75 pg
12,5	1/4	D3 10 µL = 2,88 pg
6,25	1/8	D4 10 µL = 1,438 pg
3,125	1/16	D5 10 µL = 0,7188 pg
1,563	1/32	D6 10 µL = 0,3594 pg
0,781	1/64	D7 10 µL = 0,1797 pg
0,391	1/128	D8 10 µL = 0,0894 pg

Tableau 3 : Exemple de dilutions en cascade de la solution étalon CTX1B à 50 pg/mL par puits

Exemple : Pour obtenir le niveau D1 à 50 pg/mL par puits, évaporer sous azote 46 µL de la solution étalon à 5 pg/µL à (40 ± 5) °C dans un bain chauffant (6.4) et reprendre dans 200 µL de milieu RPMI à 5% SVF (5.12.1). Le dépôt de 10 µL de cette solution dans un puits correspond à une quantité de 11,5 pg soit une concentration de 50 pg/mL par puits d'un volume final de 230 µL. Pour garantir une bonne détermination de la concentration EC₅₀ de l'étalon, il convient d'obtenir une courbe sigmoïdale avec au moins trois niveaux de dilutions qui entraînent des taux de viabilité cellulaires supérieurs à 50 % et trois niveaux de dilutions avec des taux de viabilité cellulaire inférieurs à 50%.

Note 12 : D'autres étalons peuvent également être utilisés tel que CTX3C

8.3.3.4 Préparation de la solution d'inhibiteurs ouabaïne/vératridine 1,15 mM / 0,115 mM

A partir de la solution stock d'ouabaïne (5.18.1) préalablement passée aux ultrasons et de la solution stock de vératridine (5.19.1), préparer dans un tube stérile (6.45) la solution d'ouabaïne/vératridine (O/V) à 1,15 mM / 0,115 mM à l'aide de pipettes de précision (6.38), en quantité suffisante pour la réalisation de l'ensemble des essais prévus.

Exemples	PBS (mL)	Ouabaïne 10 mM (mL)	Vératridine 1 mM (mL)	Volume total (mL)
2-4 plaques	2,009	0,300	0,300	2,609
5-8 plaques	2,017	0,600	0,600	5,217

Tableau 4 : Préparation de la solution d'inhibiteurs O/V à 1,15 mM / 0,115 mM

Après l'avoir agitée, la transférer dans un réservoir de pipetage (6.42). La solution est valable quelques heures à température ambiante. La concentration finale par puits est de 0,1 mM d'ouabaïne et de 0,01 mM de vératridine pour un dépôt de 20 µL dans un volume final de 230 µL par puits.

8.3.3.5 Mise en œuvre de l'essai Neuro-2a

A chaque série d'analyse, il est nécessaire de préparer :

- Une plaque pour l'étalon CTX1B
- Une plaque pour le contrôle interne négatif (CI négatif)
- Une plaque pour le contrôle interne positif (CI positif)
- Une ou plusieurs plaques pour les échantillons à tester (criblage ou analyse complète)

Distribuer selon le modèle ci-dessous, le volume adéquate de PBS (5.14), 20 µL de la solution des inhibiteurs O/V à 1,15 mM / 0,115 mM (8.3.3.4) fraîchement préparée, puis 10 µL des 8 niveaux de dilutions des extraits (8.3.3.2) ou de l'étalon (8.3.3.3).

Note 13 : Avant utilisation, chaque dilution est agitée à l'agitateur vibreur avant d'être prélevée.

- **Pour l'étalon, le contrôle interne négatif et le positif :** le plan de plaque suivant pour la réalisation de l'essai est proposé dans le tableau 5.
 - Les trois ligne B, C et D ne sont pas traitées avec O/V (O/V-),
 - Les trois lignes E, F et G sont traitées avec O/V (O/V+).
 - Les colonnes 2 et 3 sont réservées aux témoins de référence).
 - Les colonnes 4 à 10 sont réservées aux 8 niveaux de dilution de la solution étalon ou des extraits (CI).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
B	PBS	200 µL cellules + 30 µL PBS	200 µL cellules + 30 µL PBS	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D1	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D2	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D3	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D4	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D5	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D6	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D7	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D8	RPMI à 5% SVF	O / V -
C	PBS	200 µL cellules + 30 µL PBS	200 µL cellules + 30 µL PBS	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D1	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D2	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D3	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D4	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D5	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D6	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D7	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D8	RPMI à 5% SVF	
D	PBS	200 µL cellules + 30 µL PBS	200 µL cellules + 30 µL PBS	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D1	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D2	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D3	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D4	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D5	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D6	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D7	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL D8	RPMI à 5% SVF	
E	PBS	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL PBS	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL PBS	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D1	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D2	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D3	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D4	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D5	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D6	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D7	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D8	RPMI à 5% SVF	O / V +
F	PBS	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL PBS	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL PBS	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D1	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D2	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D3	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D4	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D5	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D6	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D7	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D8	RPMI à 5% SVF	
G	PBS	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL PBS	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL PBS	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D1	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D2	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D3	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D4	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D5	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D6	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D7	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL D8	RPMI à 5% SVF	
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	

Tableau 5 : Exemple de plan de plaque au jour 2 pour l'étalon ou les contrôles internes positifs et négatifs.

• **Pour les échantillons à tester en criblage**, 4 extraits de poissons (numérotés E1 à E4) peuvent être traités par plaque. Le plan de plaque pour la réalisation de l'essai est proposé dans le tableau 6 ci-dessous.

- Les trois ligne B, C et D ne sont pas traitées avec O/V (O/V-),
- Les trois lignes E, F et G sont traitées avec O/V (O/V+).
- Les colonnes 2 et 3 sont réservées aux témoins de référence
- Les colonnes 4-5, 6-7, 8-9, 10-11 sont réservées aux 2 niveaux de dilution à tester de chaque extrait

Note 14 : Le même plan de plaque que celui des contrôles internes sera utilisé pour les échantillons pour lesquels une analyse complète est nécessaire.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
B	PBS	200 µL cellules + 30 µL PBS	200 µL cellules + 30 µL PBS	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E1-D1	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E1-D2	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E2-D1	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E2-D2	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E3-D1	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E3-D2	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E4-D1	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E4-D2	RPMI à 5% SVF	O / V -
C	PBS	200 µL cellules + 30 µL PBS	200 µL cellules + 30 µL PBS	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E1-D1	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E1-D2	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E2-D1	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E2-D2	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E3-D1	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E3-D2	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E4-D1	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E4-D2	RPMI à 5% SVF	
D	PBS	200 µL cellules + 30 µL PBS	200 µL cellules + 30 µL PBS	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E1-D1	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E1-D2	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E2-D1	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E2-D2	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E3-D1	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E3-D2	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E4-D1	200 µL cellules + 20 µL PBS + 10 µL E4-D2	RPMI à 5% SVF	
E	PBS	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL PBS	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL PBS	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E1-D1	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E1-D2	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E2-D1	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E2-D2	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E3-D1	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E3-D2	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E4-D1	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E4-D2	RPMI à 5% SVF	O / V +
F	PBS	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL PBS	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL PBS	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E1-D1	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E1-D2	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E2-D1	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E2-D2	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E3-D1	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E3-D2	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E4-D1	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E4-D2	RPMI à 5% SVF	
G	PBS	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL PBS	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL PBS	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E1-D1	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E1-D2	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E2-D1	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E2-D2	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E3-D1	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E3-D2	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E4-D1	200 µL cellules + 20 µL O/V + 10 µL E4-D2	RPMI à 5% SVF	
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	

Tableau 6 : Exemple de plan de la plaque au jour 2 pour les extraits d'échantillons lors du criblage

Placer les plaques dans l'incubateur 37°C avec 5% CO₂ (6.28) pendant 23 h ± 1 h.

8.3.4. Jour 3 : Estimation de la viabilité cellulaire avec le MTT

8.3.4.1 Préparation de la solution de MTT à 0,83 g/L

Préparer une solution de MTT à 0,83 g/L à partir de milieu de culture RPMI à 5% SVF et de la solution stock de MTT à 5 g/L avec un ratio de 5:1, tel que décrit dans le Tableau 7. Cette solution doit être préparée dans les 10 minutes et à une température de 37°C avant la mise en contact avec les cellules.

Nombre de plaques	RPMI à 5% SVF (mL)	MTT à 5 g/L (mL)	Volume total (mL)
4	15,0	3,0	18,0
6	25,0	5,0	30,0
8	35,0	7,0	42,0

Tableau 7 : Protocole de préparation du MTT à 0,83 g/L selon le nombre de plaques testées

8.3.4.2 Estimation de la viabilité cellulaire

Éliminer le milieu des plaques en renversant leur contenu avec un mouvement énergique dans un bac de récupération, répéter plusieurs fois en tournant la plaque.

À l'aide d'une pipette multicanaux (6.39), distribuer dans chaque puits (lignes B à G), 60 µL de la solution MTT à 0,83 g/L, préparée au préalable (8.3.4.1). Incuber les plaques à 37°C dans l'étuve (6.27) pendant la durée fixée dans les conditions expérimentales du laboratoire (cf. 8.3.2). L'apparition de la couleur bleu foncé / violet témoigne de la réaction. Éliminer la solution des plaques en renversant leur contenu avec un mouvement énergique dans un bac de récupération, répéter plusieurs fois en tournant la plaque. À l'aide d'une pipette multicanaux (6.39), distribuer dans chaque puits (lignes B à G), 100 µL de DMSO (5.21).

Note 15 : Le DMSO permet de solubiliser le formazan (couleur bleu foncé / violet) qui a été produit par réduction enzymatique du MTT par les mitochondries des cellules vivantes.

Tapoter légèrement les plaques quelques secondes avant de les placer dans le lecteur. Procéder à la lecture de l'absorbance à 570 nm au moyen d'un lecteur spectrophotométrique à plaques (6.29). Certains lecteurs, tel que le Clariostar, permettent d'inclure une étape d'agitation orbitale de 180 s à 300 RPM avant la lecture. La détection de l'absorbance est une mesure absolue quantifiée en densités optiques (DO). Elle est directement proportionnelle à la viabilité cellulaire.

9. Résultats

9.1. Calculs et expression des résultats

9.1.1. Exploitation des données brutes

Reporter toutes les valeurs des absorbances (affichées en DO) obtenues par le lecteur de plaque (6.29) dans un fichier de retraitement pour pouvoir faire les calculs suivants :

9.1.1.1 Détermination des absorbances nettes

A partir des lectures effectuées dans les puits contenant le milieu RPMI à 5% SVF (colonne 12 des plaques), calculer la moyenne des absorbances des blancs (n=6) : \overline{DO}_{Blc}

Calculer l'absorbance nette de chaque puits en retranchant la moyenne des blancs à la valeur de l'absorbance brute mesurée :

$$DO_{net} = DO_{brut} - \overline{DO}_{Blc}$$

9.1.1.2 Valeurs de référence des témoins et pourcentage de viabilité cellulaire après traitement O/V+

A partir des lectures effectuées dans les puits contenant les 6 témoins non traités aux inhibiteurs O/V- et les 6 autres traités O/V+ (colonnes 2 et 3 des plaques), calculer la moyenne et l'écart type (σ) des absorbances nettes des témoins non traités O/V- (n=6) et des témoins traités O/V+ (n=6).

Ces moyennes sont les valeurs nettes de référence non traitées O/V- et traitées O/V+. Elles permettent de convertir les données des témoins, des échantillons et de l'étalon en pourcentage de viabilité cellulaire :

$$\overline{DO}_{net\ ref}^{O/V-} \quad \overline{DO}_{net\ ref}^{O/V+}$$

L'effet des inhibiteurs est vérifié sur chaque plaque en calculant le pourcentage de viabilité des cellules traitées O/V+ par rapport aux cellules non traitées O/V- :

$$\% \text{ viabilité }^{O/V+} = \frac{\overline{DO}_{net\ ref}^{O/V+}}{\overline{DO}_{net\ ref}^{O/V-}} \times 100$$

Ce pourcentage de viabilité des cellules après traitement O/V+ doit être compris entre 75 et 95 %.

9.1.1.3 Pourcentage de viabilité cellulaire

A partir des lectures effectuées dans les puits contenant les dilutions (colonnes 4 à 11 des plaques), calculer le pourcentage de viabilité cellulaire de chaque puits par rapport à la référence correspondante (O/V- et O/V+)

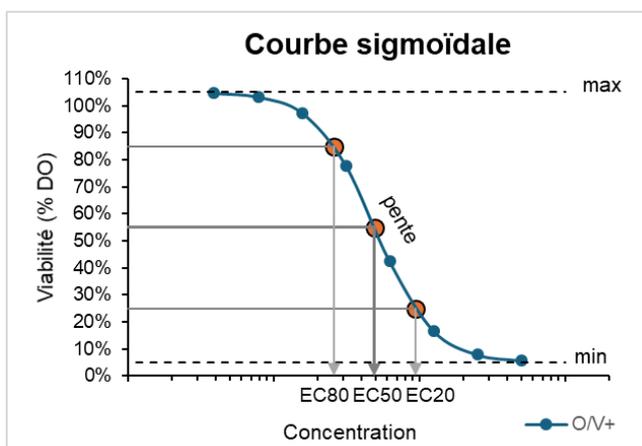
$$\% \text{ viabilité }^{O/V-} = \frac{DO_{net}^{O/V-}}{\overline{DO}_{net\ ref}^{O/V-}} \times 100 \quad \% \text{ viabilité }^{O/V+} = \frac{DO_{net}^{O/V+}}{\overline{DO}_{net\ ref}^{O/V+}} \times 100$$

Calculer à partir des 3 puits (n=3), la moyenne, l'écart type (σ), et le coefficient de variation (CV) des pourcentages de viabilité pour chacune des dilutions des échantillons, des contrôles internes et de l'étalon.

9.1.2. Représentation graphique

9.1.2.1 Choix d'une courbe de régression à 4 paramètres

Réaliser une représentation graphique, par exemple sous SigmaPlot® ou Excel avec le complément « Solveur », en choisissant un modèle de régression logistique à quatre paramètres 4PL dont l'équation est la suivante :



$$f(x) = \min + \frac{\max - \min}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^n}$$

x = concentration de l'extrait en mg chair/mL par puits ou de l'étalon en pg/mL par puits (échelle logarithmique pour l'axe des x).

y = Moyenne du pourcentage de viabilité (n=3)

La valeur minimale (min), la valeur maximale (max), la concentration pour laquelle il y a 50% de viabilité cellulaire (EC₅₀) et la pente (n) sont les 4 paramètres du modèle sigmoïdal 4PL.

Pour la suite des calculs déterminer les 4 paramètres suivants :

- Les paramètres min et max sont des paramètres d'asymptotes
- Le paramètre n est la pente (ou - Hillslope).
- Le paramètre EC₅₀ correspond à l'abscisse du point de mi-pente dont l'ordonnée est

$$f(EC_{50}) = \min + \frac{\max - \min}{2} = \frac{\max + \min}{2}$$

9.1.2.2 Calcul de la limite de quantification d'un échantillon négatif

Pour calculer la limite de quantification LQ d'un échantillon négatif, on détermine le EC₈₀ de l'étalon qui correspond à la concentration pour laquelle on observe 80% de viabilité (ou 20% d'inhibition de la viabilité cellulaire). On utilise la formule :

$$x = EC_{50} \left(\frac{\max - \min}{f(x) - \min} - 1 \right)^{\frac{1}{n}}$$

Avec $x = EC_{80}$:

$$EC_{80} = EC_{50} \left(\frac{\max - \min}{(\min + (\max - \min) * 0,8) - \min} - 1 \right)^{\frac{1}{n}} = EC_{50} \left(\frac{1}{0,8} - 1 \right)^{\frac{1}{n}}$$

$$LQ_{ech} (\mu\text{g éq. CTX1B/kg chair}) = \frac{EC_{80} \text{ étalon (pg/mL)}}{\text{concentration maximale sans effet matrice (mg chair/mL)}}$$

Note 16 : la limite de quantification (LQ_{éch} est aussi considérée comme étant la limite de détection (LD_{éch}) du test N2a (Caillaud et al., 2012).

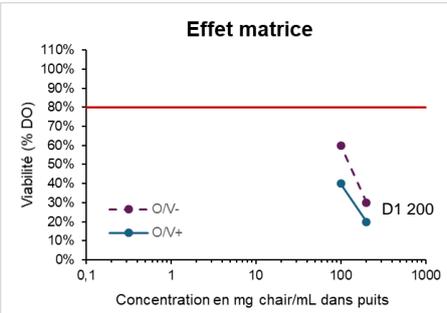
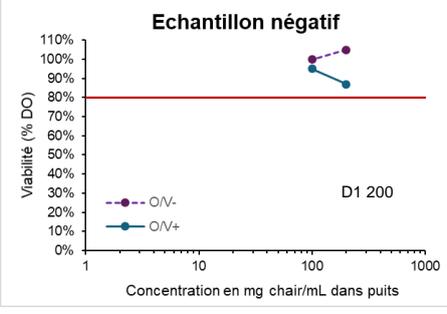
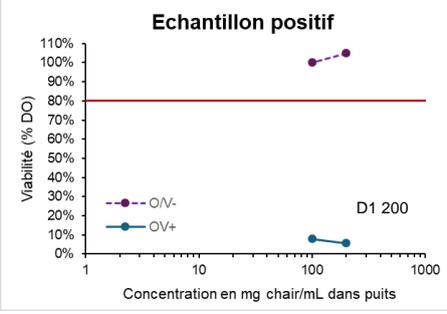
9.1.2.3 Calcul de la toxicité d'un échantillon positif

Pour calculer la toxicité d'un échantillon positif et du contrôle interne positif par rapport à l'étalon utilisé (exemple CTX1B), la formule suivante est appliquée :

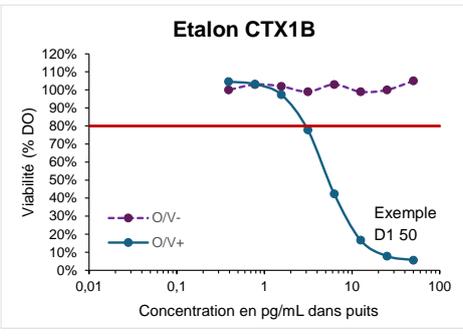
$$\text{Toxicité } (\mu\text{g éq. CTX1B/kg chair}) = \frac{EC_{50} \text{ étalon (pg/mL)}}{EC_{50} \text{ éch. (mg chair/mL)}}$$

9.2. Interprétation des résultats

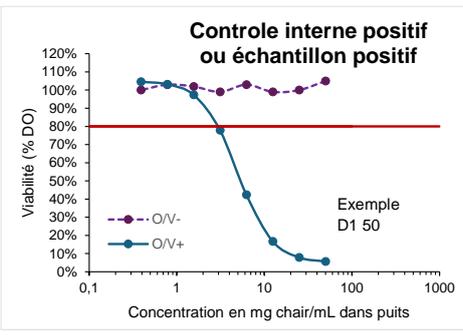
- **Pour les échantillons testés à 200 et 100 mg chair/mL par puits**, l'interprétation est la suivante :

Graphes	Observations	Interprétations
 <p>Effet matrice</p>	<p>Le pourcentage de viabilité O/V- est inférieur à 80%, il y a un effet matrice observé.</p> <p>Pas d'interprétation possible, des dilutions supplémentaires doivent être testées.</p>	<p>Analyse complète à réaliser à partir d'un niveau de dilution D1 n'entraînant pas d'effet matrice</p>
 <p>Echantillon négatif</p>	<p>Le pourcentage de viabilité O/V- est supérieur ou égal à 80%, il n'y a pas d'effet matrice observé.</p> <p>Le pourcentage de viabilité O/V+ est supérieur ou égal à 80 %, aucune ciguatoxine n'est détectée ni quantifiée.</p>	<p>La toxicité de l'échantillon est inférieure à sa limite de quantification LQ_{ech} (et donc LD_{ech}) exprimée en μg éq. CTX1B/kg chair (Formule en 9.1.2.2)</p> <p>Pas d'analyse complète supplémentaire.</p>
 <p>Echantillon positif</p>	<p>Le pourcentage de viabilité O/V- est supérieur ou égal à 80%, il n'y a pas d'effet matrice observé.</p> <p>Le pourcentage de viabilité O/V+ est inférieur à 80 %, les ciguatoxines sont détectées et l'échantillon est considéré comme positif.</p>	<p>Analyse complète à réaliser à partir du même niveau de dilution D1 pour pouvoir déterminer EC_{50} de l'échantillon.</p>

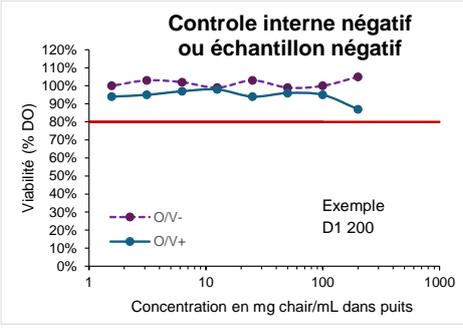
- **Pour l'étalon**, l'interprétation est la suivante :

Graphes	Observations	Interprétations
	<p>Le pourcentage de viabilité O/V- est supérieur ou égal à 80%, il n'y a pas d'effet matrice observé.</p> <p>Le choix des niveaux de dilution donne une courbe sigmoïdale équilibrée indiquant la présence des ciguatoxines.</p>	<p>Détermination EC₅₀ de l'étalon exprimé en pg/mL pour calculer la toxicité des échantillons</p> <p>Détermination EC₈₀ de l'étalon exprimé en pg/mL pour le calcul des LQ des échantillons (Formule en 9.1.2.2)</p>

- **Pour le contrôle interne positif ou un échantillon testé positif**, l'interprétation est la suivante :

Graphes	Observations	Interprétations
	<p>Le pourcentage de viabilité O/V- est supérieur ou égal à 80%, il n'y a pas d'effet matrice observé.</p> <p>Le choix des niveaux de dilution donne une courbe sigmoïdale équilibrée indiquant la présence des ciguatoxines.</p>	<p>Détermination EC₅₀ de l'échantillon exprimé en mg chair/mL.</p> <p>Calcul de la toxicité en µg éq. CTX1B/kg chair à l'aide de l'EC₅₀ de l'étalon. (Formule en 9.1.2.1)</p>

- **Pour le contrôle interne négatif ou un échantillon testé négatif à effet matrice**, l'interprétation est la suivante :

Graphes	Observations	Interprétations
	<p>Le pourcentage de viabilité O/V- est supérieur ou égal à 80%, il n'y a pas d'effet matrice observé.</p> <p>Le pourcentage de viabilité O/V+ est supérieur ou égal à 80 %, aucune ciguatoxine n'est détectée ni quantifiée.</p>	<p>La toxicité de l'échantillon est inférieure à sa propre limite de quantification LQ_{ech} (et donc LD_{ech}) exprimée en µg éq. CTX1B/kg chair (Formule en 9.1.2.2)</p>

10. Caractéristiques de performance de la méthode

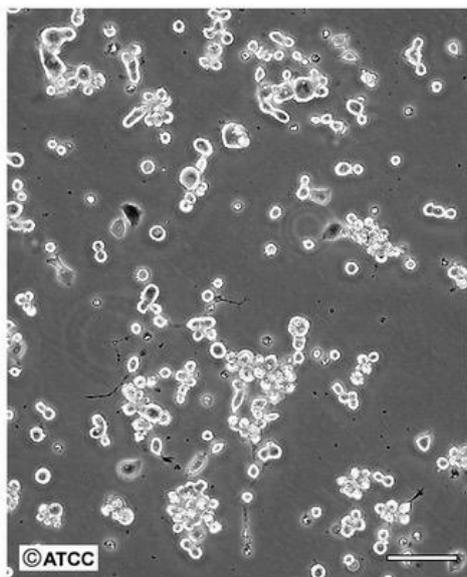
10.1. Critères de validité du test N2a

- Croissance des cellules dans la flasque : avant chaque série de test, la confluence dans la flasque doit être $\geq 80\%$ (contrôle visuel au microscope). Dans ce cas, les cellules sont comptées, diluées puisensemencées dans les plaques 96 puits.
- Croissance des cellules dans les puits après environ 24h d'incubation: avant chaque série de test, la confluence dans les puits doit être $\geq 90\%$ (contrôle visuel au microscope). Dans ce cas, les échantillons et l'étalon ainsi que les inhibiteurs peuvent être déposés.
- Le ratio de la viabilité des cellules traitées O/V+ à celle des cellules non traitées O/V- des témoins doit être compris entre 75 et 95% après 22-24h d'incubation.
- Le coefficient de variation des 3 répétitions doit être inférieur à 20%. En cas d'erreur lors du dépôt (identification du puits sur le couvercle de la plaque) seules 2 répétitions peuvent être utilisées.
- Sensibilité des cellules à l'étalon confirmée : La courbe sigmoïdale doit être équilibrée sur la zone de concentration testée. La valeur de EC_{50} doit être proche d'une série à l'autre avec le même étalon et dans les mêmes conditions expérimentales.
- Résultat de l'échantillon contrôle interne CI négatif conforme : l'analyse doit permettre de s'assurer qu'aucune ciguatoxine n'est détectée ni quantifiée. Un calcul de la LQ est effectué et tracé.
- Résultat de l'échantillon contrôle interne CI positif conforme : la courbe sigmoïdale doit être représentative de la présence de toxine de type CTX et le calcul de la toxicité doit être proche d'une série à l'autre avec le même étalon et dans les mêmes conditions expérimentales.
- Résultat des échantillons à tester : le choix des dilutions doit permettre de ne pas avoir d'effet matrice et d'obtenir pour les échantillons positifs une courbe sigmoïdale qui encadre bien l' EC_{50} .

Annexe

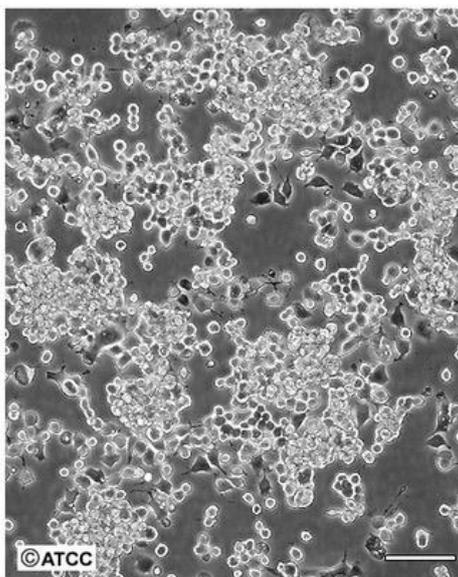
Annexe 1 : lignée Neuro2a

ATCC Number: **CCL-131**
Designation: **Neuro-2a**



©ATCC
Low Density

Scale Bar = 100µm



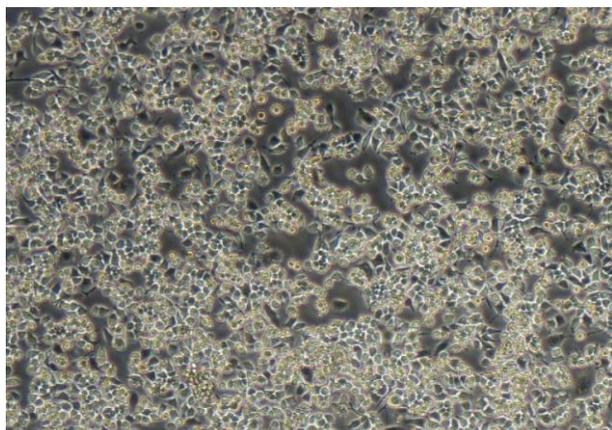
©ATCC
High Density

Scale Bar = 100µm

Contrôle de la confluence au microscope

Jour 1 : Avant la distribution des cellules

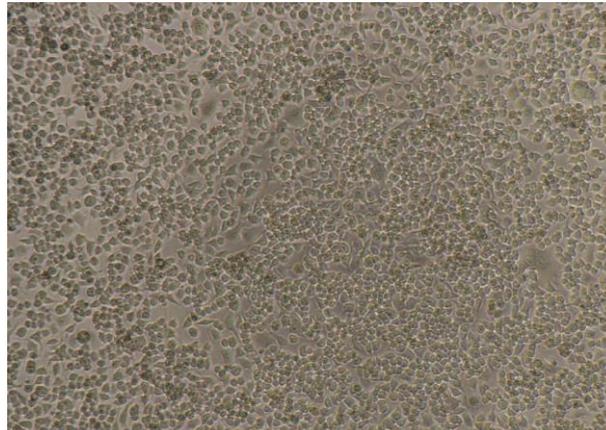
Dans la flasque utilisée le jour des essais



Critère de confluence [80% - 100%]

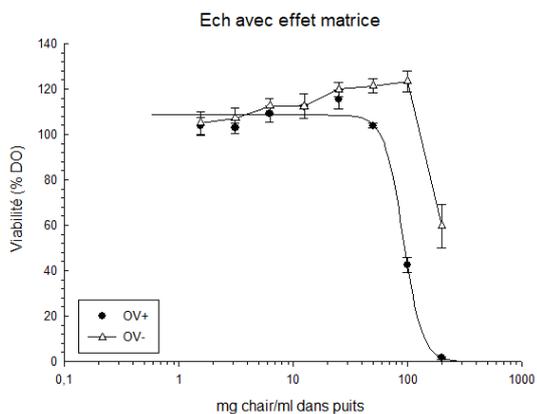
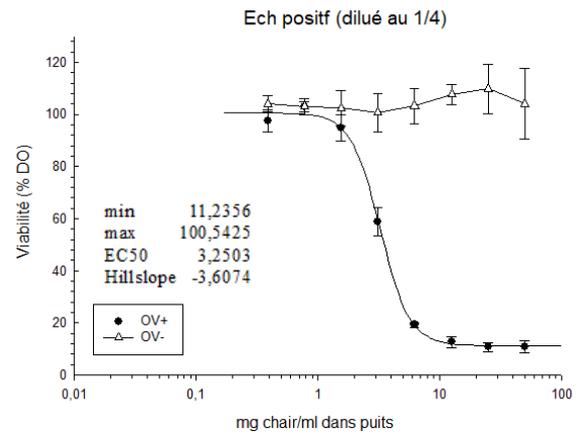
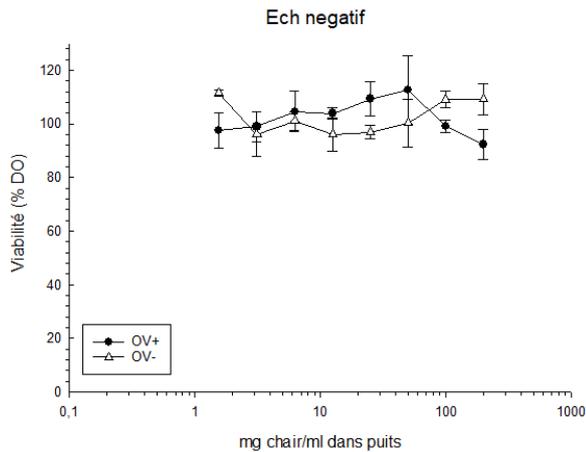
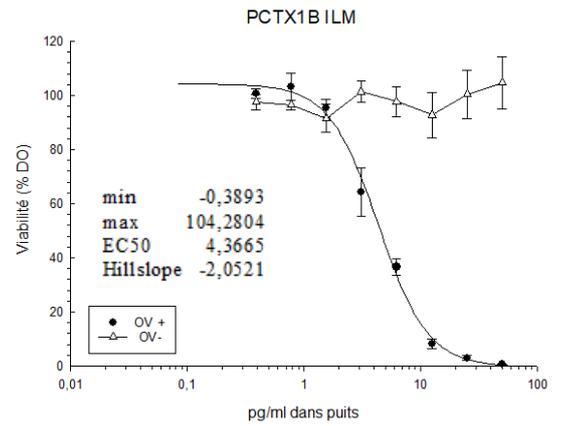
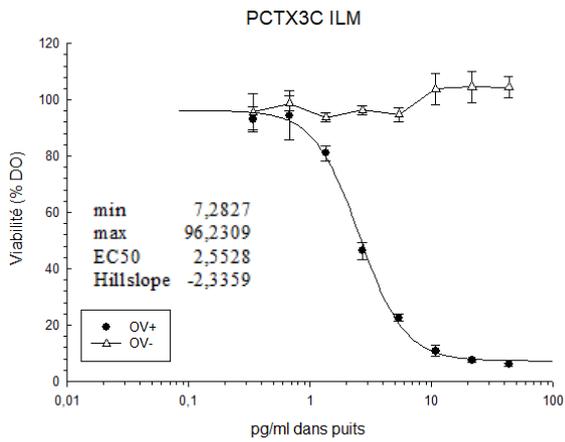
Jour 2 : Avant le dépôt des extraits ou de l'étalon

Dans un puits d'une plaque incubée 24h



Critère de confluence [90% - 100%]

Annexe 2 : exemples d'exploitation des données sous Sigmaplot 15.0



Bibliographie

- [1] Caillaud, A., H. Eixarch, P. De La Iglesia, M. Rodriguez, L. Dominguez, K.B. Andree, et J. Diogène. 2012. « Towards the standardisation of the neuroblastoma (neuro-2a) cell-based assay for ciguatoxin-like toxicity detection in fish: application to fish caught in the Canary Islands ». *Food Additives & Contaminants: Part A* 29 (6) : 1000-1010. <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.660707>.
- [2] Castro, David, Ronald Manger, Oscar Vilariño, et Ana Gago-Martínez. 2020. « Evaluation of Matrix Issues in the Applicability of the Neuro-2a Cell Based Assay on the Detection of CTX in Fish Samples ». *Toxins* 12 (5) : 308. <https://doi.org/10.3390/toxins12050308>.
- [3] Darius, Hélène, Taina Revel, Jérôme Viallon, Manoëlla Sibat, Philippe Cruchet, Sébastien Longo, Donnie Hardison, et al. 2022. « Comparative Study on the Performance of Three Detection Methods for the Quantification of Pacific Ciguatoxins in French Polynesian Strains of *Gambierdiscus polynesiensis* ». *Marine Drugs* 20 (6) : 348. <https://doi.org/10.3390/mD20060348>.
- [4] Diogène, Jorge, Laia Reverté, Maria Rambla-Alegre, Vanessa Del Río, Pablo De La Iglesia, Mònica Campàs, Oscar Palacios, et al. 2017. « Identification of ciguatoxins in a shark involved in a fatal food poisoning in the Indian Ocean ». *Scientific Reports* 7 (1) : 8240. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08682-8>.
- [5] Estevez, Pablo, Juan Osés Prieto, Alma Burlingame, et Ana Gago Martínez. 2023. « Characterization of the Ciguatoxin Profile in Fish Samples from the Eastern Atlantic Ocean using Capillary Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry ». *Food Chemistry* 418 (août) : 135960. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135960>.
- [6] Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization. (2020). Report of the expert meeting on ciguatera poisoning: Rome, 19-23 November 2018. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/332640>.
- [7] Loeffler, Christopher R., Dorina Bodi, Luciana Tartaglione, Carmela Dell'Aversano, et Angelika Preiss-Weigert. 2021. « Improving in vitro ciguatoxin and brevetoxin detection: selecting neuroblastoma (Neuro-2a) cells with lower sensitivity to ouabain and veratridine (OV-LS) ». *Harmful Algae* 103 (mars) : 101994. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.101994>.
- [8] Loeffler, Christopher, Astrid Spielmeyer, Vincent Blashke, Dorina Bodi, et Oliver Kappenstein. 2022. « Ciguatera poisoning trace-back in Europe leads to a novel ciguatoxin-3C group characterization from the Indian Ocean ». <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1715170/v1>.
- [9] Tudó, Àngels, Maria Rambla-Alegre, Cintia Flores, Núria Sagristà, Paloma Aguayo, Laia Reverté, Mònica Campàs, et al. 2022. « Identification of New CTX Analogues in Fish from the Madeira and Selvagens Archipelagos by Neuro-2a CBA and LC-HRMS ». *Marine Drugs* 20 (4) : 236. <https://doi.org/10.3390/mD20040236>.
- [10] Viallon, Jérôme, Mireille Chinain, et Hélène Taiana Darius. 2020. « Revisiting the Neuroblastoma Cell-Based Assay (CBA-N2a) for the Improved Detection of Marine Toxins Active on Voltage Gated Sodium Channels (VGSCs) ». *Toxins* 12 (5) : 281. <https://doi.org/10.3390/toxins12050281>.
- [11] Yogi, Kentaro, Naomasa Oshiro, Yasuo Inafuku, Masahiro Hirama, et Takeshi Yasumoto. 2011. « Detailed LC-MS/MS Analysis of Ciguatoxins Revealing Distinct Regional and Species Characteristics in Fish and Causative Alga from the Pacific ». *Analytical Chemistry* 83 (23) : 8886-91. <https://doi.org/10.1021/ac200799j>.