UNIVERSITÉ DE LA POLYNÉSIE FRANÇAISE

ÉCOLE DOCTORALE DU PACIFIQUE (ED 469)

LABORATOIRE DE RECHERCHE SUR LES BIOTOXINES MARINES
Institut Louis Malardé – UMR 241 EIO

THÈSE

présentée et soutenue publiquement par

Sébastien LONGO

le 06/05/2021

en vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Polynésie française en

Département: **Science**

Discipline: **Biologie des organismes (groupe X; section 68)**

Spécialité: **Toxines marines**

CIGUATÉRA

Effets du pH et de la disponibilité en azote sur la croissance et la production de toxines chez *Gambierdiscus polynesiensis*

Sous la direction de:

Mireille CHINAIN, Dr Sc. HDR, Laboratoire Biotoxines Marines Institut Louis Malardé - UMR EIO

Philipp HESS, Dr Sc. HDR, laboratoire Phycotoxines (PHYC), IFREMER

JURY

Valérie FESSARD, Dr. HDR, Chercheur (ANSES Fougères)	Rapporteure
Rodolphe LEMEE, Pr. HDR, Directeur du LOV (Villefranche-sur-Mer)	Rapporteur
Nabila GAERTNER-MAZOUNI, Pr. HDR, Vice-Présidente de la Commission de la Recherche (UPF)	Examinatrice
Phila BIANCHINI, Pr. HDR, (UPF)	Examinatrice
Thierry JAUFFRAIS, Dr., Chargé de recherche (IFREMER)	Examinateur
Mireille CHINAIN, Dr. HDR, Directrice du LBM (ILM)	Directrice de thèse
Philipp HESS, Dr Sc. HDR, Chercheur (IFREMER)	Co-directeur de thèse

RESUME

L'intoxication de type ciguatéra représente la première intoxication non bactérienne liée à la consommation de produits de la mer dans le monde. Elle résulte de la consommation de poissons et invertébrés marins contaminés par des ciguatoxines (CTX), des métabolites toxiques produits par la micro-algue *Gambierdiscus.* Autrefois limitée aux zones tropicales et intertropicales, on assiste depuis peu à une extension de la ciguatéra vers les régions tempérées du globe, probablement en raison des modifications drastiques observées dans les écosystèmes insulaires en réponse au changement climatique. Présente dans toute la région Pacifique, *Gambierdiscus polynesiensis* est l'espèce de *Gambierdiscus* la plus toxique décrite à ce jour et est considérée comme un biomarqueur du risque ciguatérique dans les programmes de surveillance menés en Polynésie française.

Dans un contexte de changement global, cette thèse avait pour objectif de caractériser l'impact de certains forçages environnementaux, tels que l'acidification ou l'eutrophisation des milieux, sur le risque sanitaire associé à la prolifération de *G. polynesiensis* dans les environnements lagonaires polynésiens.

Dans un premier temps, les performances de trois méthodes de détection des CTX ont été évaluées: le test interaction ligand-récepteur fluorescent (RBA-F), le test de cytotoxicité sur neuroblastomes de souris (CBA-N2a), et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Nos résultats ont permis (i) de montrer, pour la première fois, l'applicabilité du RBA-F à la recherche des CTX dans des extraits de *Gambierdiscus* compte tenu de la bonne concordance des quantifications obtenues avec celles de la LC-MS/MS; (ii) de confirmer l'exceptionnelle sensibilité du CBA-N2a, un test apte à détecter des toxines présentes même à l'état de traces (de l'ordre du femtogramme) chez la micro-algue; et (iii) de souligner la pertinence de combiner l'utilisation du CBA-N2a avec celle de la LC-MS/MS qui, outre sa sensibilité, est capable de détecter et quantifier chaque congénère connu de CTX présent dans les extraits de *Gambierdiscus*.

Dans un second temps, l'analyse toxicologique de quatre clones de *G. polynesiensis,* isolés d'archipels différents en Polynésie française, a permis de confirmer l'existence d'une variabilité intraspécifique et d'actualiser les connaissances sur leur profil toxinique avec (i) l'identification de quatre analogues supplémentaires de CTX; (ii) la détection de gambiérone et 44-méthyl-gambiérone qui constitue une donnée inédite; et (iii) l'absence notable de maitotoxines dans les cultures de cette micro-algue.

Enfin, l'étude de l'effet de plusieurs paramètres du milieu parmi les plus représentatifs du changement global (*i.e.*, pH du milieu et source/disponibilité en azote) sur la croissance et la toxicité de *G. polynesiensis* a montré qu'en dépit d'une croissance ralentie, l'application de conditions de culture mimant une acidification et eutrophisation du milieu conduit non seulement à une augmentation de la toxicité globale, mais également à une diversification du profil toxinique, notamment en favorisant la production d'analogues polaires habituellement minoritaires dans les cultures de cette espèce.

Ces travaux ouvrent des perspectives intéressantes quant à la possibilité de produire « à façon » certains standards de ciguatoxines à forte valeur ajoutée. Ce matériel est indispensable à la mise en place de stratégies communes dans les programmes de lutte contre la ciguatéra au sein des pays les plus vulnérables face à cette intoxication aux graves conséquences sanitaires et socio-économiques.

Mots clés: Ciguatéra, *Gambierdiscus polynesiensis*, cultures *in vitro*, écotoxicologie, ciguatoxines, gambiérones, profil toxinique, méthodes de détection

CIGUATERA

Effects of pH and nitrogen supply on the growth and the toxin production of *Gambierdiscus polynesiensis*

ABSTRACT

Ciguatera poisoning (CP) is the most prevalent phycotoxin-related seafood poisoning across the globe. It results from the consumption of fish and marine invertebrates contaminated with ciguatoxins (CTX), which are toxic metabolites produced by the microalgae *Gambierdiscus*. Originally limited to tropical and sub-tropical areas, CP is now extending to more temperate regions worldwide, a likely consequence of the drastic modifications experienced by island ecosystems as a result of global change. *Gambierdiscus polynesiensis*, a species reported only from to the Pacific Ocean so far, is the most potent *Gambierdiscus* species described to date. It is therefore regarded as a biomarker of ciguateric risk in monitoring programs currently conducted in French Polynesia.

In the context of global change, this thesis aimed at assessing the potential influence of environmental drivers (*i.e.*, ocean acidification and eutrophication) on the health risk associated with *G. polynesiensis* proliferation in French Polynesian lagoons.

First, the performance of three CTX detection methods, namely the mouse neuroblastoma cell-based assay (CBA-N2a), the fluorescent receptor-binding assay (RBA-F) and the liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was compared. Our results (i) demonstrated for the first time the applicability of RBA-F to detect CTXs in *Gambierdiscus* extracts, as shown by the good correlation with LC-MS/MS quantifications; (ii) confirmed the remarkable sensitivity of the CBA-N2a method, allowing the detection of traces of CTXs (of the order of femtograms) in *Gambierdiscus* extracts, and (iii) outlined the relevance of an approach that combines the use of both CBA-N2a and LC-MS/MS, as this latter method is able to identify and quantify each characterized CTX congener present in *Gambierdiscus* extracts.

Second, the toxicological analyses conducted on four *G. polynesiensis* clones isolated from different archipelagoes in French Polynesia, confirmed the existence of intraspecific variation and allow updating current toxin profile data with (i) the identification of four additional CTX analogs; (ii) the detection of gambierone and 44-methyl-gambierone which constitutes a novel finding; and (iii) the noticeable absence of maitotoxins in *G. polynesiensis* cultures.

Finally, the effects of pH and nitrogen source/availability in the culture medium on *G. polynesiensis*' growth and toxin production were examined. Under low pH conditions and/or supply of urea as the nitrogen source, a lower growth rate was observed. Conversely, an increase of the overall toxicity and a diversification of the toxin profile (*i.e.*, production of more polar CTX analogs) were evidenced.

More widely, this work opens interesting research avenues with regards to the targeted production of high value-added CTX standards which represent key reference material essential for the implementation of common strategies in CP risk management programs, particularly in countries most vulnerable to the health and socio-economic impacts of CP.

Keywords: Ciguatera poisoning, *Gambierdiscus polynesiensis*, *in vitro* cultures, ecotoxicology, ciguatoxins, gambierones, toxin profile, detection methods

À ma famille, mes amis

À Louis et Aimé

« Aucun de nous ne sait ce que nous
savons tous, ensemble. »

Euripide

REMERCIEMENTS

C'est avec beaucoup d'émotions que j'écris ces mots afin de remercier tous ceux qui ont contribué à l'accomplissement de ce doctorat, que ce soit de près ou parfois de plus loin lorsque plus de 16 000 kilomètres nous séparaient.

Je souhaite en premier lieu remercier la Délégation à la Recherche de Polynésie Française, en particulier Jean-Yves MEYER, ainsi que l'Université de la Polynésie française pour le financement du programme de recherche GLOBALCIG. Merci également aux directeurs successifs de l'Institut Louis Malardé, Pascal RAMOUNET et Hervé VARET, ainsi qu'à la direction du centre Ifremer de Nantes pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions tant au LBM que lors de mes deux missions au laboratoire PHYC.

Merci au Dr. Valérie FESSARD et Pr. Rodolphe LEMEE, rapporteurs du jury de thèse ainsi qu'au Pr. Nabila GAERTNER-MAZOUNI, Pr. Phila BIANCHINI, et Dr. Thierry JAUFFRAIS, examinateurs du jury pour avoir apporté leurs expertises respectives dans l'évaluation de cette thèse. Merci aussi à l'Ecole Doctorale du Pacifique ainsi qu'au Dr. Marie-Yasmine DECHRAOUI-BOTTEIN, Dr. Véronique SECHET et Pr. Christine HERRENKNECHT, membres du comité de suivi individuel de thèse, pour leur accompagnement.

J'aimerais ensuite adresser mes profonds remerciements à mes directeurs de thèse, en commençant par le Dr. Mireille CHINAIN. Sans vouloir faire de mauvais jeu de mot avec la crise sanitaire actuelle, tu as réussi, Mireille, à me transmettre le « virus » de la ciguatéra et à continuellement alimenter chez moi cette passion pour les biotoxines marines. Merci infiniment pour ton accompagnement quotidien et ton exceptionnel investissement personnel, notamment dans les innombrables relectures de manuscrits ou de publications, que ce soit tard le soir et/ou pendant tes week-ends. Merci également pour les moyens que tu as su rassembler et mettre en œuvre, sans jamais hésiter à suspendre temporairement si besoin d'autres projets de recherche du LBM, pour donner la pleine priorité à ce doctorat.

Je remercie mon co-directeur de thèse, le Dr. Philipp HESS, qui a parfaitement su prendre le relais de Mireille dans l'accompagnement et la formation au métier de chercheur lors de mes stages en spectrométrie de masse à PHYC. Merci à toi Philipp pour tes nombreux conseils, même à l'autre bout du monde, en particulier concernant la meilleure façon d'aborder et de « manger petit à petit » cet éléphant GLOBALCIG.

Je tiens à remercier chaleureusement les Drs. Hélène Taiana DARIUS, Mélanie ROUE et Clémence GATTI pour leur grande participation à la rédaction de ce manuscrit et pour leur encadrement durant cette thèse. Merci beaucoup Taiana pour toutes tes nombreuses relectures et ton immense patience face à mes productions écrites rarement complètes et/ou correctement référencées. Merci à toi, Mélanie, pour tes précieux conseils et à toi, Clémence, pour ta contribution aux volets physiopathologiques et épidémiologiques ainsi qu'à la réalisation de plusieurs illustrations.

Merci aussi à toutes les petites mains du LBM pour m'avoir permis de passer quatre années très enrichissantes professionnellement et surtout humainement à vos côtés. Merci à toi Taina REVEL pour ta formation au RBA-F et ton appui pour les manips lorsque le temps me faisait défaut. Merci Kévin HENRY et André UNG pour votre transfert de connaissances dans la culture phytoplanctonique et la gestion d'algothèque (Kévin, tes fameux « Longo ! » me manquent déjà terriblement). Merci à toi Jérôme VIALLON pour la parfaite conduite des manips CBA-N2a, nos nombreux échanges, et ton implication dans le développement de mon sens critique du résultat. Enfin, merci Philippe CRUCHET, mon éternel compagnon de bureau, pour ta gentillesse, nos nombreux moments de partage, ta participation à l'extraction des toxines et ta transmission d'expérience. Je n'oublie pas bien sûr toutes

les autres petites têtes qui sont temporairement passées au LBM (Tiriana, Jean-Baptiste, Tom, Paul) et que je serais heureux de recroiser dès que l'occasion se présentera.

Je remercie également l'ensemble des collaborateurs du laboratoire PHYC pour leur accueil chaleureux et les excellents moments passés en leur compagnie lors de mes deux missions, avec une mention toute particulière pour Manoëlla SIBAT, qui m'a parfaitement encadré jusqu'à devenir autonome (ou presque) dans les analyses par LC-MS/MS, et ce toujours dans la bonne humeur malgré mes inversions de colonne chromatographique ou mes lacunes en chimie analytique.

Merci aussi à tous les doctorants de l'UPF et de PHYC que j'ai eu la chance de cotoyer (Kristelle, Solène, Tohei, Raihei, Nour, Camille, Mathilde, Anne, Tony, Vivien, Nathanaël, Sylvain, Maxime, Marin-Pierre, et Thomas) et avec qui j'ai beaucoup apprécié échanger sur nos sujets de recherches respectifs, nos difficultés rencontrées, ou bien tout simplement sur les meilleures bières à commander au bar lors de nos afterworks…

Je tiens à remercier aussi tous mes amis polynésiens et d'ailleurs pour avoir fait de ces années de doctorat les quatre plus belles années de ma vie. En particulier, merci aux « Balls Out » pour nos nombreuses évasions rugbystiques et sportives (qui faisaient toujours un bien fou) ainsi qu'à « La Base » pour m'avoir permis de participer à tant d'heureux évènements de vos vies. Merci aux « Zinzins » pour tous ces délires inoubliables et à la « Pei / BB Family » pour ces merveilleux moments passés tous ensembles à Tahiti. Puis, merci surtout à la grande famille de la « Green Vallée », notamment Amandin, Clem-Clem, Flo, Toun, Taote et Gogo pour avoir permis à ce petit tarnais très réservé de s'épanouir pleinement et de tous vous compter, avec ceux qui sont passés à un moment donné par cette maison, parmi les plus belles amitiés qu'il m'ait été donné de forger sur ce fenua si accueillant. Et puis comment ne pas te remercier, ma petite zooxanthelle, pour ton amour sans faille durant ces longues périodes de rédaction où tu m'as peu vu mais permis de tenir bon lorsque moi, petit polype, traversais des phases difficiles.

Enfin, je cloturerai ces remerciements avec une pensée toute particulière pour ma famille, qui, malgré deux océans et un continent nous séparant, a toujours trouvé le moyen de me faire parvenir tout son amour et son soutien. J'ai également une pensée très émue pour mes deux grands-pères, qui, pendant ce doctorat, ont rejoint un monde meilleur et à qui je dédie ces travaux.

TABLE DES MATIERES

RESUME **2**

ABSTRACT **3**

REMERCIEMENTS **5**

TABLE DES MATIERES **7**

LISTE DES FIGURES **9**

LISTE DES TABLEAUX **11**

ABREVIATIONS **12**

CHAPITRE I: ETAT DE L'ART **15**

I - LES DINOFLAGELLES, SOURCE DE METABOLITES SECONDAIRES 16

A) Généralités *16*

B) Les genres Fukuyoa et Gambierdiscus *19*

(i) Le genre *Gambierdiscus* 22

(ii) Le genre *Fukuyoa* 27

C) Diversité des métabolites secondaires produits par les dinoflagellés *29*

D) Les intoxications par biotoxines marines *32*

II - INTOXICATION DE TYPE CIGUATERA 34

A) Historique et biogénèse *34*

(i) Le transfert des ciguatoxines dans les réseaux trophiques marins 34

(ii) La bioamplification des ciguatoxines 35

(iii) La biotransformation des ciguatoxines 36

(iv) La dépuration des ciguatoxines 37

(v) Contribution potentielle d'autres taxons au syndrome ciguatérique 37

B) Symptômes et traitements *39*

(i) Symptômes 39

(ii) Transmission de la ciguatéra 41

(iii) Les traitements conventionnels et traditionnels 41

C) Les différents vecteurs de la ciguatéra *43*

(i) Poissons récifaux 43

(ii) Invertébrés 44

D) Epidémiologie de la ciguatéra *44*

E) La ciguatéra en Polynésie française *46*

(i) Le poids des habitudes culturelles, du mode de vie et les impacts socio-économiques 46

(ii) Lutte contre la ciguatéra en Polynésie française: importance d'une approche intégrée 47

III - LES TOXINES IMPLIQUEES DANS LE SYNDROME CIGUATERIQUE 49

A) Les ciguatoxines et leur mode d'action *49*

(i) Les ciguatoxines du Pacifique (P-CTX) 50

(ii) Les ciguatoxines des Caraïbes (C-CTX) 52

(iii) Les ciguatoxines de l'Océan Indien (I-CTX) 53

(iv) Modes d'actions des CTX 53

B) Les Maitotoxines et leur mode d'action *54*

C) Les acides gambiériques et leur mode d'action *55*

D) Le gambiérol et son mode d'action *56*

E) Le gambieroxide et son mode d'action *56*

F) Les gambiérones et leur mode d'action *57*

IV - LES METHODES DE DETECTION DES CIGUATOXINES 57

A) Les tests biologiques in vivo *58*

B) Les tests biologiques in vitro *58*

C) Les méthodes chimiques *60*

D) Les tests immunologiques *61*

E) Les biosenseurs *61*

F) Les tests traditionnels *62*

V- LE RISQUE CIGUATERIQUE FACE AU CHANGEMENT GLOBAL 65

A) Effets de la température sur la croissance et la production toxinique de Gambierdiscus/Fukuyoa *67*

B) Effets de l'éclairement sur la croissance et la production toxinique de Gambierdiscus/Fukuyoa *69*

C) Effets de la salinité sur la croissance et la production toxinique de Gambierdiscus/Fukuyoa *69*

D) Effets des nutriments sur la croissance et la production toxinique de Gambierdiscus/Fukuyoa *70*

E) Effets des paramètres biotiques sur la croissance et la production toxinique de Gambierdiscus/Fukuyoa *71*

CHAPITRE II: DETECTION DES CIGUATOXINES CHEZ *G. POLYNESIENSIS* AU MOYEN DE TROIS METHODES D'ANALYSE: CBA-N2A, RBA-F ET LC-MS/MS **72**

I - INTRODUCTION 73
II - MATERIELS ET METHODES 74
A) Sélection des échantillons *74*
B) Purification des extraits bruts *75*
C) Méthodes de détection *76*
(i) Détection par le test de cytotoxicité sur neuroblastome (CBA-N2a) 76
(ii) Détection par le test intéraction ligand-récepteur fluorimétrique (RBA-F) 78
(iii) Détection par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) basse résolution 80
D) Analyses statistiques *83*
III - RESULTATS ET DISCUSSIONS 84
A) Analyse du standard de CTX3C *84*
B) Analyse des extraits de G. polynesiensis *87*
(ii) Comparaison des quantifications obtenues à l'aide des trois méthodes pour un même échantillon 90
(iii) Comparaison des quantifications obtenues à l'aide des trois méthodes pour l'ensemble des échantillons 92
IV - CONCLUSIONS 94

CHAPITRE III: VARIABILITE INTRASPECIFIQUE AU NIVEAU DE LA TOXICITE ET DES PROFILS TOXINIQUES DE SOUCHES POLYNESIENNES DE *GAMBIERDISCUS POLYNESIENSIS* **99**

1. INTRODUCTION 100
2. RESULTS 102
2.1 Growth rates *102*
2.2 CBA-N2a toxicity data *103*
2.3 LC-MS/MS analysis and toxin profiles in G. polynesiensis *104*
2.3.1 Quantification of CTX analogs 104
2.3.2. Quantification of the Gambierone group compounds 107
2.3.3. Quantification of MTXs 107
3. DISCUSSION 109
4. CONCLUSIONS 112
5. MATERIALS AND METHODS 113
5.1 Source of G. polynesiensis isolates *113*
5.2 In vitro cultures *113*
5.3 Growth rate *113*
5.4 Cells harvest and toxin extraction *114*
5.5 Neuroblastoma Cell-Based Assay (CBA-N2a) *115*
5.6 Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) analysis *115*
5.6.1 Method 1: P-CTXs group 115
5.6.2 Method 2: MTXs and Gambierone group 116
5.7 Statistical analysis *117*
REFERENCES 117

CHAPITRE IV: EFFETS DU PH ET DE LA DISPONIBILITE/SOURCE D'AZOTE SUR LA CROISSANCE ET LES PROFILS TOXINIQUES CHEZ LE DINOFLAGELLE CIGUATERIGENE *GAMBIERDISCUS POLYNESIENSIS* **127**

1. INTRODUCTION 129
2. RESULTS 130
2.1. Effects of Culture Age, pH, Nitrogen Source, and N:P Ratio on G. polynesiensis Growth Rate and Biomass *130*
2.2. Diversity of P-CTX Analogs in G. polynesiensis *132*
2.3. Effects of Strain, Culture Age, Nitrogen, and pH on the Overall P-CTX Cell Content in G. polynesiensis *133*
2.4. Effects of Strain, Culture Age, Nitrogen, and pH on G. polynesiensis Toxin Profiles *135*
a) Clonal variations in P-CTX profiles 135
b) Effects of culture age on *G. polynesiensis* P-CTX concentrations 135
c) Effects of N source and N:P ratio on *G. polynesiensis* P-CTXs concentrations 136
d) Effects of pH on *G. polynesiensis* P-CTX concentrations 137
3. DISCUSSION 139
4. CONCLUSIONS 141
5. MATERIALS AND METHODS 142

5.1. Source of G. polynesiensis Isolates *142*
5.2. In vitro Cultures *142*
5.3. Growth Rate *143*
5.4. Cells Harvest and Toxin Extraction *143*
5.5. Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Analysis *144*
5.6. Statistical Analyses *144*
REFERENCES 145

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES **151**

VALORISATIONS SCIENTIFIQUES **155**

COMMUNICATIONS ORALES 155
COMMUNICATION AFFICHEE 155
PUBLICATIONS 155

REFERENCES **157**

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schéma de la structure cellulaire et du mode d'insertion des deux flagelles chez le dinoflagellé marin benthique Gambierdiscus spp. (©ILM). *16*
Figure 2 (tirée de Le Bescot et al., 2016): Répartition des dinoflagellés de taille comprise entre 20-180 µm sur la base d'analyses en metabarcoding des échantillons collectés dans le cadre de l'expédition Tara Ocean (2009-2012) dans différentes régions du monde. *17*
Figure 3 (d'après Oliveira et al., 2020): Evolution du nombre de publications consacrées aux dinoflagellés depuis 1970 à nos jours. *17*
Figure 4 (d'après Kremp, 2013): Schéma du cycle de reproduction d'un dinoflagellé « type » alternant reproductions asexuée (n) et sexuée (2n) pour former des kystes de résistance sous l'effet de forçages du milieu. *18*
Figure 5: Répartition mondiale des différentes espèces de Gambierdiscus/Fukuyoa décrites de nos jours (©ILM). *20*
Figure 6 (d'après Kretzschmar et al., 2019a): Classification phylogénétique des différentes espèces et clones de Gambierdiscus/Fukuyoa et assimilés. Phylogénie basée sur des analyses bayésiennes et de mesure du maximum de vraisemblance (ML) au niveau de la région D8-D10 de la LSU rDNA. Les valeurs indiquent la probabilité bayésienne et la mesure de ML calculées pour chaque nœud. La barre d'échelle indique les substitutions par site. *22*
Figure 7 (d'après Litaker et al., 2009): Morphologie et taille des différentes espèces de Gambierdiscus décrites en Polynésie française. La désignation des plaques thécales suit la nomenclature Kofoidienne (Chinain, Faust, et al., 1999). *24*
Figure 8: Courbe de croissance d'une souche G. polynesiensis (clone RIK7) maintenue en conditions in vitro sur une période de 21 jours. *25*
Figure 9 (d'après Leung et al., 2018): Morphologie et taille des différentes espèces de Fukuyoa. La désignation des plaques thécales suit la nomenclature Kofoidienne *28*
Figure 10 (tirée de Verma et al., 2019): Illustration des différents rôles écologiques des métabolites secondaires produits par les dinoflagellés. *30*
Figure 11: Représentation du transfert des CTX (en rouge) le long de la chaîne trophique des environnements lagonaires depuis les organismes herbivores (poissons et invertébrés) jusqu'au consommateur (©ILM) *34*
Figure 12: Schéma de l'action des perturbations naturelles et anthropiques sur la prolifération de Gambierdiscus (©ILM). *35*
Figure 13: Clichés en microscopie électronique à balayage de trois familles de dinoflagellés coexistant fréquemment dans les assemblages benthiques des biotopes ciguatérigènes i.e. G. caribaeus, O. siamensis et P. lima (© N.Chomérat) *38*
Figure 14: Tableau clinique des principaux symptômes (en gras) associés à une intoxication de type ciguatéra (©ILM). *39*
Figure 15: Evolution chronologique des différents symptômes après une intoxication de type ciguatéra (©ILM). *40*
Figure 16: Illustration de (A) la forme arbustive, (D) la forme arborée, (B) l'inflorescence et (C) les feuilles du Faux-Tabac Heliotropium foertherianum (©ILM). *42*

Figure 17: Familles de poissons incriminées dans des cas de ciguatéra en Polynésie française en 2019 (©ILM).....43
Figure 18: (A) Taux d'incidence en Polynésie française de la ciguatéra en 2020 (en nombre de cas pour 10 000 habitants) par île de provenance du poisson; (B) Evolution du taux d'incidence en Polynésie française sur la période 2011-2020 (Réseau de surveillance de la ciguatéra en Polynésie française (Institut Louis Malardé, Bureau de Veille Sanitaire ©ILM). 47
Figure 19: Schéma de l'approche intégrée abordée par le LBM dans la gestion du risque ciguatérique en Polynésie française (©ILM).....48
Figure 20 (tirée de Pisapia, 2017): Différences structurelles entre (a) la CTX1B et (b) la CTX3C. 50
Figure 21 (tirée de Kryuchkov et al., 2020): Structures identifiées à ce jour des congénères de C-CTX. .52
Figure 22 (d'après Kessler et al., 2014): Schéma de la structure de la sous-unité α des CSDP avec identification du site de fixation des CTX. Chaque domaine (numéroté de I à IV) est divisé en plusieurs segments transmembranaires (numérotés de 1 à 6) dont le 4^{e} est responsable de l'ouverture et fermeture des canaux.....53
Figure 23 (tirée de Roué et al., 2018a): Illustration de la structure chimique de la MTX.....54
Figure 24 (tirée de Lindsay, 2016): Structure chimique des acides gambiériques A, B, C et D identifiés à ce jour.....55
Figure 25 (tirée de Assunção et al., 2017): Illustration de la structure chimique du Gambiérol.....56
Figure 26 (tirée de Watanabe et al., 2013): Illustration de la structure chimique de (1) le gambieroxide et (2) la yessotoxine. Les seules différences entre ces molécules se trouvent à leurs extrémités, au niveau des cycles carbonés A et L.....56
Figure 27 (tirée de Boente-Juncal et al., 2019): Illustration de la structure chimique de la gambiérone et de la 44-méthyl-gambiérone.....57
Figure 28 (tirée de Darius et al., 2013): Test (A) de rigor mortis et (B) hémorragique pratiqués sur l'île de Raivavae (Australes, Polynésie française).....63
Figure 29 (d'après Xu et al., 2016): Croissance en laboratoire de (A) G. belizeanus, (B) G. pacificus clone 3S0509-27, et (C) G. pacificus clone 3S0510-19 dans différentes conditions de température...68
Figure 30: Illustration des différentes étapes du test fonctionnel CBA-N2a (©ILM).....77
Figure 31: Illustration des différentes étapes du test biologique fonctionnel RBA-F (©ILM).....79
Figure 32: Exemples de courbes dose-réponse avec des concentrations croissantes d'extraits cellulaires permettant d'obtenir les valeurs CE_{50} par CBA-N2a (A) et RBA-F (B) dans un extrait purifié de G. polynesiensis (©ILM).....80
Figure 33: Schéma du fonctionnement de la LC-MS/MS basse résolution (©ILM).....81
Figure 34 (d'après Sibat et al., 2018): Illustration (A) d'un chromatogramme obtenu lors de la recherche de P-CTX avec l'abondance des composés et leur temps de rétention (en min) par le système chromatographique; (B) une courbe d'étalonnage après analyse d'une gamme de dilution d'un standard de toxine. L'intensité des pics est exprimée en coups par seconde (cps) et leur aire en intensité relative (counts).....83
Figure 35: Analyses du standard CTX3C à l'aide de trois méthodes de détection. (A) RBA-F, courbes dose-réponse de la réaction de compétition entre des concentrations croissantes de CTX3C et la brévétoxine marquée au bodipy pour leurs récepteurs canaux sodium; (B) CBA-N2a, courbes dose réponse des cellules N2a lorsqu'elles sont exposées à des concentrations croissantes de CTX3C en condition OV+; et (C) LC-MS/MS, droites d'étalonnage obtenues après analyses d'une gamme de dilution du standard de CTX3C.....85
Figure 36: (A et B) Courbes dose-réponse et valeurs de CE_{50} obtenues pour l'extrait SLO-20 analysé en trois expériences indépendantes (R1-3) (chaque concentration d'extrait testée en triplicat) par (A) RBA-F, et (B) CBA-N2a en condition OV+. (C) Chromatogramme des différents congénères de CTX présents dans l'échantillon SLO-20 analysé par LC-MS/MS.....88
Figure 37: Représentation graphique de la distribution des quantifications obtenues par (A) CBA-N2a, (C) RBA-F, et (F) LC-MS/MS ainsi que la corrélation de type (B) logarythmique entre RBA-F et CBA-N2a, (D) exponentiel entre CBA-N2a et LC-MS/MS, et (E) linéaire entre RBA-F et LC-MS/MS.....93
Figure 38: Carte de la distribution mondiale des espèces Gambierdiscus les plus productrices de CTX en lien avec les régions impactées par la ciguatéra.....98
Figure 39 (d'après Stocker, 2014): Modélisation des tendances d'évolution (a) de la température de surface et (b) du pH des océans du glode d'après les différents scénarii (RCP) envisagés. ...125
Figure 40: Poster présenté à l'occasion de l'ICHA 2018 (Nantes, France). 156

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Liste des différentes espèces de Gambierdiscus décrites à ce jour ainsi que les taux de croissance et niveaux de production en ciguatoxines observés chez différentes souches au sein d'une espèce donnée. 26
Tableau 2 (d'après Cho et al., 2020): Potentiel industriel et biotechnologique de plusieurs biotoxines marines phytoplanctoniques isolées de dinoflagellés. 29
Tableau 3 (d'après la thèse de Pawlowiez, 2012): Principaux syndromes d'intoxications humaines par biotoxines marines ayant pour organismes-sources des composants du phytoplancton marin. 33
Tableau 4: Liste des différents congénères de P-CTX identifiés à ce jour, leur poids moléculaire et la matrice biologique à partir de laquelle ils ont été identifiés. 51
Tableau 5: Récapitulatif des avantages, limites et de la sensibilité (LOD et LOQ) des différentes méthodes de détection employées dans la recherche de CTX. Pour l'analyse LC-MS/MS les LOD et LOQ sont définies pour un seul analogue de CTX alors qu'un échantillon contient souvent plusieurs toxines. 64
Tableau 6: Liste des 30 extraits bruts de G. polynesiensis retenus pour cette étude avec les conditions de culture appliquées, les biomasses obtenues après récolte et la concentration en CTX estimée par LC-MS/MS. 75
Tableau 7: Liste des ions parents sélectionnés et des transitions m/z demandées pour chaque congénère de CTX recherchés dans les extraits de G. polynesiensis analysés par LC-MS/MS. A noter que quatre isomères de CTX3B/C (isomère (1-4)) peuvent être détectés par notre méthode mais que leur structure moléculaire exacte n'a pas encore été décrite. 82
Tableau 8: Paramètres des courbes dose-réponses et droites d'étalonnage du standard de CTX3C obtenues via les trois méthodes de détection. Valeurs minimales (Min) / maximales (Max), moyennes ± écart-types, et coefficients de variation (CV) obtenus pour chacun des paramètres lorsque possible. 86
Tableau 9: Synthèse des quantifications moyenne obtenues (en pg CTX3C eq. cellule^{-1}), des coefficients de variation (CV), de la CME et des LOD et LOQ calculés au moyen des méthodes CBA-N2a, RBA-F et LC-MS/MS (n = 3). 89
Tableau 10: Différences significatives observées entre les quantifications en CTX (pg CTX3C eq. cellule^{-1}) calculées pour chacun des extraits de G. polynesiensis au moyen des trois méthodes (n = 3). 91

ABREVIATIONS

µL	Micro-litre	DTX	Dinophysistoxine
µm	Micro-mètre	*e.g.*	*exempli gratia*
ADN	Acide Désoxyribo Nucléique	EFSA	European Food Safety Agency
ARN	Acide Ribo Nucléique	ELA	Erythrocyte Lysis Assay
ARS	Agence Régionale de Santé	ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ASP	Intoxication Amnésique	eq.	Equivalent
AZP	Intoxication aux Azaspiracides	ESI	Electro-Spay Ionization
CARPHA	Caribbean Public Health Agency	*et al.*	Et collaborateurs
CBA	Cell Based Assay	*etc*	*et cetera*
C-CTX	Ciguatoxines des Caraïbes	FAB	Fast Atom Bombardment
CE_{50}	Concentration Efficace à 50 %	FAO	Food and Agriculture Organization
CE_{80}	Concentration Efficace à 80 %	FAS	Acides Gras Synthases
CH_2Cl_2	Dichlorométhane	FDA	Food and Drug Administration
CME	Concentration Maximale en Echantillon	FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
CP	Intoxication de type ciguatéra	FLD	Détecteur de Fluorescence
CSDP	Canaux Sodium Dépendants du Potentiel	GA	Acide Gambiérique
CTX	Ciguatoxines	H_2O	Eau
CV	Coefficient de Variation	HAB	Harmful Algal Bloom
CYP	Cytochrome P	hab.	habitants
d^{-1}	Unité de division cellulaire	HAEDAT	Harmful Algae Event database
Da	Dalton	HEK	Cellules embryonnaires de rein humain
DL_{50}	Dose Létale à 50 %	HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
DMSO	Diméthylsulfoxyde	HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
DRPF	Délégation à la Recherche de Polynésie Française	IAEA / AIEA	Agence internationale de l'énergie atomique
DSP	Intoxication Diarrhéique	I-CTX	Ciguatoxines de l'Océan Indien

i.e.	*id est*	O	Ouabaïne
ILM	Institut Louis Malardé	OMS / WHO	Organisation Mondiale de la Santé
IOC	Commission Océanographique Intergouvernementale	P	Phosphore
i.p.	Intra-péritonéale	P / P value	Valeur de P
i.v.	Intra-veineuse	PbTx	Brévétoxine
LBM	Laboratoire de recherche sur les Biotoxines Marines	P-CTX	Ciguatoxines du Pacifique
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	pg	Pico-gramme
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem	PK	Polykétides
LOD	Limite de détection	PKS	Polykétide Synthases
LOQ	Limite de quantification	PLTX	Palytoxine
LRMS	Low Resolution Mass Spectrometry	PSP	Intoxication Paralysante
M / µM	Mole / micro mole	PTX	Pecténotoxine
MBA	Mouse BioAssay	qPCR	Réaction de Polymérase en Chaîne en temps réel
MeOH	Méthanol	R&D	Recherche et Développement
mg	Milligramme	RBA	Receptor Binding Assay
ML	Maximum de vraissemblance	RBA-F	Receptor Binding Assay Fluorescent
mL	Milli-litre	RBA-R	Receptor Binding Assay Radioactif
MTT	Méthyl-thiazolyldiphényltétrazolium	RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
MTX	Maitotoxines	rfu	Unité relative de fluorescence
N	Azote	RIA	RadioImmunoAssay
N2a	Neuroblastome	RMN	Raisonnance Magnétique Nucléaire
ng	Nano-gramme	SD	Ecart-type
nM	Nano-molaire	sp	*species*
NSP	Intoxication Neurologique	sp. nov.	*species nova*
NZD	Dollars Néo-Zélandais	SPATT	Solid Phase Adsorption Toxin Tracking

SPEHIS	South Pacific Epidemiological and Health Information Service
spp	*species plurimae*
TEF	Facteur d'Equivalence Toxique
TI	Taux d'Incidence
TIAC	Toxi-Infection Alimentaire Collective
TRPC1	Transient Receptor Potential Canonical 1
UNESCO	Organisation des Nations Unies pour l'Education, la Science et la Culture
UPF	Université de la Polynésie Française
UV	Ultra-Violet
V	Vératridine
vs.	*versus*

CHAPITRE I: ETAT DE L'ART

I - Les Dinoflagellés, source de métabolites secondaires

A) Généralités

Les dinoflagellés, aussi appelés dinophytes, sont des micro-organismes unicellulaires eucaryotes. C'est un groupe monophylétique qui comprend à la fois des espèces d'eau douce, marines, estuariennes, et de milieu hypersalin pouvant être photosynthétiques (autotrophes), prédateurs (hétérotrophes) ou les deux (mixotrophes) (Taylor *et al.,* 2008; Carty & Parrow, 2015). Certaines espèces de dinoflagellés peuvent être « nues » ou, à l'inverse, dotées d'une thèque formée de plusieurs plaques de nature cellulosique (on parle alors de dinoflagellé « armé ») (Figure 1). Ces organismes possèdent également deux flagelles leur permettant de se déplacer (Fenchel, 2001). Un premier flagelle transversal (ou flagelle cingulaire) entoure la cellule, lui permettant de tourner sur elle-même. Le second flagelle, longitudinal, également appelé flagelle sulcal, est libre. La conjugaison de ces deux mouvements induit une nage hélicoïdale (Fenchel, 2001).

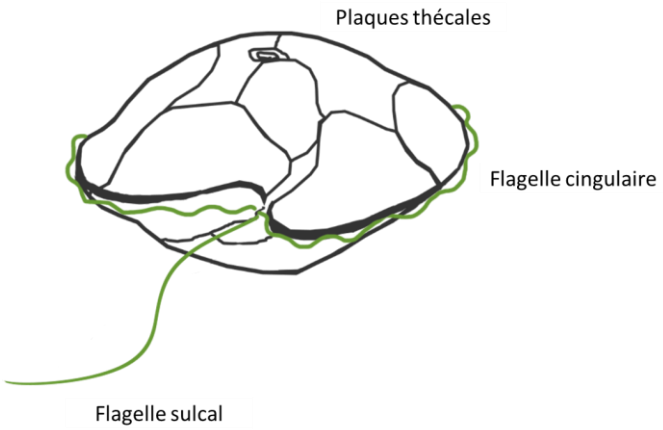


Figure 1: Schéma de la structure cellulaire et du mode d'insertion des deux flagelles chez le dinoflagellé marin benthique Gambierdiscus spp. (©ILM).

Le nombre d'espèces de dinoflagellés est estimé entre 2 000 à 2 500 réparties dans environ 300 genres (Taylor *et al.,* 2008; Hoppenrath *et al.*, 2009), dont environ 220 espèces d'eau douce (Bourrelly, 1970) *vs.* 1 500 à 2 000 espèces marines (Gómez, 2005). Parmi ces dernières, environ 10 % (*i.e.*, 189) appartiendraient à des formes benthiques (Hoppenrath *et al.,* 2014). A noter que sur ces 2 000 espèces, seulement 48 sont listées comme toxiques d'après Faust & Gulledge, 2002 dont 22 seraient capables d'efflorescences, c'est-à-dire de se multiplier rapidement et massivement lorsque les conditions environnementales leur sont favorables. Cependant, en raison de révisions taxonomiques fréquentes et de connaissances encore incomplètes sur la diversité des espèces dans de nombreuses régions/habitats, l'estimation du nombre exact d'espèces est difficile, mais devrait s'affiner au fur et à mesure du recueil de données issues des expéditions et campagnes scientifiques organisées à travers le globe (*e.g.* l'expédition Tara Océans[1]). Ainsi, cinq nouvelles familles, 48 nouveaux genres et 242 nouvelles espèces de dinoflagellés ont été décrites entre 2000 et 2014 (Hoppenrath & Elbrächter, 2015).

D'après Le Bescot *et al.,* (2016), le nombre exact d'espèces de dinoflagellés marins avoisinerait plutôt les 83 800 espèces, avec généralement une dominance des Gonyaulacales au sein du micro-phytoplancton (taille comprise entre 20 µm et 180 µm; Figure 2).

[1]https://oceans.taraexpeditions.org/m/qui-est-tara/les-expeditions/tara-oceans/

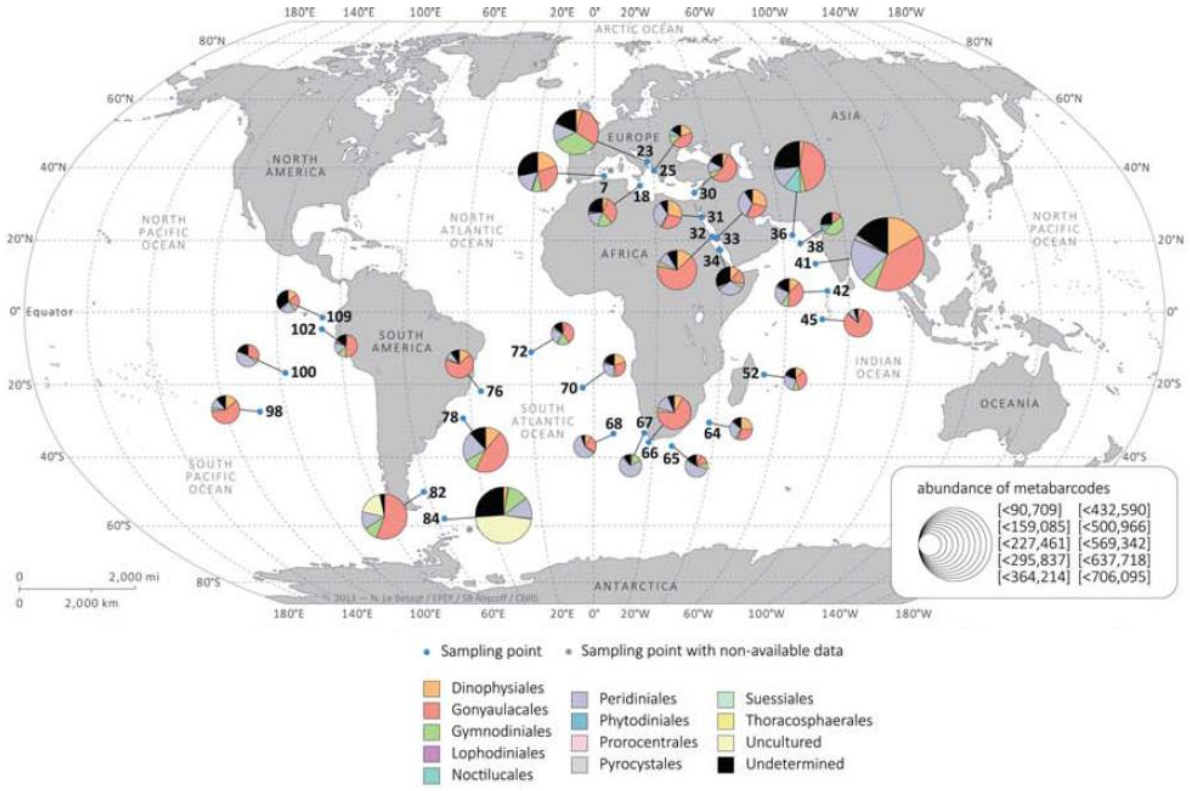


Figure 2 (tirée de Le Bescot et al., 2016): Répartition des dinoflagellés de taille comprise entre 20-180 µm sur la base d'analyses en metabarcoding des échantillons collectés dans le cadre de l'expédition Tara Ocean (2009-2012) dans différentes régions du monde.

Les dinoflagellés jouent un rôle important dans les réseaux trophiques car ils représentent, avec les diatomées, les principaux producteurs primaires de la chaîne alimentaire en milieu pélagique (Falkowski *et al.*, 2004). Depuis les dernières décennies, ils suscitent de plus en plus d'intérêt au sein de la communauté scientifique comme en témoigne le nombre croissant de publications répertoriées depuis 1970 (Oliveira *et al.*, 2020) (Figure 3).

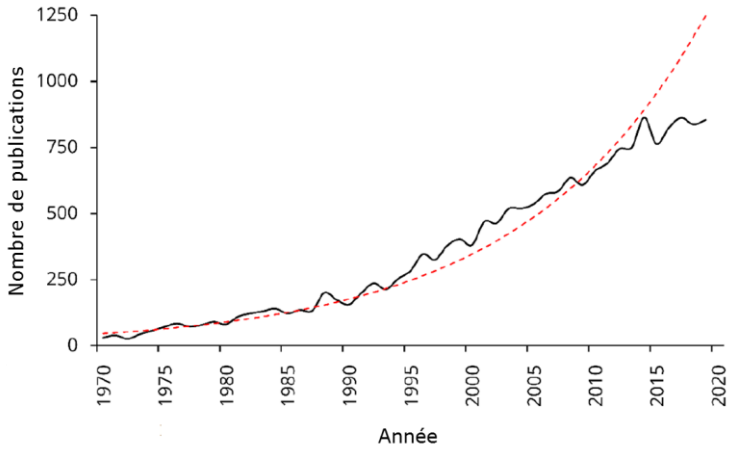


Figure 3 (d'après Oliveira et al., 2020): Evolution du nombre de publications consacrées aux dinoflagellés depuis 1970 à nos jours.

Les dinoflagellés sont dotés d'un cycle biologique complexe, alternant reproduction sexuée et asexuée (Kremp, 2013): l'essentiel de leur cycle biologique se déroule sous forme haploïde, avec un mode de reproduction principalement asexuée, par divisions végétatives (Figure 4). Toutefois, ces organismes peuvent également former, à l'occasion, des formes de résistance diploïdes issues de la reproduction sexuée. A l'instar de ce qui est observé chez les diatomées, cette capacité à former des kystes de résistance (ou spores de repos chez les diatomées) sous l'effet de divers stress environnementaux (baisse des teneurs en nutriments, dioxygène, température ou lumière) explique la propension de ces organismes à former des phénomènes de prolifération (ou efflorescences) lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables pour leur croissance: à la faveur d'une remise en suspension de ces kystes à partir des sédiments, on assiste alors à une germination de ces derniers, suivie du développement de cellules végétatives prêtes à entamer un nouveau cycle de reproduction (Figure 4).

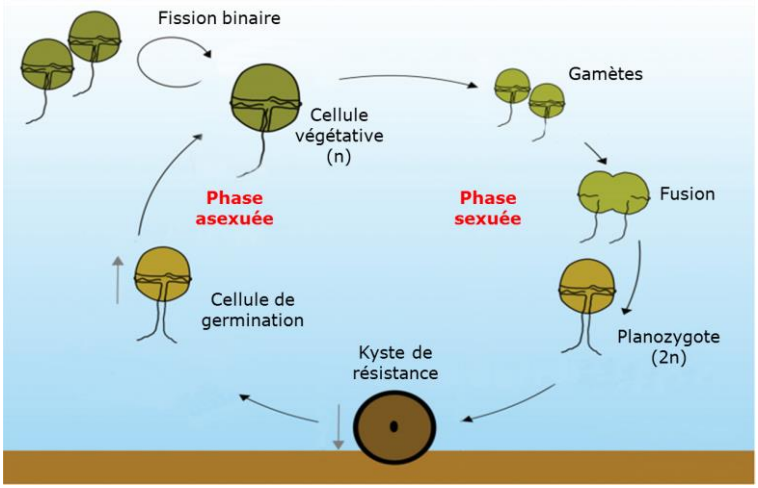


Figure 4 (d'après Kremp, 2013): Schéma du cycle de reproduction d'un dinoflagellé « type » alternant reproductions asexuée (n) et sexuée (2n) pour former des kystes de résistance sous l'effet de forçages du milieu.

Ces proliférations soudaines de phytoplancton également appelées Harmful Algal Bloom (ou HAB) peuvent, dans certains cas, s'apparenter à des marées colorées ou « red tides » qui peuvent s'avérer néfastes à la fois pour la biodiversité marine et terrestre (Sellner *et al.*, 2003; Bauman *et al.*, 2010). En effet, du fait des biomasses exceptionnellement élevées qui les caractérisent, ces HAB peuvent potentiellement s'accompagner de phénomènes d'anoxie du milieu marin entraînant des mortalités massives des poissons et de la faune marine en général. De plus, certaines espèces de dinoflagellés (tout comme certaines diatomées *e.g. Pseudo-nitzschia* sp. ou cyanobactéries *e.g. Microcystis* sp.) sont capables de produire des métabolites toxiques pouvant soit induire une mortalité supplémentaire sur la faune marine, soit contaminer l'ensemble de la chaine alimentaire avec comme principaux vecteurs les poissons, les bivalves et autres invertébrés marins, d'où un impact important sur l'économie, mais surtout, sur la santé humaine (Glibert *et al.*, 2005a). En effet, la consommation de produits marins contaminés par ces toxines peut provoquer divers symptômes cliniques, dont la variabilité et la sévérité dépendent principalement des familles toxiniques concernées, des quantités ingérées ainsi que de facteurs de susceptibilité individuelle humaine (âge, sexe, prédispositions génétiques) (Van Dolah, 2000; Moore *et al.*, 2008). C'est par exemple le cas du dinoflagellé *Gambierdiscus*, producteur de métabolites toxiques tels que les ciguatoxines (CTX), impliquées dans les intoxications alimentaires de type ciguatéra.

B) Les genres *Fukuyoa* et *Gambierdiscus*

Les genres *Gambierdiscus* et *Fukuyoa* regroupent des espèces autotrophes, dotées d'une thèque constituée de 33 plaques thécales. Ils sont préférentiellement benthiques, même si des comportements pélagiques ont déjà été observés (Yasumoto *et al.,* 1977; Bomber *et al.,* 1988b). Ils sont épiphytes des macroalgues et turfs algaux (Saint-Martin *et al.,* 1988; Parsons & Preskitt, 2007; Leaw *et al.,* 2011; Rains & Parsons, 2015) et ont une préférence pour les environnements calmes et stables de faible profondeur (de 2 à 13 m) (Richlen & Lobel, 2011), même si certaines espèces ont été observées dans des prélèvements collectés jusqu'à 40 m de profondeur (Tester *et al.,* 2013). Des densités élevées de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* spp. sont souvent observées dans les milieux fortement agressés/dégradés. En effet, plusieurs études ont rapporté que les proliférations de *Gambierdiscus* pouvaient être exacerbées par les perturbations naturelles (*e.g.* cyclones, ouragans ou tsunamis) et/ou anthropiques (*e.g.* extraction de corail, remblais ou rejets urbains) s'exerçant sur les récifs coralliens (Lewis, 1986; Bagnis, 1993; Kaly & Jones, 1994). Lors du suivi des populations de *G. toxicus* sur plusieurs années dans un site ciguatérique de Polynésie française, Chinain *et al.,* 1999b ont constaté une augmentation de la fréquence et des densités des proliférations de *Gambierdiscus* à la suite d'un épisode de blanchissement corallien de grande ampleur. Un consensus général veut que la colonisation massive de coraux morts par les macroalgues contribue à fournir le substrat favorable à une colonisation de ces macrophytes par *Gambierdiscus* et *Fukuyoa*, selon l'hypothèse initiale de Randall, 1958.

Gambierdiscus et *Fukuyoa* spp. se développent préférentiellement dans les régions tropicales et subtropicales du globe, entre 35 °N et 35 °S (Bienfang *et al.,* 2008a), mais des études récentes signalent également la présence de ces organismes dans plusieurs zones tempérées du globe, notamment en Corée (Jeong *et al.*, 2012; Jang *et al.*, 2018), au Japon (Nishimura *et al.,* 2016), aux îles Kermadec (Rhodes *et al.,* 2017a; Rhodes *et al.,* 2017c), en Australie méridionale (Larsson *et al.*, 2019), au Nord du golfe du Mexique (Tester *et al.,* 2013), en mer Méditerranée (Aligizaki & Nikolaidis, 2008; Tudó *et al.,* 2018) et en Macaronésie (Otero *et al.,* 2010; Nuñez *et al.,* 2012; Costa *et al.,* 2018; Hoppenrath *et al.,* 2019) (Figure 5).

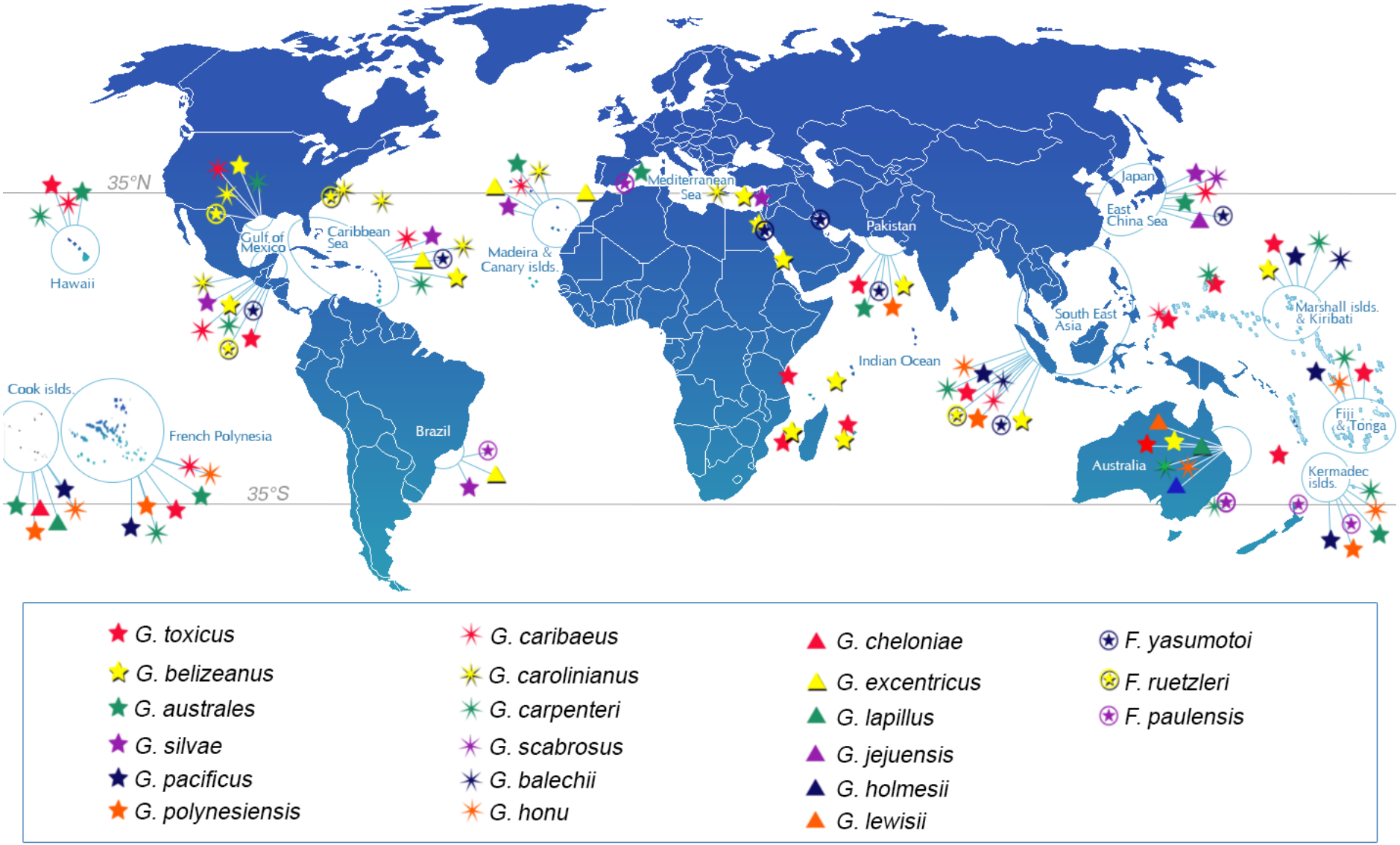


Figure 5: Répartition mondiale des différentes espèces de Gambierdiscus/Fukuyoa décrites de nos jours (©ILM).

La taxonomie de *Gambierdiscus* et *Fukuyoa* se fonde actuellement à la fois sur des caractéristiques morphologiques (morphotaxonomie) et génétiques. La morphotaxonomie se base traditionnellement sur l'analyse de la forme (*e.g.* globulaire *vs.* lenticulaire) et de la taille des cellules, ainsi que sur la taille, la forme, le nombre et l'arrangement des plaques thécales dans le cas des dinoflagellés armés (Kofoid, 1907; Adachi & Fukuyo, 1979; Besada *et al.,* 1982). Ces caractéristiques clés sont décrites en détail dans les descriptions originales des différentes espèces de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa*. La taxonomie moléculaire, quant à elle, utilise des marqueurs génétiques tels que les gènes codant pour l'ADN ribosomal (*e.g.* SSU, LSU-rDNA ou ITS) (Chinain *et al.*, 1999a; Litaker *et al.*, 2007; Gómez, 2014), la cytochrome oxydase (Takabayashi *et al.,* 2004), les gènes plastidiaux (Saldarriaga *et al.,* 2001), ou encore les marqueurs microsatellites (Sassenhagen & Erdner, 2017). Pour ces deux genres, le recours à la taxonomie moléculaire se justifie d'autant plus en raison de la plasticité morphologique bien connue chez ces organismes pouvant conduire à une identification erronée des espèces, notamment lors de la comparaison de clones de culture avec des cellules sauvages (Durand-Clement, 1986). Plusieurs techniques moléculaires sont actuellement disponibles pour discriminer les différentes espèces au sein d'un échantillon naturel, dont la Polymérase Chain Reaction en temps réel (qPCR), le recours à des enzymes de restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism ou RFLP), ou des sondes d'hybridation fluorescentes (Fluorescent In Situ Hybridization ou FISH), ou encore l'approche de type metabarcoding (Vandersea *et al.,* 2012; Nishimura *et al.,* 2016; Lyu *et al.,* 2017; Smith *et al.,* 2017; Kretzschmar *et al.,* 2019b; Litaker *et al.,* 2019; Pitz *et al.,* 2021).

A ce jour, 18 espèces de *Gambierdiscus* et trois de *Fukuyoa* ont été formellement décrites (Adachi & Fukuyo, 1979; Faust, 1995; Holmes, 1998; Chinain *et al.,* 1999a; Litaker *et al.,* 2009; Fraga *et al.,* 2011, 2016; Nishimura *et al.,* 2014; Fraga & Rodriguez, 2014; Gómez *et al.,* 2015; Smith *et al.,* 2016; Kretzschmar *et al.,* 2017; Rhodes *et al.,* 2017c; Jang *et al.,* 2018; Kretzschmar *et al.,* 2019a). *Gambierdiscus* regroupe les formes lenticulaires tandis que les formes globulaires ont été récemment reclassifiées au sein d'un nouveau genre, *Fukuyoa* (Gómez *et al.,* 2015). Mais il est vraisemblable que de nouvelles espèces viendront s'ajouter sous peu à cette liste, en raison de l'intensification des programmes de prospections sur le terrain, le recours plus systématique aux outils de taxonomie moléculaire, et le fait que plusieurs espèces listées pour l'heure comme « *Gambierdiscus* ribotype X » ou « *Gambierdiscus* sp. type X » sont en cours d'identification (Figure 6).

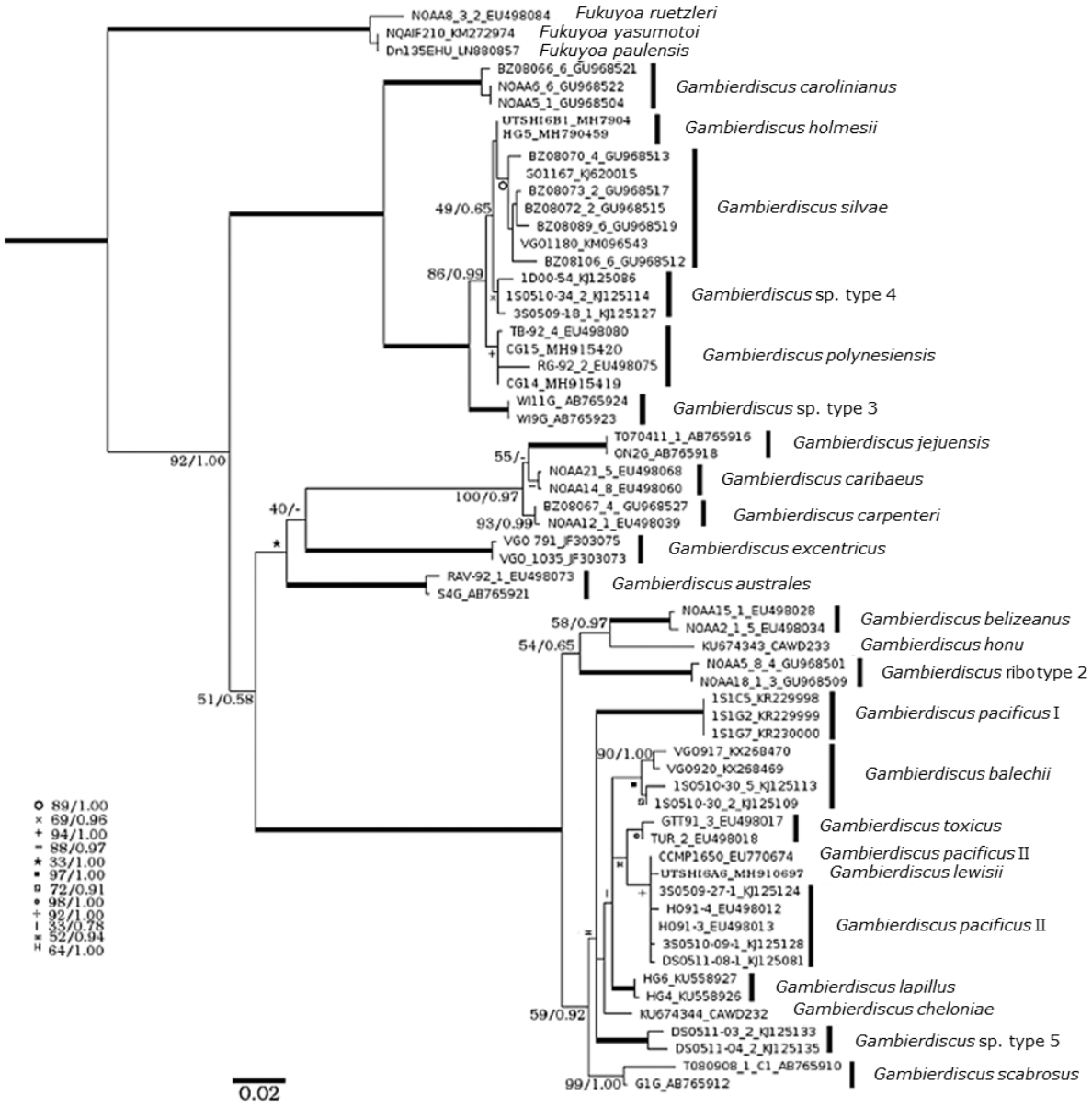


Figure 6 (d'après Kretzschmar et al., 2019a): Classification phylogénétique des différentes espèces et clones de Gambierdiscus/Fukuyoa et assimilés. Phylogénie basée sur des analyses bayésiennes et de mesure du maximum de vraisemblance (ML) au niveau de la région D8-D10 de la LSU rDNA. Les valeurs indiquent la probabilité bayésienne et la mesure de ML calculées pour chaque nœud. La barre d'échelle indique les substitutions par site.

(i) Le genre Gambierdiscus

Décrit à l'origine sous le nom de *Diplopsalis* sp. (Yasumoto *et al.*, 1977), ce genre sera rapidement renommé *Gambierdiscus* en 1979 avec, comme unique représentante, l'espèce *G. toxicus*, décrite à partir de souches sauvages collectées aux îles Gambier en Polynésie française (Adachi & Fukuyo, 1979). De fait, cette espèce sera considérée comme une espèce unique jusqu'à la fin des années 1990 où plusieurs travaux vont alors mettre en lumière les variabilités notables observées au sein de l'« espèce » *G. toxicus,* notamment au niveau des taux de croissance de plusieurs clones maintenus en culture (Bomber *et al.*, 1989; Sperr & Doucette, 1996; Chinain *et al.*, 1997), de leur production toxinique (Bomber *et al.*, 1989; Holmes *et al.*, 1990, 1991; Micouin *et al.*, 1992; Sperr & Doucette, 1996) et de leur profil génétique (Babinchak *et al.*, 1996; Chinain *et al.*, 1997). Ainsi, de 1995 à 1999, cinq nouvelles espèces seront tour à tour décrites: *G. belizeanus* isolée au large de Belize (Faust,

1995), *G. yasumotoi* découverte aux environs de l'île de Pulau Hantu à Singapour (Holmes, 1998) qui sera par la suite reclassifiée au sein du genre *Fukuyoa* (*cf.* section suivante), ainsi que trois nouvelles espèces originaires de Polynésie française, à savoir *G. polynesiensis*, *G. pacificus* et *G. australes* (Chinain *et al.*, 1999a) (Figure 7). Cette étude par Chinain *et al.*, sera d'ailleurs la première à prôner le recours à des marqueurs moléculaires (séquençage des gènes codant pour l'ARN ribosomal) pour élucider la diversité taxonomique de *Gambierdiscus,* en complément des critères morphologiques exclusivement utilisés jusque là. Depuis cette date, 15 nouvelles espèces ont été décrites, dont plus de la moitié dans la période comprise entre 2015 et 2020. Ainsi, en 2009, quatre nouvelles espèces originaires des Caraïbes et du Golfe du Mexique sont identifiées: *G. ruetzleri* (reclassifiée au sein du genre *Fukuyoa*, voir section suivante), *G. caribaeus*, *G. carolinianus* et *G. carpenteri* (Litaker *et al.,* 2009). A partir de 2011, pas moins de dix nouvelles espèces seront successivement décrites: *G. excentricus* et *G. silvae* aux Canaries (Fraga *et al.*, 2011; Fraga & Rodriguez, 2014), *G. scabrosus* au Japon (Nishimura *et al.,* 2014), *G. balechii* à Manado en Indonésie (Fraga *et al.*, 2016; Dai *et al.*, 2017), *G. cheloniae* et *G. honu* aux îles Cook (Smith *et al.,* 2016; Rhodes *et al.,* 2017b), *G. jejuensis* à Jeju Island en Corée (Jang *et al.*, 2018), et enfin *G. lapillus, G. holmesii* et *G. lewisii* isolées à Heron Island en Australie (Kretzschmar *et al.,* 2017, 2019a).

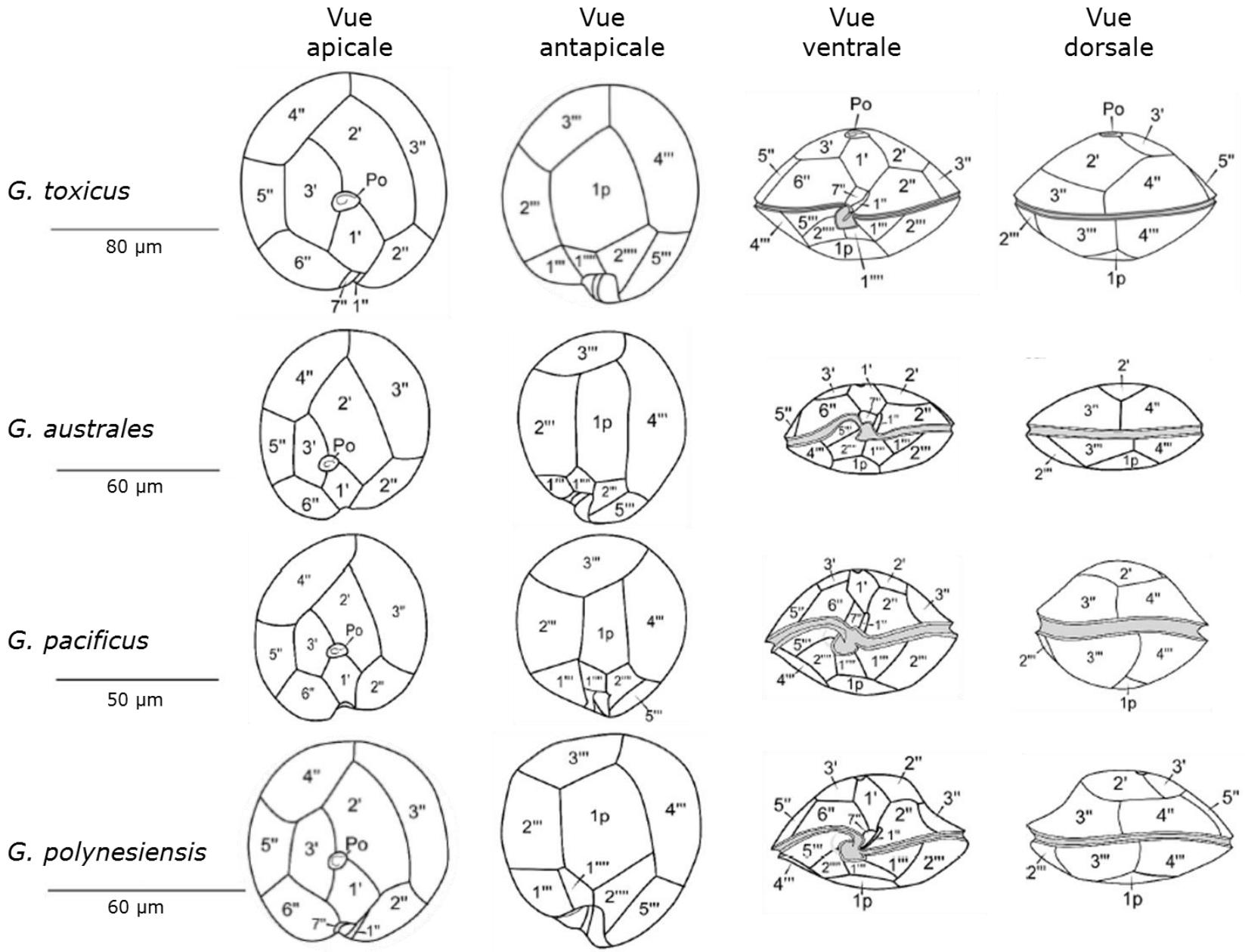


Figure 7 (d'après Litaker et al., 2009): Morphologie et taille des différentes espèces de Gambierdiscus décrites en Polynésie française. La désignation des plaques thécales suit la nomenclature Kofoidienne (Chinain, Faust, et al., 1999).

L'origine géographique, la taille des cellules, les vitesses de croissance, ainsi que les niveaux de toxicité caractérisant chacune de ces espèces sont résumés dans le Tableau 1 ci-après. Ce tableau indique que ces espèces diffèrent de manière significative au niveau de leur potentiel toxique, ce qui va avoir des implications importantes au niveau du risque lié à leur prolifération (*cf.* section V p 65). Du fait de leur production toxinique importante (> 1 pg cellule^{-1}), deux espèces représentent un risque ciguatérique majeur: *G. polynesiensis* dans le Pacifique et *G. excentricus* dans l'Atlantique.

En laboratoire, les cultures de *Gambierdiscus* se caractérisent par une croissance exponentielle pendant les 10 à 15 premiers jours de culture, suivie d'une phase stationnaire ou « plateau », au bout de 20 jours, où la production en ciguatoxines est généralement la plus importante, et enfin une phase de sénescence à partir du 25^{e} jour en moyenne au cours de laquelle les cultures périclitent (Chinain *et al.*, 2010a; Kibler *et al.*, 2012, 2015). La Figure 8 illustre la courbe de croissance-type d'une souche de *G. polynesiensis* (clone RIK7) en culture jusqu'en phase stationnaire.

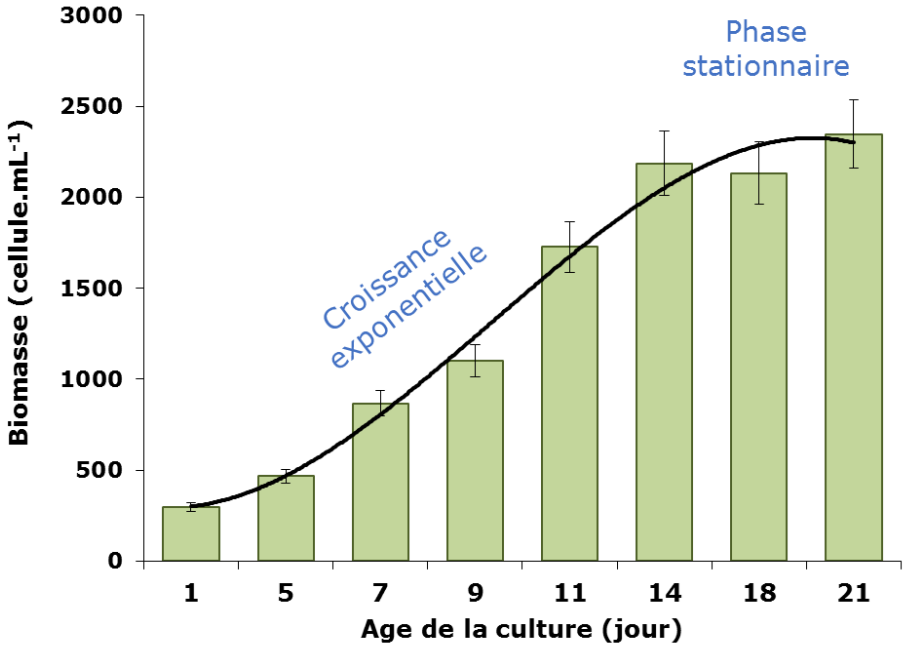


Figure 8: Courbe de croissance d'une souche G. polynesiensis (clone RIK7) maintenue en conditions in vitro sur une période de 21 jours.

Tableau 1: Liste des différentes espèces de Gambierdiscus décrites à ce jour ainsi que les taux de croissance et niveaux de production en ciguatoxines observés chez différentes souches au sein d'une espèce donnée.

Espèce	Année d'identification	Taux de croissance (division jour^{-1})	Taille Moyenne (µm)		Concentration en ciguatoxines (fg cellule^{-1})*	Références
			Largeur (W)	Hauteur (D)		
G. toxicus	1977	0,16 - 0,19	83	93	22 - 28	Adachi et Fukuyo, 1979; Chinain *et al.*, 2010a
G. belizeanus	1995	0,14 - 0,41	57	61	0,9 - 123	Faust, 1995; Chinain *et al.*, 2010a; Xu *et al.*, 2016; Litaker *et al.*, 2017;
G. australes	1999	0,12 - 0,43	63	73	0,6 - 30	Chinain *et al.*, 1999a, 2010a; Kibler *et al.*, 2012; Pisapia *et al.*, 2017a
G. pacificus	1999	0,18 - 0,42	54	59	0,5 - 13,5	Chinain *et al.*, 1999a, 2010a; Xu *et al.*, 2016; Pisapia *et al.*, 2017a; Darius *et al.*, 2018a
G. polynesiensis	1999	0,13 - 0,17	69	69	600 - 20 900	Chinain *et al.*, 1999a, 2010a; Pawlowiez *et al.*, 2013; Darius *et al.*, 2018a
G. caribaeus	2009	0,10 - 0,48	82	82	0,66 - 1,6	Lartigue *et al.*, 2009; Litaker *et al.*, 2009, 2017; Tester *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2016; Pisapia *et al.*, 2017a
G. carolinianus	2009	0,23 - 0,51	87	78	0,27 - 3,3	Litaker *et al.*, 2009, 2015, 2017; Xu *et al.*, 2016; Pisapia *et al.*, 2017a
G. carpenteri	2009	0,19 - 0,55	75	82	0,89 - 1,4	Litaker *et al.*, 2009, 2017; Kibler *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2016; Pisapia *et al.*, 2017a
G. excentricus	2011	0,08 - 0,1	83	97	469 - 1 426	Fraga *et al.*, 2011; Litaker *et al.*, 2017, 2019; Pisapia *et al.*, 2017a
G. scabrosus	2014	0,29 - 0,40	58	63	27,9 (± 3,8)	Nishimura *et al.*, 2013, 2014; Yoshimatsu *et al.*, 2014, 2016; Pisapia *et al.*, 2017a
G. silvae	2014	0,18 - 0,21	64	69	10,3 - 19,6	Fraga et Rodriguez, 2014; Xu *et al.*, 2016; Litaker *et al.*, 2017, 2019
G. balechii	2016	-	60	59	1,1 - 19,9	Fraga *et al.*, 2016; Dai *et al.*, 2017
G. cheloniae	2016	-	63	60	0**	Smith *et al.*, 2016
G. honu	2017	-	52	51	0**	Rhodes *et al.*, 2017b
G. lapillus	2017	-	39	41	0**	Kretzschmar *et al.*, 2017
G. jejuensis	2018	0,1	85	78	-	Jang *et al.*, 2018
G. holmesii	2019	-	79	79	-	Kretzschmar *et al.*, 2019a
G. lewisii	2019	-	64	64	-	Kretzschmar *et al.*, 2019a

* Quantifications estimées par méthode CBA-N2a ou MBA (*cf.* pp 58-59) en équivalent de CTX3C sauf concernant *G. balechii* où des estimations en équivalent de CTX1B ont été proposées

** Aucune CTX connue à ce jour n'a été détectée mais une toxicité globale sur souris a tout de même été observée

La division cellulaire chez *Gambierdiscus* se produit durant la nuit (ou les phases d'obscurité en conditions *in vitro*) comme c'est le cas pour d'autres dinoflagellés (Chisholm & Brand, 1981). Les premiers travaux portant sur le cycle cellulaire de *G. toxicus* sont ceux de Hokama *et al.,* 1996 qui décrivent une succession de six phases distinctes: (i) une phase mobile caractérisée par des cellules nageant librement en début de culture, (ii) une phase transitoire après deux ou trois semaines en culture débouchant sur (iii) une première puis (iv) une seconde phase enkystée, (v) une phase de mitose au cours de laquelle les kystes se divisent pour aboutir à (vi) une phase terminale pouvant durer plusieurs mois avant que ne débute un nouveau cycle. A peu près à la même période, Van Dolah *et al.,* 1995 se sont plus particulièrement intéressés à la division cellulaire chez *G. toxicus* et rapportent que la phase de division ne survient que six heures après le début de la période d'obscurité, pendant un court intervalle de trois heures. Une photopériode nuit/jour est donc nécessaire à la croissance de ce dinoflagellé. Une autre étude plus récente réalisée sur une souche de *G. balechii* confirme cette observation, mais s'est également attachée à décrire les variations observées au niveau de la taille des cellules et la forme des noyaux cellulaires lors des différentes phases du cycle de reproduction de cette espèce (Bravo *et al.,* 2014). Ces auteurs observent bien l'alternance d'une phase dominante haploïde (asexuée) et d'une phase diploïde (sexuée), mais sans fournir la preuve formelle de l'existence de kystes de résistance chez cette espèce.

(ii) Le genre Fukuyoa

À ce jour, le genre *Fukuyoa* comprend trois espèces distinctes: *F. yasumotoi* (anciennement *G. yasumotoi*) (Holmes, 1998), *F. ruetzleri* (anciennement *G. ruetzleri*) (Litaker *et al.,* 2009) et *F. paulensis* (Gómez *et al.,* 2015). C'est leur forme globulaire distincte de celle, lenticulaire, des espèces de *Gambierdiscus* qui leur a valu d'être récemment reclassées dans ce nouveau genre (Gómez *et al.,* 2015) (Figure 9).

Comme chez *Gambierdiscus*, les différences morphologiques interspécifiques observées au sein du genre *Fukuyoa* sont parfois subtiles (Leung *et al.,* 2018), ce qui nécessite ici encore le recours à la taxonomie moléculaire (Murray *et al.*, 2014; Gómez *et al.,* 2015; Laza-Martínez *et al.,* 2016; Díaz-Asencio *et al.,* 2019b). S'agissant de la contribution potentielle de ces espèces au phénomène ciguatéra, des toxicités de type CTX et maitotoxines (MTX) ont bien été détectées chez certaines souches de *F. ruetzleri* et *F. paulensis* (Roeder *et al.*, 2010; Holland *et al.,* 2013; Lewis *et al.,* 2016; Laza-Martínez *et al.,* 2016; Pisapia, 2017; Litaker *et al.,* 2017) alors que seule une activité de type MTX a été rapportée chez *F. yasumotoi* (Holmes, 1998).

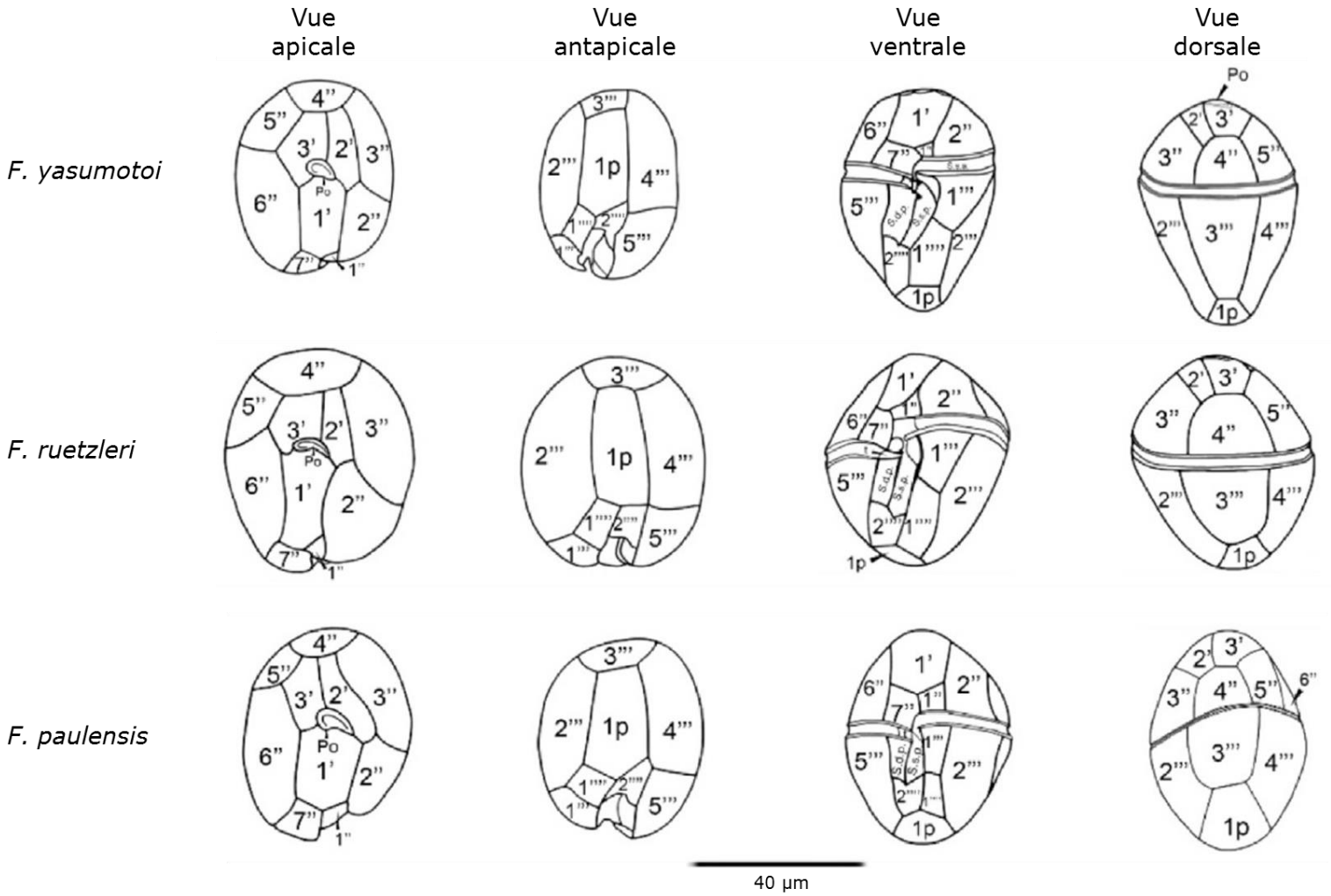


Figure 9 (d'après Leung *et al.,* 2018*): Morphologie et taille des différentes espèces de Fukuyoa. La désignation des plaques thécales suit la nomenclature Kofoidienne*

C) Diversité des métabolites secondaires produits par les dinoflagellés

Une attention croissante est portée aux métabolites secondaires produits par les micro-algues en général, et les dinoflagellés en particulier, en raison de leur valorisation potentielle en biologie, médecine et toxicologie (Assunção *et al.*, 2017) (Tableau 2).

Tableau 2 (d'après Cho et al., 2020): Potentiel industriel et biotechnologique de plusieurs biotoxines marines phytoplanctoniques isolées de dinoflagellés.

Toxines	Principal organisme source	Application potentielle	Références
Azaspiracides	*Azadinium*	Médicament contre l'arrythmie cardiaque	Twiner *et al.*, 2012
Borbotoxine	*Prorocentrum*	Médicament anticholinergique	Ten-Hage *et al.*, 2002
Brevetoxine	*Gymnodinium/Karenia*	Médicament pour les convalescences post-AVC	Sequeira *et al.*, 2019
*Coolia*toxine	*Coolia*	Analgesiques	Holmes *et al.*, 1995
Dinophysistoxine	*Dinophysis*	Traitements contre le cancer	Fujiki *et al.*, 1988
Gonyautoxine	*Gonyaulax*	Analgesiques, Anesthésiants et Antidépresseurs	Dick *et al.*, 2007
Hemolysines	*Amphidinium*	Traitements contre le cancer	Swofford *et al.*, 2014; Alizadeh *et al.*, 2020
Karlotoxine	*Karlodinium*	Traitements contre le cancer	Alizadeh *et al.*, 2020
Maitotoxine	*Gambierdiscus/Fukuyoa*	Outil dans la recherche sur la sécretion d'insuline et d'interleukine	Reyes *et al.*, 2014
Neosaxitoxine	*Alexandrium*	Analgesiques, Anesthésiants et Antidépresseurs	Dick *et al.*, 2007; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2007; Manríquez *et al.*, 2015
Acide okadaique	*Prorocentrum*	Recherche dans les maladies neurodégénératives	Forsyth *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2013; Kamat *et al.*, 2014
Palytoxine	*Ostreopsis*	Traitements contre le cancer	Wattenberg, 2007; Görögh *et al.*, 2013
Pectenotoxine	*Dinophysis*	Traitements contre le cancer	Spector *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2011
Prorocentrolides	*Prorocentrum*	Traitements contre le cancer et médicament anticholinergique	Lee *et al.*, 2020
Saxitoxine	*Pyrodinium*	Analgesiques, Anesthésiants et Antidépresseurs	Adams *et al.*, 1976; Dick *et al.*, 2007
Yessotoxine	*Protoceratium*	Antiallergique et traitement contre le cancer	Tobío *et al.*, 2016

Ces composés peuvent également avoir un rôle non négligeable sur le plan écologique: entre autres fonctions dont certaines restent encore à être élucidées, ces métabolites peuvent soit jouer un rôle prépondérant dans les processus de mixotrophie, soit agir en tant que substances allélochimiques pouvant influencer les intéractions biotiques et, de ce fait, participer à la structuration des communautés phytoplanctoniques (Granéli & Hansen, 2006) (Figure 10). On sait par exemple que certaines espèces de dinoflagellés sont capables de synthétiser et libérer des substances chimiques susceptibles d'affecter des organismes compétiteurs pour les ressources, repousser les prédateurs brouteurs, ou

encore enrayer la croissance d'organismes pathogènes (Fistarol *et al.*, 2004; Kubanek *et al.*, 2005; Granéli *et al.*, 2008).

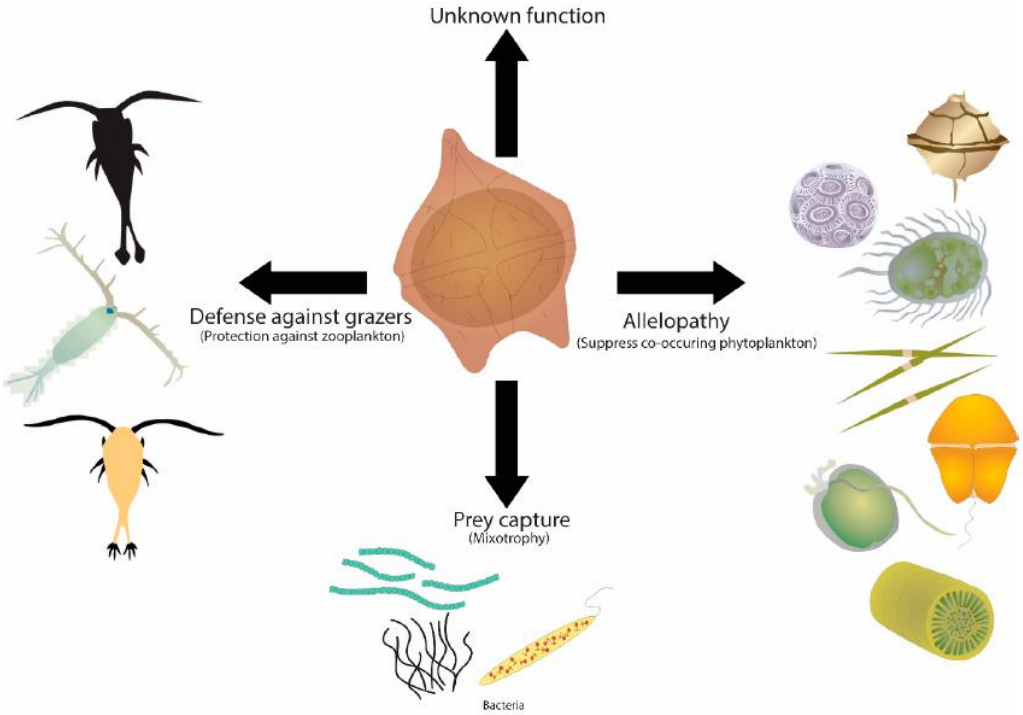


Figure 10 (tirée de Verma et al., 2019): Illustration des différents rôles écologiques des métabolites secondaires produits par les dinoflagellés.

Le développement récent de la métabolomique a fourni l'occasion d'étudier plus avant la chimiodiversité qui caractérise ce groupe des dinoflagellés, afin, par exemple, de décrire de nouveaux composés (y compris des toxines), d'évaluer la variation de leurs niveaux de productions en réponse à différents facteurs de stress, ou d'identifier des marqueurs chimiques à différents niveaux taxonomiques (Hess *et al.*, 2013). Les espèces de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* produisent plusieurs groupes de métabolites secondaires de la famille des polyéthers cycliques: les CTX, les MTX, les acides gambiériques, le gambierol, les gambieroxydes et gambierones (*cf.* section III p 49). La diversité et complexité structurelle de certains de ces composés ont conduit à l'hypothèse qu'ils pourraient être des substances allélochimiques dirigées contre les taxons coexistant fréquemment avec *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* spp. dans les environnements lagonaires (Bienfang *et al.*, 2008a; Chinain *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2017; Yong *et al.*, 2018) tels que *Ostreopsis*, *Prorocentrum*, *Coolia* et *Amphidinium* (*cf.* pp 37-38), cependant les effets allélopathiques des métabolites toxiques produits par tout ou partie de ces taxons restent encore peu documentés. Des études antérieures ont cependant montré que les exsudats (à partir de surnageants de culture) et les extraits ciguatoxiques de *G. toxicus* étaient capables d'inhiber la croissance de plusieurs espèces de diatomées et de chlorophytes (Bomber, 1990). Une étude plus récente a également montré que des milieux de culture préconditionnés avec les exsudats filtrés de *G. toxicus* sont capables d'inhiber la croissance de *Coolia monotis* et *Ostreopsis lenticularis* (Sugg & VanDolah, 1999). Une seule étude a abordé le rôle possible du GA-A comme stimulateur endogène de croissance pour les cultures de *G. toxicus* (Sakamoto *et al.*, 1996). A l'inverse, des extraits de plusieurs espèces benthiques telles que *Prorocentrum lima*, *O. lenticularis* ou *C. monotis*, sont également capables de supprimer la capacité de croissance ou d'adhérence de *Gambierdiscus* spp. en conditions *in vitro* (Sugg & VanDolah, 1999, García-Portela *et al.*, 2016; Sparrow *et al.*, 2017). Afin de mieux comprendre la pertinence écologique des métabolites secondaires produits par *Gambierdiscus* et *Fukuyoa* spp., il serait donc intéressant de

poursuivre et développer des études visant à caractériser les interactions inter-spécifiques s'exerçant entre les communautés phytobenthiques communément observées au sein des biotopes ciguatériques.

Les bases génétiques de la toxinogenèse chez *Gambierdiscus* et *Fukuyoa* spp. restent mal connues. Ainsi, les CTX sont généralement apparentées aux polykétides (PK) qui constituent un groupe très diversifié de produits naturels avec de longues chaines carbonées complexes (Staunton & Weissman, 2001; Hertweck, 2009). Ils sont classés en trois catégories principales en fonction de leur structure chimique: (i) les polyéthers cycliques (*e.g.* CTX et MTX), (ii) les macrolides (*e.g.* amphidinolides, pecténotoxines et spirolides), et (iii) les polyéthers linéaires (*e.g.* acide okadaïque, azaspiracides) (Hopwood, 1997; Rein & Borrone, 1999; Kellmann *et al.,* 2010). Une grande partie de nos connaissances actuelles sur la biosynthèse des PK provient de l'étude des organismes bactériens et fongiques. Néanmoins, les organismes producteurs de PK sont nombreux: bactéries, champignons filamenteux, plantes, macro- et micro-algues, insectes, dinoflagellés, mollusques ou éponges (Rein & Borrone, 1999; Weissman, 2004; Rein & Snyder, 2006; Hertweck, 2009). Ces composés à forte valeur ajoutée en biotechnologie font partie des molécules candidates les plus prometteuses en matière de découverte de médicaments naturels (Hopwood, 1997; Shen, 2003).

Les enzymes impliquées dans la biosynthèse des PK sont formées de grands complexes enzymatiques multi-domaines connus sous le nom de Polykétide Synthases (PKS) (voir Verma *et al.,* 2019 et références pour une revue complète). Ces enzymes présentent beaucoup de similarités avec les acides gras synthases (FAS) tant dans leur structure que dans leurs fonctions et interviennent dans les réactions catalytiques essentielles à certains processus biologiques fondamentaux chez les dinoflagellés (Hopwood & Sherman, 1990).

L'étude du transcriptome de *G. polynesiensis* par Pawlowiez *et al.,* 2014 a montré que 179 séquences ADN présentaient de fortes homologies avec des séquences déjà décrites chez d'autres organismes, et connues pour être impliquées dans les systèmes enzymatiques de type PKS (Kellmann *et al.,* 2010). A noter que sur ces 179 séquences, une trentaine de séquences présentaient également une homologie remarquable avec celles associées au système PKS identifié chez *Karenia brevis* (Monroe & Van Dolah, 2008), ce qui suggère que *Gambierdiscus* et *K. brevis* possèdent vraisemblablement un système de type PKS similaire impliqué dans la biosynthèse des ciguatoxines chez *Gambierdiscus* et des brévétoxines (PbTx, dont la strucuture est proche de celle des CTX) chez *K. brevis* (Pawlowiez *et al.,* 2014). Des travaux similaires ont permis l'identification de séquences de gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse de MTX et de PK chez d'autres espèces de *Gambierdiscus* telles que *G. australes*, *G. belizeanus* et *G. excentricus* (Kohli *et al.,* 2015b, 2017a), ainsi que chez une souche de *G. polynesiensis* originaire du Pacifique (Kholi *et al.,* 2017).

Plus récemment, Van Dolah *et al.,* 2020 ont comparé le transcriptome d'une souche hautement toxique de *G. polynesiensis*, à celui d'une souche de *G. pacificus* non productrice de CTX, et ont conclu à des différences significatives portant à la fois sur la nature et le nombre des transcrits des gènes codant pour les PKS. Le développement des connaissances encore très parcellaires dans ce domaine de recherche contribuerait sans nul doute à une meilleure compréhension des bases génétiques de la toxinogenèse chez *Gambierdiscus*. Sur un plan pratique, ces travaux pourraient potentiellement déboucher sur la caractérisation de marqueurs de toxicité (à partir des séquences de gènes de PKS spécifiques des espèces toxiques de *Gambierdiscus*) qui pourraient s'avérer fort utiles dans le cadre des programmes de surveillance du risque ciguatérique.

Toutefois, l'intérêt suscité par ces métabolites sur le plan biotechnologique ne doit pas faire oublier les problèmes que posent la plupart de ces molécules sur le plan sanitaire, notamment en raison des accidents toxiques dont elles sont à l'origine au sein des populations humaines du globe.

D) Les intoxications par biotoxines marines

Les produits de la mer constituent généralement la source d'alimentation de base de nombreuses communautés insulaires à travers le monde. Ils peuvent également constituer une source de revenus non négligeable pour ces populations (Daneshian *et al.,* 2013), notamment en Polynésie française et plus largement dans la région Pacifique (Lehane & Lewis, 2000; Bell *et al.*, 2009). Cependant, la consommation de ces produits n'est pas sans risque car ils sont potentiellement la source d'intoxications alimentaires dûes à la présence de biotoxines marines. Au moins onze intoxications de ce type sont signalées de par le monde (Tableau 3): l'intoxication amnésique (ASP), l'intoxication aux azaspiracides (AZP), l'intoxication neurologique (NSP), l'intoxication paralysante (PSP), l'intoxication diarrhéique (DSP), l'intoxication de type ciguatéra (CP), le palytoxisme, le carchatoxisme, le chélonitoxisme, le clupéotoxisme et le tétrodotoxisme (Yasumoto & Murata, 1993; Nicolas *et al.,* 2017; Daguer *et al.,* 2018).

Les composés toxiques impliqués dans ces différentes formes d'intoxications ont en commun (i) d'être parmi les toxines les plus puissantes produites par des organismes marins (Baden *et al.,* 1995); (ii) d'agir très rapidement (de quelques minutes à quelques heures); (iii) elles n'affectent ni le goût, ni l'odeur, ni la couleur des aliments contaminés, de sorte qu'il est très difficile de distinguer un poisson comestible d'un spécimen toxique (Park *et al.*, 1999); et (iv) la majorité d'entre elles agissent au niveau des cellules nerveuses (neurotoxines) et plus particulièrement au niveau de leurs membranes.

En conclusion, outre le rôle écologique majeur assuré par les dinoflagellés dans les écosystèmes marins au niveau de la production primaire, ces organismes unicellulaires s'apparentent aussi à de véritables usines de production de métabolites secondaires (Daneshian *et al.,* 2013). Dans les régions tropicales et subtropicales du globe où les populations sont fortement dépendantes des ressources lagonaires pour leur subsistance, les intoxications par biotoxines marines parfois graves, voire mortelles, dont certains de ces métabolites sont à l'origine, constituent non seulement une menace sérieuse pour la santé humaine, mais s'accompagnent également d'impacts socio-économiques non négligeables (notamment en raison du frein occasionné aux activités de pêche) (Bagnis, 1993; Lewis & Ruff, 1993; Glaziou & Legrand, 1994; Rongo & Van Woesik, 2011; Morin *et al.,* 2016).

Tableau 3 (d'après la thèse de Pawlowiez, 2012): Principaux syndromes d'intoxications humaines par biotoxines marines ayant pour organismes-sources des composants du phytoplancton marin.

Syndrome	Toxine	Organisme source	Organisme Vecteur	Taux de mortalité	Régions concernées
Intoxication amnésique (ASP)	Acide domoïque	**Diatomées**: *Pseudo-nitzschia* spp., *Amphora coffeaeformis*, *Nitzschia navis-varingica* **Algues rouges**: *Alsidium corallinum*, *Amansia glomerata*, *Chondria* spp., *Digenea simplex*, *Vidalia obtusiloba*	Coquillages et Poissons	3%	Amérique du Nord
Intoxication aux azaspiracides (AZP)	Azaspiracides	**Dinoflagellés**: *Azadinium* sp.	Bivalves	proche de 0%	Irlande et Europe
Carchatoxisme	Carchatoxines	indéterminé	Requins	jusqu'à 30%	Océan Indien
Chélonitoxisme	Lyngbyatoxine	**Cyanobactéries**: *Lyngbya majuscula*	Tortues	jusqu'à 100%	Indo-Pacifique
Ciguatéra (CP)	Ciguatoxines	**Dinoflagellés**: *Gambierdiscus* sp.	Poissons, Invertébrés, Mollusques	< 0,5%	Zones tropicales et Subtropicales
Clupéotoxisme	Palytoxine	**Dinoflagellés**: *Ostreopsis* sp., **Corail mou**: *Palythoa* sp.	Clupéidés	10%	Indo-Pacifique et Hawaï
Intoxication diarrhéique (DSP)	Acide okadaïque, Yessotoxines et Dinophysistoxines	**Dinoflagellés**: *Dinophysis* spp., *Prorocentrum* spp., *Coolia* spp.	Coquillages et Bivalves	proche de 0%	Japon, Europe et Amérique
Intoxication neurologique (NSP)	Brévétoxines	**Dinoflagellés**: *Karenia* sp., *Chatonella marina, C. antiqua, Fibrocapsa japonica, Heterosigma akashiwo*	Coquillages, Bivalves et Poissons	proche de 0%	Golfe du Mexique et Nouvelle-Zélande
Palytoxisme	Palytoxine	**Dinoflagellés**: *Ostreopsis* sp., **Corail mou**: *Palythoa* sp.	Crabes, Coquillages et Poissons	10%	Mediterranée Occidentale, Japon, Nouvelle-Zélande et Océan Indien
Intoxication paralysante (PSP)	Saxitoxine	**Dinoflagellés**: *Alexandrium* spp., *Gymnodinium catenatum, Pyrodinium bahamense*	Crabes et Coquillages	15%	Régions tempérées et tropicales
Tétrodotoxisme	Tétrodotoxine	**Bactéries:** *Vibrio* spp., *Alteromonas* sp., *Shewanella* sp.	Tetraodontidés	60 à 70%	Japon, Polynésie Française, Thaïlande et Bangladesh

II - Intoxication de type ciguatéra

A) Historique et biogénèse

L'intoxication de type ciguatéra (en anglais, Ciguatera Poisoning ou CP) représente la première intoxication non bactérienne liée à la consommation de produits de la mer, avec 50 000 à 500 000 cas estimés par an à l'échelle mondiale (Fleming *et al.,* 1998; Lehane & Lewis, 2000). Elle est causée par des biotoxines marines de nature lipophile, les CTX, qui sont de puissantes neurotoxines susceptibles d'être bioaccumulées dans les chairs, muscles et viscères des organismes marins tels que les poissons, les mollusques marins, et les crustacés (Yasumoto *et al.,* 1979; Vernoux *et al.,* 1985; Darius *et al.,* 2007; Chinain *et al.,* 2010b; Oshiro *et al.,* 2010; Roué *et al.,* 2016; Ikehara *et al.,* 2017) (Figure 11).

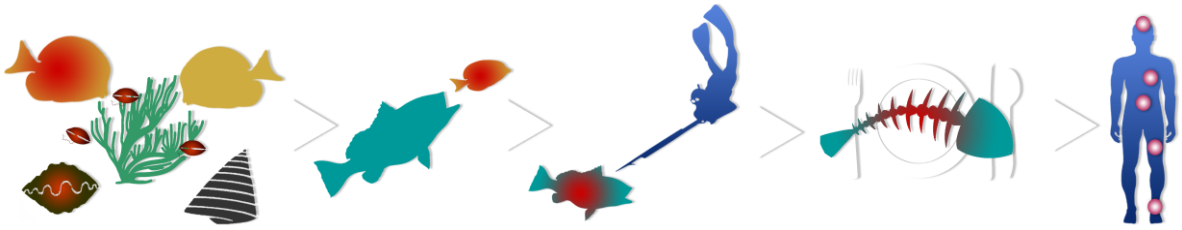


Figure 11: Représentation du transfert des CTX (en rouge) le long de la chaîne trophique des environnements lagonaires depuis les organismes herbivores (poissons et invertébrés) jusqu'au consommateur (©ILM).

Les premières traces écrites d'une CP remontent au VIIe siècle en Chine suite aux observations du médecin Chen Tsang Chi relatives à un empoisonnement après consommation d'une carangue à queue jaune (Halstead, 1967). D'autres mentions d'incidents toxiques sont également relevées en 1521 lorsque plusieurs capitaines de l'armée espagnole ont été intoxiqués dans le golfe de Guinée (Urdaneta, 1580). Certains membres d'équipage du capitaine Cook en ont également été affectés en 1786, et dont une description très détaillée figure dans les carnets de voyage de Cook (Pearn, 1994). En 1787, plusieurs symptômes neurologiques sont décrits dans les Antilles après ingestion d'un invertébré marin *Cittarium pica* (anciennement nommé *Turbo pica* ou *Livona pica*) appelé localement « sigua » (Poey, 1866; Lee, 1980) d'où dériveront le terme « siguatera » (Richardson, 1862) et le participe passé « siguatado » avant que le médecin cubain Felipe Poey y Aloy ne propose le terme de « ciguatera » en 1866 (Poey, 1866). Il faudra attendre 1948 pour un premier signalement de la présence de *Gambierdiscus* à Cabo Verde par Sousa e Silva, 1956 qui le baptiseront *Goniodoma* sp. à l'époque. Le lien véritable entre *Gambierdiscus* et la ciguatéra ne sera établi que vingt ans plus tard par Yasumoto *et al.,* 1977 puis Bagnis *et al.,* 1980 dans l'archipel des Gambier en Polynésie française. Yasumoto *et al.,* 1977 seront en effet les premiers à corréler la forte toxicité des algues/détritus sur les coraux dégradés/morts avec la présence de grandes quantités d'un dinoflagellé identifié à l'époque comme *Diplopsalis* sp. nov. Ce dinoflagellé sera également retrouvé dans le contenu stomacal d'un spécimen toxique de *Naso unicornis* prélevé dans la même zone d'étude. Bagnis *et al.,* 1980 confirmeront ensuite son implication dans les cas de CP en examinant la toxicité de cellules sauvages prélevées dans l'archipel des Gambier. Le terme « ciguatoxine » est quant à lui utilisé pour la première fois par Scheuer *et al.,* 1967 pour décrire une toxine isolée à partir de la chair de la murène javanaise *Gymnothorax javanicus*.

(i) Le transfert des ciguatoxines dans les réseaux trophiques marins

La première tentative d'explication de la biogénèse de la ciguatéra revient à l'ichtyologue John Randall qui, dès 1958, propose sa fameuse théorie de la chaîne alimentaire. Selon lui, les flambées de la ciguatéra interviendraient sous l'influence d'un « ferment toxique » présent dans l'environnement marin (*e.g.* une algue, un champignon, une bactérie ou une cyanobactérie) brouté dans un premier temps par les poissons herbivores qui, à leur tour, sont consommés par les poissons carnivores

(Randall, 1958). Par la suite, des études souligneront le lien entre les flambées de ciguatéra et la survenue de perturbations naturelles (cyclones, phénomènes de mortalité, blanchissement corallien, *etc.*) ou anthropiques (extractions de soupe de corail, dynamitage des passes, creusement de chenaux, *etc.*), néfastes pour les écosystèmes coralliens, car elles conduisent au développement de macro-algues sur les coraux dégradés, constituant autant de substrats favorables à la prolifération des micro-organismes benthiques toxiques (Banner, 1976; Bagnis, 1994; Chinain *et al.*, 1999b; Dickey, 2008; Rongo & van Woesik, 2013) (Figure 12). Ces phénomènes d'efflorescences de *Gambierdiscus* constituent ainsi le point de départ de la contamination de la chaîne alimentaire récifale. Dans un premier temps, les CTX algales produites par *Gambierdiscus* vont s'accumuler progressivement au niveau d'organismes microphages herbivores par broutage des gazons algaux recouvrant les coraux morts ou dégradés, et abritant *Gambierdiscus,* le transfert des CTX aux étages trophiques supérieurs étant ensuite assuré par la prédation de ces brouteurs par des poissons carnivores (Randall, 1958; Helfrich & Banner, 1963) (Figure 12).

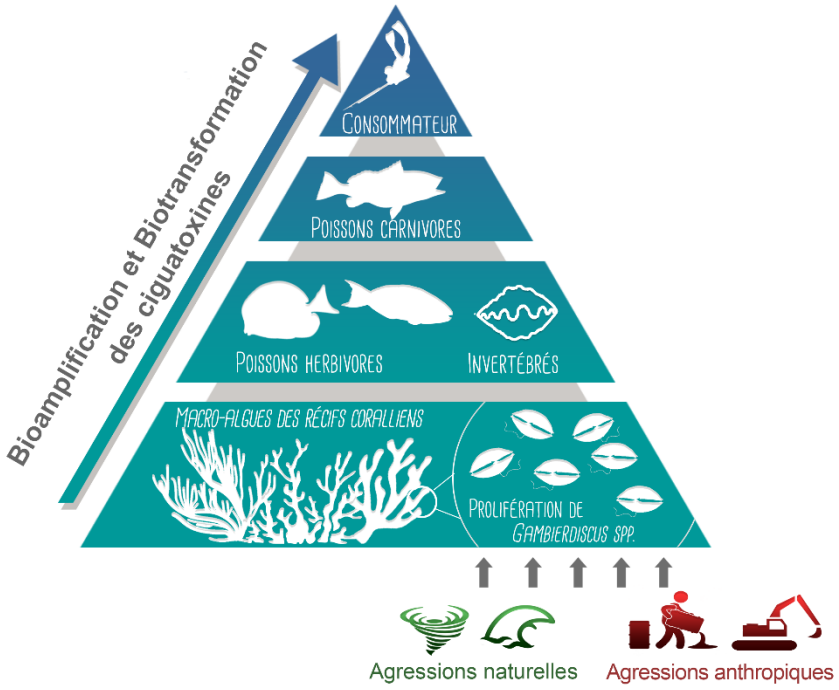


Figure 12: Schéma de l'action des perturbations naturelles et anthropiques sur la prolifération de Gambierdiscus (©ILM).

Cette bioamplification (transfert d'un contaminant par relation directe de prédation) couplée à une biotransformation des CTX microalgales – *i.e.* une métabolisation des CTX par le foie ou le système digestif des poissons hôtes - conduit à terme à l'intoxication du consommateur situé en haut de cette pyramide alimentaire (Lehane & Lewis, 2000).

(ii) La bioamplification des ciguatoxines

La bioamplification est un principe central du transfert trophique des CTX dans la chaîne alimentaire (Bienfang *et al.*, 2013). Les preuves de ce transfert ont pu être établies en analysant à la fois des poissons prélevés directement dans le milieu naturel (Chan *et al.*, 2011; Mak *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2016 pour revue), et des espèces pisciaires contaminées expérimentalement en laboratoire (Helfrich & Banner, 1963; Ledreux *et al.*, 2014; Roué *et al.*, 2016; Clausing *et al.*, 2018). En particulier, des essais de gavage ont été réalisés sur le poisson omnivore *Mugil cephalus* (une espèce rarement ciguatoxique dans la nature) au moyen de cellules hyper-toxiques de *G. polynesiensis*. Ils montrent que la quasi-totalité des toxines ingérées par le poisson est éliminée dans les 24 h suivant la prise alimentaire, permettant de conclure à l'absence d'accumulation des CTX algales dans les tissus

de *M. cephalus*, même après 16 jours d'expérimentation (Ledreux *et al.,* 2014). A l'inverse, l'étude réalisée par Clausing *et al.,* 2018 sur une période plus longue (16 semaines) sur des spécimens de *Naso brevirostris*, une espèce de poisson herbivore connue pour être à haut risque de ciguatéra en milieu tropical, a permis de confirmer l'accumulation progressive des CTX dans l'organisme de ces poissons, notamment au niveau des muscles. Une accumulation des CTX dans les muscles (10 %) a également été observée chez le poisson carnivore *Epinephelus coioides*, ainsi que dans le foie (25 %), la peau (20 %), les intestins (15 %), le cerveau (15 %) et les branchies (15 %) (Li *et al.,* 2020). Par ailleurs, certains résultats suggèrent que les espèces à croissance très rapide présenteront, à terme, des concentrations de CTX plus faibles que les espèces à croissance lente, en raison du facteur de dilution lié à la croissance somatique des individus (Yang *et al.,* 2016, Clausing *et al.,* 2018). Cette « bio-dilution » des toxines est un phénomène bien établi chez les poissons (Clark *et al.,* 1990; Ward *et al.,* 2010) qui a également été décrit chez des tortues contaminées par les PbTx (Perrault *et al.,* 2014).

Ces observations en faveur d'une bioaccumulation progressive des CTX dans les organismes marins vont dans le sens des résultats obtenus par Roué *et al.,* 2018b, chez des mollusques bivalves appartenant à l'espèce *Tridacna maxima* (bénitier). Ils indiquent qu'après avoir été exposés pendant 48 h à des cellules toxiques de *G. polynesiensis*, ces invertébrés ont bioaccumulé les CTX algales dans divers tissus (hépatopancréas, muscles et manteau), et ce à des teneurs excédant très largement le seuil de salubrité recommandé pour les CTX (~ 2,0 ± 0,8 ng/g en moyenne dans les bénitiers durant les six jours qui ont suivi l'exposition, soit 200 fois le seuil de salubrité recommandé fixé à 0,01 ng/g). En particulier, 65 % de la charge totale des CTX accumulées sont retrouvés dans l'hépatopancréas, 25 % dans la chair et 10 % dans le manteau (Roué *et al.,* 2018b).

(iii) La biotransformation des ciguatoxines

Lewis & Holmes, 1993 ont été les premiers à évoquer ce phénomène de transformation subi par les congénères de CTX chez les hôtes pisciaires, qui aboutit non seulement à une diversification des analogues algaux de CTX mais également à une augmentation de la toxicité de cette famille de composés au fur et à mesure que l'on s'élève vers les étages trophiques supérieurs de la chaîne alimentaire. En raison de ce processus, l'ingestion de gros poissons carnivores (donc de spécimens âgés) a souvent été associée à des cas graves de CP, dûs vraisemblablement aux fortes charges en toxines présentes dans les tissus de ces poissons (Van Dolah, 2000; Pearn, 2001). Cependant, dans la zone Pacifique, il est à noter que certaines espèces de poissons herbivores peuvent, à l'occasion, héberger des concentrations élevées de CTX dans leur chair, à des teneurs comparables à celles trouvées dans les poissons carnivores inféodés à la même zone d'étude (Darius *et al.,* 2007; Chan *et al.,* 2011; Gaboriau *et al.,* 2014). Les travaux de Yogi *et al.*, 2011, 2014, en mettant en lumière les différences à la fois régionales et intra-spécifiques observées au niveau des profils toxiniques de diverses espèces de poissons originaires d'Okinawa (Japon) et des régions alentour, ont conduit à émettre l'hypothèse que les caractéristiques génétiques des populations de la micro-algue *Gambierdiscus* propres à chaque région peuvent également contribuer à façonner les profils toxiniques observés chez les poissons environnants.

L'origine de cette distinction entre les toxines produites par *Gambierdiscus* et celles trouvées dans les poissons a récemment été précisée grâce aux travaux de Ikehara *et al.*, 2017 qui ont montré que (i) certains analogues de CTX trouvés préférentiellement chez les poissons carnivores (*e.g.* CTX1B, *cf.* Tableau 4 p 51) résultent directement de l'oxydation enzymatique de CTX d'origine algale (*e.g.* CTX3C, CTX4A, CTX4B, *cf.* Tableau 4 p 51); et (ii) les processus de bio-oxidation des CTX algales ont vraisemblablement lieu dans le foie des hôtes pisciaires, et impliqueraient des enzymes de la famille des cytochromes P (CYP) puisque des homogénats de CYP humain et de foie de poisson ont été utilisés pour catalyser les réactions de bio-oxydation *in vitro*. Ces résultats suggèrent que des réactions enzymatiques ou même chimiques *in vitro* appliquées aux CTX algales (pour lesquelles nous disposons d'une source quasi illimitée via les cultures de *Gambierdiscus*) constituent une approche possible pour l'obtention de formes plus oxydées de CTX, ouvrant ainsi des pistes intéressantes quant à la production

d'un large panel de standards de CTX qui font actuellement défaut aux progammes de recherche sur la ciguatéra.

(iv) La dépuration des ciguatoxines

Une meilleure connaissance/compréhension des processus de métabolisation puis d'élimination des CTX (*i.e.* vitesse de dépuration et voies d'excrétion) chez les organismes marins ciguatoxiques est capitale dans la gestion du risque ciguatérique. Or, pour l'heure, ces processus restent encore très peu documentés dans la littérature. S'agissant de la cinétique d'élimination des CTX chez les poissons, le consensus général est qu'un poisson contaminé par des CTX est susceptible de rester ciguatérique pendant des mois, voire des années, à l'inverse de ce qui est classiquement observé chez certaines espèces de mollusques bivalves capables d'une dépuration rapide (quelques jours) via le phénomène de clairance. Ainsi, chez la murène *Lycodontis javanicus*, la demi-vie des CTX dans le foie a été estimée à plus de 264 jours (Lewis *et al.,* 1992) tandis que chez le lutjan (*Lutjanus bohar*), aucune réduction de la toxicité en CTX n'a été observée après 30 mois d'essais (Banner *et al.,* 1966). Les vitesses de dépuration des CTX ont également été investiguées chez des poissons herbivores (*Mugil cephalus*, *Naso brevisrostris)* et des bénitiers (*Tridacna maxima)*, à l'occasion d'expériences de contaminations expérimentales en laboratoire. Ces études sont en faveur d'une élimination lente des CTX chez le nason et le bénitier (Clausing *et al.,* 2018; Roué *et al.*, 2018c) alors que chez *M. cephalus*, la quasi-totalité des toxines est éliminée dans les 24 h suivant l'ingestion du repas toxique (Ledreux *et al.,* 2014). Dans le milieu naturel, Darius *et al.*, 2018a ont montré que des trocas (*Tectus niloticus*) exposés naturellement à des efflorescences toxiques de *G. polynesiensis* en baie d'Anaho (Nuku Hiva, Marquises) demeuraient hautement toxiques même 30 mois après le signalement des premiers incidents toxiques (Gatti *et al.*, 2018).

De la même façon, les quelques études qui se sont intéressées aux voies d'excrétion des CTX indiquent que ces dernières varient en fonction des espèces considérées. Ledreux *et al.,* 2014 ont par exemple identifié que la vésicule biliaire serait un organe important pour l'élimination des CTX chez le poisson *M. cephalus*. Selon ces auteurs, les CTX sont vraisemblablement excrétées dans l'intestin via la bile, ce qui explique la toxicité élevée mesurée dans l'intestin de *Mugil cephalus*. De même, la voie respiratoire jouerait un rôle prépondérant dans la dépuration des CTX puisqu'une concentration élevée de CTX a également été observée dans les branchies de *M. cephalus* 12 h après l'arrêt de l'exposition des poissons aux cellules toxiques *G. polynesiensis*. Li *et al.,* 2020 ont quant à eux noté que plus de 90 % des CTX accumulées dans le foie du poisson *Epinephelus coioides* sont éliminées au bout de 30 jours après l'arrêt de la phase d'exposition aux CTX, alors que les concentrations de CTX n'ont été réduites que de moitié dans les muscles et l'intestin, ce qui suggère que le foie serait un organe pouvant servir d'indicateur à une exposition récente aux CTX chez ce carnivore. En revanche, ces mêmes auteurs n'ont noté qu'une dépuration limitée des CTX au niveau de la peau et des branchies chez *E. coioides*. Ces différences de dépuration des CTX entre espèces herbivores et carnivores confirment la complexité de ce phénomène et soulignent le déficit de connaissances actuel concernant les processus présidant à la bioaccumulation des CTX dans les réseaux trophiques marins.

(v) Contribution potentielle d'autres taxons au syndrome ciguatérique

Les dinoflagellés *Gambierdiscus/Fukuyoa* spp. sont considérés comme les principaux agents responsables des flambées de ciguatéra. Toutefois, de nombreuses études font aussi état de la contribution potentielle d'autres taxons toxinogènes tels que *Ostreopsis* (*e.g. O. siamensis*), *Prorocentrum* (*e.g. P. lima*), *Amphidinium*, et *Coolia*, également très présents dans les biotopes ciguatérigènes, notamment en Polynésie française, (Fukuyo, 1981; Yasumoto *et al.,* 1987; Morton & Faust, 1997) (Figure 13).

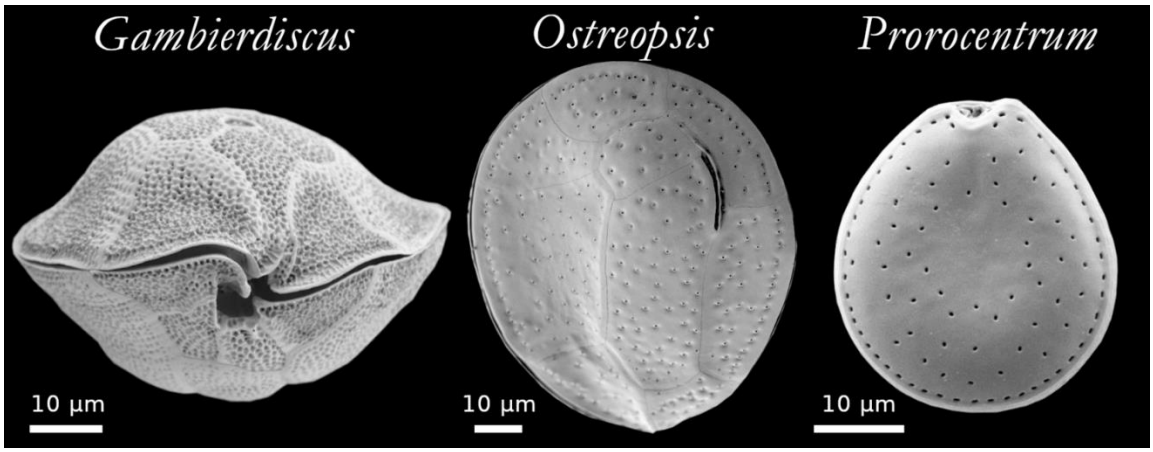


Figure 13: Clichés en microscopie électronique à balayage de trois familles de dinoflagellés coexistant fréquemment dans les assemblages benthiques des biotopes ciguatérigènes i.e. G. caribaeus, O. siamensis et P. lima (© N.Chomérat)

Or, les genres *Ostreopsis* et *Prorocentrum* sont déjà connus pour leur rôle dans les intoxications de type palytoxicose et DSP, respectivement. *Ostreopsis* est aussi fréquemment impliqué dans des cas d'intoxication par exposition à des aérosols marins contenant de la palytoxine ou dérivés autour du bassin méditerranéen et sur les côtes italiennes (Ciminiello *et al.,* 2006, 2014; Amzil *et al.,* 2012; Gémin *et al.,* 2020). Les dinoflagellés du genre *Coolia* présentent de fortes similarités avec le genre *Ostreopsis*, et sont producteurs de *Coolia*toxines (Holmes *et al.,* 1995), des toxines proches des yessotoxines (Murata *et al.,* 1987) qui sont responsables d'intoxications de type DSP dans l'hémisphère Nord (Draisci *et al.,* 1999; Ramstad *et al.,* 2001). Récemment, une espèce du genre *Coolia*, *C. tropicalis*, a également été identifiée comme productrice de 44-méthyl-gambiérone, un composé à activité neurotoxique également retrouvé chez *Gambierdiscus* (*cf.* section III p 58) qui est en fait très similaire à la yessotoxine (Boente-Juncal *et al.*, 2019; Tibiriçá *et al.,* 2020). Enfin, le genre *Amphidinium* est la source de divers composés comme les amphidinolides, amphidinols, amphidinines et amphirionines aux propriétés cytotoxiques avérées (voir Cousseau *et al.,* 2020 pour une revue).

Les cyanobactéries sont également suspectées de participer aux flambées de ciguatéra. Laurent *et al.,* 2008 ont notamment suggéré l'implication probable de *Hydrocoleum lyngbyaceum*, une cyanobactérie marine benthique apte à synthétiser un complexe toxinique dont les effets s'apparentent à la fois à l'action des CTX et à celle des toxines paralysantes. Ces organismes marins avaient déjà été suspectés dans le passé comme source potentielle de composés ciguatoxiques (Randall, 1958). En effet, dès les années 1960, Halstead, 1965 a observé dans le système digestif de poissons toxiques, la présence de la cyanobactérie *Lyngbya majuscula* (Oscillatoriales), et proposa l'hypothèse qu'elle pourrait être la source principale de toxines. Bagnis, 1967 rapporte ensuite un épisode sévère d'intoxication suite à la consommation de bénitiers dans le lagon de Bora-Bora (archipel de la Société, Polynésie française). D'après ses observations, les bénitiers incriminés étaient recouverts de cyanobactéries. Par la suite, les études menées ont permis de confirmer que plusieurs espèces de cyanobactéries marines pélagiques (*Trichodesmium*) et benthiques (*Hydrocoleum, Oscillatoria*) du groupe des Oscillatoriales sont susceptibles de synthétiser plusieurs familles de toxines (Laurent *et al.,* 2008; Laurent *et al.,* 2012), notamment (i) l'anatoxine-a et l'homoanatoxine-a qui agissent en compétition avec l'acéthylcholine (Mejean *et al.,* 2010; Osswald *et al.,* 2007); (ii) la palytoxine et la 42-hydroxy-palytoxine (Kerbrat *et al.,* 2011); et (iii) des composés de type CTX (Laurent *et al.,* 2008, 2012). Cette hypothèse de l'origine cyanobactérienne de certains composés de type CTX reste toutefois à être formellement démontrée, mais pour l'heure de telles études se heurtent principalement à la difficulté d'établir/maintenir des cultures pures de ces espèces de cyanobactéries (Alvarenga *et al.,* 2017).

L'implication réelle de ces dinoflagellés et cyanobactéries dans la ciguatéra reste à être clairement établie, mais il est vraisemblable que la diversité de métabolites actifs dont ils sont la source puissent d'une manière ou d'une autre contribuer au syndrome ciguatérique au sens large et, partant, au large panel de symptômes décrits chez les patients (Richlen & Lobel, 2011; Chinain *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2017).

B) Symptômes et traitements

(i) Symptômes

Près de 175 symptômes différents, peu spécifiques et d'intensité variable, sont rapportés dans la littérature pour décrire l'intoxication de type ciguatéra (Friedman *et al.*, 2017; Gatti *et al.*, 2018; Sims, 1987). Ces signes cliniques peuvent être regroupés en cinq grandes familles: digestifs, neurologiques, neuropsychiatriques, cardio-vasculaires et généraux (Allsop *et al.*, 1986; Palafox & Buenconsejo-Lum, 2001; Gatti *et al.*, 2008; Friedman *et al.*, 2017) (Figure 14). En l'absence d'outil diagnostic dûment validé, le diagnostic de ciguatéra repose actuellement uniquement sur l'expression d'un tableau clinique évocateur rattaché à la consommation récente de produits marins, ce diagnostic étant d'autant plus conforté lorsque l'intoxication survient dans un contexte de Toxi-Infection Alimentaire Collective (TIAC) *i.e.* lorsque deux convives ou plus développent des signes de l'intoxication à l'issue d'un même repas toxique. Seule la recherche de CTX dans les restes du repas toxique permet de confirmer de façon formelle l'exposition des patients aux toxines de la ciguatéra.

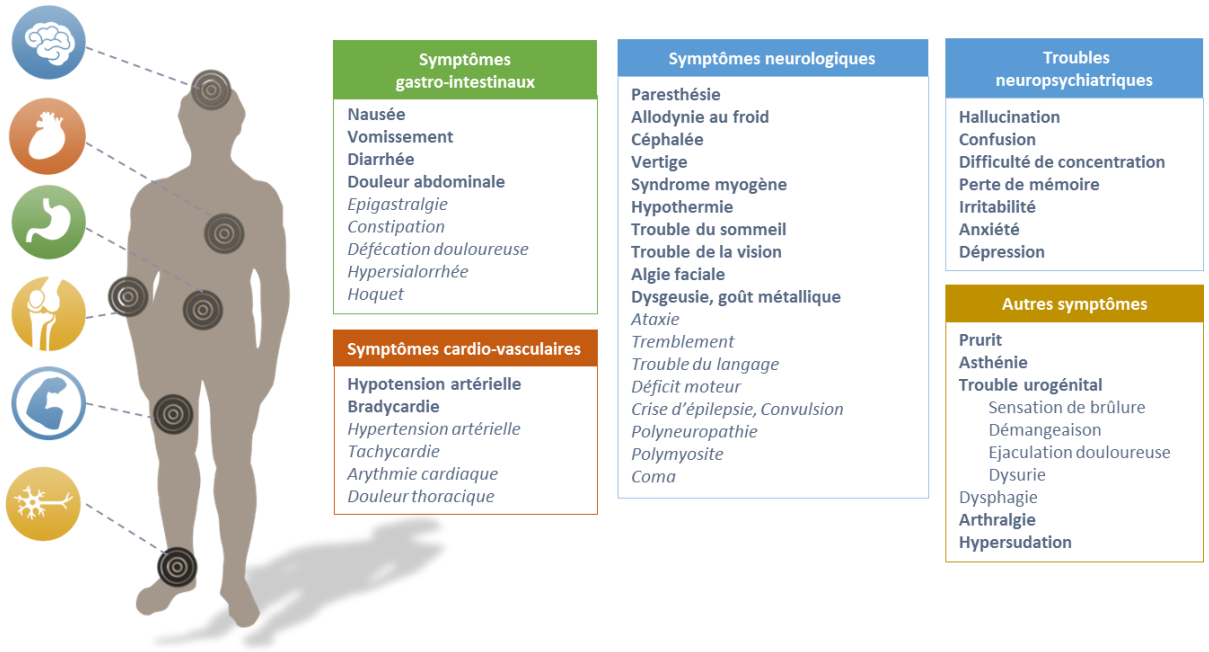


Figure 14: Tableau clinique des principaux symptômes (en gras) associés à une intoxication de type ciguatéra (©ILM).

Classiquement, la survenue des premiers symptômes est estimée entre deux heures et 12 h (parfois < 1 h) après consommation de produits contaminés (Figure 15) (Bagnis, 1968; Chateau-Degat *et al.*, 2007; Friedemann, 2016). Les premiers signes sont souvent d'ordre digestif, de type crampes, nausées, diarrhées et vomissements, s'estompant généralement au bout de deux jours, spontanément ou grâce à l'action d'une médication spécifique. Ils laissent alors place à une « phase d'état », marquée par l'apparition de signes généraux, rhumatologiques (articulations, muscles) et neurologiques tels que les paresthésies (brûlures, picotements) et l'allodynie au froid (sensations de brûlures au contact de liquides ou d'objets froids). Dans certains cas, les malades peuvent exprimer des troubles neurologiques

(prurit de type neurogène, céphalées, dysesthésies et paresthésies) dès les premières heures qui suivent l'ingestion du repas toxique, parfois, en l'absence totale de manifestations digestives. A l'inverse des signes gastro-intestinaux, les troubles neurologiques sont susceptibles de perdurer dans le temps, pendant plusieurs semaines, mois ou années (Chateau-Degat *et al.*, 2007, 2009; Friedemann, 2016, Friedman *et al.*, 2017; Gatti *et al.*, 2018) (Figure 15). Parmi eux, le prurit sans signes cutanés, les paresthésies, les dysesthésies, faiblesse musculaire, la fatigue généralisée et les troubles neuropsychiatriques, sont les plus fréquemment décrits. Concernant les symptômes cardio-vasculaires, ceux-ci interviennent en général dans les premières 48 heures, sous la forme d'hypotension artérielle et de bradycardie sévères, présentées comme des indicateurs de gravité de l'intoxication.

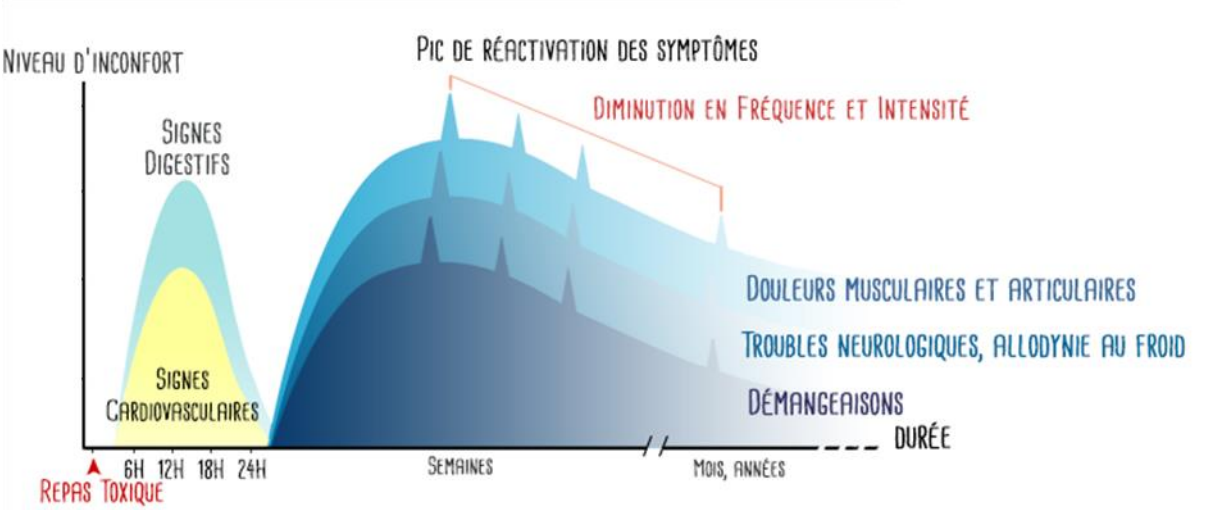


Figure 15: Evolution chronologique des différents symptômes après une intoxication de type ciguatéra (©ILM).

L'allodynie au froid associée à des paresthésies des extrémités ou du visage, survenant dans un contexte apyrétique, voire d'hypothermie transitoire, peuvent être considérés comme caractéristiques de la ciguatéra (Gatti *et al.*, 2018). Bien que l'intoxication soit dans la très grande majorité bénigne, des cas létaux, bien que rares sont observés dans toutes les régions d'endémie (Rabenjarison *et al.*, 2016; Chan, 2016; Friedman *et al.*, 2017). Si le taux de létalité lié à la ciguatéra est estimé à moins de 0,5 % (Bagnis *et al.*, 1979; Allsop *et al.*, 1986), dans certains clusters épidémiques, celui-ci peut atteindre 10 % (Bagnis, 1970; Rabenjarison *et al.*, 2016). Les décès font généralement suite à des défaillances cardiovasculaires et atteintes neurologiques centrales sévères. Exceptionnellement, la ciguatéra peut être aussi responsable d'accouchements prématurés, de fausse couche en cas d'intoxication au cours de la grossesse, de troubles neurologiques transitoires chez le nourrisson et d'intoxications via le lait maternel (Pearn *et al.*, 1982; Bagnis *et al.*, 1989; Blythe & de Sylva, 1990).

Certaines études suggèrent par ailleurs que le panel de symptômes observés varie d'une région à l'autre. Par exemple, Palafox & Buenconsejo-Lum, 2001 rapportent que les diarrhées sont quasi absentes aux îles Marshall et que les démangeaisons sont plus importantes en Australie que dans d'autres régions. Selon Friedman *et al.*, 2008, ce sont les symptômes neurologiques qui prédominent aux Caraïbes après une phase aiguë de symptômes gastro-intestinaux *i.e.* dans les 12 premières heures suivant l'intoxication (Lawrence *et al.*, 1980), tandis que dans l'océan Pacifique, les symptômes neurologiques sont majoritairement observés (Nicholson & Lewis, 2006) et les formes cliniques semblent plus sévères (coma éventuel d'après Bagnis *et al.*, 1979). Les problèmes neuropsychiatriques, avec notamment la survenue d'épisodes hallucinatoires, semblent être en revanche spécifiques à l'Océan Indien (Quod & Turquet, 1996). Cette variabilité du tableau clinique de la ciguatéra, si elle se confirme, peut être attribuée à différents facteurs tels que l'exposition à des

analogues de CTX qui diffèrent selon les régions d'endémie considérées (Pacifique, Caraïbes et indiennes; *cf.* section III p 49), les espèces de poissons consommées (Morris *et al.*, 1982; Kodama & Hokama, 1989; Vernoux & Lewis, 1997) ou la co-occurrence d'autres familles toxiniques (*e.g.* MTX, l'acide okadaïque, la palytoxine ou l'anatoxine) (Hokama, 1988).

L'existence d'une hypersensibilité à divers produits alimentaires et contextes environnementaux qui peuvent contribuer à la réapparition de symptômes chez les patients (*cf.* Figure 15 p 40) est une des spécificités de la ciguatéra. Parmi ces facteurs de réactivation des symptômes, citons notamment l'alcool, les produits de la mer ou d'eau douce, la viande (bovine, porcine et volaille), les noix, les produits en conserve, les produits laitiers, la caféine, le chocolat, l'activité physique intense, la perte de poids rapide, l'exposition prolongée au froid ou au soleil, la déshydratation, la fatigue, le stress et le manque de sommeil, (Gillespie *et al.*, 1986; Lange *et al.*, 1992; Barton *et al.*, 1995; Fleming *et al.*, 1997; Lewis, 2001; Vigneau *et al.*, 2008; Friedman *et al.*, 2017; Gatti *et al.*, 2018).

Il est possible qu'au cours d'un même repas toxique, une partie seulement des convives déclare les symptômes de l'intoxication. Ce phénomène s'explique par l'existence d'un « seuil symptomatique » propre à chaque individu, et dépendant possiblement de son appartenance ethnique, (Bagnis *et al.*, 1989; Kodama & Hokama, 1989), son âge (Glaziou & Martin, 1993), ses habitudes alimentaires (*i.e.* consommateur fréquent *vs.* occasionnel de poissons lagonaires), sa corpulence, *etc.* En d'autres termes, ce n'est que lorsque le niveau de toxines dans l'organisme dépasse ce seuil symptomatique que les signes de l'intoxication se déclenchent chez les patients. Selon Lewis, 2001, 0,1 µg de toxines/kg de chair contaminée suffiraient à déclencher des symptômes d'intoxication chez l'Homme pour des espèces pisciaires issues du Pacifique. Toutefois, en vertu du principe de précaution, les agences de santé européennes (EFSA) et américaines (FDA) recommandent un seuil de salubrité dix fois inférieur aux données proposées par Lewis, 2001: soit 0,01 µg de CTX1B/kg de chair pour les poissons consommés dans le Pacifique et 0,1 µg de C-CTX1/kg de chair pour les poissons originaires des Caraïbes (EFSA, 2010; FDA, 2011).

(ii) Transmission de la ciguatéra

Plusieurs voies de transmission de la ciguatéra sont connues chez l'homme, en particulier la voie trans-plancentaire (Pearn *et al.*, 1982), le lait maternel qui contraint les mères à arrêter l'allaitement de leur nourrisson durant plusieurs mois (Bagnis *et al.*, 1989; Thoman, 1989; Blythe & de Sylva, 1990), ou encore par voie sexuelle, ce qui pourrait expliquer la survenue de prurit vulvaire chez des femmes lors de rapports sexuels avec un partenaire atteint de ciguatéra, ou de douleurs pelviennes chez les hommes durant l'éjaculation (Lange *et al.*, 1989; Geller *et al.*, 1991).

(iii) Les traitements conventionnels et traditionnels

En l'absence de traitements spécifiques, la prise en charge médicale des patients est essentiellement symptomatique (Kumar-Roiné *et al.*, 2010) et préconise par exemple le recours à des antispasmodiques, des antiémétiques, des anti-diarrhéiques, des antihistaminiques, *etc.* (Bourdy *et al.*, 1992; Lehane & Lewis, 2000). Les troubles cardiovasculaires sont généralement traités par l'atropine mais la dopamine, le gluconate de calcium ainsi que l'adrénaline peuvent être également utilisés pour les cas les plus sévères (Chinain *et al.*, 2014).

Les symptômes neurologiques peuvent être traités par des injections de vitamines (B1, B6, B12) (Bourdy *et al.*, 1992). Les formes chroniques, très fréquentes, peuvent être traitées par amitriptyline, tocainide, fluoxétine, duloxétine, gabapentine, ou prégabaline (Mullins & Hoffman, 2017). Dans les cas graves, une administration de D-mannitol par voie intraveineuse (i.v.) peut permettre d'atténuer les troubles neurologiques (Palafox *et al.*, 1988; Lewis *et al.*, 1993; Mattei *et al.*, 1999; Mitchell, 2005). Ce composé serait capable de piéger les radicaux libres générés par les CTX, et de réduire leur action au niveau des canaux sodium (Friedman *et al.*, 2008). Toutefois, il est recommandé de l'administrer dans les 48 h suivant l'intoxication, pour une efficacité optimale (Mines *et al.*, 1997). A noter cependant que les résultats contradictoires observés dans le cadre d'essais cliniques ne permettent pas de conclure définitivement à une véritable efficacité du D-mannitol (Mullins & Hoffman, 2017). Ainsi, dans l'étude de Schnorf *et al.*, 2002, aucune amélioration de l'état de santé des patients n'a été observée

dans les 24 h suivant l'administration intraveineuse du traitement. De plus, aucune différence n'a été observée entre l'atténuation des symptômes d'un groupe de patients ayant reçu un traitement au D-mannitol et ceux ayant reçu un placebo, ce qui explique pourquoi son utilisation par les professionnels de santé pour traiter les intoxications ciguatériques demeure très limitée (Kumar-Roiné *et al.,* 2011).

En revanche, dans la médecine traditionnelle, il existe de nombreux remèdes à base de plantes qui sont couramment employés dans le Pacifique pour traiter cette affection (sous forme de décoction, infusion ou macération à partir de feuilles, racines, écorces ou sèves, purs ou en mélange dans différentes proportions) (voir Kumar-Roiné *et al.*, 2011 pour une revue). Plus de 90 plantes entrant dans la formulation de remèdes traditionnels en Nouvelle Calédonie et Vanuatu ont été recensées (Laurent *et al.,* 1993). Par la suite, la présence potentielle de molécules actives capables de contrecarrer les effets des CTX a été recherchée dans les extraits d'une vingtaine de plantes (Boydron-Le Garrec *et al.*, 2005; Kumar-Roiné *et al.*, 2009), dont les racines du pandanus (*Pandanus tectorius*), et les feuilles de faux poivrier (*Vitex trifolia*) et de faux-tabac (*Heliotropium foertherianum;* Figure 16). Seule *H. foertherianum*, plante particulièrement prisée dans le Pacifique Sud en traitement de la ciguatéra, a fait l'objet d'études plus poussées (Kumar-Roiné, 2009; Kumar-Roiné *et al.*, 2009; Rossi *et al.*, 2012; Braidy *et al.*, 2014). Ces travaux ont confirmé que l'acide rosmarinique, principe actif majeur contenu dans les extraits de feuilles, était capable de contrecarrer les effets neurotoxiques de la CTX1B. Le remède traditionnel, quant à lui, qui consiste en une décoction de feuilles de *H. foertherianum*, s'avère cinq fois plus efficace qu'un traitement à base d'acide rosmarinique seul, suggérant une action synergique des autres composés présents dans la préparation. En effet, au moins 24 composés additionnels ont été mis en évidence dans l'extrait de feuilles de faux tabac en Polynésie française (Rossi *et al.*, 2012).

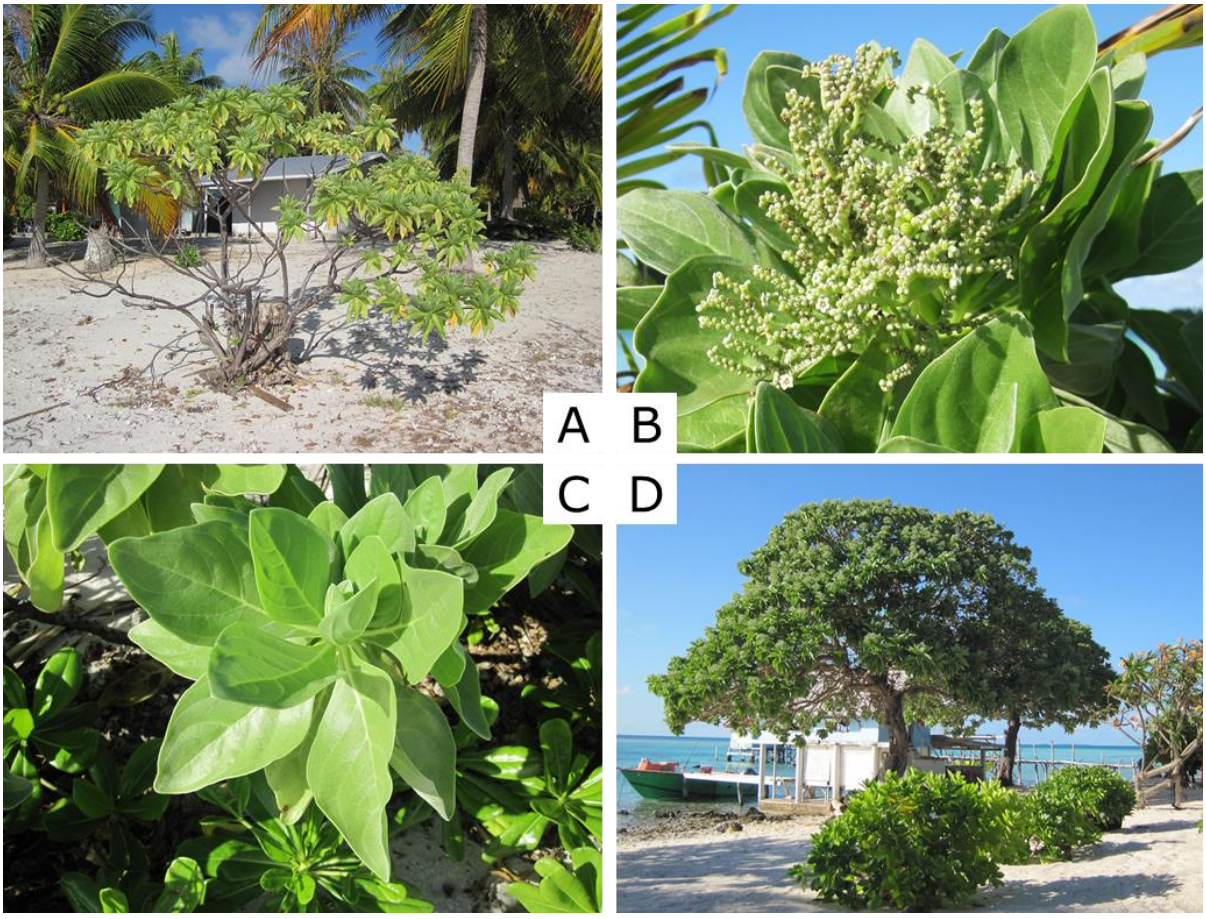


Figure 16: Illustration de (A) la forme arbustive, (D) la forme arborée, (B) l'inflorescence et (C) les feuilles du Faux-Tabac Heliotropium foertherianum (©ILM).

C) Les différents vecteurs de la ciguatéra

(i) Poissons récifaux

Les poissons herbivores et carnivores constituent les principaux vecteurs de la ciguatéra. Selon Halstead, 1988, plus de 400 espèces de poissons lagonaires seraient susceptibles d'héberger des CTX (Juranovic & Park, 1991; Pérez-Arellano *et al.*, 2005; Mattei *et al.*, 2014). Néanmoins, il est aujourd'hui admis que les CTX sont susceptibles de contaminer l'ensemble du réseau trophique piscicole, par bio-amplification (Kohli *et al.*, 2015a). Les poissons de récif couramment impliqués dans la ciguatéra sont les *Sphyraenidae*, *Serranidae*, *Lutjanidae*, *Labridae*, *Carangidae*, *Acanthuridae*, *Muraenidae*, et les *Scaridae* (FDA, 2011; Chinain *et al.*, 2020b; Figure 17). Les études de Diogène *et al.*, 2017 ont également permis d'inclure les requins (*Carcharhinus leucas*) comme vecteur potentiel de ciguatéra.

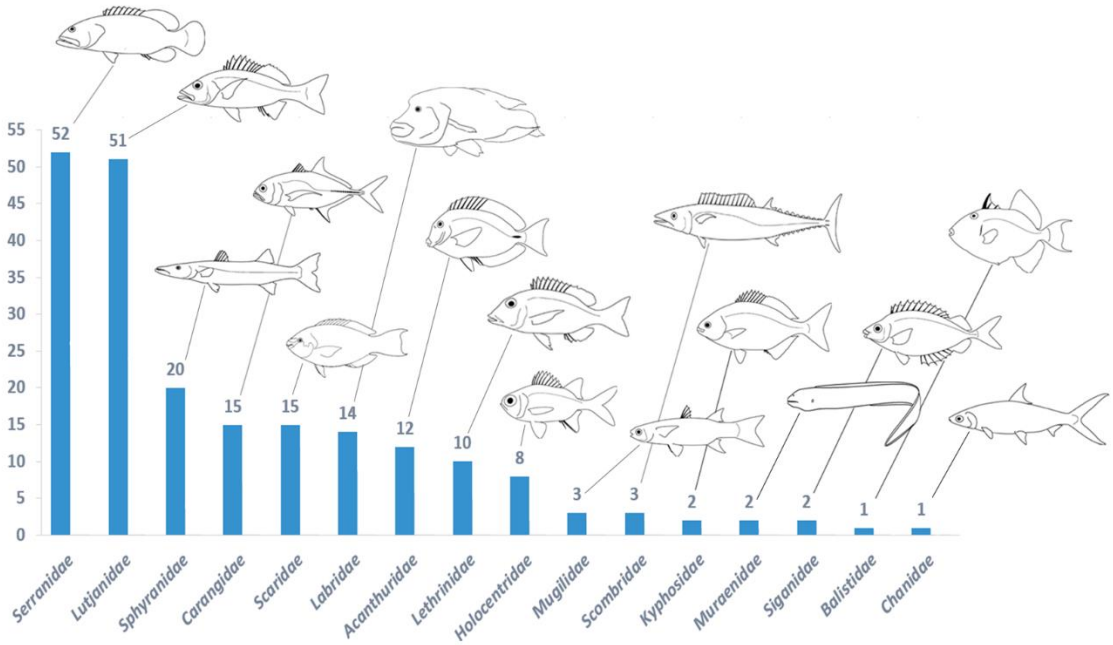


Figure 17: Familles de poissons incriminées dans des cas de ciguatéra en Polynésie française en 2019 (©ILM).

Pour prévenir le risque d'intoxication, plusieurs recommandations peuvent être suivies par les populations (Lewis, 1983; Lehane & Lewis, 2000), telles que: (i) ne consommer que des petites portions (< 50 g) de poisson lors d'un repas; (ii) éviter de consommer la tête, les œufs et les viscères qui sont généralement plus chargés en toxines; (iii) privilégier la consommation de spécimens de petite taille; (iv) éviter la consommation de certaines espèces de grands carnivores et particulièrement les murènes; (v) éviter de consommer les poissons toute espèce confondue, lorsqu'ils proviennent d'une zone réputée ciguatérique. Dans certains pays, la protection des consommateurs est même renforcée par le biais de règlementations interdisant la vente sur les marchés publics de certaines espèces en provenance de zones à risque, ou imposant des restrictions de taille ou de poids pour une sélection d'espèces (Lewis, 1983; Lehane & Lewis, 2000; Clua *et al.*, 2011; Sumner *et al.*, 2014; Chan, 2015; Sanchez-Henao *et al.*, 2019).

La relation entre la teneur en CTX et le poids ou la taille des poissons a fait l'objet de nombreuses études, et se fonde sur le postulat que les spécimens de grande taille/poids sont également ceux les plus susceptibles d'avoir bioaccumulé de fortes concentrations de CTX dans leur organisme (Lehane & Lewis, 2000). De fait, une relation positive entre la taille/poids des poissons et les niveaux de CTX a bien été démontrée chez de nombreuses espèces de carnivores (Vernoux & Lejeune, 1994; Pottier & Vernoux, 2003; Mak *et al.*, 2013; Bravo *et al.*, 2015; Loeffler *et al.*, 2018; Sanchez-Henao *et al.*, 2019). Toutefois, d'autres études ciblant plusieurs espèces d'herbivores, omnivores et carnivores ont

également conclu à l'absence de corrélation (Vernoux & Lejeune, 1994; Darius *et al.,* 2007; O'Toole *et al.,* 2012; Mak *et al.,* 2013; Gaboriau *et al.,* 2014; Kohli *et al.,* 2017b; Soliño & Costa, 2018; Sanchez-Henao *et al.,* 2020; Chinain *et al.,* 2020c). Ces résultats contradictoires suggèrent que la taille et le poids ne seraient pas de bons pédicteurs de la ciguatoxicité chez les poissons. D'autres facteurs tels que le niveau trophique, la teneur en lipides, les sites de pêche, la saison, *etc,* ont également été étudiés mais ne concernent qu'un nombre limité d'espèces voire de spécimens (Darius *et al.*, 2007, Dierking & Campora, 2009, Bravo *et al.,* 2015, Díaz-Asencio *et al.,* 2019a, Sanchez-Henao *et al.,* 2019, 2020, Montojo *et al.,* 2020). Un autre critère en cours d'évaluation est celui de l'âge des poissons qu'il est possible d'estimer via l'analyse de leurs otolithes (Darius *et al.*, 2021). Toutefois, il est vraisemblable que la concentration en CTX chez les poissons soit également placée sous la dépendance d'autres facteurs, *e.g.* les apports et préférences alimentaires du poisson, sa vitesse de croissance, les processus métaboliques de bioamplification et d'excrétion des CTX, très variables d'une espèce à l'autre (*cf.* pp 35-37). Enfin, la ciguatoxicité d'un poisson semble aussi espèce et site dépendant, ce qui souligne la nécessité d'adapter les programmes de surveillance du risque ciguatérique à l'échelle d'une région, voire d'une île (FAO, 2020).

(ii) Invertébrés

Bien que les poissons des récifs coralliens soient considérés comme les principaux vecteurs de la ciguatéra, d'autres types de vecteurs ne doivent pas être négligés. C'est le cas de plusieurs espèces d'invertébrés marins, comme les bénitiers (*e.g. Tridacna maxima*) (Laurent *et al.*, 2012; Roué *et al.*, 2016, 2018b), les crustacés (Lewis *et al.*, 1994), les gastéropodes (*i.e. Tectus niloticus)* (Kanno *et al.*, 1976; Gatti *et al.*, 2015; Lonati *et al.*, 2015; Darius *et al.*, 2018a) et les échinodermes *(e.g. Tripneustes gratilla)* (Silva *et al.*, 2015; Darius *et al.*, 2018b) qui sont également susceptibles de véhiculer les CTX le long de la chaîne alimentaire.

Dès les années 1960, les bénitiers étaient déjà connus pour être impliqués dans des cas de ciguatéra (Bagnis, 1967). Laurent *et al.,* 2008 ont également rapporté de nombreux cas de syndrome atypique de ciguatéra dus à la consommation de bénitiers. Plus récemment, Roué *et al.,* 2016 ont montré la capacité des bénitiers à bioaccumuler les CTX dans leurs tissus (*cf.* section II p 34), confirmant le risque sanitaire potentiel associé à la consommation de ces mollusques dans les zones fortement infestées par des populations toxiques de *Gambierdiscus* et *Fukuyoa*. Chinain *et al.*, 2010b ainsi que Rongo & van Woesik, 2011 ont également signalé des cas d'intoxication dus à la consommation de bénitiers sur les îles de Raivavae (Polynésie française) et Rarotonga (îles Cook).

Les oursins et les trocas sont également impliqués de manière épisodique dans des intoxications humaines en Polynésie française (Pawlowiez *et al.,* 2013; Gatti *et al.*, 2018), la présence de plusieurs analogues de CTX dans leurs tissus ayant été formellement confirmée (Darius *et al.*, 2018a). En République de Kiribati, les pieuvres et les langoustes sont également considérées comme des vecteurs potentiels de la ciguatéra (Mak *et al.,* 2013).

D) Epidémiologie de la Ciguatéra

Traditionnellement, la ciguatéra est connue pour être endémique dans plusieurs régions tropicales et subtropicales: (i) la région Pacifique (Chinain *et al.*, 2010a; Rhodes *et al.*, 2017a; Bagnis *et al.*, 1979); (ii) la région des Caraïbes (Tester *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 1982; Lawrence *et al.*, 1980; Parsons *et al.*, 2020); et (iii) l'Océan Indien (Quod *et al.*, 1990; Thomassin *et al.*, 1992; Quod & Turquet, 1996). Toutefois, depuis le début des années 2000s, on assiste à une expansion géographique de la ciguatéra à des régions jusque-là indemnes (*cf.* section V p 65). L'exemple le plus frappant est sans aucun doute celui de la Macaronésie (Îles Canaries, Madères), région où la détection concomitante de populations naturelles de *Gambierdiscus* spp. et le signalement des premiers cas endogènes d'intoxication sont documentés depuis 2004 (Pérez-Arellano *et al.*, 2005; Aligizaki & Nikolaidis, 2008; Boada *et al.*, 2010; Fraga *et al.*, 2011; Nuñez *et al.*, 2012; Fraga & Rodriguez, 2014). Cette extension des aires de distribution de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* spp. pourrait être en partie

liée aux effets du changement climatique (voir Chinain *et al.*, 2020a pour revues et références associées) (*cf.* section V p 65).

Outre ces cas endogènes (*i.e.* épisodes toxiques impliquant des poissons pêchés localement), de nombreux cas importés de ciguatéra sont déplorés chaque année dans plusieurs régions du monde, en raison de l'engouement croissant des populations pour les poissons exotiques importés de zones tropicales (voir Chinain *et al.*, 2020b pour une revue et références associées). Plusieurs incidents toxiques ont ainsi été signalés (i) au Canada et aux États-Unis (Graber *et al.*, 2013); (ii) en Allemagne et Europe (Schlaich *et al.*, 2012; Mattei *et al.*, 2014); et (iii) en Asie (Lee *et al.,* 2019). La gestion de ces épidémies sporadiques est par ailleurs considérablement compliquée par l'absence de traçabilité des filières alimentant les circuits de distribution (Farrell *et al.*, 2017). Enfin, l'accroissement des activités touristiques vers les destinations situées dans les zones de grande endémie de cette pathologie contribue aussi fortement à l'augmentation du nombre de cas importés dans les régions tempérées du globe (voir Chinain *et al.*, 2020b pour une revue et références associées).

En dépit d'un fort taux de sous-déclaration qui peut représenter plus de 50 % des cas selon les régions (Begier *et al.,* 2006; Tester *et al.,* 2010; Skinner *et al.,* 2011; Chinain *et al.*, 2020a), les chiffres de la ciguatéra s'avèrent particulièrement alarmants dans de nombreux pays et territoires insulaires du Pacifique (Skinner *et al.,* 2011). Selon Nau, 2007 le coût annuel des HAB à l'échelle mondiale serait compris entre 1 700 000 $US et 185 500 000 $US. L'évaluation précise de l'impact socio-économique de la ciguatéra sur les communautés côtières des régions tropicales et subtropicales du globe s'avère délicate (Glaziou & Legrand, 1994; Nau, 2007; Chinain *et al.*, 2020a). Dans le Pacifique, deux études menées à Rarotonga (îles Cook) de 1989 à 2011, et à Moorea (Polynésie française) de 2007 à 2013, se sont par exemple intéressées au coût des frais médicaux *stricto sensu* liés à la ciguatéra, *i.e.* ceux résultant de la prise en charge des patients (Rongo & van Woesik, 2012; Morin *et al.,* 2016), et ont conclu à un coût qui s'élève respectivement à 300 542 $US et 241 847 $US. Toutefois, ce calcul n'intègre pas la baisse de revenus liée par exemple à la perte de confiance des consommateurs vis à vis des produits lagonaires qui représentent non seulement une ressource alimentaire à haute valeur nutritionnelle, mais également la principale source de protéines des populations locales (Dalzell & Adam, 1996; Bell *et al.*, 2009; Kronen *et al.*, 2012). Ceci nous rappelle que les conséquences des flambées toxiques se doivent d'être appréhendées d'un point de vue sociologique et ethnologique, et non pas exclusivement de celui de la santé publique. Ainsi, une enquête menée auprès des communautés de Rarotonga a montré que les flambées de ciguatéra à répétition survenues de 1989 à 2011 se sont accompagnées d'une perte dans la transmission des connaissances traditionnelles sur les pratiques de pêche au sein des communautés locales (Rongo & van Woesik, 2012).

De même, la méfiance des populations vis-à-vis des filières lagonaires peut, dans certains cas, entraîner une modification progressive des habitudes alimentaires des habitants, avec une dépendance de plus en plus prononcée vis à vis des produits importés et/ou aliments en conserve, certes plus abordables d'un point de vue économique mais de moindre valeur nutritionnelle (Lewis & Ruff, 1993; Rongo & Van Woesik, 2011; Friedman *et al.,* 2017). Aux îles Cook, on a pu noter par exemple que la consommation de poisson frais avait diminué de 50 % entre 1989 et 2006 suite à la survenue de nombreuses flambées de ciguatéra, tandis que la part des protéines à base de viandes importées dans l'alimentation avait augmenté (Rongo & van Woesik, 2011). Selon ces mêmes auteurs, ceci s'est traduit par des pertes économiques élevées liées à la pêche et au coût d'importation des produits étrangers avoisinant les 1 000 000 $ NZD par an.

En tout état de cause, ces phénomènes de transition alimentaire forcée sont susceptibles de conduire, à terme, à l'apparition de problèmes de santé tels que le diabète, l'obésité et autres maladies cardiovasculaires (Dewailly *et al.,* 2008).

E) La Ciguatéra en Polynésie française

En Polynésie française, la ciguatéra représente la cause majeure, voire exclusive (selon les archipels) des intoxications par consommation des produits de la mer (Gatti *et al.*, 2008). Avec 118 îles réparties entre cinq archipels (Société, Tuamotu, Gambier, Australes et Marquises) sur une surface totale aussi vaste que l'Europe occidentale, la Polynésie française figure depuis trois décennies dans le top trois des pays du Pacifique les plus touchés par la Ciguatéra (Skinner *et al.*, 2011).

(i) Le poids des habitudes culturelles, du mode de vie et les impacts socio-économiques

Certaines îles en Polynésie française telles que Mangareva, Fakarava, Nuku Hiva ou Rapa, font figure de hotspots vis à vis du risque ciguatérique. L'éloignement géographique de ces îles (plusieurs heures de vol sont nécessaires pour rejoindre Tahiti), la forte dépendance des populations concernées vis-à-vis des ressources lagonaires et halieutiques, ainsi que l'absence de structures hospitalières conséquentes (hôpitaux périphériques, dispensaires, centres médicaux, infirmeries, médecins privés) contribuent à accentuer ce risque et l'exposition des populations à des poissons/invertébrés potentiellement contaminés.

La Polynésie française est l'un des rares états du Pacifique à disposer d'un programme de suivi épidémiologique de la ciguatéra opérationnel sur l'ensemble des cinq archipels polynésiens (Bagnis *et al.*, 1985a; Chateau-Degat *et al.*, 2007; www.ciguatera.pf). Mené en collaboration avec le personnel de santé publique des 61 structures sanitaires de la Direction de la Santé réparties sur l'ensemble du territoire, ce suivi vise à préciser l'origine des différentes formes d'intoxications par biotoxines marines, et à surveiller l'évolution du taux d'incidence annuel de ces intoxications par île/archipel. Ce programme consiste à associer à chaque patient déclaré une fiche clinique standardisée renseignée par le personnel de santé publique de la structure concernée, et indiquant notamment l'île de résidence, le type de symptômes développés, le site de pêche et le produit marin impliqué (espèce, partie consommée) (Chateau-Degat *et al.*, 2007).

Sur la base des données collectées en 2018, environ 52 % des patients atteints de ciguatéra déclarent avoir déjà expérimenté au moins une fois dans leur vie une précédente intoxication à la ciguatéra (parfois plus de 10 à 20 fois chez certains patients). Ce phénomène est particulièrement visible dans les îles les plus reculées de la Polynésie française, où la disponibilité et la diversité alimentaires sont plus limitées qu'à Tahiti. Au sein des communautés de certains atolls des Tuamotu souvent confrontés à un approvisionnement alimentaire limité et un taux de chômage élevé, la population n'a pas d'autre choix que de manger le produit de sa pêche quotidienne, même si elle est consciente d'un danger potentiel et du risque d'être intoxiquée.

L'éloignement de certaines îles combiné à la forte hétérogénéité de densité de population entre les archipels (75 % de la population sont concentrés sur les îles de la Société) explique le risque ciguatérique très contrasté qui est observé d'une île et/ou d'un archipel à l'autre (Figure 18A). En 2020 par exemple, c'est à Ua Huka que le plus grand nombre d'évènements toxiques a été recensé (taux d'incidence de 207,7 cas pour 10 000 habitants). En revanche l'analyse des données recueillies ces 10 dernières années indique que le taux d'incidence le plus élevé concerne l'archipel des Gambier (Figure 18B). En effet, depuis 2007, le taux d'incidence moyen sur cet archipel apparait deux à trois fois supérieur à celui observé aux Marquises, Australes et Tuamotu (entre 200 et 250 cas pour 10 000 habitants en moyenne *vs.* 80 à 100 cas pour les autres archipels sur la période 2011-2020). A l'inverse, du fait de sa forte population (environ 240 000 habitants), l'archipel de la Société présente un taux d'incidence très faible. Cette situation s'explique notamment par l'offre alimentaire à la fois plus importante et diversifiée dans cet archipel qui permet à ses habitants d'être moins dépendants des produits de la mer et donc moins exposés au risque toxique. Cependant, il est également probable que ce faible taux d'incidence dans la Société soit entaché d'un fort taux de sous-déclaration puisqu'une grande partie des patients sont vus en consultation dans des cabinets privés ou aux urgences hospitalières, qui ne sont pas les structures les plus actives dans ce programme de déclaration des cas d'intoxication.

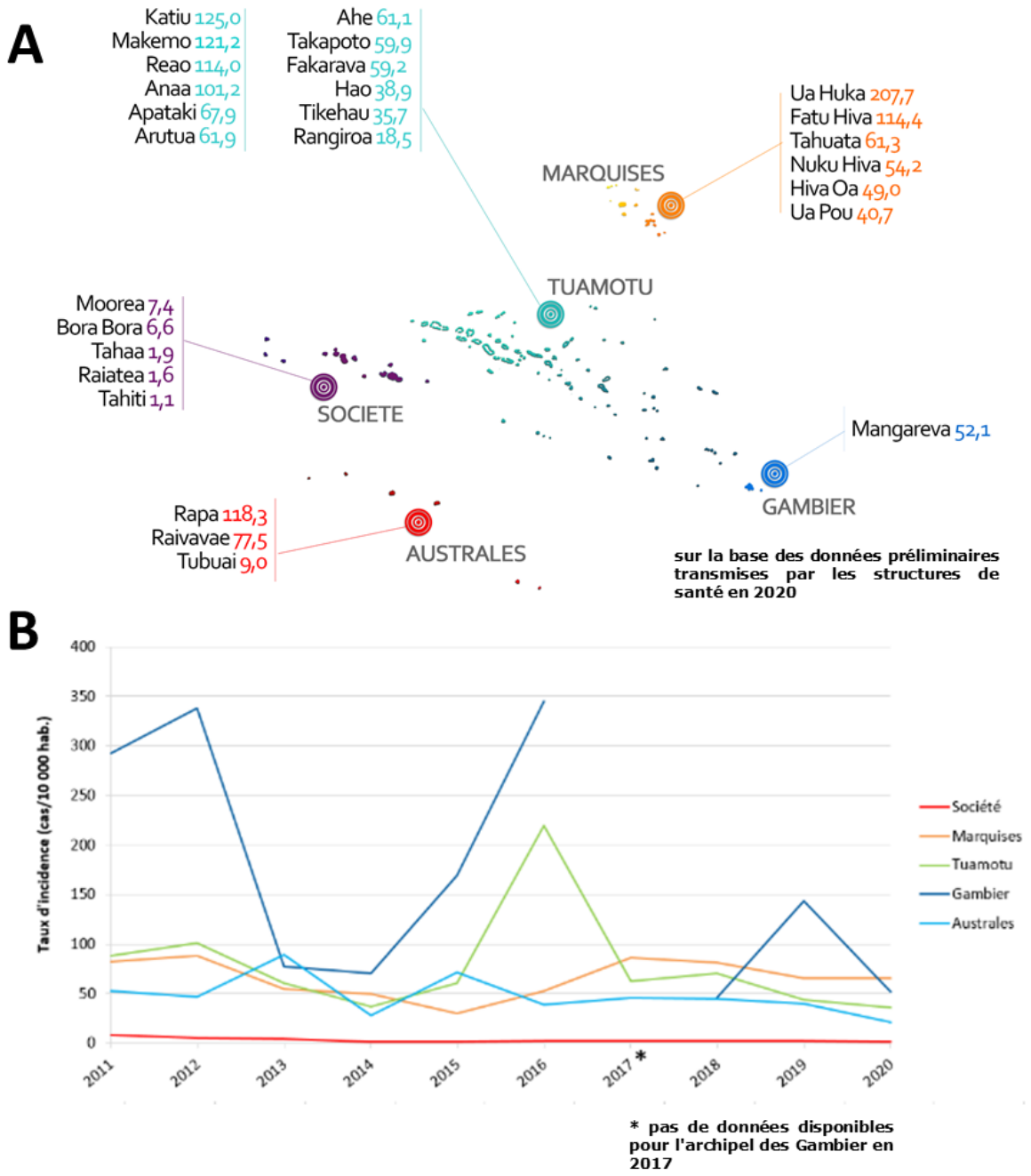


Figure 18: (A) Taux d'incidence en Polynésie française de la ciguatéra en 2020 (en nombre de cas pour 10 000 habitants) par île de provenance du poisson; (B) Evolution du taux d'incidence en Polynésie française sur la période 2011-2020 (Réseau de surveillance de la ciguatéra en Polynésie française (Institut Louis Malardé, Bureau de Veille Sanitaire ©ILM).

(ii) Lutte contre la ciguatéra en Polynésie française: importance d'une approche intégrée

En matière de lutte contre la ciguatéra, la Polynésie française privilégie une approche intégrée qui aborde le problème sous divers angles (Figure 19):

- **Épidémiologique**: grâce au suivi des cas d'intoxication et des taux d'incidence sur l'ensemble des cinq archipels, afin d'anticiper l'émergence potentielle de nouveaux hotspots de la ciguatéra en Polynésie française, et le développement d'outils numériques pour faciliter la déclaration et le suivi des intoxications.

- **Biologique**: via la caractérisation des assemblages à *Gambierdiscus* spécifiques à chaque archipel/île de Polynésie française, et des études au laboratoire sur le potentiel toxique réel de ces espèces en conditions de culture.
- **Environnemental**: via la caractérisation de la diversité des vecteurs d'intoxication dans les lagons polynésiens, et l'évaluation de la contribution d'autres taxons algaux et toxines associées aux épisodes toxiques signalés en Polynésie française.
- **Médical**: via l'étude des formes chroniques d'intoxication et l'évaluation de l'efficacité des remèdes traditionnels dans le traitement de la ciguatéra.

En parallèle de ces travaux de recherche, le laboratoire de l'ILM mandaté par le pays (Laboratoire de recherche sur les Biotoxines Marines, LBM) assure également (i) une veille technologique grâce au développement/validation d'un large panel d'outils de détection des algues toxiques et des toxines associées, à la fois sur le terrain et au laboratoire (Chinain *et al.*, 2016); et (ii) des actions d'information, d'éducation et de sensibilisation auprès des populations locales et des professionnels de santé, qui ont largement fait la preuve de leur efficacité puisqu'elles ont permis une baisse significative des taux d'indicence, dans des îles comme Raivavae et Rapa dans l'archipel des Australes (Chinain *et al.*, 2010b; Chinain *et al.*, 2020c).

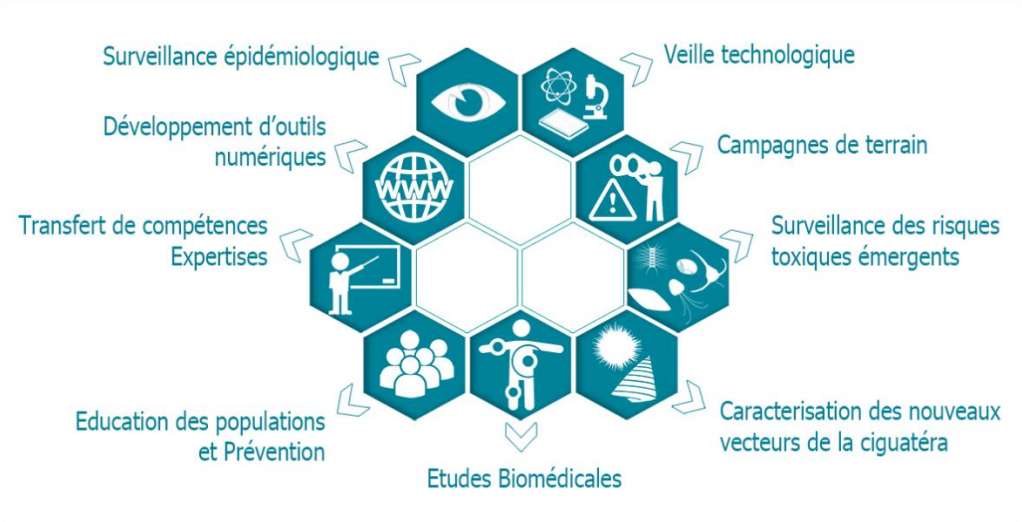


Figure 19: Schéma de l'approche intégrée abordée par le LBM dans la gestion du risque ciguatérique en Polynésie française (©ILM).

La présente thèse s'inscrit dans la continuité de cette approche intégrée qui vise à renforcer la gestion du risque ciguatérique en Polynésie française, notamment par la consolidation des connaissances sur les facteurs environnementaux susceptibles de modifier la croissance et/ou la toxicité chez la micro-algue *Gambierdiscus*. De même, les travaux portant sur la comparaison des performances des différentes méthodes analytiques classiquement utilisées pour la détection des CTX, contribuent directement à la veille technologique instaurée au sein du LBM.

A ce jour, très peu de pays disposent d'un réseau de surveillance renforcé de la ciguatéra (voir Chinain *et al.*, 2020a pour revue et références). Dans les Caraïbes, la surveillance de la ciguatéra est assurée par la Caribbean Public Health Agency (CARPHA) tandis qu'aux Antilles françaises, la surveillance est confiée à l'Agence Régionale de Santé (ARS). Dans le Pacifique, le SPEHIS (South Pacific Epidemiological and Health Information Service) référençait jusqu'au début des années 2000 les épisodes de CP à l'échelle de toute la région Sud-Pacifique mais suite à la défection progressive de nombreux pays initialement intéressés par ce programme de suivi (Goater *et al.*, 2011), seul un nombre limité de pays tels que la Polynésie française, l'Australie et Hawaï ont repris le flambeau via la mise en place de réseaux de surveillance à l'échelle locale (Chinain *et al.*, 2020a).

En Asie, à l'exception de Hong-Kong, du Japon et des Philippines (Chan, 2015) où ce suivi est assuré par des structures sanitaires dûment identifiées et mandatées, partout ailleurs, les signalements d'épisodes toxiques sont souvent le fait d'agences de santé et/ou des médias locaux, mais l'information reste globalement très parcellaire, sans mise à jour régulière (les données actuellement disponibles sont généralement antérieures à 2008) (Chinain *et al.*, 2020a).

Face à l'expansion mondiale du phénomène ciguatéra, une mobilisation forte de la communauté scientifique à l'échelle régionale et internationale a récemment émergé afin d'intensifier la surveillance épidémiologique de cette pathologie, et renforcer la gestion du risque ciguatérique à l'échelle du globe. Citons pour exemple la Global Ciguatera Strategy[1], une initiative inter-agences soutenue à la fois par l'IOC-UNESCO (Commission Océanographique Intergouvernementale), la FAO (Food and Agriculture Organization), l'OMS (Organisation mondiale de la Santé) et l'IAEA (Agence Internationale de l'Energie Atomique). Son plan d'action se compose de trois axes principaux visant à (i) améliorer la détection de *Gambierdiscus* et les stratégies d'échantillonnage; (ii) améliorer la détection des toxines en cause; (iii) améliorer la collecte des données épidémiologiques, la déclaration des cas et l'évaluation du risque ciguatérique. A l'échelle communautaire, le projet EuroCigua qui rassemble 24 partenaires de recherche, est un programme européen ayant pour objectif de mieux caractériser le risque sanitaire lié à la ciguatéra dans les pays de l'Union Européenne avec un centrage marqué sur les localités de Macaronésie[2]. La base de données Harmful Algae Event database (HAEDAT) de l'IOC-UNESCO, quant à elle, fournit une cartographie mondiale (actualisée quasiment en temps réel) de tous les évènements en lien avec les proliférations d'algues nuisibles, dont la Ciguatéra[3].

III - Les toxines impliquées dans le syndrome ciguatérique

Cette section présentera tour à tour les différentes familles de métabolites secondaires (ainsi que leurs modes d'action) connus chez *Gambierdiscus* spp., à savoir les CTX, les MTX, les acides gambiériques, le gambierol, le gambieroxide et les gambierones. Alors que le rôle des CTX dans l'intoxication ciguatérique est désormais clairement établi, la contribution des autres familles toxiniques, dont les MTX, reste encore à être démontrée. Des activités de type MTX et des composés à même activité biologique que les CTX (composés « CTX-like ») ont été détectés chez *F. paulensis* (Rhodes *et al.*, 2014; Laza-Martínez *et al.*, 2016) et *F. ruetzleri* (Roeder *et al.*, 2010; Holland *et al.*, 2013) tandis qu'une activité de type MTX a été rapportée chez *F. yasumotoi* (Holmes, 1998). Si la présence de CTX chez *Fukuyoa* venait à être confirmée, cela suggèrerait que les gènes associés à la production de ces familles de composés chez *Gambierdiscus* et *Fukuyoa* sont apparus avant la divergence entre ces deux genres (Leung *et al.*, 2018).

A) Les ciguatoxines et leur mode d'action

Les CTX sont des molécules liposolubles, thermorésistantes (Lewis *et al.*, 1991; Lewis & Holmes, 1993; Abraham *et al.*, 2012) qui se composent de 13 ou 14 cycles carbonés (Abraham *et al.*, 2012). Les CTX sont classées en trois familles selon leur origine géographique: les ciguatoxines du Pacifique (P-CTX), celles de la région Caraïbes (C-CTX) et celles de l'Océan Indien (I-CTX) (Caillaud *et al.*, 2010). Plusieurs analogues de P-CTX ont été identifiés chez *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* ainsi que dans les autres maillons de la chaine trophique de la ciguatéra. Par contre, aucune des C-CTX ou I-CTX identifiées respectivement dans les poissons des Caraïbes et de l'Océan Indien n'a encore été formellement mise en évidence dans les cultures de ces dinoflagellés, ce qui pose la question de savoir s'il s'agit d'analogues issus de la métabolisation de CTX algales ou encore d'artefacts d'analyse (pour certains d'entre eux).

1: https://www.iode.org/index.php?option=com_oe&task=viewDocumentRecord&docID=15111
2: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/ciguatéra/seccion/the_project.htm
3: http://haedat.iode.org/

(i) Les ciguatoxines du Pacifique (P-CTX)

Les P-CTX sont divisés en deux grands groupes:

- **les analogues de type CTX1B**: constitués de six carbones dans le cycle carboné « E », ces composés ont également une chaîne de quatre carbones sur le cycle « A » (Figure 20). La molécule de référence, la CTX1B (Scheuer *et al.,* 1967), a été identifiée comme l'un des composés majoritairement présents dans le profil toxinique des poissons carnivores du Pacifique (Murata *et al.,* 1990; Lewis *et al.,* 1991; Legrand *et al.,* 1992; Lewis & Sellin, 1993; Yogi *et al.*, 2011, 2014). Son élucidation structurale a été réalisée par Murata *et al.,* 1989, 1990 par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). La **CTX4A** est un autre des analogues appartenant à ce groupe (Chungue *et al.,* 1977; Joh & Scheuer, 1986; Satake *et al.*, 1997). Il a été isolé par Satake *et al.*, 1997 à la fois à partir des cellules de *G. toxicus* et du poisson perroquet *Scarus gibbus*, ce qui constitue la toute première démonstration du phénomène de transfert des CTX algales vers l'étage trophique des herbivores. A noter le cas intéressant des M-*seco*-methyl acetals isolées par Yogi *et al.*, 2011 à partir de cultures de *Gambierdiscus,* mais dont les auteurs pensent que ces composés seraient, en fait, des artefacts d'analyse suite à l'utilisation de méthanol comme solvant de stockage et d'extraction.
- **les analogues de type CTX3C** qui comptent sept carbones dans le cycle « E » (Figure 20). La molécule de référence, la **CTX3C**, a été décrite par Satake *et al.*, 1993b à partir de *G. toxicus* (souche RGI-1, Rangiroa, Tuamotu). Elle a également été identifiée chez la murène par ces mêmes auteurs, confirmant de ce fait le transfert des CTX algales vers l'étage trophique des carnivores.

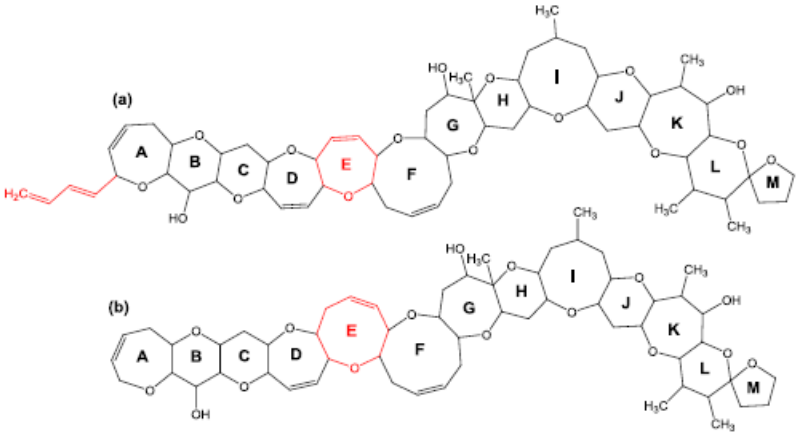


Figure 20 (tirée de Pisapia, 2017): Différences structurelles entre (a) la CTX1B et (b) la CTX3C.

Le Tableau 4 illustre la diversité des analogues de P-CTX identifiés dans ces deux groupes jusqu'à présent.

À ce jour, 11 P-CTX ont été identifiées à partir de deux espèces de *Gambierdiscus*, à savoir *G. polynesiensis* (souches TB92 et RG92 de Polynésie française, CAWD212 des îles Cook), ainsi que certaines souches de *G. toxicus* (souches GII-1 et RGI-1 de Polynésie française mais il est vraisemblable que ces souches identifiées avant les années 2000 appartiennent en réalité à l'espèce *G. polynesiensis*) (Murata *et al.,* 1990; Legrand *et al.,* 1992; Satake *et al.*, 1993b, 1997; Yasumoto *et al.*, 2000; Chinain *et al.*, 2010a; Yogi *et al.*, 2011; Rhodes *et al.,* 2014b; Roué *et al.,* 2016; Smith *et al.,* 2016; Munday *et al.*, 2017; Murray *et al.*, 2018; Roué *et al.*, 2018b; Sibat *et al.*, 2018).

Tableau 4: Liste des différents congénères de P-CTX identifiés à ce jour, leur poids moléculaire et la matrice biologique à partir de laquelle ils ont été identifiés.

	Nom	Poids moléculaire (Da)	Matrice biologique			Références
Analogues de type CTX1B	CTX4A	1 060,6	*Gambierdiscus*	Poisson	Invertébrés	Lewis *et al.*, 1993b, Satake *et al.*, 1997; Yasumoto *et al.*, 2000; Darius *et al.*, 2018a,b
	CTX4B	1 060,6	*Gambierdiscus*	Poisson	Invertébrés	Murata *et al.*, 1989, 1990; Yasumoto *et al.*, 2000; Darius *et al.*, 2018a,b
	52-*epi*-54-deoxyCTX1B	1 094,6	*Gambierdiscus*	Poisson		Lewis *et al.*, 1991, 1993a; Yasumoto *et al.*, 2000, 2001; Mak *et al.*, 2013
	54-deoxyCTX1B	1 094,6	*Gambierdiscus*	Poisson		Lewis *et al.*, 1991, 1993a; Yasumoto *et al.*, 2001; Mak *et al.*, 2013
	M-*seco*-CTX4A/B	1 078,6	*Gambierdiscus*	Poisson		Yasumoto *et al.*, 2000, 2001
	CTX1B	1 110,6		Poisson	Invertébrés	Murata *et al.*, 1989, 1990; Mak *et al.*, 2013
	CTX1A	1 110,6		Poisson		Yasumoto *et al.*, 2000, 2001
	7-oxoCTX1B	1 126,6		Poisson		Yasumoto *et al.*, 2000, 2001
	7-hydroxyCTX1B	1 128,6		Poisson		Yasumoto *et al.*, 2000, 2001
	4-hydroxy-7-oxoCTX1B	1 144,6		Poisson		Yasumoto *et al.*, 2000, 2001
	54-deoxy-50-hydroxyCTX1B	1 110,6		Poisson		Yasumoto *et al.*, 2000, 2001
	54-*epi*CTX1B	1 110,6		Inconnue		Yasumoto *et al.*, 2001
	52,54-*epi*CTX1B	1 110,6		Inconnue		Yasumoto *et al.*, 2001
Analogues de type CTX3C	CTX3C	1 022,6	*Gambierdiscus*	Poisson	Invertébrés	Satake *et al.*, 1993b; Yasumoto *et al.*, 2000; Darius *et al.*, 2018a,b
	CTX3B	1 022,6	*Gambierdiscus*	Poisson	Invertébrés	Yasumoto *et al.*, 2000, 2001; Roué *et al.*, 2016; Darius *et al.*, 2018a,b
	51-hydroxyCTX3C	1 038,6	*Gambierdiscus*	Poisson	Invertébrés	Satake *et al.*, 1998; Yasumoto *et al.*, 2000; Darius *et al.*, 2018a,b
	M-*seco*-CTX3C	1 040,6	*Gambierdiscus*	Poisson		Yasumoto *et al.*, 2000, 2001
	2,3-dihydro-2-hydroxyCTX3C	1 040,6	*Gambierdiscus*	Poisson		Yasumoto *et al.*, 2000, 2001
	2,3-dihydro-2,3-dihydroxyCTX3C	1 056,6		Poisson		Satake *et al.*, 1998; Yasumoto *et al.*, 2000
	2,3-dihydro-51-hydroxy-2-oxoCTX3C	1 054,6		Poisson		Yasumoto *et al.*, 2000, 2001
	2,3-dihydro-2,3,51-trihydroxyCTX3C	1 072,6		Poisson		Yasumoto *et al.*, 2000, 2001
	A-*seco*-2,3-dihydro-51-hydroxyCTX3C	1 058,6		Poisson		Yasumoto *et al.*, 2000, 2001
	M-*seco*-CTX3C methylacetal	1 054,9	*Gambierdiscus*			Yasumoto *et al.*, 2000, 2001
	M-*seco*-2,3-dihydro-2-hydroxy-49-O-methylCTX3C	1 072,6		Inconnue		Yasumoto *et al.*, 2001

De plus, des traces de 54-deoxy-CTX1B auraient été détectées dans une souche de *F. paulensis* (Laza-Martínez *et al.*, 2016) bien que les données obtenues par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS en anglais) restent discutables. La présence de CTX a également été suspectée chez certaines autres espèces de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* , mais leur identité n'a pas été formellement confirmée en l'absence de l'utilisation de standards lors des analyses LC-MS/MS (Roeder *et al.*, 2010; Caillaud *et al.*, 2011; Paz *et al.*, 2011).

A noter que Lewis & Holmes, 1993, puis Yasumoto, 2001 , ont proposé un schéma de transformation (par oxydation) des P-CTX. La métabolisation successive des analogues algaux (*e.g.* CTX4A, CTX3C) en composés plus polaires se ferait par oxydation enzymatique dans le foie des poissons (*cf.* section II p 34). Ainsi, neuf P-CTX ont été identifiées exclusivement chez les poissons (*cf.* Tableau 4 p 51) et dix ont été retrouvées à la fois chez *Gambierdiscus* et chez les poissons. A noter qu'aucune P-CTX connue à ce jour n'est exclusive aux invertébrés.

(ii) Les ciguatoxines des Caraïbes (C-CTX)

A ce jour, quatre C-CTX ont été structurellement caractérisées à partir de matrices pisciaires (Figure 21): (i) la C-CTX-1 (Vernoux & Lewis, 1997; Lewis *et al.*, 1998); (ii) la C-CTX-2 (Lewis *et al.*, 1998); (iii) la C-CTX-3 et (iv) la C-CTX-4 (Kryuchkov *et al.*, 2020). En outre, huit autres analogues ont également été détectés mais pas encore caractérisés à ce jour (Vernoux & Lewis, 1997; Pottier *et al.*, 2002a,b; Abraham *et al.*, 2012; Estevez *et al.*, 2019a). Même si les C-CTX-1 et -2 ont été initialement identifiées dans des poissons des Caraïbes, les études récentes suggèrent que ces toxines sont également présentes dans des poissons des îles Canaries (Sanchez-Henao *et al.*, 2020) et des Iles Sauvages entre les îles des archipels de Madère et des Canaries (Estevez *et al.*, 2020a). Comme certains de ces poissons ne sont pas migrateurs, par exemple les murènes (Sanchez-Henao *et al.*, 2020), il est fort probable que la contamination des carnivores dans ces zones ait une origine micro-algale répartie sur cette zone de l'Atlantique Nord-Est. Ceci suggère une certaine homogénéité de l'Océan Atlantique, ce qui est cohérent avec l'observation de diverses espèces du genre *Gambierdiscus* réparties dans l'Océan Atlantique Nord (Rodríguez *et al.*, 2017; Litaker *et al.*, 2017; I. Bravo *et al.*, 2020) et Sud (Pisapia *et al.*, 2017a).

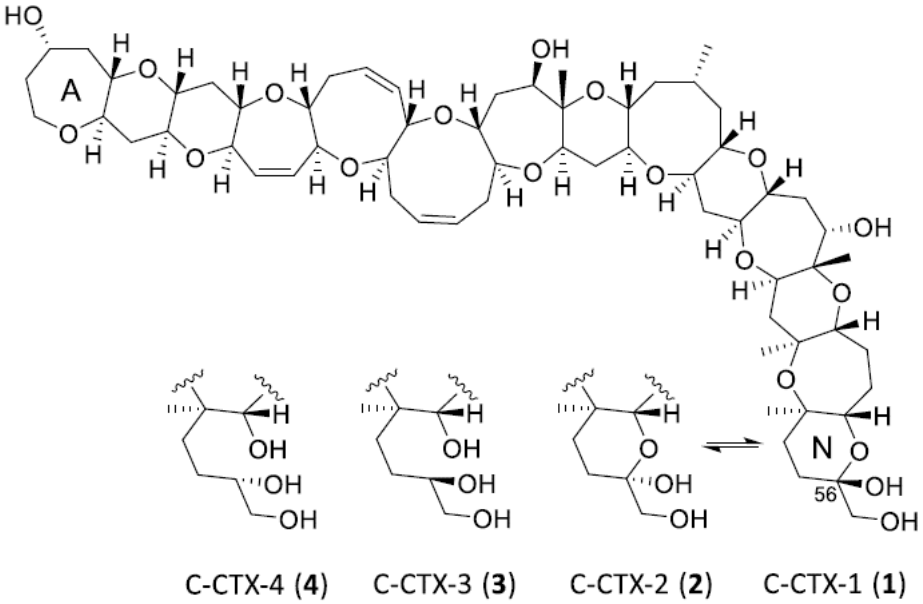


Figure 21 (tirée de Kryuchkov et al., 2020): Structures identifiées à ce jour des congénères de C-CTX.

(iii) Les ciguatoxines de l'Océan Indien (I-CTX)

A l'instar des C-CTX, les I-CTX ont été détectées uniquement chez des poissons et requins (Hamilton *et al.*, 2002; Vernoux *et al.*, 2014; Rabenjarison *et al.*, 2016; Diogène *et al.*, 2017). On dénombre actuellement six congénères dont les structures moléculaires n'ont pas encore été déterminées.

(iv) Modes d'actions des CTX

Au niveau cellulaire, les CTX agissent en activant les canaux sodium dépendant du potentiel (CSDP; Yamaoka *et al.*, 2004, 2011; Figure 22). La fixation des CTX sur le site cinq des sous-unités α de ces récepteurs (Catterall *et al.*, 1992) va en effet entraîner un flux constant d'ions sodium vers le milieu intracellulaire des cellules nerveuses (Shmukler & Nikishin, 2017), engendrant une dépolarisation membranaire et des potentiels d'action spontanés et répétés. Cette augmentation marquée de l'excitabilité nerveuse active à son tour une libération soutenue de neurotransmetteurs (jusqu'à épuisement) au niveau des terminaisons nerveuses, provoquant alors une modification de l'efficacité synaptique voire une déficience de la transmission de messages nerveux conduisant au panel de symptômes neurologiques observables chez les patients (Cameron & Capra, 1991).

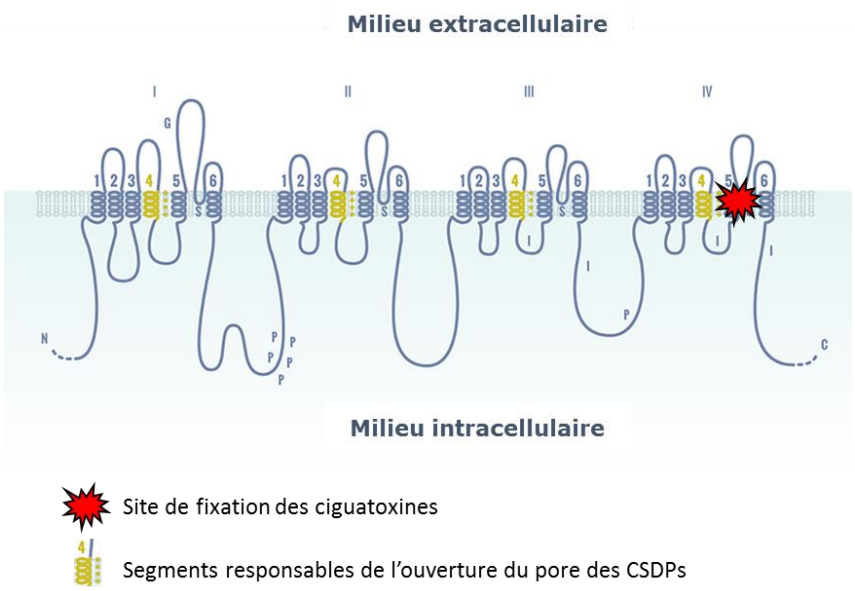


Figure 22 (d'après Kessler et al., 2014): Schéma de la structure de la sous-unité α des CSDP avec identification du site de fixation des CTX. Chaque domaine (numéroté de I à IV) est divisé en plusieurs segments transmembranaires (numérotés de 1 à 6) dont le 4^{e} est responsable de l'ouverture et fermeture des canaux.

Les CSDP et leur sous-unité α sont la cible de nombreuses toxines telles que les saxitoxines, les tétrodotoxines, les conotoxines, la batrachotoxine, les pyréthrines, la vératridine et plusieurs venins d'arachnides (Al Sabi *et al.*, 2006; Arias, 2006; voir Zhang *et al.*, 2013 pour une revue). Cependant, seules les brévétoxines produites par le dinoflagellé *Karenia brevis*, et les CTX se fixent sur le site cinq des CSDP de façon quasi irréversible (Bidard *et al.*, 1984; Lombet *et al.*, 1987; Bylund & Yamamura, 1990; Mattei *et al.*, 2011). Les CTX se fixent indifféremment sur les canaux sodium isolés de mammifères ou de poissons (Dechraoui *et al.*, 1999). Une forte charge en CTX serait donc susceptible d'entraîner des modifications morphologiques et/ou des comportements anormaux chez les poissons (Lehane & Lewis, 2000; Ledreux *et al.*, 2014; Clausing *et al.*, 2018).

Les CTX agissent aussi sur les canaux potassium dépendants du potentiel avec des affinités différentes selon les analogues de CTX considérés (Mattei *et al.*, 2014 et références). Kumar-Roiné *et al.*, 2008, et Matsui *et al.*, 2010, ont également démontré que les CTX perturbent l'expression des ARN messagers et les mécanismes de réponse immunitaire chez les mammifères. Un autre effet des CTX est la modulation de l'expression génique (Rubiolo *et al.*, 2018), consistant en une surexpression

des gènes « Arc » et « Egr » et une sous-expression des récepteurs glutamate « NMDA » et « AMPA » dans les neurones (Martín *et al.*, 2015).

B) Les Maitotoxines et leur mode d'action

Les MTX (Figure 23) comptent parmi les plus grosses et les plus puissantes toxines marines non-protéiniques actuellement décrites (Murata *et al.*, 1993) avec 32 cycles carbonés, 28 groupements -OH et 21 groupes -CH_3. Alors que la production de CTX est apparemment limitée à un petit nombre de souches ou d'espèces, les MTX semblent être produites par un plus grand nombre d'espèces de *Gambierdiscus/Fukuyoa*, parfois en quantités très abondantes (de l'ordre de la dizaine à la centaine de pg cellule^{-1}) (Rhodes *et al.*, 2014b; Munday *et al.*, 2017; Pisapia *et al.*, 2017a,b; Reverté *et al.*, 2018; Mazzola *et al.*, 2019).

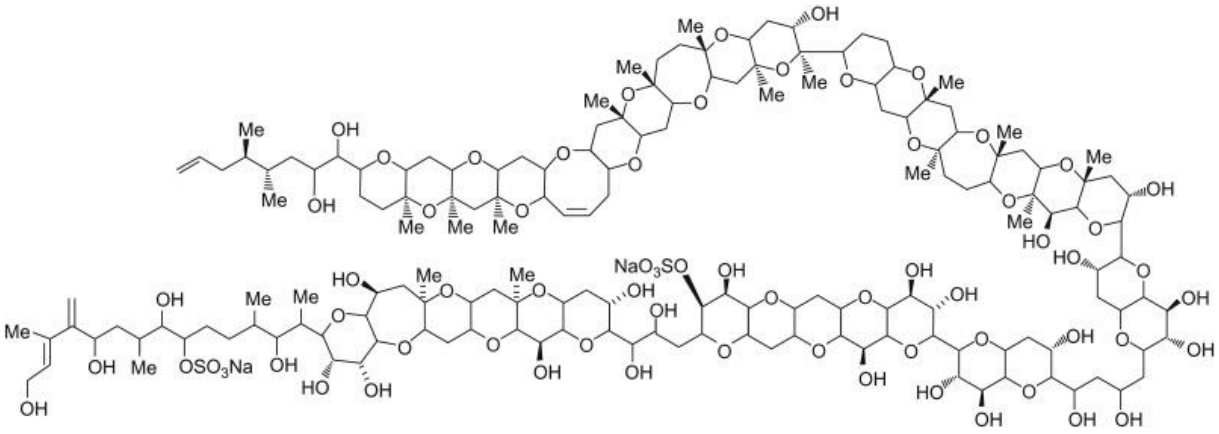


Figure 23 (tirée de Roué *et al.*, 2018a*): Illustration de la structure chimique de la MTX.*

Cinq maitotoxines sont connues à ce jour: (i) la **MTX** (Yasumoto *et al.*, 1971, 1976, 1987) dont la structure a été élucidée en 1993 (Murata *et al.*, 1993); (ii) la **MTX2** (Holmes *et al.*, 1990) dont on ne connait pas la structure mais dont la dose létale à 50 % (DL_{50}) est de 0,08 µg kg^{-1} (par injection intrapéritonéale (i.p.) sur souris) ce qui en fait l'une des toxines marines les plus puissantes (Holmes and Lewis 1994); (iii) la **MTX4** (Pisapia *et al.*, 2017b) dont la structure exacte reste à élucider (Pisapia *et al.*, 2020), et qui a été identifiée jusqu'ici uniquement dans *G. excentricus*, mais dans toutes les souches de cette espèce (Pisapia *et al.*, 2017b; Estevez *et al.*, 2020b); (iv) la **desulfo-MTX** (Mazzola *et al.*, 2019) isolée de cultures de *G. belizeanus* (souche CCMP 399) et (v) la **didehydro-demethyl-desulfo MTX** (Mazzola *et al.*, 2019) isolée de cultures de *Gambierdiscus* ribotype-2 (souche CCMP 1655). Pour ces deux derniers analogues, des études de spectrométrie de masse et RMN suggèrent fortement qu'ils soient des analogues de la MTX mais l'élucidation structurale reste incomplète pour le moment.

Les MTX activent des canaux ioniques non spécifiques possédant le récepteur TRPC1 (Transient Receptor Potential Canonical 1) (Brereton *et al.*, 2001; Meunier *et al.*, 2009; Flores *et al.*, 2017). Murata *et al.*, 2008 ont émis l'hypothèse selon laquelle un assemblage de quatre MTX ou plus pourrait créer un pore dans la membrane des cellules et permettre ainsi le passage non sélectif d'ions. Les MTX sont des activateurs des canaux calcium induisant une augmentation de calcium dans les cellules menant à une cascade de réaction en chaîne jusqu'à la mort cellulaire (Caillaud *et al.*, 2010, Mazzola *et al.*, 2019). Les effets des MTX se caractérisent par diverses actions physiologiques: (i) action sur les récepteurs sodium-hydrogène « NHE » dans les neurones (Wang *et al.*, 2009); (ii) activité hémolytique (Holland *et al.*, 2013); (iii) action sur les récepteurs sodium-calcium « NCX » chez le rat (Frew *et al.*, 2008) et (iv) action sur la pompe Ca^{2+} - ATPase «PCMA » (Takahashi *et al.*, 1982; Sinkins *et al.*, 2009; Estevez *et al.*, 2020b).

L'implication des MTX dans les épisodes de ciguatéra reste controversée car, malgré leur forte cytotoxicité et leur abondance dans les cellules de *Gambierdiscus/Fukuyoa*, leur caractère hydrosoluble

et leur grande taille ne leur permet pas de pénétrer efficacement la barrière intestinale (Kanno *et al.*, 1976). Cela explique pourquoi ces toxines sont essentiellement retrouvées dans les viscères des poissons herbivores même si une étude de Kohli *et al.*, 2014 montre la présence de MTX dans les viscères et muscles de poissons carnivores. Cette observation reste toutefois discutable car dans ce travail, des mérous ont été nourris avec des poissons herbivores ayant préalablement reçu une injection hypodermique d'un culot de *G. australes*, connu pour être un grand producteur de MTX (Reverté *et al.*, 2018; Rossignoli *et al.*, 2020), ce qui est relativement éloigné des quantités réelles de MTX retrouvées dans les herbivores et des voies de transmission qui s'appliquent en milieu naturel. Toutefois, une implication des MTX dans certaines formes de ciguatéra provoquées par la consommation de poissons herbivores ne peut pas être totalement exclue, en particulier si les viscères ou le foie sont consommés ou si des inattentions dans leur séparation permettraient la contamination de la chair de poisson avec le contenu viscéral.

C) Les acides gambiériques et leur mode d'action

Les acides gambiériques (GA) sont des composés hydrosolubles retrouvés dans les surnageants de culture (Nagai *et al.*, 1992), qui présentent des activités antifongiques (Nagai *et al.*, 1992, 1993) ainsi qu' une activité cytotoxique modérée chez la souris (Nagai *et al.*, 1992). Leur mode d'action n'est toujours pas clairement élucidé.

Quatre GA sont connus à ce jour (Figure 24): (i) l'**acide gambiérique A**, qui semble entrer en compétition avec les PbTx et les CTX pour la fixation sur le site cinq des CSDP (Inoue *et al.*, 2003). C'est un promoteur de croissance chez *Gambierdiscus* (Sakamoto *et al.*, 1996) et il a également été identifié dans les cultures de *Fukuyoa paulensis* (Laza-Martínez *et al.*, 2016); (ii) l'**acide gambiérique B** (Nagai *et al.*, 1992); (iii) l'**acide gambiérique C** qui présente une activité cytotoxique modérée chez la souris (Nagai *et al.*, 1992); et (iv) l'**acide gambiérique D**, qui a la même activité cytotoxique que l'acide gambiérique C. Diogène *et al.*, 2017 en ont retrouvé des traces dans la chair d'un requin *Carcharhinus leucas* à l'origine d'un incident toxique ciguatérique mortel à Madagascar. Les acides gambiériques C et D ont été identifiés de manière putative par spectrométrie de masse dans des cultures de six souches de *G. australes* en provenance de Menorque et Majorque en Méditerranée (Estevez *et al.*, 2020b).

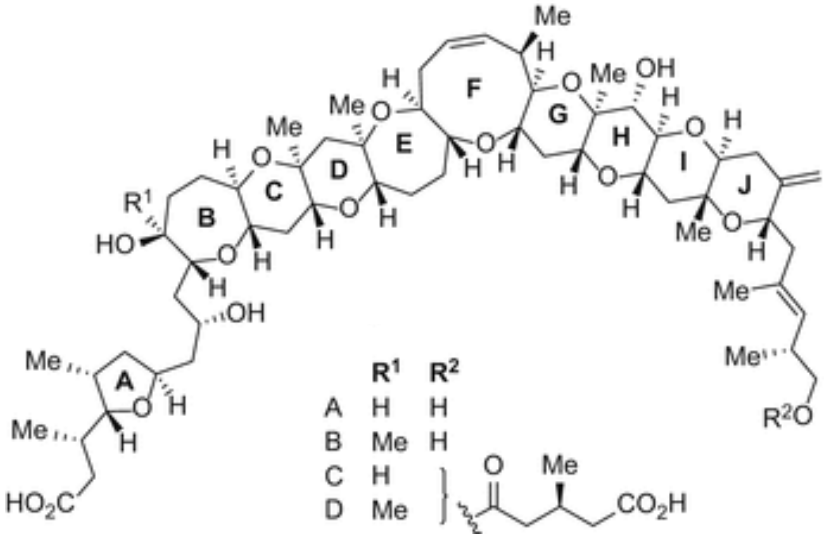


Figure 24 (tirée de Lindsay, 2016): Structure chimique des acides gambiériques A, B, C et D identifiés à ce jour.

D) Le gambiérol et son mode d'action

Ce composé (Figure 25) a été isolé et identifié en 1993 à partir de cellules de *Gambierdiscus* originaire de l'atoll de Rangiroa (Satake *et al.*, 1993a; Morohashi *et al.*, 1999).

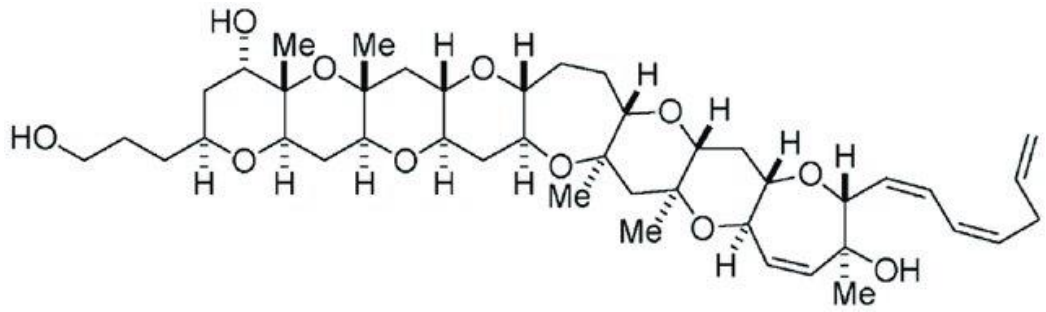


Figure 25 (tirée de Assunção *et al.*, 2017*): Illustration de la structure chimique du Gambiérol.*

Il agit sur les canaux potassium (Kopljar *et al.*, 2013; Martínez-Morales *et al.*, 2016) et peut aussi agir sur les cellules gustatives des souris (Ghiaroni *et al.*, 2005) ce qui pourrait expliquer parfois la présence d'altérations du goût chez les patients atteints de ciguatéra (Meunier *et al.*, 2009). Le gambiérol stimule aussi la libération de neurotransmetteurs (Schlumberger *et al.*, 2007) et pourrait, au même titre que les CTX et GA, se lier sur le site cinq des CSDP (Inoue *et al.*, 2003; Louzao *et al.*, 2006; LePage *et al.*, 2007). Sa DL_{50} en i.p est de 50 à 80 µg kg^{-1} (Satake *et al.*, 1993a; Ito *et al.*, 2003) soit 100 fois plus que les MTX ce qui le rend beaucoup moins cytotoxique que ces dernières. C'est un composé actuellement à l'étude dans la recherche et développement (R&D) de nouveau médicaments contre la maladie d'Alzheimer (Alonso *et al.*, 2012, 2017; Molgó *et al.*, 2020).

E) Le gambieroxide et son mode d'action

Ce composé, isolé en 2013 à partir de *G. toxicus* (Watanabe *et al.*, 2013), présente 12 cycles carbonés et une forte ressemblance avec la yessotoxine (Figure 26) (Takahashi *et al.*, 1996; Murata *et al.*, 1987; Loader *et al.*, 2007). Son mode d'action reste cependant méconnu à ce jour. Le gambieroxide (ou un isomère) a également été détecté récemment dans des souches de *G. australes* des îles Baléares en Méditerranée (Estevez *et al.*, 2020b).

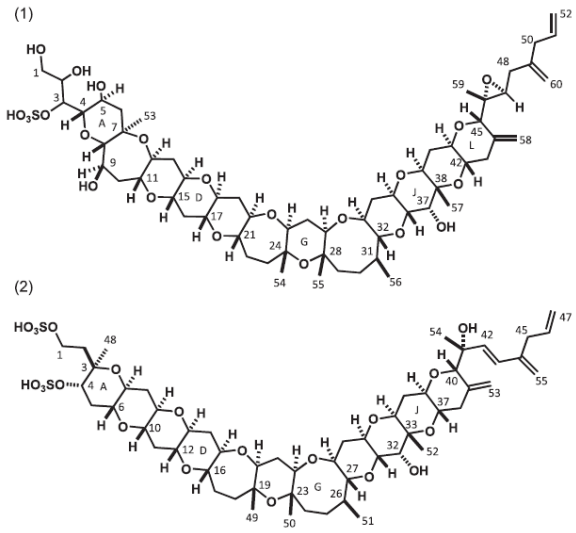


Figure 26 (tirée de Watanabe et al., 2013): Illustration de la structure chimique de (1) le gambieroxide et (2) la yessotoxine. Les seules différences entre ces molécules se trouvent à leurs extrémités, au niveau des cycles carbonés A et L.

F) Les gambiérones et leur mode d'action

Ces composés, isolés à l'origine de cultures de *G. australes* et *G. belizeanus*, présentent une activité activatrice des CSDP au même titre que les CTX (Rodríguez *et al.*, 2015) et une action sur les récepteurs glutamates et sur l'influx d'ions Ca^{2+} mais à des degrés moins importants que les CTX (de l'ordre d'un facteur x20) (Boente-Juncal *et al.*, 2019).

Deux analogues sont pour l'instant connus: (i) la **gambiérone** (Figure 27), isolée de *G. belizeanus* et composée de neuf cycles carbonés et (ii) la **44-méthyl-gambiérone** (Boente-Juncal *et al.*, 2019; Murray *et al.*, 2019, 2020), anciennement classée parmi les MTX sous le nom de MTX3 (Lewis *et al.*, 1994). Elle a été isolée concomitamment chez *G. australes* / *G. belizeanus* et sa structure est identique à celle de la gambiérone mais avec un groupe $-CH_3$ supplémentaire sur le carbone « C44 ». Elle semble être retrouvée dans la plupart des espèces de *Gambierdiscus* et *Fukuyoa* (Murray *et al.*, 2020) et même chez le dinoflagellé *Coolia* (Tibiriçá *et al.*, 2020). Ce composé constitue donc un biomarqueur de choix pour le suivi de la présence/absence de ces dinoflagellés dans les milieux marins (Murray *et al.*, 2020).

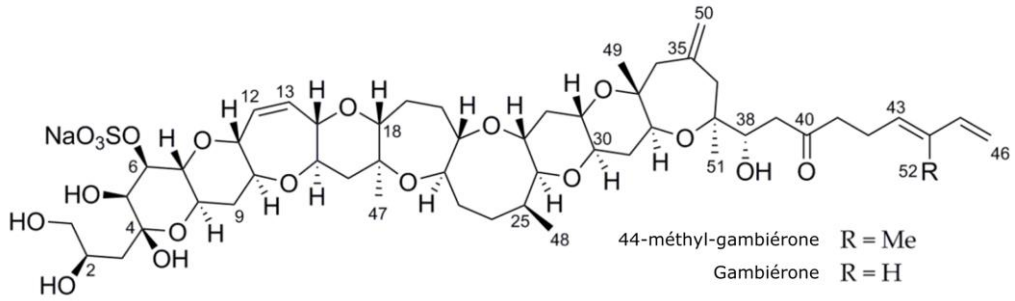


Figure 27 (tirée de Boente-Juncal *et al.*, 2019*): Illustration de la structure chimique de la gambiérone et de la 44-méthyl-gambiérone.*

En conclusion, *Gambierdiscus* et *Fukuyoa* sont la source d'une foule de composés aux modes d'action diversifiés sur les organismes vivants. S'agissant des CTX, leur capacité à être bioaccumulées dans une variété d'organismes marins entrant dans la consommation courante des populations mondiales souligne la nécessité et l'urgence de mettre en place des programmes de surveillance de ces toxines à la fois dans les environnements marins et les réseaux trophiques lagonaires. C'est pourquoi des efforts très conséquents sont actuellement consacrés au développement et à l'optimisation de méthodes de détection qui soient suffisamment spécifiques et sensibles pour être en mesure de détecter ces composés même lorsque présents à l'état de traces dans les matrices biologiques contaminées.

IV - Les méthodes de détection des ciguatoxines

On assiste depuis plusieurs années à une mobilisation des équipes de recherche sur le développement et l'optimisation des techniques de détection et de quantification des CTX dans les produits de la mer et les micro-algues. Cela constitue un véritable défi technique en raison de la grande diversité des congénères à détecter, de leurs structures complexes et de leur présence parfois à l'état de trace dans les matrices contaminées (Lehane & Lewis, 2000; Caillaud *et al.*, 2010; Vilariño *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2017).

Même si diverses méthodes de détection sont aujourd'hui disponibles, aucune d'entre elles n'a fait l'objet d'une validation inter-laboratoire, un prérequis pour pouvoir être considérée comme méthode de référence par la communauté scientifique. Il est donc actuellement très difficile pour les gouvernements de s'appuyer sur un test en particulier pour garantir la sécurité sanitaire des produits marins à l'échelle régionale et internationale. L'absence de standards de CTX certifiés est également un frein majeur au développement de ces techniques car ces matériaux de référence sont indispensables à la calibration

ou l'étalonnage des méthodes de détection pour quantifier spécifiquement et précisément les congénères de CTX retrouvées dans les matrices étudiées. Enfin, l'absence de seuils règlementaires clairement définis, *i.e.* les teneurs en CTX à ne pas dépasser dans les produits marins consommés pour garantir leur salubrité, constitue un autre obstacle à la validation de méthode ainsi qu'à la mise en place de programmes de contrôle.

A) Les tests biologiques *in vivo*

Développé à l'origine par Banner *et al.,* 1960, le test biologique sur souris (Mouse BioAssay, MBA) a été historiquement le premier test utilisé pour la détection des CTX. Ce test repose sur l'observation des symptômes et le temps de survie chez des souris pendant une période de 24 à 48 h après une injection i.p. ou i.v. de l'extrait à analyser. Son principal avantage est de permettre une estimation de la toxicité globale d'un échantillon et ce à l'échelle d'un organisme entier. Il est par contre beaucoup moins sensible que les tests *in vitro* et il est nécessaire de disposer d'une animalerie aux normes et de tenir compte des problèmes éthiques liés à l'expérimentation sur animaux vivants (Nicolas *et al.,* 2014, 2017; Pasinszki *et al.,* 2020). D'autres espèces animales ont été utilisées dans ces tests *in vivo*: les tests sur chats, poussins, ou mangoustes qui offrent une meilleure sensibilité aux CTX, mais leur taille/poids supérieurs à ceux d'une souris nécessitent de disposer d'une grande quantité d'extraits, notamment pour les échantillons les moins concentrés en CTX (Banner *et al.,* 1960; Bagnis *et al.*, 1985b; Pottier & Vernoux, 2003). Pour s'affranchir de cette contrainte, des invertébrés comme les moustiques, les écrevisses, les larves de diptères ou de crevettes ont également été utilisés (Granade *et al.,* 1976; Chungue *et al.,* 1984; Bagnis *et al.*, 1987; Pompon & Bagnis, 1984; Labrousse & Matile, 1996).

Néanmoins, même si quelques sympômes peuvent donner une certaine spécificité aux tests sur animaux, tel que la pilo-érection chez la souris mâle (Vernoux *et al.,* 1985), un manque général de spécificité (détermination uniquement d'une toxicité globale), de sensibilité (besoin d'une grande quantité de matrice biologique) ainsi que les problèmes éthiques restent récurrents quel que soit le modèle d'étude utilisé. C'est pourquoi ces tests *in vivo* tendent aujourd'hui à disparaitre au profit de méthodes alternatives *in vitro* moins contraignantes, moins consommatrices en matériel biologique et, pour certaines, plus économiques, respectant de ce fait la règle des 3R: « Reduce, Refine, Replace » (réduire, améliorer, remplacer) et qui sont basées plus spécifiquement sur le mode d'action, les propriétés chimiques et immunologiques des CTX (Botana *et al.,* 2009; Caillaud *et al.,* 2010).

B) Les tests biologiques *in vitro*

Le test de **cytotoxicité sur neuroblastomes de souris** (**CBA-N2a**) a été développé à l'origine par Kogure *et al.,* 1988 pour détecter deux types de toxines marines, les saxitoxines et les tétrodotoxines. Ces toxines se fixent sur le site un de la sous-unité α des CSDP et sont considérées comme des inhibiteurs de ces canaux (Cestele & Catterall, 2000; Catterall *et al.,* 2007). Manger *et al.*, 1993 ont étendu ce test à la détection de deux activateurs des CSDP que sont les PbTx et les CTX et ont également introduit une mesure de la viabilité cellulaire en utilisant un dosage colorimétrique au bromure de méthyl-thiazolyldiphényltétrazolium (MTT). Il est basé sur la capacité des cellules vivantes à réduire le MTT en un produit insoluble de formazan pourpre (Abe & Matsuki, 2000). La quantité de formazan produite est directement liée au nombre de cellules viables. Après la lyse des cellules, les cristaux de formazan sont solubilisés suivi d'une mesure de l'absorbance (à 570 nm). Plus les valeurs d'absorbance sont élevées, plus il y a de cellules vivantes reflétant l'absence de toxines.

Ce test offre une sensibilité compatible avec le seuil de salubrité recommandé par la FDA et l'EFSA, soit 0,01 ng P-CTX1B g^{-1} et constitue le test le plus sensible à ce jour. Il se prête également bien à des criblages haut débit grâce à son format de plaque en 96 puits (Viallon *et al.,* 2020). En revanche, une des principales limites du CBA-N2a est qu'il ne permet pas de cibler une toxine en particulier mais une famille de toxines, *i.e.* celles actives sur les CSDP. En d'autres termes, ce test ne donnera que la **cytotoxicité composite** d'un extrait. C'est aussi un test qui requiert un long temps d'analyse (trois jours), ce qui le rend inadapté à de la détection rapide en dehors d'un laboratoire. Une méthode

alternative plus rapide consiste à détecter l'action des activateurs des CSDP sur les neuroblastomes en suivant les changements de la dépolarisation de la membrane cellulaire par fluorescence (Louzao *et al.,* 2004). Cette technique est intéressante car la durée n'est plus que d'une vingtaine de minutes (McCall *et al.,* 2014) mais reste cependant peu utilisée en pratique par les laboratoires.

Le test interaction ligand-récepteur ou « **Receptor Binding Assay** » (**RBA**) est un autre test fonctionnel mis au point dans les années 1980 (Catterall & Risk, 1981; Poli, 1985; Poli *et al.,* 1986; Lombet *et al.,* 1987; Sharkey *et al.,* 1987), dès lors qu'il a été possible d'isoler des CSDP à partir de tissu animal (Catterall & Gainer, 1985). Ce test se base sur le mode d'action des CTX: l'affinité spécifique des CTX (et des PbTx) pour le site cinq des sous-unités α des CSDP (Catterall *et al.,* 1992). Cependant, les CTX ont une plus grande affinité pour ce récepteur que les PbTx, lorsque l'on met en présence un complexe PbTx/protéine-canal et des CTX. Ces dernières vont déplacer la PbTx par compétition en se fixant sur la protéine-canal (Dechraoui *et al.,* 1999; Darius *et al.*, 2007, Dechraoui-Bottein & Clausing, 2017). Au moyen d'un complexe radiomarqué [^{3}H]PbTx-3/canal sodique, il est possible de suivre la PbTx radiomarquée déplacée par les CTX éventuellement présentes dans un échantillon biologique, en mesurant la décroissance de la radioactivité dans le tube réactionnel. La proportion de complexes radiomarqués va diminuer proportionnellement à l'augmentation de la teneur en CTX. Cependant, l'utilisation de la PbTx radiomarquée est soumise à l'application de règles très contraignantes de radioprotection. De plus, le traitement spécifique et l'évacuation onéreuse des déchets radioactifs vers des centres dédiés ne facilitent pas l'application de ce test dans les laboratoires les plus isolés. A l'instar du CBA-N2a, le RBA est spécifique d'un mode d'action, ne permettant pas de cibler une toxine individuellement. Il reste cependant moins sensible que le CBA-N2a car il nécessite une plus grande quantité de standards ou de matrices biologiques, ce qui le rend rapidement onéreux pour une utilisation en routine. Pour pallier ce problème, des versions fluorescentes et chimioluminescentes de ce test ont récemment été mises au point grâce au marquage de la PbTx avec, respectivement, le bore-dipyrrométhene « bodipy » (McCall *et al.,* 2012) et l'acridinium (Murata & Yasumoto, 2019).

Bignami, 1993 a introduit un test hémolytique pour la détection de la palytoxine et des extrait de *Polycavernosa tsudai* (algue rouge productrice de polycavernosides), qui a ensuite été adapté et renommé en test de la lyse des érythrocytes (**Erythrocyte lysis assay, ELA**) au début des années 2000 (Eschbach *et al.,* 2001). Il repose sur la mesure de l'absorbance de l'hémoglobine libérée lors de la lyse d'érythrocytes en présence de composés hémolytiques. Shimojo & Iwaoka, 2000 ont utilisé cette technique pour la recherche de toxines affectant le canal sodique ou la pompe Na^+/K^+-ATPase alors que Holland *et al.,* 2013 l'ont utilisé pour la mise en évidence d'une activité de type MTX chez *Gambierdiscus*. Cette mesure n'est cependant pas spécifique de l'action des CTX car aussi observée pour les MTX (Holland *et al.,* 2013), les acides gras insaturés (de Boer *et al.,* 2009), des glycolipides (Emura *et al.,* 2004) et des composés réactifs à l'oxygène (Chiu *et al.,* 1982) ce qui rend inutile l'utilisation de ce test dans la recherche spécifique des CTX dans les matrices biologiques susceptibles d'avoir bioaccumulées différentes familles de composés.

Toutefois, malgré les multiples avantages qu'ils offrent, les tests CBA-N2a, RBA ou ELA ont en commun de refléter **la toxicité composite** des extraits analysés (présence de plusieurs analogues de CTX ou autres composés produits par des dinoflagellés dans la matrice contaminée). Dans l'hypothèse d'une action synergique de ces différents analogues, le risque d'une surestimation des teneurs en toxines ne peut donc formellement être écarté. Par ailleurs, ces tests fonctionnels ne fournissent aucune indication sur la structure et l'identité des CTX, qui nécessite le recours à des méthodes chimiques.

C) Les méthodes chimiques

Plusieurs méthodes chimiques sont actuellement disponibles pour la détection et l'identification des différents analogues de CTX, telles que la chromatographie liquide à haute performance (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) couplée (i) à une détection ultraviolets (HPLC-UV) (Hamilton *et al.,* 2002), (ii) à une détection par fluorescence (HPLC-FLD) (Dickey *et al.,* 1992), ou encore (iii) à la spectrométrie de masse simple (liquid chromatography coupled to mass spectrometry, LC-MS) ou en tandem (LC-MS/MS) (voir Pisapia, 2017 pour une revue complète). Ces méthodes chromatographiques ont toutes pour but de purifier/séparer les composés présents dans un mélange (*e.g.* sur la base de leur polarité).

La **HPLC-UV** a été développée au début des années 1990 (Legrand *et al.,* 1989, 1997; Lewis *et al.,* 1991, 1998; Satake *et al.*, 1993b, 1997; Hamilton *et al.,* 2002). Le principal écueil à l'utilisation d'une détection UV repose sur le fait que la plupart des CTX ne possèdent pas de chromophores distinctifs ce qui rend cette technique peu sensible et peu spécifique.

La **HPLC-FLD** se base sur l'utilisation du groupe -OH à l'extrémité des CTX pour les transformer en esters fluorescents (Dickey *et al.,* 1992). Cependant, cette technique s'avère également peu sensible et peu spécifique car plusieurs autres composés peuvent avoir un OH en bout de chaîne. De plus, elle n'est pas applicable aux CTX ne possédant pas de chaîne latérale portant des groupements -OH.

Les analyses **HPLC-MS** et **–MS/MS** ont été introduites au début des années 1990 et restent largement utilisées aujourd'hui (Lewis & Sellin, 1993; Lewis *et al.,* 1991, Lewis & Jones, 1997; Yasumoto *et al.*, 2000; Yasumoto, 2001; Ikehara *et al.*, 2017; Yogi *et al.*, 2011, 2014; Sibat *et al.*, 2018; Dechraoui-Bottein *et al.,* 2011; Chinain *et al.*, 2010a, Otero *et al.,* 2010; Murray *et al.*, 2019) avec une source d'ionisation à bombardement atomique rapide (Fast Atom Bombardment, FAB) (Yasumoto *et al.*, 2000) ou par electrospray (ElectroSpray Ionization, ESI) (Dickey *et al.,* 1992; Lewis & Jones, 1997). La haute résolution (high-resolution mass spectrometry, HRMS) est aussi parfois utilisée depuis les début des années 2000 (Diogène *et al.,* 2017; Sibat *et al.*, 2018) (Hamilton *et al.,* 2002; Laza-Martínez *et al.,* 2016; Diogène *et al.,* 2017). Cette dernière permet de rechercher une multitude de composés connus ou inconnus à partir de la détermination de leur masse moléculaire précise et de la déduction de leur formule brute, tandis que la basse résolution (LRMS) permet uniquement de rechercher les composés dont le spectre de fragmentation est connu. Ainsi, au minimum 42 analogues ont été recensés: 24 P-CTX du Pacifique (Murata *et al.*, 1989, 1990; Lewis *et al.,* 1991; Satake *et al.*, 1993b, 1997, 1998; Yasumoto *et al.*, 2000), 12 C-CTX des Caraïbes (Vernoux & Lewis, 1997; Lewis *et al.,* 1998; Pottier *et al.,* 2001, 2002a) et six I-CTX (Hamilton *et al.,* 2002; Diogène *et al.,* 2017). En revanche, les structures de huit C-CTX et de toutes les I-CTX restent incomplètes ou inconnues à ce jour.

Bien que l'EFSA recommande la HPLC-MS/MS comme méthode alternative au test biologique sur souris, cette méthode, de sensibilité intermédiaire entre les tests sur animaux et les tests cellulaires mais très spécifique, ne permet pas d'identifier les toxines inconnues, ni de faire du criblage à haut débit (Daneshian *et al.,* 2013; Nicolas *et al.,* 2014). Les équipements de spectrométrie de masse coûtent très cher et nécessitent la consommation d'un grand volume d'étalon, matériel indispensable pour calibrer la quantification avec cette méthode et obtenir des courbes d'étalonnage. Sa sensibilité et spécificité vis-à-vis des différents analogues de CTX en font toutefois une méthode de « confirmation » idéale des données issues d'un criblage préalable des échantillons au moyen des tests biologiques *in vitro*.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est la seule capable de déterminer précisément la structure chimique des CTX. Cette méthode a permis d'identifier les premières structures (Murata *et al.,* 1989, 1990; Lewis *et al.,* 1991; Satake *et al.*, 1993b, 1997, 1998) tandis que celle des autres analogues a été déduite la plupart du temps par des analyses LC-MS/MS (Yasumoto *et al.*, 2000;

Yasumoto, 2001). C'est une technique très complexe et coûteuse ne pouvant pas être applicable hors d'un laboratoire. De plus elle est applicable uniquement sur des composés parfaitement purs (> 95 % de pureté minimum) et a ainsi été peu utilisée. Récemment, les techniques RMN en combinaison avec la dérivation avec des agents anisotropes ont été utilisées pour déterminer la configuration stéréochimique de plusieurs toxines, y compris les CTX, MTX, gambiérol et les acides gambiériques (Satake & Yasumoto, 2020). La RMN est aussi une des rares techniques capables de quantifier de manière absolue un composé (avec la gravimétrie), elle a ainsi été récemment utilisée dans ce but pour les CTX (Kato & Yasumoto, 2017). Cette étude est une première étape vers la certification de la concentration d'une ciguatoxine dans un étalon et pose ainsi les bases pour la validation de méthodes de détection, la gestion du risque ciguatérique et sa réglementation.

D) Les tests immunologiques

En théorie, c'est cette approche qui est considérée comme la plus prometteuse pour la mise au point d'un test de détection à la fois rapide, fiable, et sensible. Ces tests se basent sur le principe d'une reconnaissance spécifique entre un anticorps (anticorps anti-CTX) et son antigène (les CTX). Plusieurs tests immunologiques ont été mis au point pour la détection des CTX: (i) le test radio-immunologique ou radioimmunoassay (RIA); et (ii) le test en « sandwich » ou enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Kimura *et al.,* 1982; Hokama, 1985, 1989; Campora *et al.,* 2008a; Campora *et al.,* 2008b; Tsumuraya *et al.,* 2010; Ebesu & Campora, 2012). Leur mode opératoire permet un criblage à haut débit des échantillons compatible avec leur utilisation directement sur le terrain, notamment par des particuliers (Naar *et al.,* 2002).

L'ensemble de ces travaux a même abouti à la commercialisation de deux tests disponibles sous forme de kits: le CIGUATECT™ et le Cigua-Check®, mais ces kits ont finalement été retirés du marché en raison du fort taux de faux positifs et de faux négatifs observés (Bienfang *et al.,* 2011). Les CTX utilisées ne sont pas immunogènes naturellement en raison de leur caractère polyéther polycyclique. Pour leur conférer une immunogénicité, il faut donc recourir au préalable à une technique de couplage avec des molécules porteuses, immunogènes (Caillaud *et al.,* 2010), de nature très variée (polysaccharides, protéines d'origine bactérienne ou virale, acides polyaminés, billes de résine) (Pauillac *et al.,* 1997, 2000). Ce type de manipulations représente un des freins majeurs au développement de cet outil. Plusieurs essais de synthèse chimique pour recréer certains fragments de CTX ont également été tentés, sans véritable succès (Inoue *et al.*, 2009; Nagumo *et al.,* 2004; Tsumuraya *et al.,* 2006, 2010, 2012). Depuis peu, un kit ELISA (n°382-14341) est commercialisé par FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation. Il est au départ capable de détecter uniquement deux analogues de P-CTX: la CTX1B et la 54-deoxy-CTX1B qui sont majoritairement présentes dans les poissons carnivores (Tsumuraya *et al.,* 2018) mais, en 2019, la CTX3C et la 51-hydroxy-CTX3C ont été ajoutées à la liste des CTX capables d'être détectées par cette méthode (Tsumuraya & Hirama, 2019). Actuellement, le prix élevé des kits d'analyse ne permet malheureusement pas d'en faire un outil de surveillance mais ces techniques restent des outils pour la recherche.

E) Les biosenseurs

A la différence des tests fonctionnels et chimiques, cette approche, très récente, relève encore du domaine de la R&D. Richter & Fidler, 2015 ont été les premiers à évaluer la possibilité de développer des tests basés sur le modèle « levure » pour la détection des toxines de micro-algues. Les cellules de levure offrent en effet plusieurs avantages: haute résistance grâce à leur épaisse paroi cellulaire qui les protège du stress nocif (De Nobel & Barnett, 1991; Klis *et al.,* 2006), cellules pouvant être facilement déshydratées pour le transport, possibilité de mise au point d'un test ne nécessitant le rajout d'aucune toxine supplémentaire (à l'inverse du CBA-N2a), autant de caractéristiques potentiellement intéressantes pour le développement d'un test portable. Ce modèle a été appliqué pour la première fois à la détection des toxines de la ciguatéra par Martin-Yken *et al.,* 2018. Dans cette étude préliminaire basée sur un suivi des concentrations intracellulaires de Ca^{2+}, les auteurs ont montré qu'un standard pur de CTX3C et les extraits d'une souche toxique de *G. polynesiensis* pouvaient induire une entrée de

Ca^{2+} dans les levures. Plusieurs souches de levure génétiquement modifiées, notamment pour présenter une paroi cellulaire plus perméable à l'action des CTX, ont été testées par la suite, afin de vérifier leur capacité à détecter les CTX avec, une sensibilité satisfaisante. Malheureusement, ces essais n'ont pas tenu leurs promesses puisque, outre des problèmes liés à l'absence de reproductibilité et de répétabilité des résultats, les souches testées se sont avérées incapables de détecter des concentrations même très élevées de CTX3C.

Leonardo *et al.*, 2020 ont mis au point une détection par électrochimie utilisant des anticorps. Dans cette étude, trois anticorps différents (3G8, 10C9 et 8H4), qui se lient spécifiquement à quatre principaux congénères des CTX (CTX1B, CTX3C, 51-hydroxy-CTX3C, et 54-deoxy-CTX1B), sont utilisés pour développer un test « sandwich » (similaire à l'ELISA) utilisant des billes magnétiques pour une amplification du signal de réponse. Cette technique permet la détection des teneurs en CTX1B de l'ordre de 0,01 µg kg^{-1} chez des poissons contaminés et offre plus de spécificité en comparaison aux méthodes biologiques *in vitro* telles que le CBA-N2a ou le RBA.

Bien que très sensibles et spécifiques, l'ensemble des tests décrits précédemment présente l'inconvénient majeur d'être des tests de laboratoire, nécessitant pour certains d'entre eux des équipements lourds, coûteux, des conditions parfaitement contrôlées et un personnel technique adéquat. Ces tests ne sont donc pas accessibles aux populations des îles éloignées, souvent les plus vulnérables à la ciguatéra car confrontées quotidiennement au risque toxique.

F) Les tests traditionnels

Les populations insulaires ont donc développé au fil des générations plusieurs formes de tests traditionnels pour tenter d'évaluer la dangerosité d'un produit de leur pêche. Selon l'archipel ou l'île considéré, différentes méthodes traditionnelles peuvent être privilégiées (Lewis, 1983, 1986a). Ces tests traditionnels sont pratiqués soit en nourrissant des animaux ou des insectes avec un morceau de chair ou de foie du poisson; soit en utilisant une pièce de monnaie en argent ou des allumettes; soit en se basant sur l'aspect ou la couleur du poisson entier ou de certains de ses organes (Davis-Lewis, 1983; Juranovic & Park, 1991; Lewis, 1986a). Leur fiabilité et leur efficacité restent cependant très discutables et rares sont les méthodes ayant fait l'objet d'une validation scientifique.

A notre connaissance, l'étude de Darius *et al.*, 2013 est la seule à avoir évalué deux tests traditionnels communément utilisés à Raivavae (Australes, Polynésie française): le test de *rigor mortis* et le test hémorragique (Figure 28). Le test de *rigor mortis* consiste à évaluer la rigidité cadavérique du poisson plusieurs heures après qu'il ait été pêché. Si le poisson est flasque, il est considéré comme toxique. Le test hémorragique, quant à lui, consiste à évaluer les signes de saignement visibles au niveau de la chair du poisson après une incision à la base de la queue. Si le saignement est abondant, le poisson est considéré comme toxique.



Figure 28 (tirée de Darius et al., 2013): Test (A) de rigor mortis et (B) hémorragique pratiqués sur l'île de Raivavae (Australes, Polynésie française).

Les estimations de plusieurs dépisteurs locaux ont été comparées aux résultats de toxicité obtenus au moyen d'un test RBA. L'analyse statistique des résultats de cette étude indique que les meilleurs scores observés sont respectivement de 55 % et 70 % pour le test de *rigor mortis* et le test hémorragique. Le recours à ces tests, combiné avec la bonne connaissance des populations locales sur les espèces et les sites de pêche les plus à risque, pourrait donc contribuer à diminuer le risque d'intoxication dans ces communautés fortement dépendantes des poissons lagonaires (Darius *et al.*, 2013) en attendant la mise au point d'un test de terrain plus sensible et spécifique.

En conclusion, chacune des méthodes de détection des CTX présentées précédemment offre des avantages et des inconvénients propres, le choix d'une méthode en particulier par rapport à une autre dépendant essentiellement des objectifs et/ou mandats du laboratoire usager (Tableau 5). L'ensemble de la communauté scientifique s'accorde cependant sur l'urgence d'une meilleure standardisation des protocoles de détection et de quantification qui rendrait alors possible les études comparatives inter-laboratoires. La complexité et la diversité chimique des CTX, et surtout la faible disponibilité en standards expliquent également les difficultés à aboutir au développement d'une méthode de référence qui fasse consensus à l'échelle internationale. De plus, les CTX ne présentant pas toutes les mêmes niveaux de toxicité, l'EFSA a proposé en 2010 sur la base de tests MBA des facteurs d'équivalence toxique (TEF) (EFSA, 2010). Ces données mériteraient d'être ré-actualisées en utilisant des méthodes plus récentes et spécifiques, mais ces travaux sont, une fois encore, freinés par l'accès limité à un large panel de standards puisque seuls un analogue non certifié de CTX3C et un analogue de MTX sont actuellement disponibles commercialement (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation).

Tableau 5: Récapitulatif des avantages, limites et de la sensibilité (LOD et LOQ) des différentes méthodes de détection employées dans la recherche de CTX. Pour l'analyse LC-MS/MS les LOD et LOQ sont définies pour un seul analogue de CTX alors qu'un échantillon contient souvent plusieurs toxines.

Méthode de détection		Avantages	Limites	Limite de détection (LOD)	Limite de quantification (LOQ)	Références
MBA		Réponse rapide et à l'échelle d'un organisme vivant entier	Manque de spécificité; sensibilité variable entre individus; problème d'éthique; besoin d'animaleries et de personnel qualifié; demande un certain degré de purification des échantillons en amont	0,56 ng CTX1B eq. /g	0,56 ng CTX1B eq. /g	EFSA, 2010; Pazinski *et al.*, 2020;
CBA-N2a		Détecte une cytotoxicité composite de tous les analogues présents; sensible; faible consommateur de standard; ne nécessite pas beaucoup d'équipement; possibilité de criblage haut débit sur différentes matrices biologiques	Spécifique d'un mode d'action; potentiel effet "matrice"; test long (3 jours); inadaptable sur le terrain; demande un certain degré de purification des échantillons en amont	0,031 ng CTX3C eq. /g	0,064 ng CTX3C eq. /g	Viallon *et al.*, 2020; Roué *et al.*, 2016; Pawlowiez *et al.*, 2013; Darius *et al.*, 2018a, b
RBA	**Fluorescent**	Détecte une affinité composite de tous les analogues présents; test rapide; criblage haut débit possible et ce sur différentes matrices biologiques; kit commercialisé	Manque de spécificité; potentiel effet "matrice"; demande un certain degré de purification des échantillons en amont; inadaptable sur le terrain	0,075 ng CTX3C eq. /g	0,1 ng CTX3C eq. /g	Hardison *et al.*, 2016, 2018
	Radioactif		Mêmes inconvénients que la méthode fluorescente; besoin d'équipement, de formation et d'agréments spécifiques au travail avec des radio-éléments; radioprotection; élimination des déchets soumise à réglementation; inadaptable sur le terrain	0,15 ng CTX3C eq. /g	0,3 ng CTX3C eq. /g	Clausing *et al.*, 2018 Darius *et al.*, 2007, 2013; Chinain *et al.*, 2010b
LC-MS/MS	**Basse résolution**	Détecte tous les analogues connus; sensible; obtention de profils toxiniques	**Basse résolution:** ne détecte pas les CTXs inconnues; besoin de standards en CTX **Basse et Haute résolutions:** Coût élevé des équipements et de leur maintenance; inadaptable sur le terrain; demande un certain degré de purification des échantillons en amont	0,014 ng CTX1B eq. /g	0,048 ng CTX1B eq. /g	Murray *et al.*, 2018
	Haute résolution	Détecte des composés connus et inconnus; très spécifique; obtention de profils toxiniques		ND	1,25 ng CTX1B eq. /g	Sibat *et al.*, 2018
Tests immunologiques		Spécifique de chaque congénère de CTX; réponse rapide; criblage haut débit possible	Demande un certain degré de purification des échantillons en amont; difficilement transposable sur le terrain; ne détecte que certains analogues	0,01 ng P-CTX eq. /g	ND	Tsumuraya *et al.*, 2018; Leonardo *et al.*, 2020
Tests traditionnels		Rapide; réalisable sur le terrain; pas de purification nécessaire	Très grand manque de spécificité et de sensibilité; résultats variables selon les testeurs; certains tests se font sur animaux vivants qui doivent être disponibles	ND	ND	Darius *et al.*, 2013

V- Le risque ciguatérique face au changement global

Au cours des dernières décennies, les épisodes de HAB ont augmenté en fréquence et en intensité, affectant de plus en plus de régions à travers le monde (Van Dolah, 2000). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour tenter d'expliquer cette augmentation, parmi lesquelles: (i) l'impact du changement climatique, directement ou indirectement induit par une augmentation à l'échelle du globe de la concentration en gaz à effet de serre, *i.e.* le dioxyde de carbone (favorisant donc la photosynthèse) ou d'autres gaz (méthane et protoxyde d'azote) par les activités humaines (Moore *et al.,* 2008); (ii) l'augmentation des pressions anthropiques (agriculture ou aquaculture), qui conduisent à des phénomènes d'eutrophisation des zones côtières (Glibert *et al.,* 2005b); (iii) la dissémination des espèces toxiques de micro-algues via les eaux de ballast des navires de transport (Burkholder *et al.,* 2007).

Les territoires insulaires sont actuellement confrontés à de nombreux problèmes environnementaux tels que l'érosion côtière, la perte de biodiversité terrestre et marine, la contamination des ressources en eau douce (sous la pression du développement urbain, agricole et industriel), la pollution marine et la dégradation des récifs coralliens (Barnett, 2011). Les écosystèmes des îles du Pacifique sont donc considérés comme extrêmement vulnérables aux effets du changement climatique. Au regard de la place centrale occupée par les pêcheries dans l'alimentation et le développement économique des communautés locales, les conséquences potentielles de la ciguatéra sur la sécurité alimentaire constituent donc une menace supplémentaire pour ces populations (Cooke *et al.,* 2016). Plus préoccupant encore, on estime que les impacts de la ciguatéra ne pourront qu'augmenter de façon exponentielle avec le changement climatique, l'eutrophisation des lagons et la mondialisation du commerce international des produits de la pêche.

La Polynésie française se trouve dans le gyre subtropical du Pacifique, qui est une zone oligothrophe, pauvre en chlorophylle. L'azote (N) y est l'élément limitant, et le phosphore (P) plus abondant (Dufour *et al.,* 1999; Wunsch *et al.,* 1983; Raimbault *et al.,* 2008). Les fortes précipitations sont connues pour favoriser le transfert par ruissellement de nutriments terrestres vers les lagons et milieux côtiers, ce qui est important dans la structure des communautés côtières (Fabricius, 2005; Bellwood *et al.,* 2004). Par exemple, Fong *et al.,* 2020 ont observé une augmentation significative, mais de courte durée, des transferts de nutriments à la suite d'un épisode de pluie extrême à Moorea. Ceci a contribué à favoriser la prolifération des macro-algues de la communauté benthique, capables d'assimiler rapidement les nutriments transportés, et, de ce fait, à créer de nombreux habitats potentiels pour les micro-algues ciguatérigènes. Des phénomènes similaires ont également été observés dans les régions tempérées (Cohen & Fong, 2004; Kennison *et al.,* 2011). Il est à noter que ces apports terrigènes peuvent également être exacerbés par les activités anthropiques telles que l'exploitation forestière, l'agriculture et l'urbanisation (Fabricius, 2005; Brodie *et al.,* 2012; Townsend-Small *et al.,* 2013), notamment dans les localités où la gestion des eaux usées demeure balbutiante voire inexistante comme c'est le cas en Polynésie française (Fong *et al.,* 2020). Sur Tahiti par exemple, les concentrations élevées en nitrates et phosphates dans la colonne d'eau coïncident avec les zones de forte activité anthropique (Haßler *et al.,* 2019). D'autres activités très présentes en Polynésie française, telles que la perliculture ou l'aquaculture, peuvent également contribuer à l'augmentation des teneurs en nutriments dans les milieux côtiers (Bouvy *et al.,* 2012; Gaertner-Mazouni *et al.,* 2012; Lacoste *et al.,* 2014; Vitousek *et al.,* 2014). En résumé, les projections futures en termes de changement climatique laissent craindre des risques de prolifération du phytoplancton benthique toxinogène via le développement des populations de macroalgues (Rodier *et al.*, 2019). En outre, l'accroissement des apports terrigènes qui en résulte pourrait également contribuer à augmenter les quantités de métaux lourds et autres contaminants dans les poissons consommés par les populations locales (Dewailly *et al.,* 2008).

Trois niveaux de risque sont à considérer dans la gestion de la ciguatéra dans une zone donnée: (i) présence de *Gambierdiscus* (en particulier *G. polynesiensis* ou *G. excentricus*) et/ou *Fukuyoa,* mais pas de contamination avérée des poissons ou invertébrés environnants (Nascimento *et al.,* 2012; Ennaffah

& Chaira, 2015; Tawong *et al.,* 2015); (ii) présence de *Gambierdiscus* et/ou *Fukuyoa*, et détection de CTX (encore à l'état de traces) dans les produits de la mer, mais sans signalement de cas d'intoxications humaines; (iii) présence d'espèces de *Gambierdiscus* et/ou *Fukuyoa* toxinogènes et de produits marins hautement ciguatoxiques, avec signalement de cas d'intoxications au niveau des populations locales. C'est le cas de la Polynésie française, qui est considérée de longue date comme une zone d'endémie de la maladie (Chinain *et al.*, 2010b, 2019), et, plus récemment, de la Macaronésie (Fraga *et al.,* 2011; Fraga & Rodriguez, 2014; Pisapia *et al.,* 2017a,b; Reverté *et al.,* 2018) où la contamination par les CTX de poissons et d'invertébrés locaux et des cas endogènes d'empoisonnements sont documentés depuis le début des années 2000 (Caillaud *et al.,* 2012; Bravo *et al.,* 2015; Silva *et al.,* 2015; Costa *et al.,* 2018; Estevez *et al.,* 2019b; Sanchez-Henao *et al.,* 2020). En effet, des foyers de ciguatéra impliquant principalement des poissons carnivores tels que les mérous, murènes ou sérioles (Serranidae, Muraenidae, Carangidae) sont signalés depuis 2004 aux îles Canaries (Espagne) (Pérez-Arellano *et al.,* 2005; Boada *et al.,* 2010; Nuñez *et al.,* 2012 ; Sanchez-Henao *et al.,* 2020) et depuis 2008 à Madère (Portugal) (Caires, 2010; Gouveia *et al.,* 2010; Otero *et al.,* 2010). Ces signalements coincident avec la description concomittante de plusieurs espèces de *Gambierdiscus* dans la région, puisque Rodriguez *et al.*, 2017 et Rossignoli *et al.,* 2020 y font état de la présence d'au moins cinq espèces distinctes et potentiellement d'une nouvelle espèce (*G. australes*, *G. caribaeus, G. carolinianus, G. excentricus, G. silvae* et *Gambierdiscus* ribotype 3). Dans l'océan Atlantique, les côtes tropicales du Cameroun pourraient potentiellement représenter un nouveau hotspot de ciguatéra, au regard de la prévalence élevée de poissons ciguatoxiques observées dans les populations de *Sphyraena barracuda* et *Lutjanus* spp. (Bienfang *et al.,* 2008b). Par ailleurs, la présence de *Gambierdiscus* est signalée depuis 2015 sur les côtes atlantiques Sud du Maroc (Ennaffah & Chaira, 2015) tandis qu'en mer Méditerranée, *Gambierdiscus* sp. a été observé à plusieurs reprises en Crète (Grèce) en 2003, 2005 et 2007 (Aligizaki & Nikolaidis, 2008) et sur l'île de Formentera (Baléares) depuis 2016 (Laza-Martínez *et al.,* 2016; Tudó *et al.,* 2020; Estevez *et al.,* 2020b). Toutefois, il est intéressant de noter que des intoxications sporadiques évocatrices d'un empoisonnement ciguatérique (dont certaines mortelles ou s'accompagnant d'une composante hallucinatoire) sont signalées depuis les années 1980 en Egypte (Abd-Elhaleem & Abd-Elkarim, 2011) et depuis les années 1990 en Méditerranée occidentale (de Haro *et al.,* 2003). En Asie, la Corée pourrait également être potentiellement concernée par le risque de ciguatéra avec le signalement récent dans les eaux coréennes d'une nouvelle espèce de *Gambierdiscus, G. jejuensis* (Jang *et al.*, 2018), mais dont la capacité à produire des CTX reste à être confirmée.

Selon certains auteurs, l'extension géographique des aires de distribution de *Gambierdiscus* et/ou des poissons toxiques à des zones auparavant indemnes pourrait être une conséquence directe du changement climatique, notamment en contribuant à créer des conditions favorables à l'installation et au développement des micro-organismes ciguatérigènes dans les régions tempérées du globe. Toutefois, d'autres facteurs pourraient également contribuer à expliquer ces nouveaux patrons de distribution des micro-algues, tels que la dissémination sur de larges distances d'espèces indigènes via les radeaux formés par les macroalgues dérivantes (*e.g. Turbinaria*, *Sargassum),* ou via les eaux de ballast (Baumann *et al.,* 2010; Bienfang *et al.,* 2011).

Pour tenter de clarifier le lien entre changement global et l'extension progressive des foyers de ciguatéra à l'échelle du globe, de nombreuses études se sont intéressées à l'influence de divers paramètres environnementaux sur la croissance et la production toxinique de *Gambierdiscus* et *Fukuyoa*, à la fois dans le milieu naturel et en laboratoire. Au regard de la diversité des habitats qui caractérise les biotopes ciguatérigènes (voir Parsons *et al.,* 2012 et Chinain *et al.*, 2020b pour une revue), quelques études se sont également penchées sur les effets de certains facteurs biotiques. Les données ainsi recueillies peuvent être utilisées pour développer des modèles visant à anticiper l'émergence potentielle du risque ciguatérique dans des régions pour l'instant indemnes de la maladie.

Les principaux paramètres étudiés sont la température, l'éclairement, la salinité et l'apport en nutriments. S'agissant de la variable pH, à notre connaissance, les seules données actuellement disponibles concernent une souche de *G. balechii* originaire du Pacifique, chez laquelle il a été observée

une stimulation de la croissance mais une baisse de la production toxinique sous l'effet d'une acidification du milieu de culture (Chan *et al.,* 2018, comm. person.).

A) Effets de la température sur la croissance et la production toxinique de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa*

La réponse de *Gambierdiscus* spp. à la variable température est probablement le thème le mieux documenté actuellement dans la littérature, qu'il s'agisse d'études sur le terrain, en laboratoire, ou de travaux dans le cadre de modélisations et projections (voir Parsons *et al.,* 2012 pour références; Hales *et al.,* 1999; Gingold *et al.,* 2014; Zheng *et al.,* 2020).

En milieu naturel, plusieurs résultats contradictoires sont retrouvés dans la littérature avec généralement une corrélation positive entre la croissance de *Gambierdiscus* et l'augmentation de température (voir Parsons *et al.,* 2012 pour références), mais qui s'est avérée négative dans d'autres cas (Withers, 1981; Besada *et al.,* 1982; Caire *et al.,* 1985; Carlson & Tindall, 1985; Gillespie *et al.,* 1986). A titre d'exemple, Morton *et al.,* 1992 indiquent un taux de croissance maximal chez *Gambierdiscus* sp. à une température de 29 °C en Floride, tandis que l'étude de Gillespie *et al.,* 1986 conclut à une abondance maximale de *Gambierdiscus* sp. à des températures inférieures à 22 °C dans les eaux australiennes.

En laboratoire, une augmentation du taux de croissance a été observée chez *G. carpenteri* au sein de cultures soumises à un accroissement de la températures de 19 °C à 33 °C (Vacarizas *et al.*, 2018), ce qui corrobore les résultats obtenus par Kibler *et al.,* 2012 sur plusieurs espèces originaires des Caraibes (*i.e. G. australes*, *G. belizeanus*, *G. caribeaus, G. carolinianus, G. carpenteri*, et *G. pacificus*) qui affichent des seuils de tolérance compris entre 15 °C et 31 °C. La relation croissance-température décrit souvent une courbe « gaussienne » (Figure 29 A, B) où un optimum de croissance est généralement observé entre 26 °C et 29 °C tandis que des températures inférieures à 16 °C sont généralement létales pour *Gambierdiscus* (Withers, 1981; Bomber *et al.*, 1988a). L'ensemble de ces résultats suggère que dans le milieu naturel, la croissance de *Gambierdiscus* sera stimulée par le réchauffement des océans. Il faut toutefois noter que les seuils de tolérance et optima de croissance sont suceptibles de varier significativement d'une espèce à l'autre. C'est par exemple le cas pour les souches de *G. australes*, *G. scabrosus* et *Gambierdiscus* sp. type 2 au Japon (Yoshimatsu *et al.,* 2014) ainsi que *G. belizeanus* et *G. pacificus* étudiées par Xu *et al.*, 2016, qui présentent des optima de température respectifs de 26 °C et 29 °C (Figure 29 A, B). Dans cette même étude, un autre clone de *G. pacificus* présentait même une courbe de tolérance caractérisée par deux optima de température, à 23 °C et 30 °C (Figure 29 C). Ces résultats soulignent donc clairement l'existence d'une variabilité inter-spécifique mais également intra-spécifique dans la réponse de *Gambierdiscus* à la variable température. Ils expliquent aussi vraisemblablement le caractère cosmopolite de certaines espèces (celles tolérantes à de larges plages de température) *vs.* une distribution géographique plus restreinte pour les espèces à faible tolérance thermique (Parsons *et al.,* 2012).

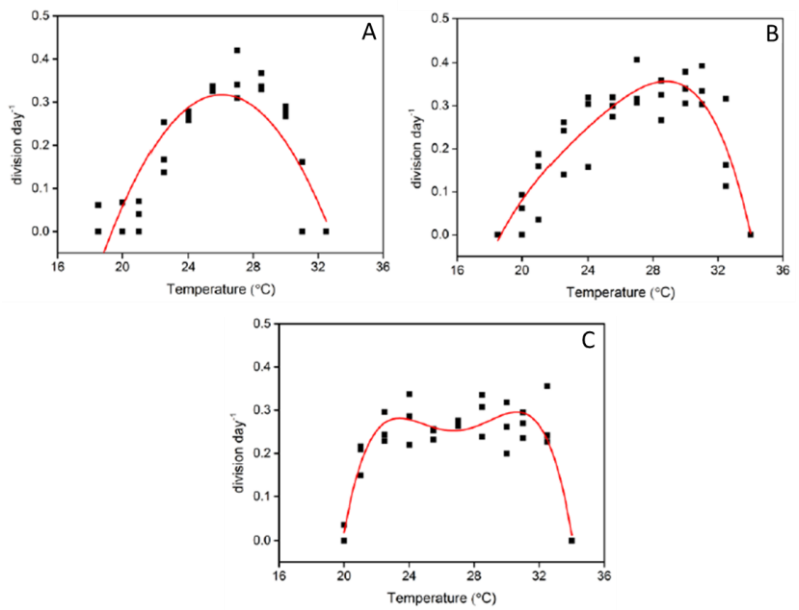


Figure 29 (d'après Xu et al., 2016): Croissance en laboratoire de (A) G. belizeanus, (B) G. pacificus clone 3S0509-27, et (C) G. pacificus clone 3S0510-19 dans différentes conditions de température.

En dépit de ces variabilités entre espèces ou clones, il existe un consensus général sur le fait que le réchauffement climatique s'accompagnera inévitablement d'un changement substantiel dans la distribution et l'abondance de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* spp. à l'échelle du globe (Kibler *et al.*, 2015) et, partant, d'une expansion des aires de distribution de la ciguatéra. En effet, dans le Pacifique, des pics au niveau des cas de ciguatéra associés à des températures anormalement élevées des eaux océaniques à la suite de phénomènes El Niño ont été rapportés au Kiribati, Ouest de Samoa, Tuvalu, les îles Cooks (Hales *et al.*, 1999), ainsi qu'en Californie du Sud (Barton *et al.*, 1995) et dans les Caraïbes (Gingold *et al.*, 2014). De même, Tester *et al.*, 2010 signalent que les taux d'incidence les plus élevés rapportés entre 1996 et 2006 dans les Caraïbes ont concerné les îles où les températures étaient les plus élevées. Llewellyn, 2009 estime toutefois qu'une température de surface trop élevée pourrait, à terme, s'avérer néfaste pour le développement de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* ce qui est confirmé en conditions *in vitro* par Sparrow *et al.*, 2017 où une température élevée (*i.e.* 34 °C) s'est avérée délétère pour plusieurs clones de *G. carpenteri* par rapport à des températures plus basses (*i.e.* 24 °C et 28 °C).

Vis-à-vis de la production toxinique, l'étude de Vacarizas *et al.*, 2018 a montré que la toxicité chez l'espèce *G. carpenteri* est maximale à 19 °C suivie d'une diminution progressive d'un facteur x2 puis d'une stabilisation au températures les plus élevées (*i.e.* 33 °C). Ces auteurs ont suggéré que cette décroissance de production avec l'augmentation de la température pouvait être liée à l'altération des mécanismes d'expression de l'ARN messager impliqué dans la synthèse des CTX. Il existe néanmoins aussi des résultats contradictoires vis-à-vis du lien température-toxicité chez *Gambierdiscus* car une étude antérieure de Bomber *et al.*, 1988a donne des valeurs de toxicité plus importantes pour des cultures cultivées à 27 °C par rapport à celles cultivées à 21 °C. Un troisième cas de figure est également retrouvé dans la littérature où la température ne semble pas affecter la production toxinique de *Gambierdiscus* (Durand-Clement, 1986). L'interprétation et la comparaison de tous ces résultats de toxicité restent cependant difficiles. En effet, Vacarizas *et al.*, 2018 ont utilisé un standard de PbTx-3 qui n'est pas connue à ce jour comme faisant partie du profil toxinique de *Gambierdiscus*. De plus, l'injection i.p. d'extraits méthanoliques (Durand-Clement, 1986) ou directement de cellules *G. toxicus* (Bomber *et al.*, 1988a) dans des souris ne peut pas garantir une réponse spécifique aux CTX car on sait désormais que *Gambierdiscus* est capable de produire différentes familles toxiniques (*cf.* section III p 49).

B) Effets de l'éclairement sur la croissance et la production toxinique de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa*

Dans le milieu naturel, *Gambierdiscus* est capable de se développer aussi bien dans des environnements faiblement éclairés que dans des biotopes soumis à une forte luminosité (Tester *et al.,* 2013): en effet, dans les eaux tropicales peu profondes, il n'est pas rare de trouver des cellules de *Gambierdiscus* sur les macroalgues benthiques ou sur des algues dérivantes (Faust, 2009).

En laboratoire, cette micro-algue semble montrer une préférence pour les faibles éclairements ce qui, en théorie, devrait lui permettre de survivre même à des profondeurs de 80-100 m en milieu tropical (Kibler *et al.*, 2012; Yoshimatsu *et al.*, 2016). Seules quelques études se sont intéressées à la distribution verticale de *Gambierdiscus* (Tester *et al.,* 2013; Loeffler *et al.,* 2015; Boisnoir *et al.,* 2018) et elles tendent à montrer que les populations de *Gambierdiscus* sont capables de se maintenir entre 30 m et 50 m de profondeur (Tester *et al.,* 2013). En outre, la réponse de *Gambierdiscus* au facteur intensité lumineuse semble spécifique à chaque espèce, certaines espèces semblant parfaitement adaptées à des éclairements élevés (*e.g. G. belizeanus*, *G. caribaeus*, *G. pacificus* et *G. carolinianus),* tandis que d'autres semblent préférer des éclairements plus faibles (*e.g. G. silvae*, *Gambierdiscus* sp. type 4 et *Gambierdiscus* sp. type 5) (Xu *et al.*, 2016; Leynse *et al.,* 2017). Par ailleurs, plusieurs travaux suggèrent que les cellules de *Gambierdiscus* sont capables de développer différents types de stratégies et/ou adaptations comportementales visant à les rendre plus tolérantes aux fortes luminosités, telles que la production de mucus, une plasticité accrue de la taille des cellules, des teneurs en chlorophylle variables, ou encore des phénomènes d'agrégation cellulaire (Indelicato & Watson, 1986; Villareal & Morton, 2002; Leynse *et al.,* 2017).

L'effet de l'éclairement sur la production de toxines de *Gambierdiscus* a également été étudié. Ainsi, chez *G. carpenteri,* la production toxinique apparait plus élevée dans des conditions de faible éclairement et diminue progressivement d'un facteur deux aux plus forts éclairements (Vacarizas *et al.*, 2018). Des résultats similaires sont observés chez d'autres dinoflagellés toxiques tels que *Pyrodinium* sp. chez qui une augmentation de la chlorophylle-a*,* suite à une augmentation de l'éclairement, s'accompagne d'une diminution de la production toxinique (Usup *et al.,* 1994). Toutefois, le lien entre la photosynthèse et les voies biochimiques de synthèse des toxines n'est toujours pas clairement établi.

C) Effets de la salinité sur la croissance et la production toxinique de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa*

Dans le milieu naturel*, Gambierdiscus* montre une préférence marquée pour les environnements dont la salinité est comprise entre 28 et 35 (Parsons *et al.,* 2012; Litaker *et al.*, 2010; Kibler *et al.*, 2012). Toutefois, cette micro-algue est également capable de se développer dans des zones à la salinité très contrastée, telles que les estuaires (Delgado *et al.,* 2006) ou, à l'inverse, des milieux de type mangroves où la salinité dépasse régulièrement 40 (Taylor & Gustavson, 1986).

En laboratoire, Vacarizas *et al.*, 2018 ont montré que les cultures de *G. carpenteri* pouvaient tolérer de larges variations de salinité (de 26 à 41), à l'instar des espèces *G. toxicus*, *G. australes* et *G. scabrosus* (Bomber *et al.*, 1988a; Yoshimatsu *et al.,* 2014). De même, selon Xu *et al.*, 2016, des espèces telles que *G. belizeanus*, *G. caribaeus* et *G. pacificus* sont capables de survivre et de se développer dans des gammes de salinité variant de 20 à 50, ce qui expliquerait leur large distribution géographique, alors que les espèces *G. silvae*, *Gambierdiscus* sp. type 4 et *Gambierdiscus* sp. type 5 montrent des seuils de tolérance plus restreints (croissance à des salinités comprises entre 30 et 40). L'ensemble de ces observations suggère l'existence d'une variabilité interspécifique dans les réponses de *Gambierdiscus* à la variable salinité.

S'agissant de l'influence de la salinité sur la toxicité de *Gambierdiscus*, Vacarizas *et al.*, 2018 ont montré que chez une souche de *G. carpenteri* originaire des Philippines soumise à des salinités variant de 26 et 41, la production de CTX était optimale à la salinité la plus basse, puis diminuait progressivement au fur et à mesure de l'augmentation de la salinité dans le milieu de culture. Une autre étude réalisée sur une souche de *G. toxicus* originaire du Vietnam indique que différentes conditions de salinités (*i.e.* 30, 32 et 35) ont un effet direct sur le profil toxinique de cette souche, notamment au niveau de l'abondance relative du congénère majoritaire (Roeder *et al.*, 2010). Cependant, l'absence d'analyses sur des standards ne permet pas d'affirmer si, dans cette étude, certains des composés majoritaires appartiennent véritablement à la famille des CTX ou plutôt à celle des MTX ou des gambiérones.

Quoi qu'il en soit, les raisons exactes de la baisse de toxicité observée chez *Gambierdiscus* en réponse à de fortes salinités ne sont pas encore bien connues. Selon Errera & Campbell, 2011, une explication possible pourrait être liée à la capacité des CTX (de par leur action sur les CSDP) à affecter l'osmorégulation au niveau des cellules. Ainsi, des concentrations intracellulaires en CTX (trop) élevées chez *Gambierdiscus* le rendraient *de facto* moins tolérant aux fortes valeurs de salinités.

D) Effets des nutriments sur la croissance et la production toxinique de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa*

Dans les îles Vierges américaines, Carlson & Tindall, 1985 et Loeffler *et al.*, 2015 ont observé une corrélation positive entre les concentrations de nutriments et l'abondance de *Gambierdiscus.* A l'inverse, aucune corrélation directe n'a été trouvée entre l'accroissement des concentrations en nutriments et les densités cellulaires de la micro-algue en Polynésie française et à Hawaii (Yasumoto *et al.*, 1980; Ichinotsubo *et al.*, 1994; Parsons & Preskitt, 2007). Ces résultats contradictoires suggèrent que les apports de nutriments dans les environnements côtiers ne conduisent pas nécessairement à des efflorescences de *Gambierdiscus*. Cependant, selon Skinner *et al.*, 2013, dans les zones côtières exposées à d'importants apports de nutriments, un changement dans la distribution et l'abondance des populations de dinoflagellés peut tout de même être observé. Ainsi, dans plusieurs localités du littoral australien touchées par des phénomènes d'eutrophisation, ces auteurs ont noté que les assemblages benthiques autrefois dominés par *Gambierdiscus* étaient désormais principalement composés de *Prorocentrum* et *Ostreopsis*, alors que *Gambierdiscus* demeure le taxon dominant dans les zones situées plus au large.

L'effet des nutriments sur la croissance *in vitro* de *Gambierdiscus* sp. n'a fait l'objet que d'un nombre limité d'investigations (Sperr & Doucette, 1996; Lartigue *et al.*, 2009) qui ont toutes conclu à l'existence de réponses très variables selon les souches considérées. Il est intéressant de noter que ces études ont été réalisées à une époque où la taxonomie du genre *Gambierdiscus* n'était pas encore complètement résolue, ce qui pose la question de la part imputable à l'espèce d'appartenance des souches dans les variabilités observées.

De même, peu d'études se sont intéressées à l'effet des nutriments sur la production toxinique chez *Gambierdiscus*. D'après Okolodkov *et al.*, 2014, les flux de CTX observés dans les réseaux trophiques de la péninsule du Yucatan au Mexique sont plus importants dans les environnements où les concentrations en nutriments sont les plus élevées. En conditions de laboratoire, en revanche, aucun effet significatif du ratio azote/phosphore (N:P) n'a été observé sur la toxicité de souches identifiées à l'époque comme appartenant à l'espèce unique *G. toxicus* (Sperr & Doucette, 1996). De même, Lartigue *et al.*, 2009 ont conclu à l'absence d'effets de différentes sources d'azote (*e.g.* nitrates, ammonium, urée, putrescine et un mélange d'acides aminés) sur la toxicité de deux souches de *G. toxicus,* qui, par la suite, se sont avérées appartenir aux espèces *G. caribaeus* et *Gambierdiscus* ribotype 2.

E) Effets des paramètres biotiques sur la croissance et la production toxinique de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa*

D'autres paramètres directement en lien avec les habitats où les populations de *Gambierdiscus* sont préférentiellement observées et susceptibles d'influencer l'abondance de ce dinoflagellé, tels que la nature des macro-algues hôtes, ou la présence concomittante d'autres organismes dans les assemblages benthiques à *Gambierdiscus*.

De nombreuses études soulignent en effet une préférence marquée de *Gambierdiscus* pour certains types/espèces de substrats macrophytaires (voir Cruz-Rivera & Villareal, 2006 et Parsons *et al.,* 2012 pour une revue; Rains & Parsons, 2015; Sparrow & Heimann, 2016; Boisnoir *et al.,* 2019; Díaz-Asencio *et al.,* 2019a), mais l'origine exacte de cette préférence demeure ambigüe. Plusieurs facteurs ont été évoqués, tels que la surface, la structure, l'espèce d'appartenance de ces macro-algues, ou encore l'intervention potentielle de composés chimiques aptes à stimuler la croissance de *Gambierdiscus*, présents dans les extraits macro-algaux ou libérés dans le micro-environnement formé par les thalles macrophytaires (voir Parsons *et al.,* 2012, pour revue; Mustapa *et al.,* 2019).

L'hypothèse d'une influence de la microflore bactérienne présente dans les assemblages à *Gambierdicus* ne doit pas non plus être écartée. En effet, Wang *et al.,* 2018 ont montré qu'en conditions *in vitro*, la croissance de *Gambierdiscus* spp. était favorisée en présence de certaines bactéries (*e.g. Bacillus anthracis).* Selon ces auteurs, ces résultats pourraient s'expliquer par des mécanismes de type *quorum sensing*, sous la forme d'un apport en nutriments ou via l'intervention de substances bioactives. Ces auteurs indiquent également que la production toxinique globale de *Gambierdiscus* spp. est négativement ou positivement impactée, en fonction des espèces de bactéries co-cultivées avec la micro-algue (Wang *et al.,* 2018).

Par ailleurs, Nakada *et al.,* 2018 ont également signalé l'existence d'une compétition entre certaines espèces de diatomées pennées et *Gambierdiscus,* en mer du Japon. Ces observations rejoignent celles de Sparrow *et al.*, 2017 qui rapportent des variations positives ou négatives dans les taux de croissance de *Gambierdiscus* lorsque cette micro-algue est maintenue en co-cultures avec d'autres groupes de dinoflagellés (*e.g. Ostreopsis*, *Prorocentrum lima*), suggérant l'intervention de phénomènes d'allélopathie (*cf.* section I pp 29-31). En tout état de cause, ces relations micro-algue/bactérie et micro-algue/macro-algue qui demeurent globalement peu documentées nécessitent de plus amples investigations.

En conclusion, la présente revue bibliographique souligne le caractère encore très parcellaire de nos connaissances sur les effets des paramètres-clés les plus caractéristiques du changement global tels que la température (réchauffement climatique), le pH (acidification des océans) ou la source/disponibilité en nutriments (eutrophisation de l'environnement), sur la distribution biogéographique et la toxinogenèse de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa*. En tout état de cause, l'existence évidente de variabilités intra- et inter-spécifiques dans les réponses de ces dinoflagellés ciguatérigènes à ces divers forçages nécessitent d'approfondir les recherches sur l'écotoxicologie de ces organismes, et plus particulièrement sur l'espèce la plus toxique décrite à ce jour, *G. polynesiensis*.

CHAPITRE II: Détection des ciguatoxines chez *G. polynesiensis* au moyen de trois méthodes d'analyse: CBA-N2a, RBA-F et LC-MS/MS

I - Introduction

Bien que la ciguatéra soit connue depuis des siècles dans les régions tropicales du globe (*cf.* p 34), les CTX sont considérées comme des toxines marines émergentes en Europe et, à l'instar de la palytoxine et de ses dérivés, des spirolides, des gymnodimines et des pinnatoxines, ne font toujours l'objet d'aucune règlementation (UE, 2019). Cette situation s'explique principalement par:

- l'absence d'une méthode de détection de référence, dument validée à l'échelle internationale,
- l'absence de seuils règlementaires clairement définis,
- la faible disponibilité en étalons certifiés, qu'il s'agisse de standards purs de CTX ou de matrices biologiques pré-dosées contenant des CTX (témoin positif) ou dépourvues de toxines (témoin négatif). Ces matériaux de référence sont en effet indispensables aux études visant à la validation intra- et inter-laboratoire des méthodes d'analyse classiquement utilisées pour la détection et la quantification des CTX dans les produits de la mer (Caillaud *et al.*, 2010; Rodriguez *et al.*, 2017; Estevez *et al.*, 2019b).

S'agissant des brévétoxines, autre famille de toxines marines déjà règlementées aux Etat-Unis, en Nouvelle-Zélande et en Australie, mais non encore règlementées à l'échelle communautaire, seule une étude inter-laboratoire a été réalisée jusqu'à présent dont l'objectif était d'évaluer les performances du CBA-N2a, du RBA-R (deux formats différents), d'un test Elisa et de la LC-MS/MS (Dickey *et al.*, 2004).

Quelle que soit la méthode de détection retenue, celle-ci doit remplir plusieurs critères:

- Une spécificité élevée, permettant de garantir que le signal mesuré est bien lié à l'espèce chimique ou famille de composés recherchée, et non aux effets non-spécifiques occasionnés par l'utilisation de tel ou tel solvant, ou par la matrice biologique des échantillons.
- Une sensibilité élevée, permettant de détecter la présence des toxines ciblées même à partir d'une petite quantité de matériel biologique. Pour cela, les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) du test devront être en adéquation avec les valeurs seuils recommandées ou réglementaires.
- Une bonne répétabilité et reproductibilité, permettant d'obtenir, pour un même échantillon, des résultats identiques lorsque la mesure est effectuée plusieurs fois par un même manipulateur (répétabilité), ou par d'autres laboratoires (reproductibilité).

Historiquement, le bioessai sur souris a longtemps été la méthode de référence recommandée pour les CTX, ainsi que pour plusieurs autres familles de toxines lipophiles (Banner *et al.*, 1960; Hoffman *et al.*, 1983; Leonardo *et al.*, 2020; Pasinszki *et al.*, 2020). Cependant, depuis 2015, l'Europe (UE, 2019) recommande de le remplacer par la HPLC-MS/MS pour les toxines liposolubles (Daneshian *et al.*, 2013; Nicolas *et al.*, 2014). Il existe également plusieurs méthodes alternatives (décrites en détail au chapitre I, section IV cf. pp 57-64), qui peuvent être appliquées seules, ou de façon complémentaire de manière à combiner les atouts d'au moins deux méthodes de détection pour une plus grande fiabilité des résultats. Actuellement, l'approche la plus communément utilisée est de procéder au criblage des échantillons à l'aide d'une méthode biologique fonctionnelle mesurant la **toxicité composite** dans ces échantillons, suivie de la confirmation de la présence de composés de type CTX dans les échantillons positifs au moyen d'une méthode chimique analytique. Plusieurs études de terrain ont ainsi démontré la pertinence de cette approche lorsqu'appliquée à la détection des CTX dans la colonne d'eau (via l'utilisation de dispositifs capables d'adsorber les toxines lipophiles dissoutes circulantes) (Roué *et al.*, 2020), dans la chair d'invertébrés (Roué *et al.*, 2018b; Darius *et al.*, 2018a,b) ou de poissons (Dechraoui-Bottein *et al.*, 2005; Bienfang *et al.*, 2008b; Wu *et al.*, 2011; Robertson *et al.*, 2014; Hossen *et al.*, 2015; Kulsawat *et al.*, 2018; Estevez *et al.*, 2019b; Chinain *et al.*, 2020c), ainsi qu'en laboratoire dans des extraits de cultures de *Gambierdiscus* (Chinain *et al.*, 2010a).

Parmi les tests fonctionnels existants, deux méthodes en particulier, *i.e.* le CBA-N2a et le RBA, ont retenu notre attention, en raison de leur sensibilité/spécificité, leur capacité à cribler les CTX selon un

format haut débit (high-throughput screening) ainsi que pour leur applicabilité à divers types de matrices biologiques (algues, cyanobactéries, chairs d'invertébrés et de poisson, sang, *etc*).

Le CBA-N2a a été appliqué à la fois à la détection de CTX pures (Dechraoui *et al.,* 1999; Dechraoui-Bottein *et al.*, 2005; Pawlowiez *et al.,* 2013; Darius *et al.,* 2018a,b) et à celle d'analogues algaux de CTX dans des cellules de *Gambierdiscus* sauvages ou cultivées en laboratoire (Pawlowiez *et al.,* 2013; Xu *et al.*, 2014; Roué *et al.,* 2016; Pisapia *et al.,* 2017a; Litaker *et al.,* 2017; Dai *et al.,* 2017; Reverté *et al.,* 2018; Darius *et al.,* 2018a,b). Cette méthode a de plus permis de montrer la présence de molécules au mode d'action similaire à celui des CTX dans des cyanobactéries marines (Laurent *et al.,* 2008; Kerbrat *et al.,* 2011; Laurent *et al.,* 2012). Elle est également bien adaptée à la détection et quantification de CTX dans des matrices biologiques plus complexes telles que les chairs de poissons (Wu *et al.*, 2011; Chan *et al.,* 2011; Jiang *et al.*, 2012; Darius *et al.,* 2013; Pawlowiez *et al.,* 2013; Hossen *et al.*, 2015; Soliño *et al.*, 2015; Diogène *et al.,* 2017; Sanchez-Henao *et al.,* 2019; Viallon *et al.,* 2020) et d'invertébrés marins (Mak *et al.,* 2013; Pawlowiez *et al.,* 2013; Roué *et al.,* 2016, 2018b; Darius *et al.,* 2018a,b), ainsi que dans le sang de rongeurs (Dechraoui-Bottein *et al.*, 2005) et de poissons (Clausing *et al.,* 2018). A noter que le CBA-N2a a aussi été utilisé, avec succès, pour rechercher des CTX adsorbées sur des dispositifs passifs de surveillance des biotoxines marines (filtres SPATT) (Roué *et al.*, 2018a,c).

Le RBA a été appliqué dans sa version radioactive (RBA-R) à la détection de CTX dans des extraits de cellules de *Gambierdiscus* sauvages ou cultivées en laboratoire (Darius *et al.,* 2007; Chinain *et al.,* 2010; Vacarizas *et al.*, 2018), de cyanobactéries marines (Laurent *et al.,* 2008; Kerbrat *et al.,* 2011; Laurent *et al.,* 2012) ainsi que de matrices biologiques plus complexes comme le foie et la chair de poissons (Darius *et al.,* 2007; Chinain *et al.,* 2010b; Reguera *et al.*, 2011; Darius *et al.,* 2013; Gaboriau *et al.,* 2014; Clausing *et al.,* 2018) ou d'invertébrés marins (Laurent *et al.,* 2008, 2012). Dans sa version fluorescente (RBA-F), le RBA n'a été appliqué, pour l'instant, qu'aux chairs de poissons des Caraïbes (Hardison *et al.*, 2016, 2018).

La LC-MS/MS a également été appliquée dans la recherche de CTX dans différentes matrices telles que des cellules de *Gambierdiscus/Fukuyoa* (voir Chinain *et al.*, 2020b pour une revue; Estevez *et al.*, 2020b), des poissons (*cf.* Tableau 4 p 51 pour références sur les P-CTX; Hamilton et al., 2002; voir Kryuchkov *et al.*, 2020 et Estevez *et al.*, 2020a,b pour références sur les C-CTX; Oshiro *et al.*, 2021) ou invertébrés marins (Mak *et al.*, 2013; Darius *et al.*, 2018a, b), dans le sang de mammifères (Dechraoui-Bottein *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2020) ou même à partir de dispositifs SPATT (Caillaud *et al.*, 2011; Roué *et al.*, 2018c, 2020).

L'objectif de ce chapitre méthodologique est de comparer les performances de trois tests, *i.e.* le CBA-N2a, le RBA-F et la LC-MS/MS vis-à-vis de la détection des CTX dans des extraits purifiés de *G. polynesiensis*. Pour le CBA-N2a et la LC-MS/MS, les protocoles utilisés sont ceux ayant fait l'objet de travaux d'optimisation par Viallon *et al.,* 2020 et Sibat *et al.,* 2018, respectivement. En revanche, l'application, pour la première fois, de la méthode RBA-F à la matrice *Gambierdiscus* constitue l'une des originalités de cette thèse. Cette étude fait l'objet d'un article en cours de rédaction.

II - Matériels et Méthodes

A) Sélection des échantillons

Au total, 30 extraits purifiés provenant de quatre clones de *G. polynesiensis* cultivés dans différentes conditions de pH et de ratio N:P ont été analysés (Tableau 6). Ces échantillons ont été sélectionnés parmi des extraits bruts dont la concentration en CTX avait été préalablement estimée par LC-MS/MS, avec les contraintes suivantes: (i) disposer de suffisamment de biomasse cellulaire pour permettre des analyses en triplicats au moyen de chacune des méthodes de détection ciblées, et (ii) la gamme de toxicité couverte par ces 30 échantillons devait être la plus large possible. Ainsi, les 30 échantillons retenus correspondaient à des biomasses allant de 80 000 à 175 000 cellules, et une gamme de concentration en CTX comprise entre 0,47 et 4,23 pg eq. CTX3C.cell^{-1} (Tableau 6).

B) Purification des extraits bruts

Le même protocole d'extraction a été appliqué aux extraits destinés aux analyses via les tests fonctionnels (CBA-N2a, RBA-F) *vs.* la méthode chimique (LC-MS/MS), pour limiter d'éventuels biais de quantification liés à l'utilisation de protocoles différents ayant une efficacité et un rendement d'extraction variables (Harwood *et al.*, 2017). Pour ce faire, des culots cellulaires issus de cultures de chaque clone de *Gambierdiscus* (Tableau 6) ont été lyophilisés puis extraits dans du méthanol absolu (MeOH) puis du méthanol aqueux (MeOH:H_2O 1:1), sous ultrasons, selon la méthode décrite dans Chinain *et al.*, 2010b. Les extraits bruts ainsi obtenus ont ensuite été purifiés à l'aide d'un partage liquide-liquide au dichlorométhane (CH_2Cl_2) et méthanol aqueux (MeOH:H_2O 3:2) qui permet de séparer les composés liposolubles (*e.g.* les CTX) des composés hydrosolubles (*e.g.* les MTX), ces derniers étant susceptibles d'interférer dans les mesures de viabilité cellulaire par CBA-N2a. A l'issue, la fraction liposoluble (phase CH_2Cl_2) a été récupérée puis partagée en trois aliquots correspondant à un équivalent de 1 000 cellules pour le test CBA-N2a, 20 000 cellules pour l'analyse par LC-MS/MS, et la biomasse restante pour le test RBA-F.

Tableau 6: Liste des 30 extraits bruts de G. polynesiensis retenus pour cette étude avec les conditions de culture appliquées, les biomasses obtenues après récolte et la concentration en CTX estimée par LC-MS/MS.

Code	Biomasse cellulaire	Concentrations de l'extrait brut en CTXs (pg.cellule^{-1})	Clone	Conditions de culture			
				Source d'azote	Ratio azote/phosphore	Age de la culture (jour)	pH
SLO - 1	79 772	0,47	RG92	urée	50	21	8,2
SLO - 2	119 500	0,61	RG92	urée	50	30	8,2
SLO - 3	128 825	0,67	RG92	urée	50	30	8,2
SLO - 4	84 730	1,00	RIK7	urée	50	30	7,9
SLO - 5	80 216	1,20	RIK7	urée	50	30	7,9
SLO - 6	112 161	1,22	RIK7	urée	50	21	8,4
SLO - 7	106 722	1,35	RIK7	urée	50	21	8,4
SLO - 8	84 075	1,67	RIK7	urée	24	30	8,4
SLO - 9	84 059	1,73	RIK7	urée	50	21	8,2
SLO - 10	94 966	1,76	RAI-1	urée	50	30	7,9
SLO - 11	98 725	1,76	RAI-1	urée	50	30	8,2
SLO - 12	81 597	1,94	RAI-1	urée	50	30	7,9
SLO - 13	92 316	1,94	RIK7	urée	50	21	8,2
SLO - 14	118 625	1,96	RIK7	urée	24	30	8,4
SLO - 15	98 122	1,96	RAI-1	urée	50	21	8,4
SLO - 16	137 700	2,02	RAI-1	urée	50	30	8,4
SLO - 17	84 304	2,03	RAI-1	urée	50	21	8,4
SLO - 18	114 000	2,03	RIK7	urée	50	30	8,2
SLO - 19	133 650	2,10	RIK7	urée	50	30	8,4
SLO - 20	140 675	2,11	RIK7	urée	50	30	8,2
SLO - 21	117 825	2,23	RAI-1	urée	50	30	8,2
SLO - 22	127 775	2,33	RIK7	urée	50	30	8,4
SLO - 23	173 150	2,52	NHA4	urée	50	30	8,4
SLO - 24	127 400	2,53	RAI-1	urée	50	30	8,4
SLO - 25	79 282	2,96	NHA4	urée	50	21	8,4
SLO - 26	115 825	3,20	NHA4	urée	50	30	8,4
SLO - 27	117 275	3,55	NHA4	urée	50	30	8,2
SLO - 28	133 625	3,55	NHA4	urée	50	30	8,2
SLO - 29	85 946	4,23	NHA4	urée	50	21	8,2
SLO - 30	94 643	4,23	NHA4	urée	50	21	8,2

C) Méthodes de détection

(i) Détection par le test de cytotoxicité sur neuroblastome (CBA-N2a)

Le modèle cellulaire le plus communément utilisé dans le CBA est celui des neuroblastomes de souris (N2a). Ces cellules possèdent en effet des CSDP au niveau de leur surface membranaire, mais ces derniers sont faiblement exprimés, ce qui explique la faible sensibilité des N2a aux toxines agissant sur les CSDP (LePage *et al.*, 2007). Pour cette raison, afin de mieux visualiser l'activité cytotoxique de cette famille de toxines, le CBA-N2a nécessite le recours à l'action combinée de deux potentialisateurs, l'ouabaïne (O), inhibiteur de la pompe sodium/potassium (Na^+/K^+), et la vératridine (V), qui induit l'activation permanente des CSDP (Catterall & Nirenberg, 1973). Ainsi, aucun effet cytotoxique n'est observé lorsque les CTX sont appliquées seules sur les cellules N2a en l'absence de traitement O/V (OV-). A l'inverse, en présence d'O/V (OV+), les CTX induisent une diminution dose-dépendante de la viabilité cellulaire (Manger *et al.,* 1993, 1995). Un autre avantage notable du CBA-N2a est sa grande modularité vis-à-vis de la détection d'une large gamme de familles toxiniques. En effet, grace à une adaptation du traitement à base d'O/V, le CBA-N2a peut être utilisé pour la détection de toxines telles que les saxitoxines (Viallon *et al.,* 2020), les pecténotoxines (PTX), l'acide okadaïque (AO) et les dinophysistoxines (DTX) (Cañete & Diogène, 2008). De même, après un pré-traitement des N2a avec de l'ouabaïne seule et le SK&F 96365, un inhibiteur des canaux Ca^{2+} (Merritt *et al.*, 1990), le CBA-N2a permet également de détecter respectivement les palytoxines (PLTX) et dérivés (Ledreux *et al.*, 2009, Pawlowiez *et al.,* 2013), et les MTX (Caillaud *et al.,* 2010). Outre les N2a, plusieurs autres lignées cellulaires ont également été testées en CBA dans le cadre d'études visant à améliorer ce test, telles que les cellules embryonnaires de rein humain (HEK) (Fairey *et al.*, 2001; Dechraoui-Bottein & Ramsdell, 2003; Neves *et al.*, 2020), les cellules de la lignée hybride neuroblastome/gliome (NG108-15) (Cañete & Diogène, 2008, 2010) ou encore la lignée cellulaire humaine SH-SY5Y (Lewis *et al.,* 2016; Coccini *et al.*, 2017; Larsson *et al.*, 2018; Neves *et al.,* 2020).

Le protocole-type du CBA-N2a comporte trois étapes successives (Manger *et al.,* 1993, 1995) (Figure 30): (i) l'ensemencement de cellules N2a dans une plaque de culture à 96 puits pendant 24 h afin d'obtenir des tapis cellulaires confluents; (ii) une étape d'incubation consistant à exposer les N2a aux toxines marines recherchées (sous la forme d'étalons purs ou d'extraits biologiques contaminés), en l'absence ou présence de traitement OV pendant 24 h pour les activateurs de CSDP (*e.g.* CTX); (iii) une étape de mesure de la viabilité cellulaire finale à l'aide d'un test colorimétrique (test MTT) qui repose sur la capacité des cellules viables à métaboliser le methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) en formazan de couleur pourpre.

Depuis la publication de ce protocole par Manger *et al.,* 1993, 1995, de multiples modifications ont été apportés à ce test, notamment au niveau des densités cellulaires ensemencées, les doses d'O/V appliquées, le temps d'incubation, *etc.*, générant autant de protocoles différents qu'il y a eu d'études, ce qui rend impossible toute tentative de comparaison des résultats entre laboratoires. C'est pourquoi Viallon *et al.,* 2020 ont récemment revisité ce test en évaluant l'influence de six paramètres-clés, tout en soulignant l'importance d'établir les témoins/contrôles *ad hoc* pour limiter les risques de réponses non spécifiques. A ce titre, cette étude constitue une première étape décisive vers la standardisation de ce test.

Dans le cadre de notre étude, les extraits cellulaires ont été dilués dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour obtenir une concentration de 400 cellules μL^{-1}. A partir de cette solution, une gamme de huit dilutions successives au ½ est réalisée dans du milieu de culture, en prenant soin d'obtenir des concentrations d'extraits adaptées à la toxicité des échantillons. Ainsi, les extraits les moins cytotoxiques sont préférentiellement testés à une gamme de concentrations finales allant de 0,039 à 5 équivalent cellules/puits, contre 0,008 à 1 équivalent cellule/puits pour les extraits les plus toxiques. Cette gamme de dilution est alors déposée (en triplicat) sur un tapis cellulaire de N2a ensemencé la veille à raison de 55 000 cellules N2a/puits, puis soumis à un traitement O/V « non destructeur » de 90 µM/9 µM. Après 24 h, la mesure de viabilité cellulaire s'effectue au bout de 45 min d'incubation en présence de MTT.

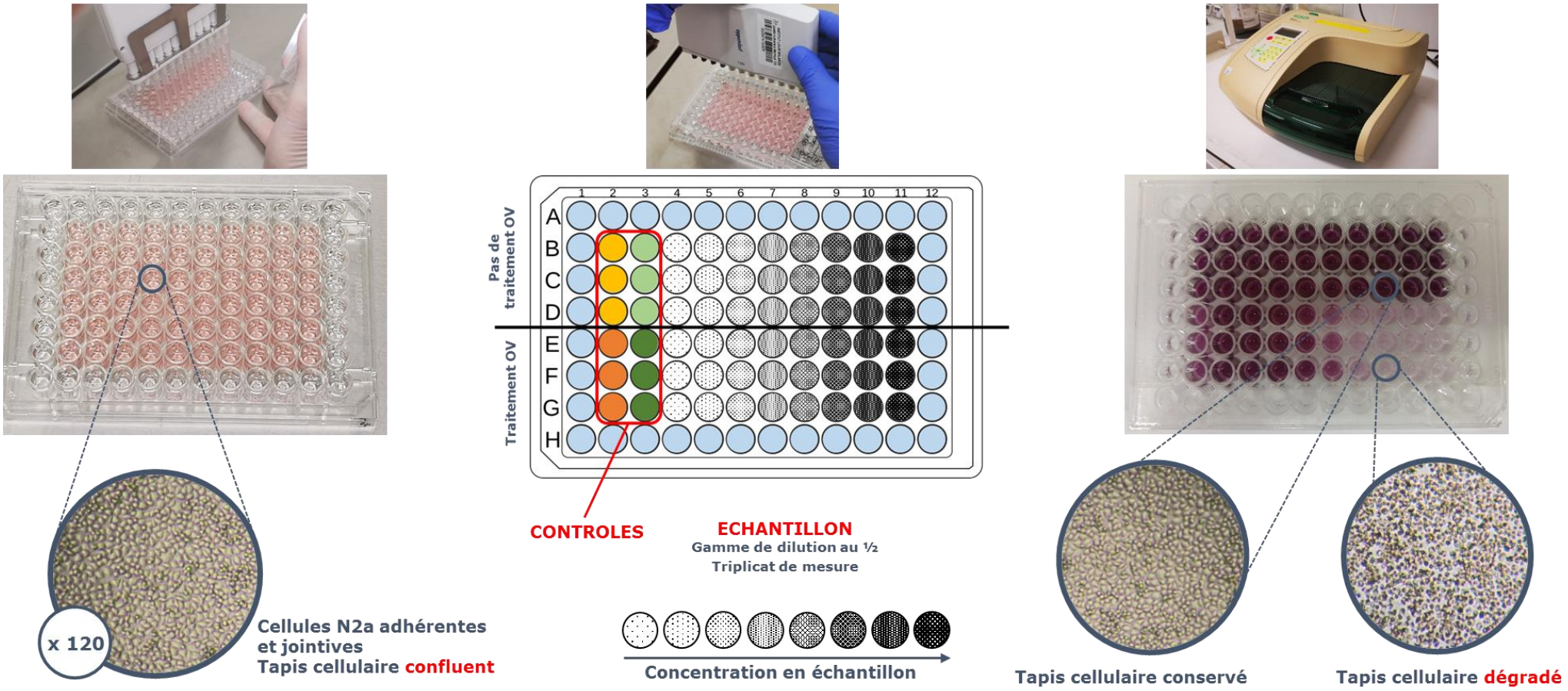


Figure 30: Illustration des différentes étapes du test fonctionnel CBA-N2a (©ILM).

La réponse type des CTX en CBA-N2a est une absence d'effet cytotoxique en condition OV- *vs.* une courbe sigmoïdale dose-dépendante en condition OV+ (Viallon *et al.*, 2020). Pour cette étude, en raison du grand nombre d'échantillons à traiter et du facteur de dilution appliqué (qui écarte tout risque de réponse non-spécifique au niveau des N2a), l'effet de la CTX3C et des extraits de *G. polynesiensis* a été évalué uniquement en condition OV+.

(ii) Détection par le test intéraction ligand-récepteur fluorimétrique (RBA-F)

Pour la réalisation des expériences de RBA-F, il est nécessaire de disposer de préparations membranaires riches en récepteurs CSDP ou synaptosomes, obtenues à partir de cerveaux de rats congelés, suivant le protocole de Dodd *et al.*, 1981. Le principe est de réaliser un gradient de sucrose qui permettra de séparer les différents organites des cellules nerveuses. Les cerveaux sont décongelés puis les hémisphères cérébraux sont broyés et homogénéisés dans un potter, dans une solution de sucrose à 0,32 M à partir d'un tampon phosphate (K_2HPO_4) à 0,005 M à pH 7,4. L'homogénat obtenu est centrifugé à 2 000 g pendant 10 min à 4 °C, et les surnageants centrifugés à très haute vitesse à 200 000 g pendant 50 min à 4 °C dans une solution de sucrose à 1,2 M. Seule l'interface est prélevée puis reprise dans une solution de sucrose à 0,8 M, avant d'être soumise à une nouvelle étape de centrifugation à 200 000 g pendant 50 min à 4 °C. Le culot ainsi obtenu contenant les synaptosomes est alors remis en suspension dans le tampon phosphate. La teneur en protéines, évaluée selon le protocole de Bradford, 1976, doit être comprise entre 10 et 20 mg ml^{-1}. Ces préparations de synaptosomes sont ensuite aliquotées et stockées à -80 °C pour garantir leur bonne conservation pendant une durée de six à douze mois.

Le protocole RBA-F se décline ensuite de la façon suivante: tout d'abord, une gamme de dilution au ½ des échantillons à tester est réalisée avec la solution tampon dans une microplaque 96 puits à fond rond. Techniquement, cela consiste à réaliser (i) huit points de gamme allant de 0,08 à 10 pg μL^{-1} pour le standard de CTX3C, et (ii) huit concentrations d'extraits de *G. polynesiensis* correspondant à un équivalent de 16 à 2 000 cellules mL^{-1}, ou 31 à 4 000 cellules mL^{-1} pour les extraits moins concentrés en CTX.

Dans une plaque 96 puits, 230 µL de tampon sont déposés puis 50 µL d'une solution à 1 nM de brévétoxine marquée au Bodipy, permettant de suivre la fluorescence mesurée en fin d'expérience. Dans ces puits, 20 µL d'échantillon sont déposés, chaque concentration étant testée en triplicat sur une même microplaque. Pour compléter le mélange réactionnel, 200 µL de la solution de synaptosomes sont rajoutés. Il est très important de respecter cet ordre de dépôt des différents « acteurs » de la réaction de compétition, *i.e.*, les compétiteurs en premiers et les synpatosomes en dernier. Si les synaptosomes sont déposés en premiers ou avant l'un des deux compétiteurs, la réaction de fixation serait quasi instantanée et irréversible, empêchant toute réaction de compétition. La plaque est ensuite couverte à l'abri de la lumière puis incubée à 37 °C pendant 30 min. Quelques minutes avant la fin de cette étape d'incubation, les puits d'une microplaque filtrante (96 puits) sont préalablement rincés par filtration avec 250 µL de tampon, puis 2 x 240 µL d'échantillon sont déposés en deux temps sur la microplaque (selon le schéma de plaque illustré à la Figure 31), puis filtrés. Enfin, les puits sont à nouveau rincés avec 2 x 250 µL de tampon. Cette étape de filtration permet d'éliminer la brévétoxine fluorescente et les CTX libres et de ne garder que les complexes « brévétoxine fluorescente/synaptosomes » et/ou « CTX/synaptosomes ». Sur chaque microplaque, les puits extérieurs sans mélange réactionnels permettront de définir le bruit de fond de fluorescence de la microplaque dont la valeur moyenne sera déduite des valeurs brutes mesurées pour les standards et les échantillons (Figure 31). De plus, plusieurs puits-contrôles ne contenant que le tampon, la brévétoxine marquée au Bodipy et les synaptosomes vont permettre de vérifier le bon déroulement de la réaction en mesurant le niveau maximal de fluorescence correspondant à la totalité de la brévétoxine fluorescente fixée sur les CSDP en l'absence de compétiteurs, *i.e.*, les CTX (Figure 31).

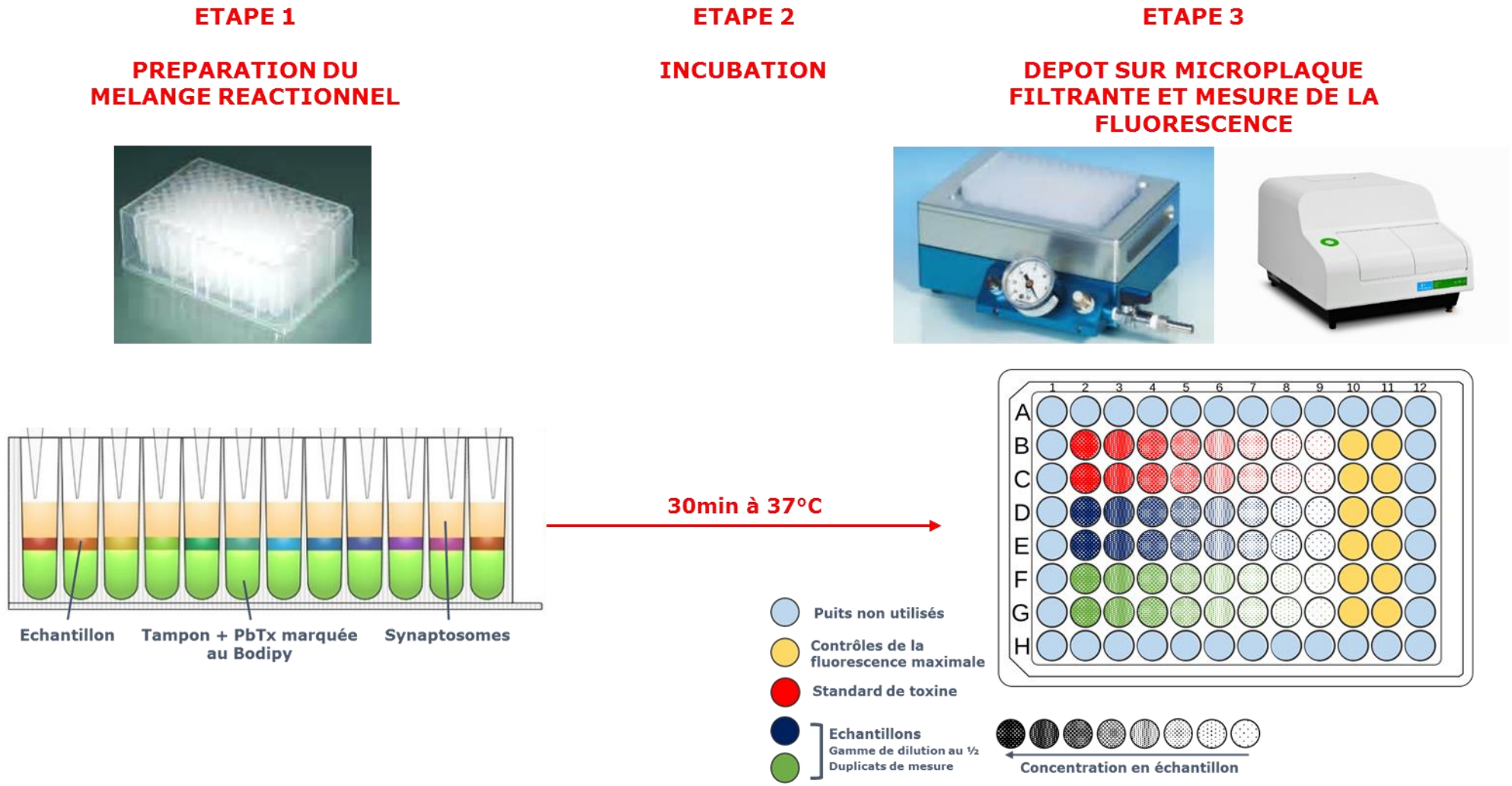


Figure 31: Illustration des différentes étapes du test biologique fonctionnel RBA-F (©ILM).

La fluorescence du bodipy émettant à une longueur d'onde de 520 nm est alors mesurée au moyen d'un spectrophotomètre doté d'un filtre d'émission 530/10 nm et d'un filtre d'excitation 500/8 nm (Victor X2, PerkinElmer, Etats-Unis). Les données sont exprimées en unités relatives de fluorescence (rfu). En pratique, plus la valeur de rfu est basse, plus la concentration en CTX dans les extraits est élevée. Le temps de mesure de la totalité de la plaque varie en général de 1 à 2 min.

Comme avec la méthode CBA-N2a (Figure 32-A), les résultats obtenus permettent de tracer une courbe dose-réponse selon le modèle 4PL four-logistic parameter (Prism v8.1.2. GraphPad, San Diego, Etats-Unis; Figure 32 B) qui permet de calculer la CE_{50} d'un échantillon, *i.e.* la concentration nécessaire pour obtenir 50 % de l'effet mesuré (soit une baisse de la viabilité cellulaire en CBA-N2a et une inhibition de la fluorescence en RBA-F).

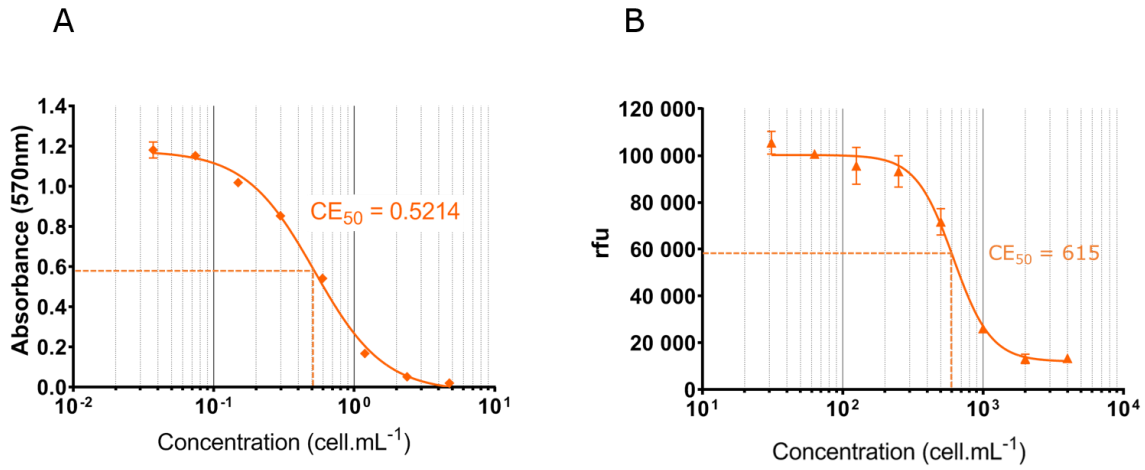


Figure 32: Exemples de courbes dose-réponse avec des concentrations croissantes d'extraits cellulaires permettant d'obtenir les valeurs CE_{50} par CBA-N2a (A) et RBA-F (B) dans un extrait purifié de G. polynesiensis (©ILM).

En utilisant la CE_{50} obtenue avec le standard de toxine, on peut alors estimer la concentration en CTX de l'échantillon grâce à la formule suivante:

$$\text{Concentration en toxine} = CE_{50\ \text{standard}} / CE_{50\ \text{échantillon}}$$

Les 30 échantillons ne pouvant être analysés en une seule fois, ces derniers ont été répartis de manière aléatoire dans deux lots de 15 échantillons, chaque lot d'échantillons étant testé en parallèle avec le standard CTX3C en trois expériences indépendantes (soit trois réplicats, *cf.* Figure 34, p 83).

(iii) Détection par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) basse résolution

La LC-MS/MS basse résolution est une méthode de détection chimique permettant de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse et analyse de leur spectre de fragmentation. Son principe réside dans (i) la sélection d'une molécule chargée d'intérêt (« ion parent ») sur la base de son rapport masse/charge (*m/z*), (ii) la fragmentation de cet ion « parent » en ions « fils », et (iii) l'analyse des rapports *m/z* des ions « fils » ainsi obtenus (*i.e.*, spectre de fragmentation). La quantification des composés d'intérêt est possible en utilisant le mode Multiple Reaction Monitoring (MRM) où un seul ion « fils » d'intérêt est sélectionné (en fonction de son rapport *m/z*) puis analysé (Figure 33).

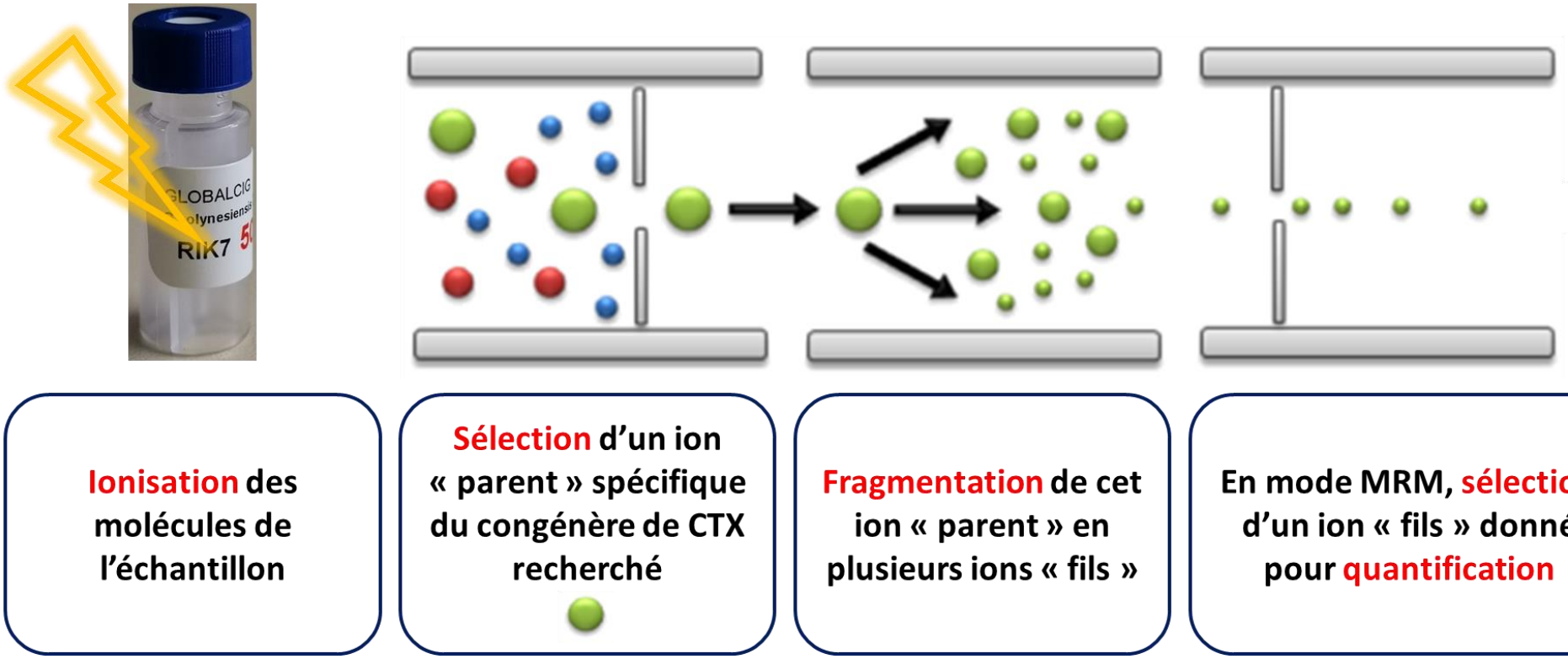


Figure 33: Schéma du fonctionnement de la LC-MS/MS basse résolution (©ILM)

L'ensemble des paramètres utilisés dans la recherche des P-CTX via cette méthode a été revisité par Sibat *et al.*, 2018 et le protocole ainsi optimisé a été appliqué dans notre étude (*cf.* p 144 pour une description complète du protocole). Les extraits secs ont été solubilisés avec 0,2 mL de méthanol avant d'être analysés par un système de chromatographie liquide ultra haute performance (UFLC Nexera, SHIMADZU, Japon) couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle (SCIEX, Redwood City, Etats-Unis) équipé d'une source d'ionisation de type ESI. La détection a été paramétrée avec un mode MRM pour une ionisation positive. Le Tableau 7 suivant récapitule les ions parents sélectionnés pour chaque congénère de CTX détecté dans les extraits purifiés ainsi que les transitions m/z associées.

Tableau 7: Liste des ions parents sélectionnés et des transitions m/z demandées pour chaque congénère de CTX recherchés dans les extraits de G. polynesiensis analysés par LC-MS/MS. A noter que quatre isomères de CTX3B/C (isomère (1-4)) peuvent être détectés par notre méthode mais que leur structure moléculaire exacte n'a pas encore été décrite.

Congénère	**Ion parent sélectionné**	**Transition *m/z* recherchée**
CTX3B, CTX3C et isomère (4)	$[M+NH_4]^+$ $[M+H]^+$	1040.6 → 1005.6 1023.6 → 1005.6 125.1
Isomères (1), (2) et (3) de CTX3B/C	$[M+NH_4]^+$ $[M+H]^+$	1040.6 → 1005.6 1023.6 → 1005.6 125.1
CTX4A et CTX4B	$[M+NH_4]^+$ $[M+H]^+$	1078.6 → 1043.6 1061.6 → 1043.6 125.1
M-*seco*-CTX3C	$[M+H]^+$	1041.6 → 1023.6 1005.6 125.1
2-OH-CTX3C	$[M+NH_4]^+$	1058.6 →1023.6 1005.6 125.1

A l'aide d'une gamme de dilution d'un standard de toxine utilisé comme étalon (*e.g.* la CTX3C), on peut donc estimer la quantité de toxines présentes dans l'échantillon en se basant sur l'aire des pics du chromatogramme obtenu (Figure 34), au moyen de l'équation suivante:

$$\text{Aire du pic} = [CTX]*A + B$$

avec A et B respectivement la pente et l'ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage du standard

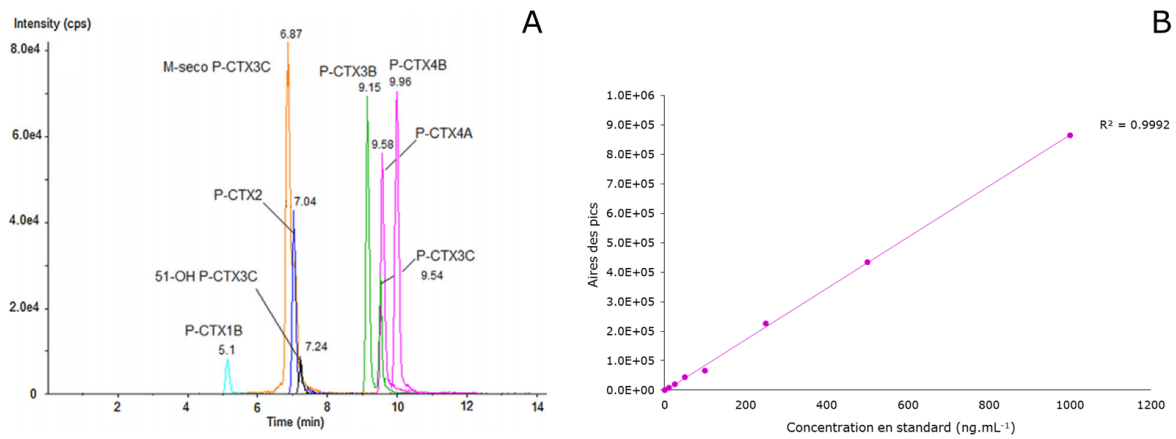


Figure 34 (d'après Sibat et al., 2018): Illustration (A) d'un chromatogramme obtenu lors de la recherche de P-CTX avec l'abondance des composés et leur temps de rétention (en min) par le système chromatographique; (B) une courbe d'étalonnage après analyse d'une gamme de dilution d'un standard de toxine. L'intensité des pics est exprimée en coups par seconde (cps) et leur aire en intensité relative (counts).

D) Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées au moyen du logiciel Prism v8.1.2. (GraphPad, San Diego, Etats-Unis). Pour chaque jeu de données obtenu, la normalité de la distribution des valeurs a été évaluée par le test de Shapiro-Wilk. Les CE_{50} et CE_{80} des méthodes fonctionnelles, *i.e.*, les concentrations nécessaires pour obtenir respectivement 50 % et 80 % du signal mesuré, ont été calculées grâce à la modélisation 4PL (*cf.* p 80). Dans le cas d'un standard de toxine pure, les CE_{50} et CE_{80} correspondent directement aux limites de quantification (LOQ) et de détection (LOD) des méthodes CBA-N2a et RBA-F. Grâce à la concentration maximale d'échantillon (ou CME, *i.e.*, la concentration maximale d'un échantillon pouvant être analysée sans entraîner de réponses non-spécifiques), les LOD et LOQ des tests pour la matrice *Gambierdiscus* ont été calculées à l'aide des relations suivantes:

$$LOD_{matrice} = CE_{80\ standard} / CME \qquad LOQ_{matrice} = CE_{50\ standard} / CME$$

Les LOD, LOQ, CE_{50} et CE_{80} obtenues pour chacune des trois méthodes de détection (*i.e.* CBA-N2A, RBA-F et LC-MS/MS) ont été comparées deux à deux en utilisant le test de Wilcoxon.

Afin d'évaluer la répétabilité des mesures par chaque méthode de détection, le standard CTX3C a été analysé en 7, 6 et 9 réplicats pour le RBA-F, CBA-N2a et LC-MS/MS, respectivement (chaque concentration étant testée en triplicat pour les deux tests fonctionnels et une seule fois en LC-MS/MS). Concernant la répétatiblité de quantification des extraits, chaque échantillon a été analysé en trois expériences indépendantes (chaque concentration d'extrait étant testée en triplicat, à l'exception de la LC-MS/MS où un seul réplicat par expérience a été analysé). Cela permet de déterminer l'écart-type (SD) et le coefficient de variation (CV = SD/Moyenne, en %) correspondant à chaque moyenne obtenue.

Les valeurs de quantifications obtenues par RBA-F, CBA-N2a et LC-MS/MS pour un extrait donné de *G. polynesiensis* puis sur l'ensemble des échantillons (n = 30) ont été utilisées pour comparer les méthodes deux à deux, au moyen du test de Wilcoxon. Un test de corrélation a été réalisé et lorsque la présence d'une corrélation était vérifiée ($p < 0,05$), une courbe ou droite de régression a été proposée.

III - Résultats et Discussions

A) Analyse du standard de CTX3C

A noter que le même lot de standard de CTX3C (issu de la banque de standards de l'ILM) a été utilisé pour les trois méthodes de dosage. Les courbes sigmoïdales dose-réponse typiques de l'activité des CTX obtenues pour le standard de CTX3C au moyen des tests fonctionnels RBA-F (R1-R7) et CBA-N2a (R1-R6) ainsi que les droites d'étalonnage obtenues par LC-MS/MS (R1-R9) sont illustrées à la Figure 35 A-C.

L'ensemble des paramètres issus de la modélisation 4PL pour les tests fonctionnels *i.e.*, les valeurs de fluorescence (RBA-F) ou d'absorbance (CBA-N2a) maximales et minimales, la pente de la courbe et les valeurs de CE_{80} et CE_{50} calculées à partir de chaque réplicat, est synthétisé au Tableau 8. Ce tableau donne également la pente et l'ordonnée à l'origine des droites d'étalonnage ainsi que les LOD et LOQ de la méthode chimique LC-MS/MS.

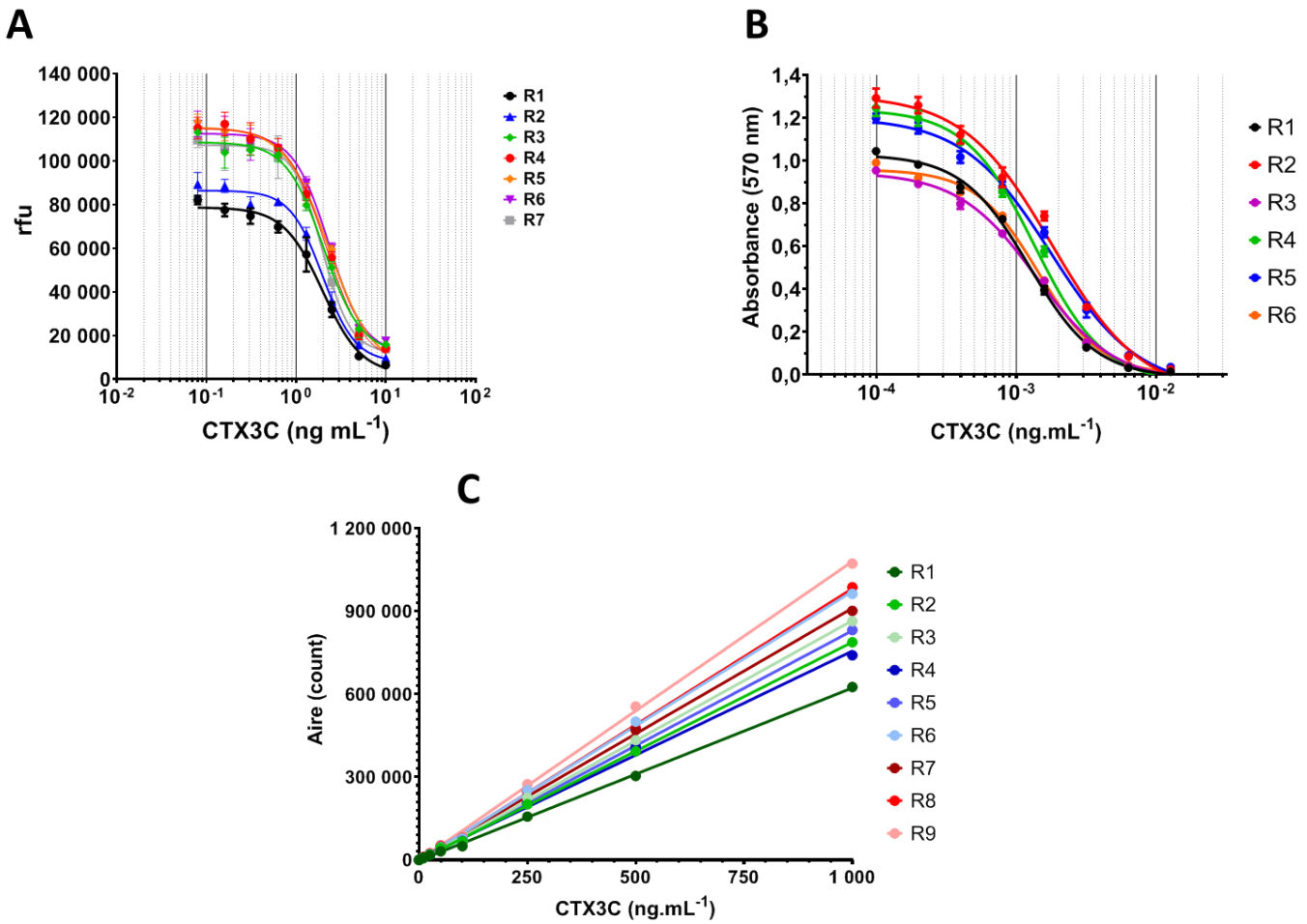


Figure 35: Analyses du standard CTX3C à l'aide de trois méthodes de détection. (A) RBA-F, courbes dose-réponse de la réaction de compétition entre des concentrations croissantes de CTX3C et la brévétoxine marquée au bodipy pour leurs récepteurs canaux sodium; (B) CBA-N2a, courbes dose réponse des cellules N2a lorsqu'elles sont exposées à des concentrations croissantes de CTX3C en condition OV+; et (C) LC-MS/MS, droites d'étalonnage obtenues après analyses d'une gamme de dilution du standard de CTX3C.

Tableau 8: Paramètres des courbes dose-réponses et droites d'étalonnage du standard de CTX3C obtenues via les trois méthodes de détection. Valeurs minimales (Min) / maximales (Max), moyennes ± écart-types, et coefficients de variation (CV) obtenus pour chacun des paramètres lorsque possible.

		Valeur maximale	Valeur minimale	Pente*	Ordonnée à l'origine	CE_{50} (=LOQ) ($ng.mL^{-1}$)	CE_{80} (= LOD) ($ng.mL^{-1}$)
RBA-F	**Min**	78 783	2 222	-2,72		1,95	0,99
	Max	115 513	12 138	-1,78		2,32	1,24
	Moyenne ± écart-type	103 475 ± 14 720	8 207 ± 3 837	-2,17 ± 0,31		2,10 ± 0,16	1,10 ± 0,08
	CV (%)	14,2	46,8	14,3		7,5	7,7
CBA-N2a	**Min**	0,95	-0,094	-1,93		$1,23.10^{-3}$	$5,7.10^{-4}$
	Max	1,31	-0,001	-1,36		$1,8.10^{-3}$	$7,01.10^{-4}$
	Moyenne ± écart-type	1,11 ± 0,16	-0,041 ± 0,034	-1,63 ± 0,24		$1,5.10^{-3}$ ± $2,3.10^{-4}$	$6,27.10^{-4}$ ± $5,12.10^{-5}$
	CV (%)	13,9	83	14,4		15,6	8,2
LC-MS/MS	**Min**	625 720	7 380	624,4	-3 917	12	6
	Max	1 072 300	11 468	1 082	3 100		
	Moyenne ± écart-type	863 621 ± 136 240	8 583 ± 1 483	868,4 ± 138,1	-1 121 ± 2 373		
	CV (%)	15,8	17,3	15,9	211,7		

Valeurs maximales et minimales exprimées en rfu pour la méthode RBA-F, en valeur d'absorbance pour le CBA-N2a, et en count pour l'aire des pics en LC-MS/MS

* Pente déterminée d'après l'équation de Hill pour les tests fonctionnels et d'après l'équation y = ax + b pour la LC-MS/MS

On note que malgré des variations parfois importantes des valeurs minimales de fluorescence (Tableau 8), ces dernières n'ont au final que très peu d'influence sur la détermination des valeurs de CE_{80} et CE_{50} de la CTX3C pour lesquelles les CV observés sont respectivement de 7,7 % et 7,5 % en moyenne sur les 7 réplicats (Tableau 8), ce qui souligne la bonne répétabilité du RBA-F lorsque ce test est appliqué à la toxine pure.

Pour les données de CBA-N2a, on note également une bonne répétabilité du CBA-N2a (CV de 15,6 % pour les valeurs de CE_{50}) dans la présente étude, à l'instar des résultats de Viallon *et al.*, 2020. Les valeurs de CE_{50} pour la CTX3C concordent avec les résultats d'études récentes (Hardison *et al.*, 2016; Pisapia *et al.*, 2017a; Loeffler *et al.*, 2021) mais diffère parfois d'un facteur 3 avec d'autres études comme celle de Dechraoui-Bottein *et al.*, 2007 qui indique une CE_{50} de 0,57 ± 0,11.10^{-3} ng mL^{-1}. Toutefois, la diversité des protocoles CBA-N2a appliqués dans ces études ainsi que l'absence d'informations sur l'origine des standards utilisés, rendent toute comparaison délicate. Seuls Pisapia *et al.*, 2017a donnent une CE_{80} de la CTX3C à 0,197 ng.mL^{-1}, soit une valeur 300 fois plus élevée que dans la présente étude. Litaker *et al.*, 2017 donnent, quant à eux, une LOD à 0,2 pg CTX3C eq. mL^{-1} ce qui est environ trois fois plus sensible que la LOD de cette étude.

Si l'on se base sur les valeurs de LOD et LOQ des trois méthodes évaluées vis-à-vis du standard de CTX3C, le CBA-N2a s'avère respectivement 10 000 fois et 1 500 fois plus sensible que la LC-MS/MS et le RBA-F, ce dernier étant six fois plus sensible que la LC-MS/MS (Tableau 8). Cependant, le RBA-F reste la méthode la plus consommatrice en standard puisqu'au minimum 40 ng de CTX3C sont nécessaires pour obtenir une courbe dose-réponse complète alors que la LC-MS/MS nécessite environ trois fois moins de standard (*i.e.*, 12 ng), et le CBA-N2a 500 fois moins (*i.e.*, 80 pg) (Viallon *et al.*, 2020).

L'uniformisation des protocoles et la conduite d'études inter-laboratoires complémentaires permettraient d'évaluer la reproductibilité de ces méthodes vis-à-vis de la détection des CTX. Mais pour l'heure, seul le CBA-N2a a fait l'objet d'une étude collaborative entre cinq laboratoires dans le cadre de la détection de trois familles de toxines lipophiles: les azaspiracides, les pecténotoxines et l'acide okadaïque (Ledreux *et al.*, 2012; Sérandour *et al.*, 2012). A noter que dans cette étude collaborative, en raison du mode d'action différent de ces toxines par rapport aux CTX, le CBA a été testé dans un format different où aucun traitement OV n'a été appliqué sur les lignées cellulaires.

B) Analyse des extraits de *G. polynesiensis*

Les quantités de CTX présentes dans les 30 extraits de *G. polynesiensis* ont également été estimées au moyen des trois méthodes évaluées. La Figure 36 A-C ci-après présente les courbes dose-réponse typiques de l'activité des CTX obtenues en RBA-F et CBA-N2a, ainsi que les résultats de LC-MS/MS pour l'extrait SLO-20, une souche de toxicité « intermédiaire ». Les données relatives aux 30 extraits testés sont résumées au Tableau 9 suivant. A noter que les profils toxiniques obtenus par LC-MS/MS étaient quasiment identiques entre les 30 échantillons et sont détaillés dans le chapitre IV (*cf.* pp 132, 135-138).

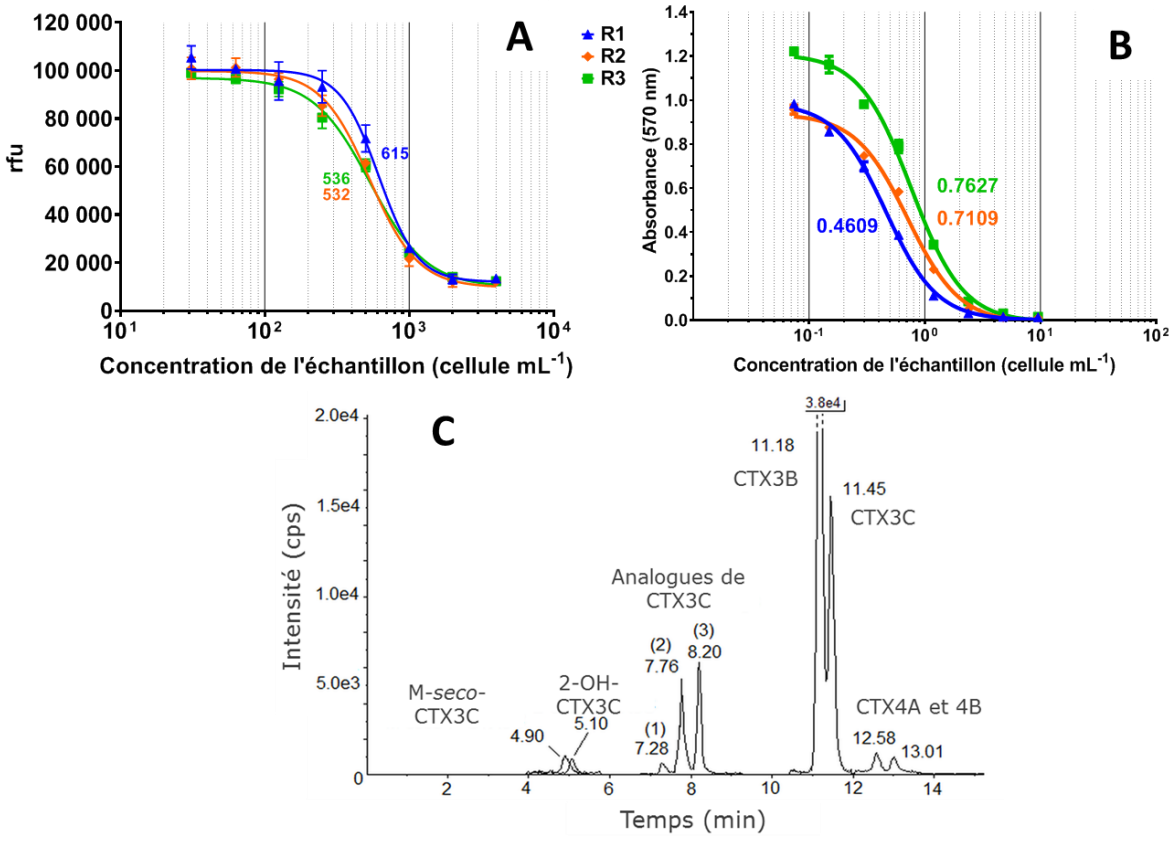


Figure 36: (A et B) Courbes dose-réponse et valeurs de CE_{50} obtenues pour l'extrait SLO-20 analysé en trois expériences indépendantes (R1-3) (chaque concentration d'extrait testée en triplicat) par (A) RBA-F, et (B) CBA-N2a en condition OV+. (C) Chromatogramme des différents congénères de CTX présents dans l'échantillon SLO-20 analysé par LC-MS/MS.

Les concentrations en CTX trouvées dans les extraits de *G. polynesiensis* varient de 1,10 ± 0,15 à 8,27 ± 0,68 pg CTX3C eq. cellule^{-1} en RBA-F, de 0,68 ± 0,03 à 9,72 ± 1,64 en CBA-N2a, et de 1,11 ± 0,17 à 8,36 ± 0,54 en LC-MS/MS (Tableau 9).

Tableau 9: Synthèse des quantifications moyenne obtenues (en pg CTX3C eq. cellule^{-1}), des coefficients de variation (CV), de la CME et des LOD et LOQ calculés au moyen des méthodes CBA-N2a, RBA-F et LC-MS/MS (n = 3).

Code échantillon	CBA-N2a		RBA-F		LC-MS/MS	
	Moyenne ± écart-type	CV (%)	Moyenne ± écart-type	CV (%)	Moyenne ± écart-type	CV (%)
SLO - 1	0,68 ± 0,09	13,6	2,04 ± 1,40	68,6	1,12 ± 0,05	4,4
SLO - 2	0,68 ± 0,03	4,3	1,10 ± 0,15	14,0	1,11 ± 0,17	15,8
SLO - 3	0,75 ± 0,10	13,8	1,64 ± 0,17	10,2	1,29 ± 0,04	2,9
SLO - 4	2,03 ± 0,12	6,1	4,36 ± 0,14	3,3	2,83 ± 0,32	11,2
SLO - 5	2,19 ± 0,30	13,6	4,54 ± 0,48	10,7	3,22 ± 0,17	5,2
SLO - 6	2,03 ± 0,35	17,4	2,88 ± 0,23	8,0	2,38 ± 0,06	2,5
SLO - 7	1,10 ± 0,24	22,2	2,14 ± 0,13	6,2	1,92 ± 0,05	2,6
SLO - 8	2,53 ± 0,54	21,3	4,70 ± 0,18	3,9	4,96 ± 0,53	10,7
SLO - 9	2,14 ± 0,17	8,0	1,89 ± 0,31	16,2	3,20 ± 0,15	4,7
SLO - 10	2,44 ± 0,48	19,7	4,90 ± 0,10	2,0	3,86 ± 0,04	1,1
SLO - 11	2,57 ± 0,31	12,2	4,92 ± 0,66	13,3	3,37 ± 0,10	3,0
SLO - 12	2,47 ± 0,53	21,6	5,73 ± 0,73	12,7	3,96 ± 0,25	6,3
SLO - 13	2,34 ± 0,32	13,7	5,56 ± 0,64	11,4	4,21 ± 0,23	5,6
SLO - 14	3,39 ± 0,91	27,0	5,19 ± 0,21	4,0	5,30 ± 0,54	10,2
SLO - 15	3,55 ± 0,16	4,6	4,88 ± 0,50	10,3	5,22 ± 0,27	5,1
SLO - 16	3,00 ± 0,24	8,0	5,60 ± 0,35	6,3	5,69 ± 0,55	9,6
SLO - 17	2,70 ± 0,35	13,1	5,53 ± 2,12	38,3	2,67 ± 0,12	4,7
SLO - 18	0,79 ± 0,08	9,8	2,74 ± 0,50	18,1	2,00 ± 0,03	1,4
SLO - 19	3,33 ± 0,43	12,8	5,87 ± 0,76	13,0	5,50 ± 0,31	5,7
SLO - 20	2,32 ± 0,36	15,5	3,76 ± 0,54	14,2	3,97 ± 0,33	8,2
SLO - 21	2,31 ± 0,16	7,1	3,63 ± 0,45	12,3	3,72 ± 0,30	8,1
SLO - 22	3,31 ± 0,33	10,1	5,07 ± 0,49	9,6	5,64 ± 0,14	2,5
SLO - 23	5,04 ± 0,63	12,5	8,05 ± 0,40	5,0	6,88 ± 0,18	2,6
SLO - 24	4,72 ± 0,31	6,7	5,87 ± 0,74	12,5	5,95 ± 0,35	5,9
SLO - 25	6,93 ± 0,66	9,5	8,27 ± 0,68	8,2	7,21 ± 0,57	7,9
SLO - 26	5,75 ± 0,92	16,1	7,97 ± 0,76	9,6	7,26 ± 0,12	1,6
SLO - 27	4,21 ± 0,73	17,2	7,76 ± 0,18	2,3	6,75 ± 0,26	3,9
SLO - 28	4,45 ± 0,86	19,3	7,53 ± 0,35	4,6	7,83 ± 0,74	9,4
SLO - 29	3,90 ± 0,49	12,6	7,70 ± 0,46	6,0	6,82 ± 0,09	1,3
SLO - 30	9,72 ± 1,64	16,9	8,01 ± 0,65	8,1	8,36 ± 0,54	6,4

Paramètres	CBA-N2a	RBA-F	LC-MS/MS
LOD $_{CTX3C}$ (ng.mL^{-1})	$6{,}27.10^{-4}$ ± $5{,}12.10^{-5}$	1,10 ± 0,08	6 ± 0,3
LOQ $_{CTX3C}$ (ng.mL^{-1})	$1{,}5.10^{-3}$ ± $2{,}3.10^{-4}$	2,10 ± 0,16	12 ± 0,6
CME (cellule.mL^{-1})	1 904	4 000	100 000
LOD $_{matrice}$ (fg.cellule^{-1})	0,33 ± 0,027	275 ± 20	60 ± 3
LOQ $_{matrice}$ (fg.cellule^{-1})	0,79 ± 0,012	525 ± 40	120 ± 6

Avec des teneurs en CTX variant de 0,68 ± 0,03 à 9,72 ± 1,64 pg par cellule, toutes méthodes confondues, nos résultats confirment *G. polynesiensis* dans son statut d'espèce de *Gambierdiscus* la plus toxique décrite à ce jour, les niveaux de toxicité rapportées chez les autres espèces étant plutôt de l'ordre du fg (*cf.* Tableau 1 p 26) (Litaker *et al.,* 2009; Fraga et Rodriguez, 2014; Pisapia *et al.,* 2017a; Litaker *et al.,* 2017). Ces données mettent également en évidence une variation de la production en CTX entre les différents clones de *G. polynesiensis* déjà soulignée chez *Gambierdiscus* (*cf.* Tableau 1 p 26). En effet, en fonction des paramètres de culture testés (*cf.* Tableau 6 p 75) et de la méthode de dosage utilisée, des différences d'un facteur x3 à x10 peuvent être observées entre les clones NHA4 (SLO 23, 25-30) et RG-92 (SLO 1-3).

Dans le cas d'une détection des CTX dans la matrice algale, la méthode qui s'avère la plus sensible reste le CBA-N2a qui affiche une LOD et une LOQ de 0,33 ± 0,027 et 0,79 ± 0,012 fg cellule^{-1}, respectivement (Tableau 8), *vs.* des LOD et LOQ différentes d'environ un facteur x800 avec le RBA-F (LOD= 275 ± 20 fg cellule^{-1} et LOQ= 525 ± 40 fg cellule^{-1}) et environ x200 avec la LC-MS/MS (LOD = 60 ± 3 fg cellule^{-1} et LOQ = 120 ± 6 fg cellule^{-1}) (Tableau 9).

Les niveaux de quantifications obtenues par CBA-N2a sont aussi significativement plus faibles que celles déterminées via la LC-MS/MS ($p = 0,276$; test de Wilcoxon) et le RBA-F ($p = 0,0017$; test de Wilcoxon), tandis qu'aucune différence significative n'est observée entre les données de LC-MS/MS et le RBA-F ($p = 0,999$; test de Wilcoxon). En outre, en termes de répétabilité des mesures, nos résultats montrent que la LC-MS/MS présente la meilleure répétabilité avec un CV moyen de 5,7 ± 3,5 % contre 12,1 ± 4,3 % pour le RBA-F (si on ne prend pas en compte les CV de 68,6 % et 38,3 % des échantillons SLO-1 et SLO-17), et 13,5 ± 5,6 % pour le CBA-N2a (Tableau 9). Bien qu'une variabilité jusqu'à 30 % reste acceptable (Van Dolah *et al.*, 2012), ces différences de répétabilité pourraient s'expliquer, en partie, par les différences fondamentales liés aux principes de ces trois méthodes (méthodes de détection chimiques *vs.* méthodes fonctionnelles).

(ii) Comparaison des quantifications obtenues à l'aide des trois méthodes pour un même échantillon

Pour un peu moins de la moitié des extraits (*i.e.* 12 échantillons), aucune différence significative ($p > 0,05$; test de Wilcoxon) n'a été observée entre les trois méthodes au niveau des valeurs de toxicité mesurées pour un extrait donné: ainsi, l'extrait SLO-6 présente par exemple des niveaux de toxicité en CTX compris entre 2 et 3 pg CTX3C eq. cellule^{-1} quelque soit la méthode de détection utilisée (Tableau 9). A l'inverse, une différence significative ($p < 0,05$, test de Wilcoxon) est observée pour 18 extraits chez lesquels les teneurs en CTX peuvent varier de façon notable selon la méthode de détection utilisée (Tableau 10). C'est notamment le cas pour l'extrait SLO-29 dont la toxicité a été estimée à 3,9 pg CTX3C eq.cellule^{-1} en CBA-N2a *vs.* 7 à 8 pg CTX3C eq. cellule^{-1} en RBA-F et LC-MS/MS) (Tableau 9). Toutefois, des différences significatives ne sont observées entre ces deux méthodes que pour deux extraits (SLO-4 et SLO-10, Tableau 10), *vs.* 11 extraits entre le CBA-N2a et la LC-MS/MS, et 9 extraits entre le CBA-N2a et le RBA-F.

Tableau 10: Différences significatives observées entre les quantifications en CTX (pg CTX3C eq. cellule^{-1}) calculées pour chacun des extraits de G. polynesiensis au moyen des trois méthodes (n = 3).

CBA-N2a *vs.* LC-MS/MS				
Echantillon	valeur de P	Moyenne CBA-N2a	Moyenne LC-MS/MS	Différence
SLO - 18	0,000016	0,79	2	-1,21
SLO - 22	0,000355	3,31	5,64	-2,33
SLO - 29	0,00053	3,9	6,82	-2,92
SLO - 15	0,00077	3,55	5,22	-1,67
SLO - 3	0,000968	0,75	1,29	-0,54
SLO - 13	0,001195	2,34	4,21	-1,87
SLO - 9	0,001264	2,14	3,2	-1,06
SLO - 16	0,001483	3	5,69	-2,69
SLO - 1	0,001777	0,68	1,12	-0,44
SLO - 21	0,00199	2,31	3,72	-1,41
SLO - 19	0,002089	3,33	5,5	-2,17
CBA-N2a *vs.* RBA-F				
Echantillon	valeur de P	Moyenne CBA-N2a	Moyenne RBA-F	Différence
SLO - 4	0,000026	2,03	4,36	-2,33
SLO - 16	0,000446	3	5,6	-2,6
SLO - 29	0,000609	3,9	7,7	-3,8
SLO - 10	0,000965	2,44	4,9	-2,46
SLO - 27	0,001217	4,21	7,76	-3,55
SLO - 3	0,001446	0,75	1,64	-0,89
SLO - 13	0,001462	2,34	5,56	-3,22
SLO - 5	0,001982	2,19	4,54	-2,35
SLO - 23	0,002208	5,04	8,05	-3,01
LC-MS/MS *vs.* RBA-F				
Echantillon	valeur de P	Moyenne LC-MS/MS	Moyenne RBA-F	Différence
SLO - 10	0,000075	3,86	4,9	-1,04
SLO - 4	0,001619	2,83	4,36	-1,53

(iii) Comparaison des quantifications obtenues à l'aide des trois méthodes pour l'ensemble des échantillons

Les Figures 37 A, C, F illustrent le mode de distribution des niveaux de toxicité déterminés au moyen de chacune des trois méthodes, tandis que les Figures 37 B, D, E examinent le degré de corrélation observé entre les méthodes comparées deux à deux. Les quantifications obtenues par CBA-N2a obéissent à une loi de distribution normale ($p < 0.05$; test de Shapiro-Wilk; $R^2 = 0,78$) centrée sur une toxicité moyenne de 2 pg CTX3C eq. cellule^{-1}. Les données issues du RBA-F et de la LC-MS/MS ne suivent, quant à elles, aucun mode de distribution particulier ($p > 0.05$; test de Shapiro-Wilk).

Concernant le niveau de corrélation entre les trois tests, les analyses statistiques montrent l'existence d'une corrélation entre les méthodes CBA-N2a, RBA-F et LC-MS/MS ($p < 0,05$; test de corrélation), la meilleure corrélation étant toutefois observée entre le RBA-F et la LC-MS/MS ($R^2 = 0,91$) (Figure 37 E). Plus précisément, les tests CBA-N2a et RBA-F présentent une corrélation de type logarithmique se traduisant par un plafonnement progressif des estimations de quantification au fur et à mesure que les échantillons testés sont concentrés en CTX (Figure 37 B). La relation entre CBA-N2a et LC-MS/MS, quant à elle, semble être de type « exponentiel » avec une rapide augmentation des estimations des quantifications par CBA-N2a en fonction de la concentration en CTX quantifies par LC-MS/MS (Figure 37 D). Enfin, le RBA-F et la LC-MS/MS montrent une relation de type plutôt linéaire (Figure 37 E).

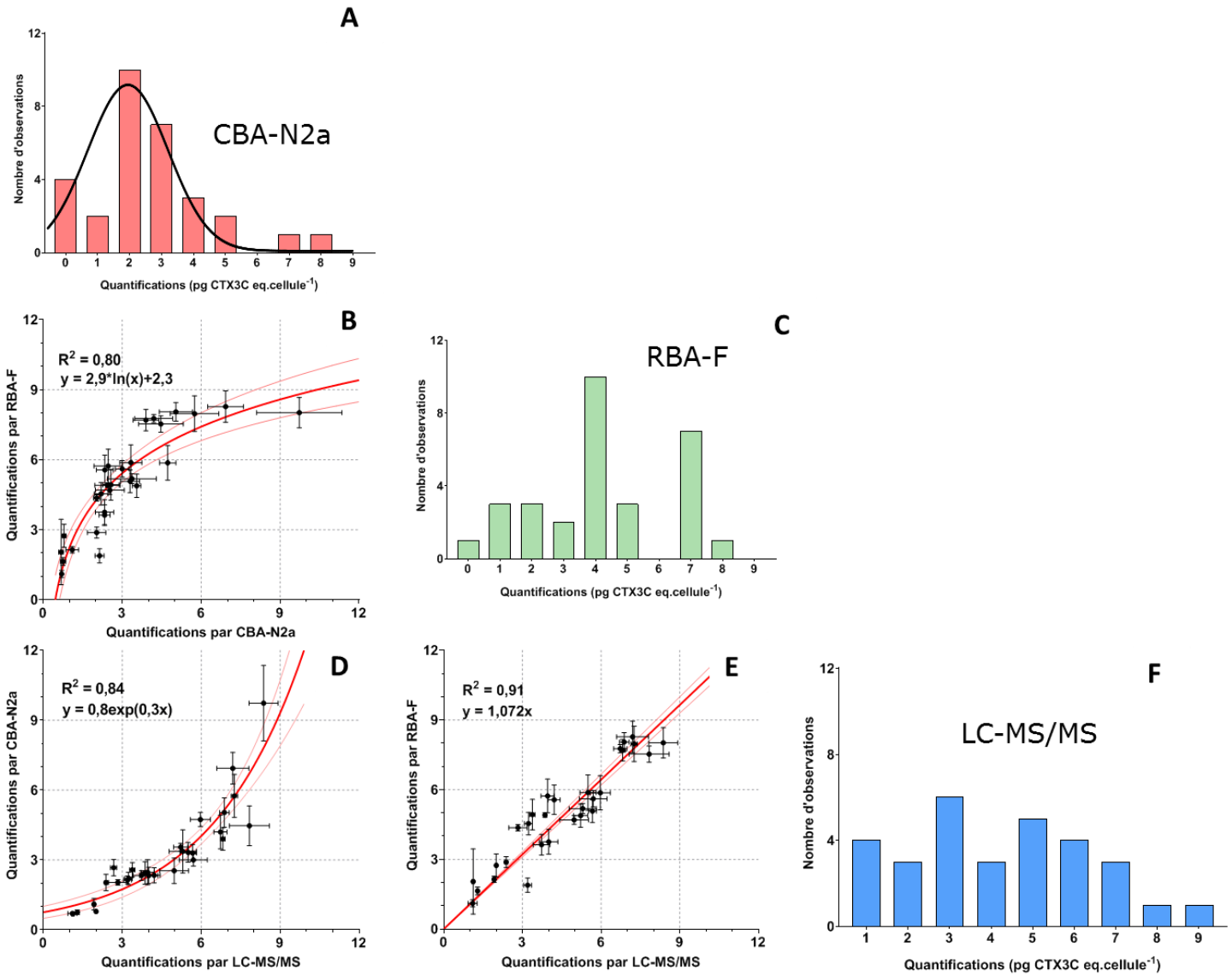


Figure 37: Représentation graphique de la distribution des quantifications obtenues par (A) CBA-N2a, (C) RBA-F, et (F) LC-MS/MS ainsi que la corrélation de type (B) logarythmique entre RBA-F et CBA-N2a, (D) exponentiel entre CBA-N2a et LC-MS/MS, et (E) linéaire entre RBA-F et LC-MS/MS.

La comparaison de tout ou partie de ces résultats avec ceux d'autres équipes s'avère délicate dans la mesure où le test RBA-F n'a, pour l'instant, jamais été appliqué à la matrice algale, mais uniquement à la détection de CTXs dans des poissons des Caraïbes (Hardison *et al.,* 2018). Concernant le CBA-N2a, quelques études ont utilisé ce test pour le criblage d'extraits de *Gambierdiscus* appartenant à d'autres espèces que *G. polynesiensis* (Pisapia *et al.,* 2017a ; Litaker *et al.,* 2017 ; Dai *et al.,* 2017 ; Reverté *et al.,* 2018) mais ne fournissent pas de donnée chiffrée relative aux valeurs de CE_{50}, de CME ou encore de LOD et LOQ de leurs échantillons. En tout état de cause, on note donc que même dans le cadre de l'utilisation de deux tests fonctionnels basés sur un mode d'action rigoureusement identique (*i.e.*, la fixation des CTX sur les CSDP) les résultats obtenus peuvent parfois être très différents d'un test à l'autre pour un échantillon donné. Ces différences de LOD et LOQ entre les méthodes pourraient s'expliquer en partie par les congénères de CTX présents dans les extraits de *G. polynesiensis,* et qui ne présentent pas les mêmes niveaux d'affinité pour les CSDP (Dechraoui *et al.,* 1999; Dechraoui-Bottein *et al.*, 2005 ; Darius *et al.,* 2007) et/ou de cytotoxicité vis-à-vis des N2a (Lombet *et al.,* 1987 ; Darius *et al.,* 2018b ; Loeffler *et al.,* 2021). En effet, les potentiels effets synergiques liés à la toxicité composite peuvent produire une cascade de réactions dans les cellules N2a pouvant être à l'origine de cette plus grande sensibilité par rapport à l'intéraction moléculaire mesurée par RBA-F entre un ligand (*e.g.* CTX) et son récepteur (*e.g.* CSDP).

Dans la littérature, quelques études se sont penchées sur les corrélations entre le test CBA-N2a *vs.* les tests ELISA (Campora *et al.*, 2008a) ou encore sur les performances de tests fonctionnels *vs.* le bioessai souris (Botana *et al* 2009). En revanche, très peu d'études ont exploré le degré de corrélation entre les trois méthodes évaluées dans cette étude pour la détection des CTX, et ce, quelque soit la matrice biologique considérée (*i.e.* standard de CTX3C, extrait de *Gambierdiscus* ou matrice pisciaire). Ainsi, Dechraoui-Bottein *et al.*, 2005 ont conclu à l'absence de corrélation entre le CBA-N2a et le RBA-R pour des échantillons de barracuda contaminés par de la C-CTX-1, bien que le CBA-N2a se soit avéré plus sensible que le RBA-R d'un facteur x12. A l'inverse, Wu *et al.*, 2011 ont mis en évidence l'existence d'une forte corrélation entre les quantifications obtenues par LC-MS/MS et le CBA-N2a sur des échantillons de poissons carnivores originaires de la République de Kiribati préalablement soumis à un protocole d'extraction rapide.

Concernant les brévétoxines, qui comme les CTX sont des toxines activatrices des CSDP, l'étude de Dechraoui-Bottein *et al.*, 2005 a montré qu'à l'inverse de ce qui est observé pour les CTX, le RBA-R s'avérait trois fois plus sensible que le CBA-N2a pour la détection de la PbTx-3 et 24 fois plus sensible pour la détection de la PbTx-1. Les travaux de Twiner *et al.*, 2007 ont également démontré que, dans la matrice algale du dinoflagellé *Karenia brevis*, la LC-MS/MS s'avérait plus sensible que le CBA-N2a et le RBA-R pour la détection des PbTx. En effet, ces auteurs ont montré que le CBA-N2a et le RBA-R avaient respectivement détecté 51 % et 73 % des quantités de PbTx quantifiées par LC-MS/MS.

La présente étude est en tout cas la première à documenter les performances de trois méthodes classiquement utilisées pour la détection des CTX lorsqu'appliquées à la matrice *Gambierdiscus*. Elle souligne également l'importance de l'utilisation d'un même standard de CTX3C et d'un même protocole d'extraction dans ce genre d'études (Park, 1994, 2012; Lewis 2001; Díaz-Asencio *et al.*, 2018).

IV - Conclusions

Cette étude qui visait à comparer la performance de trois méthodes de détection pour la détection des CTX dans des extraits de *Gambierdiscus*, a permis de préciser les sensibilités respectives du RBA-F, CBA-N2a et LC-MS/MS pour ce type de matrice biologique. Avec un seuil de détection avoisinant les 0,3 fg de CTX par cellule, le CBA-N2a apparait comme la méthode la mieux adaptée au criblage des espèces de *Gambierdiscus* les moins productrices de CTX telles que *G. carolinianus, G. belizeanus, G. australes* ou *G. pacificus* dont certaines souches peuvent parfois produire moins de 1 fg de CTX par cellule (*cf.* Tableau 1 p 26).

Dans le cadre d'un suivi du risque ciguatérique dans un site de pêche donné, cette méthode s'avérant à la fois très sensible et peu consommatrice en standard de toxine, elle se présente comme

un outil idéal pour identifier rapidement des échantillons suspects dépourvus de CTX afin de focaliser ensuite les recherches sur les échantillons les plus concentrés en toxines. Néanmoins, sa forte sensibilité illustrée par la relation exponentielle avec les autres méthodes, implique qu'aux fortes concentrations en CTX (dans notre cas supérieures à 3 pg cellule^{-1}) les estimations par CBA-N2a deviennent de moins en moins fiables avec des CV qui augmentent progressivement. Mais dans tous les cas, cette méthode fonctionnelle nécessite d'être couplée à d'autres méthodes analytiques telles que la LC-MS/MS si l'on veut pouvoir caractériser précisément les différents analogues de CTX présents.

Mille fois moins sensible mais beaucoup plus rapide, la méthode RBA-F permet de doser en quelques heures des extraits algaux moyennement toxiques (> 500 fg cellule^{-1}). Cependant, sa forte consommation en standard (*i.e.*, 60 ng par expérience) limite son usage aux laboratoires disposant d'une grande quantité de standards. En revanche, sa bonne répétabilité avec des CV relativement faibles en font une méthode fiable.

La LC-MS/MS, quant à elle, manque de sensibilité mais présente une très haute spécificité lui permettant d'établir des profils toxiniques. En revanche, les échantillons analysés doivent être suffisamment concentrés en CTX (de l'ordre du ng mL^{-1}) pour que la quantification des différents congénères de CTX puisse être réalisée dans de bonnes conditions.

Enfin, cette étude aura également permis de souligner l'existence d'une variabilité intraspécifique au niveau de la production toxinique au sein de l'expèce *G. polynesiensis* qu'il convient d'étudier plus avant dans la suite de nos travaux.

La revue bibliographique exhaustive sur les effets de plusieurs paramètres environnementaux (*i.e.* température, salinité, éclairement, nutriments) et biotiques (*i.e.* algue hôte, co-cultures bactériennes, ou co-occurrence d'autres taxons benthiques) sur la croissance et la toxicité de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* a permis de souligner l'existence de variabilités inter- et intra-spécifiques de ces organismes à ces divers forçages.

Le risque ciguatérique dans une région donnée dépend principalement des espèces présentes dans les assemblages benthiques, et notamment de la présence d'espèces/souches réellement toxiques. Or, sur les 21 espèces de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* décrites jusqu'à présent, seules 12 espèces de *Gambierdiscus* ont réellement montré une aptitude à produire des CTX en culture (*cf.* tableau 1 p 26), et 2 espèces de *Fukuyoa* ont présenté une toxicité de type CTX (Chinain *et al.*, 1999b; Rhodes *et al.*, 2014b; Litaker *et al.*, 2017; Bomber & Tindall 1989; Holmes *et al.*, 1991; Vacarizas *et al.*, 2018; Kibler *et al.*, 2012; Lartigue *et al.*, 2009). En d'autres termes, des flambées de ciguatéra suite à des efflorescences de *Gambierdiscus* ou *Fukuyoa* ne sont à craindre que si ces proliférations sont composées majoritairement de souches productrices de CTX. La Figure 38 illustre la bonne concordance entre les zones géographiques où sept des espèces les plus toxiques sont d'ores et déjà signalées et celles actuellement affectées par la ciguatéra (*i.e.* signalement de cas autochtones et/ou présence de produits de la mer pêchés localement et contaminés par des CTX). Par conséquent, dans le cadre de la mise en place de programmes de surveillance et/ou le développement de modèles prédictifs fiables du risque ciguatérique, il est impératif de collecter des données à la fois qualitatives et quantitatives sur les populations naturelles de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* pour éviter des fausses alertes et, le cas échéant, d'assurer un suivi régulier des espèces à fort potentiel toxique dans le site d'étude. Dans l'état actuel de nos connaissances, les espèces de *Gambierdiscus* dont la présence pourrait être utilisée comme biomarqueur de risque (Litaker *et al.,* 2017; Darius *et al.,* 2018b et références; Murray *et al.,* 2020) sont *G. polynesiensis* dans le Pacifique - espèce la plus toxique décrite à ce jour, avec des teneurs en CTX en culture pouvant varier de 0,6 à 20,9 pg CTX3C eq. cellule^{-1} (*cf.* tableau 1 p 26) - *G. excentricus* (Pisapia *et al.,* 2017a; Litaker *et al.,* 2017) et possiblement *G. silvae* dans les Caraïbes (Robertson *et al.*, 2018). Il faut noter que l'âge des cultures peut également contribuer à modifier le profil toxinique de *Gambierdiscus*. En effet, plusieurs études ont montré une augmentation de la toxicité globale des cultures entre la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire chez plusieurs espèces de *Gambierdiscus* (Sperr & Doucette, 1996; Lartigue *et al.,* 2009; Chinain *et al.*, 2010a, Litaker *et al.*, 2017). Ainsi, Chinain *et al.*, 2010a ont observé chez *G. polynesiensis* une augmentation de la production toxinique d'un facteur x3 entre le 5^{e} jour de culture (*i.e.* en phase exponentielle de croissance) et le 20^{e} jour (*i.e.* phase stationnaire). Litaker *et al.*, 2017 rapportent des observations similaires entre huit espèces de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* (*i.e. G. belizeanus, G. carolinianus, G. caribaeus, G. carpenteri, G. excentricus, G. silvae, G.* ribotype 2 et *F. ruetzleri*) où la production toxinique apparait la plus importante chez les espèces présentant les plus faibles taux de division. Par exemple, l'espèce *G. excentricus* produit au bas mot dix fois plus de toxines que *G. silvae* pour des taux de croissance respectifs de 0,05 d^{-1} et 0,1 d^{-1}. L'ensemble de ces résultats, qui suggère que l'énergie requise pour assurer la division cellulaire chez *Gambierdiscus* ne peut servir en même temps à la production de toxines, est conforme avec l'idée communément admise que les ciguatoxines sont des métabolites secondaires, *i.e.* des composés dont la production est optimale pendant la phase stationnaire de croissance (Anderson *et al.,* 1990; Lartigue *et al.,* 2009; Chinain *et al.,* 2010a; Litaker *et al.,* 2017; Vacarizas *et al.,* 2018; *cf.* chapitre I section I p 25).

Enfin, outre l'influence de facteurs génétiques et abiotiques, plusieurs facteurs inhérents à l'habitat de prédilection de *Gambierdiscus* et *Fukuyoa* (*e.g.,* algue hôte, bactéries et autres dinoflagellés ou diatomées présents) peuvent potentiellement affecter la croissance et la toxicité de ces micro-algues (Parsons *et al.,* 2012; Sparrow *et al.,* 2017; Nakada *et al.,* 2018; Wang *et al.,* 2018; Mustapa *et al.,* 2019). A l'échelle des populations humaines, cet effet « habitat » peut se traduire par le signalement de taux d'incidence pouvant varier significativement d'une région à l'autre. C'est ce qui est effectivement observé à l'échelle des cinq archipels qui composent la Polynésie française: de 2010 à 2020, les taux

d'incidence (TI) les plus élevés ont été signalés dans les archipels des Gambier et Tuamotu (*cf.* Figure 18 p 47).

Compte tenu de l'ensemble de ces données, le chapitre III propose de s'intéresser à la croissance et à la production toxinique chez quatre clones de *G. polynesiensis* isolés d'archipels au statut ciguatérique contrasté. Ce travail a fait l'objet d'une publication en 2019 dans la revue internationale *Toxins*.

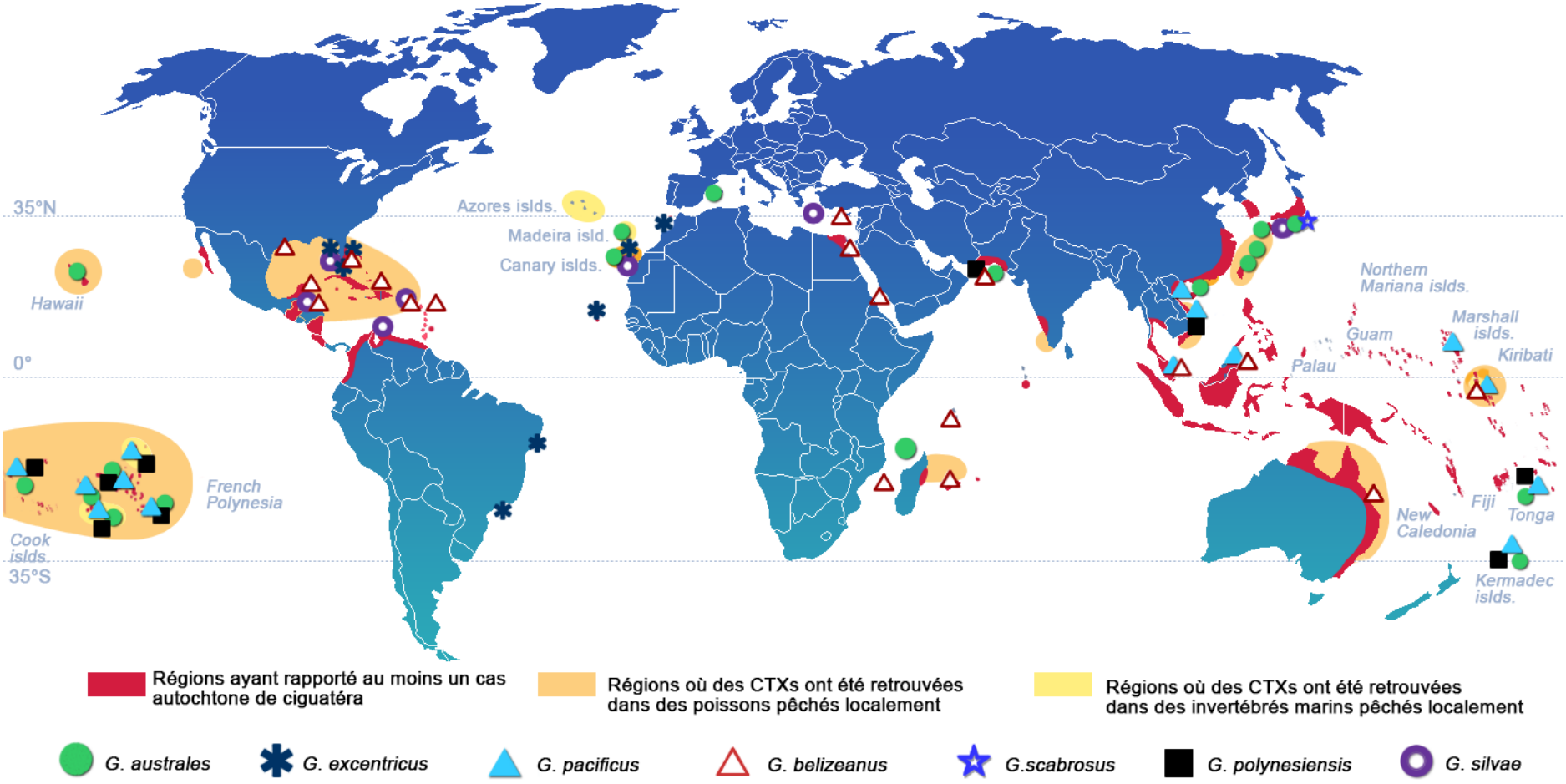


Figure 38: Carte de la distribution mondiale des espèces Gambierdiscus les plus productrices de CTX en lien avec les régions impactées par la ciguatéra.

CHAPITRE III: VARIABILITE INTRASPECIFIQUE AU NIVEAU DE LA TOXICITE ET DES PROFILS TOXINIQUES DE SOUCHES POLYNESIENNES DE *GAMBIERDISCUS POLYNESIENSIS*

Article

Intraspecific variability in the toxicity and toxin profiles of French Polynesian strains of *Gambierdiscus polynesiensis* (*Dinophyceae*) in culture

S. Longo [1*], M. Sibat [2], K. Henry [1], J. Viallon [1], A. Ung [1], H. T. Darius[1], P. Hess [2], M. Chinain [1]

[1] Laboratoire de recherche sur les Biotoxines Marines, Institut Louis Malardé, UMR241 EIO, Papeete, Polynésie Française

[2] Laboratoire Phycotoxines, Ifremer, Nantes, France

* Correspondence: slongo@ilm.pf; Tel.: +689-87-34-52-88

Received: 26 November 2019; Accepted: 12 December 2019; Published: 17 December 2019

Abstract: Ciguatera Poisoning (CP) is a foodborne disease caused by the consumption of seafood contaminated with ciguatoxins (CTX) produced by dinoflagellates in the genera *Gambierdiscus* and *Fukuyoa*. The toxin production and toxin profiles were explored in four clones of *G. polynesiensis* originating from different islands in French Polynesia with contrasted CP risk: RIK7 (Mangareva, Gambier), NHA4 (Nuku Hiva, Marquesas), RAI-1 (Raivavae, Australes), and RG92 (Rangiroa, Tuamotu). Productions of CTXs, maitotoxins (MTX), and gambierone group analogs were examined at exponential and stationary growth phases using the neuroblastoma cell-based assay (CBA-N2a) and liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). While none of the strains was found to produce known MTX compounds, all strains showed high overall P-CTX production ranging from 1.1 ± 0.1 to 4.6 ± 0.7 pg cell^{-1}. In total, nine P-CTX analogs were detected, depending on strain and growth phase. The production of gambierone, as well as 44-methyl-gamberione, was also confirmed in *G. polynesiensis*. This study highlighted: (i) intra-specific variations in toxin production and profiles between clones from distinct geographic origins and (ii) the noticeable increase in toxin production of both CTXs, in particular CTX4A/B, and gambierone group analogs from the exponential to the stationary phase.

Keywords: *Gambierdiscus polynesiensis*, ciguatera, ciguatoxins, gambierone, 44-methylgambierone, LC-MS/MS, CBA-N2a, toxin profiles

Key Contribution: This study tells us that a toxic intraspecific variability is existing inside *G. polynesiensis* species; it is also beneficial for expanding our knowledge of ciguatera poisoning risk in Polynesian lagoons.

1. Introduction

Ciguatera poisoning (CP) is a common seafood intoxication mainly found in tropical to subtropical coral reef areas. CP cases occur after the consumption of seafood contaminated with toxins known as ciguatoxins (CTXs) that are produced by dinoflagellates in the genera *Gambierdiscus* and *Fukuyoa*. CTXs enter the coral reef food web through grazing by herbivores and detritivores and are further accumulated through predation and biotransformed in carnivores [1,2]. CP is characterized by complex symptomatology, including gastrointestinal, cardiovascular, and neurological signs, which may persist in some form for weeks, months, and even years [3,4].

This symptomatology may vary in different parts of the world: *e.g.*, neurological signs clearly predominate in the Pacific region, whereas gastrointestinal symptoms seem to prevail in the Caribbean and the Indian Ocean, with the report of additional mental status alterations in this latter region [5–7]. These regional differences in symptom patterns have been attributed to the presence of different suites of CTXs in different geographic regions [6,8], the occurrence of different *Gambierdiscus*/*Fukuyoa*

species/strains depending on the region [9], or the presence of other co-occurring toxins in contaminated marine products [10]. Highest incidence rates of CP are consistently reported from the Pacific Island Countries and Territories (PICTs) where it constitutes not only a serious threat for human health but also has major socioeconomic impacts on the life of local populations [11–14].

Overall, 18 species of *Gambierdiscus* are now recognized worldwide: *G. toxicus, G. belizeanus, G. australes, G. pacificus, G. polynesiensis, G. caribaeus, G. carolinianus, G. carpenteri, G. excentricus, G. scabrosus, G. silvae, G. balechii, G. cheloniae, G. lapillus, G. honu, G. jejuensis, G. lewesii*, and *G. holmesii* [15–21]. In addition, two globular *Gambierdiscus* species have recently been reclassified as *Fukuyoa yasumotoi* and *F. ruetzleri*, with a new species described as *F. paulensis* [18,22,23]. These organisms are the potential source of several groups of bioactive compounds, including CTXs [24–26], MTXs [27–29], gambieric acids [30], gambierol [31,32], gambieroxide [33], and gambierones [34–36]. While CTXs and, to a lesser extent, MTXs have been implicated in CP [37,38], it is not fully understood if the other metabolites could also play a role in CP, but most of them are considered as compounds of interest for their bioactivity [38] and/or potential therapeutic applications [34,39].

Several *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* species/strains have been identified as likely producers of CTXs or CTX-like compounds, as measured by Mouse Biological Assay (MBA) [15,21,40,41], Receptor Binding Assay (RBA) [24], neuroblastoma cell-based assay (CBA-N2a) [42–45], fluorescent calcium flux assay [46], or liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [47–51]. However, the formal confirmation of the presence of previously characterized CTX- and/or MTX-group compounds using LC-MS/MS has been demonstrated only in a limited number of species, *i.e.*, *F. paulensis, G. australes, G. caribaeus, G. excentricus, G. pacificus, G. polynesiensis*, and *G. toxicus*, although for this latter species, a potential misidentification of the species is likely [38]. Conversely, most species of *Gambierdiscus* seem to produce 44-methylgambierone (previously reported as MTX3) [20,21,49,52,53]. Most of these toxigenic species/strains, however, exhibit very low toxicity, toxin production ranging from several femtograms to sub-picograms per cell [38,54]. Only two species proved significantly more toxic than the others, producing pg amounts of CTXs, namely *G. polynesiensis* [24,49,51] and *G. excentricus* [44,54,55], and are recognized as important toxin-producing species in the South Pacific and the Atlantic Oceans, respectively. As an example, published toxicity records for *G. polynesiensis* range from 1.2 up to 18.2 pg cell^{-1}, as determined by either RBA [24], CBA-N2a [47,56], or LC-MS/MS [49].

The overall toxicity of *Gambierdiscus* species/strains is believed to vary according to the types of CTX congeners they produce, in addition to the amount [56,57]. Based on their skeletal structures, CTX analogs can be separated into two types, *i.e.*, CTX1B type and CTX3C type analogs [57]. Once accumulated in fish, algal CTXs are metabolized into more oxidized congeners [2,58,59], although the occurrence of small amounts of the oxidized forms of CTXs, *i.e.*, 2,3-dihydroxy-P-CTX3C, 51-hydroxy-P-CTX3C, 2-hydroxy-P-CTX3C, M-seco-P-CTX3C has also been shown in cultures of *G. toxicus* and *G. polynesiensis* [26,51]. Complex biotransformation processes likely take place in fish livers [2] and lead to species-specific and region-specific toxin profiles in fish [26,57]. More precisely, Ikehara *et al.* (2017) [2] have recently showed that the enzymatic oxidation of CTX4A, CTX4B, and CTX3C, which are produced by the algal source-organism, actually leads to CTX derivatives that bioaccumulate in fish, namely CTX-1 (or CTX1B), CTX-2 (or 52-epi-54-deoxyCTX1B), CTX-3 (or 54-deoxyCTX1B), 2-hydroxyCTX3C, and 2,3-dihydroxyCTX3C. Such findings, together with results of studies that compared the toxin characteristics in various fish species *vs.* the causative *Gambierdiscus* spp. from different areas in Japan, strongly suggest that the genetic composition of *Gambierdiscus* populations in toxic areas likely contributes to shape the toxin profiles in fish [57,60]. Hence, extensive studies aiming at documenting the toxicity level and complete toxins profiles in *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* spp. worldwide are most useful to understand/predict CP patterns in ciguatera-prone areas.

Numerous studies have examined the responses of *Gambierdiscus* spp. (*i.e.*, growth and toxin production) to varying environmental factors including temperature, salinity, light, and nutrient availability [38,60–64]. Results point out the complexity of the toxinogenesis in *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* spp. and suggest that this functional trait may be under the control of a combination of factors, including genetic [15,54,65,66], physiological [24,65,67], environmental [43,68] and microbial drivers [69].

These variations in *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* species/strains affect not only the nominal cell toxin content but may also concern the toxin profiles, *i.e.*, both the identity and ratio of the different CTXs congeners produced [24,50]. In French Polynesia, *G. polynesiensis* is regarded as the dominant source of CTXs entering the food web [56]. Thus, CP risk assessment programs currently conducted in this region primarily focus on the monitoring of the abundance of this key toxin-producing species using species-specific molecular assays [54,56]. At least 11 distinct P-CTX congeners have been previously characterized in this species, namely P-CTX4B, P-CTX4A (52-epi-P-CTX4B), P-CTX3C, P-CTX3B (49-epi-P-CTX3C), M-seco-P-CTX3C methyl acetal, 2-hydroxy-P-CTX3C, 54-deoxy-P-CTX1B, 52-epi-54-deoxy-P-CTX1B, 51-hydroxy-P-CTX3C, M-seco-P-CTX3C, and M-seco-P-CTX4A/4B [24,47,70,71].

Several studies have highlighted the significant variations observed in CTX production across species/strains from different geographic origins [15,49,54,65,66]. The objective of the present study was to characterize the toxin production and profiles in four clones of *G. polynesiensis* from distinct geographic origins, at two distinct growth phases, *i.e.*, exponential *vs.* stationary growth phase, focusing primarily on three groups of toxins, *i.e.*, CTXs, MTXs, and gambierone group analogs. For this purpose, CTXs were detected using both CBA-N2a and LC-MS/MS whereas only this latter method was performed for the detection of MTXs and gambierone group analogs. Furthermore, CTX-related toxicity, as determined by CBA-N2a, and concentrations of CTX-analogs, as determined by LC-MS/MS analysis, will also be compared to each other to evaluate whether or not there is an agreement between these two methods.

2. Results

2.1 Growth rates

Cultivated in batch culture conditions (26 ± 1 °C, stabilized pH at 8.4, under 60 ± 10 µmol photons m^{-2} s^{-1} irradiance, in a 12 h light: 12 h dark photoperiod), all clones displayed a typical growth curve characterized by an exponential phase, from day 0 to 12, and a stationary phase between day 12 to 18 (Figure 1).

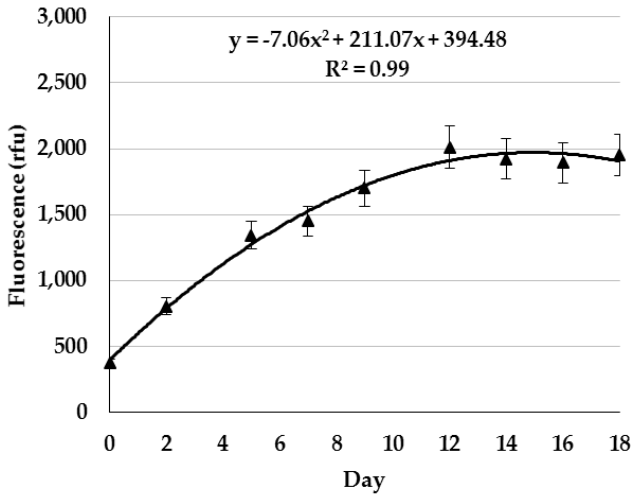


Figure 1. Growth curve of *G. polynesiensis* RAI-1 as measured by mean natural *in vivo* fluorescence (rfu). Data represent the mean ± SD of three experiments (with each fluorescence reading run five times).

Growth rates monitored at the exponential phase ranged between 0.22 ± 0.01 and 0.35 ± 0.09 div. day^{-1} (Table 1), with no significant differences between clones (p-values ranging from 0.1 to 1, Wilcoxon test). The total cell yields obtained at the stationary phase ranged from 275,000 to 440,000 cells (in a total volume of 180 mL in 250 mL-Erlenmeyer flasks) as assessed by automated counting on the Multisizer III™ particle counter, with clone NHA4 giving the highest cellular biomass. No cell size differences have been noticed.

Table 1. Growth rate for each *G. polynesiensis* clone, as determined at the exponential phase

	RIK7	NHA4	RAI-1	RG92
Growth rate μ*	0.22 ± 0.01	0.26 ± 0.03	0.35 ± 0.09	0.22 ± 0.02

*Growth rates μ are expressed in div. day^{-1} ± SD (n = 3)

2.2 CBA-N2a toxicity data

All four *G. polynesiensis* clones in this study produced CTX-like compounds as measured by the CBA-N2a assay (Figure 2). Indeed, all dichloromethane-soluble fractions (DSF) showed no cytotoxicity on neuroblastoma cells in OV$^-$ conditions (data not shown), whereas a sigmoidal dose-response curve was observed in OV$^+$ conditions, a response typical of CTX activity.

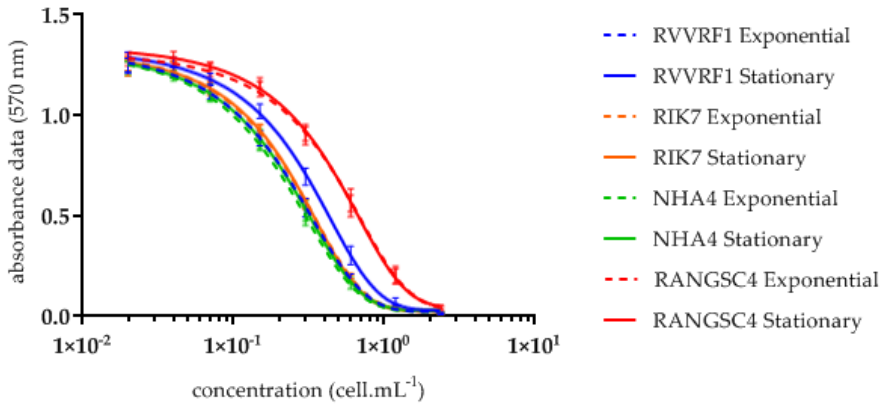


Figure 2. Dose-response curve of Neuro-2a cells in OV$^+$ conditions when exposed to increasing concentrations of dichloromethane-soluble fractions of *G. polynesiensis* strains. Data represent the mean ± SD of three replicate cultures per clonal isolate, with each concentration run in triplicate.

The effective concentration reducing 50 % of cell viability (EC_{50}) and the overall composite toxicity were estimated at both growth phases for each *G. polynesiensis* clone showing no significant difference between exponential *vs.* stationary growth phase regardless of the clone (Table 2). Among these four clones, NHA4 produced the highest toxin content (3.7 ± 0.3 pg P-CTX3C eq. cell^{-1}) at the late exponential phase, followed by RIK7, RAI-1, and RG92, this latter being significantly less toxic than the other three strains (Table 2).

Table 2. Composite toxicity of *G. polynesiensis* clones as measured by neuroblastoma cell-based assay (CBA-N2a) at the exponential *vs.* stationary phase.

CLONE	Growth phase	EC50 (cell. mL^{-1})[1,2]	pg P-CTX3C eq. cell^{-1}[2]
RIK7	Exponential	0.265 ± 0.01	3.3 ± 0.1
	Stationary	0.266 ± 0.02	3.3 ± 0.2
NHA4	Exponential	0.234 ± 0.02	3.7 ± 0.3
	Stationary	0.248 ± 0.03	3.6 ± 0.4
RAI-1	Exponential	0.253 ± 0.02	3.5 ± 0.3
	Stationary	0.334 ± 0.05	2.6 ± 0.4
RG92	Exponential	0.552 ± 0.09	1.6 ± 0.2
	Stationary	0.528 ± 0.05	1.7 ± 0.2

[1] EC_{50} is the effective concentration reducing 50% of cell viability.

[2] Effective concentration (EC_{50}) and composite cytotoxicity data represent the mean ± SD of three replicate cultures per clonal isolate.

2.3 LC-MS/MS analysis and toxin profiles in *G. polynesiensis*

2.3.1 Quantification of CTX analogs

LC-MS/MS analysis of the crude methanol extracts of the four clones revealed the presence of nine detectable P-CTX congeners (Figures 3 and 4, Table 3) consisting of (i) two majors compounds, P-CTX3B and P-CTX3C; and (ii) seven minor CTXs analogs: two non-polar congeners from the P-CTX1B group, *i.e.* P-CTX4A and P-CTX4B; two oxidized forms of P-CTX3C *i.e.* 2-OH-P-CTX3C and M-seco-P-CTX3C; and three undescribed isomers belonging to the P-CTX3B/C group, referred to as P-CTX3B/C group isomers 1, 2 and 3 (Figure 3 and Table 3).

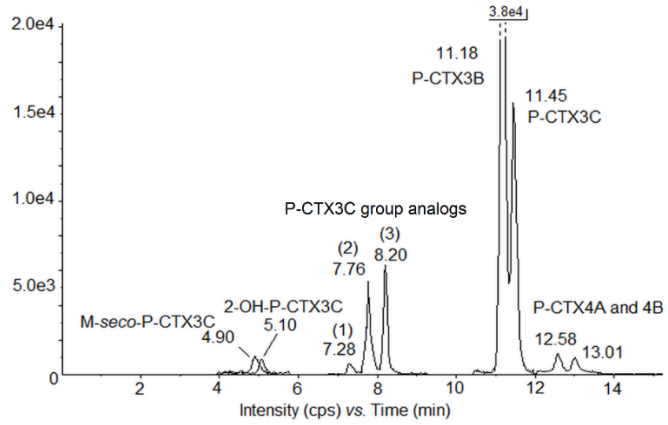


Figure 3. Chromatogram of scheduled Multiple Reaction Monitoring (MRM) liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) showing the different P-CTX analogs detected in crude extracts (methanol) of strain RIK7 tested at the stationary growth phase. The retention time (RT) of each analog is indicated close to the corresponding peak and the different P-CTX3B/C group isomers 1, 2 and 3 are indicated in brackets. NB: P-CTX3B peak is cut off to show all analogs.

Of note, only P-CTX3B/C group isomers 2 and 3 were present at quantifiable amounts, whereas P-CTX3B/C isomer 1 (RT = 7.28 min) was consistently detected at levels below the limit of quantification (LOQ). When detected above the LOQ, the quantitation of each other P-CTX congener was estimated by integration of the chromatogram peaks (Figure 3) allowing for the calculation of the overall toxin cell content in each clone (Table 3). P-CTX3B and -3C amounts accounted for 54 % – 69 % and 26 % – 32 %, respectively, of the total CTX production. Interestingly, if the amount per cell of P-CTX3B remained stable or slightly increased from the exponential to the stationary growth phase, its relative abundance clearly decreased in favor of minor analogs at the stationary phase. Still, P-CTX3B and P-CTX3C contributed to at least 80 % of the total CTXs profile in the stationary phase. Regarding the total toxin content, NHA4 was the highest producer, *i.e.*, 4.61 ± 0.71 pg P-CTX3C eq. cell^{-1}, followed by RIK7, RA-1, and RG92, this latter being again the least toxic strain (Table 3). Thus, the same hierarchy was found among these four strains whatever the growth phase between LC-MS/MS and CBA-N2a results.

Table 3. LC-MS/MS quantitation (pg P-CTX3C eq. cell^{-1}) of P-CTXs analogs in *G. polynesiensis* RIK7, NHA4, RAI-1 and RG92*,* at the exponential (Expo.) *vs.* stationary (Stat.) growth phase, as approached by integration of the chromatogram peaks. Data represent the mean ± SD of three replicate cultures per clonal isolate, with a single LC-MS/MS run per extract). The limit of quantification (LOQ) was established at 40 ng mL^{-1} (this ranges from 0.02 to 0.08 pg equivalents P-CTX3C cell^{-1}). Total concentrations are the sum of individual concentrations which were estimated in P-CTX3C equivalents, assuming equal response factors in LC-MS/MS.

	P-CTX3C	**P-CTX3B**	**P-CTX4A**	**P-CTX4B**	**P-CTX3B/C type isomer 2**	**P-CTX3B/C type isomer 3**	**2-OH-P-CTX3C**	**M-seco-P-CTX3C**	**Total**
RIK7 Expo.	1.00 ± 0.14	2.21 ± 0.37	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	3.21 ± 0.51
RIK7 Stat.	1.08 ± 0.05	2.27 ± 0.07	0.25 ± 0.04	0.14 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.09 ± 0.01	< LOQ	4.20 ± 0.22
NHA4 Expo.	1.06 ± 0.03	2.61 ± 0.19	< LOQ	< LOQ	0.18 ± 0.01	0.20 ± 0.01	< LOQ	< LOQ	4.05 ± 0.24
NHA4 Stat.	1.23 ± 0.18	2.79 ± 0.45	0.06 ± 0.01	< LOQ	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	4.61 ± 0.71
RAI-1 Expo.	0.96 ± 0.24	2.10 ± 0.52	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.20 ± 0.04	< LOQ	< LOQ	3.26 ± 0.8
RAI-1 Stat.	1.11 ± 0.02	2.15 ± 0.03	< LOQ	< LOQ	0.17 ± 0.01	0.19 ± 0.01	< LOQ	< LOQ	3.62 ± 0.07
RG92 Expo.	0.35 ± 0.04	0.75 ± 0.05	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1.10 ± 0.09
RG92 Stat.	0.71 ± 0.01	1.23 ± 0.11	0.09 ± 0.02	< LOQ	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.02	< LOQ	< LOQ	2.23 ± 0.18

The relative abundance of P-CTX3B/C group isomers 2 and 3 differed, depending on the strain and growth stage considered: for instance, in strain RIK7 examined at the stationary phase, these compounds represented up to 10 % of the total CTX production. In addition, P-CTX3B/C group isomer 3 always contributed to 5 % of the total CTXs production in all four clones at the stationary phase (Figure 4).

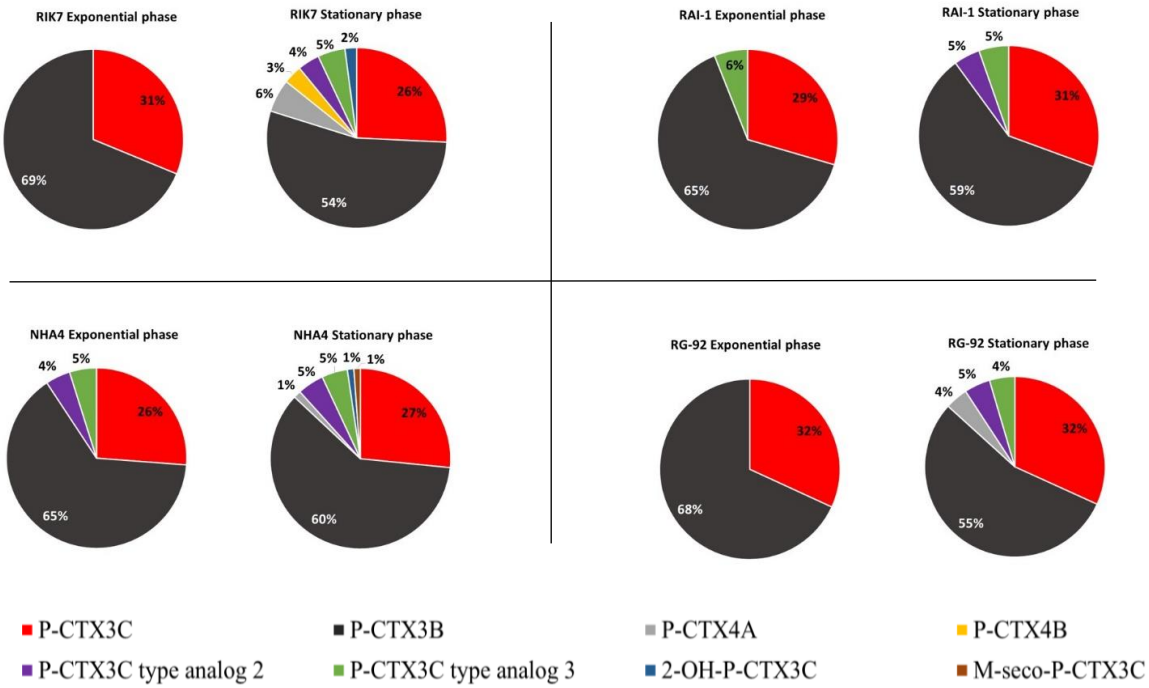


Figure 4. Comparison of the toxin profiles in batch cultures of *G. polynesiensis* RIK7, NHA4, RAI-1 and RG92 as determined by LC-MS/MS at the exponential *vs.* the stationary phase. A diversification in CTXs profile in cells harvested at the stationary phase is observed in all four clones. Only quantifiable compounds are included in this representation.

Analysis of toxin profiles also revealed a noticeable increase in the diversity of CTX analogs from the exponential to the stationary phase (Table 3 and Figure 4). Strains RIK7 and NHA4 showed the most diversified toxin profiles, which consisted of the two primary toxins P-CTX3B and P-CTX3C at the exponential phase *vs.* seven analogs at the stationary phase (Figure 4, Table 3). Indeed, the total CTX content found in RG92 was significantly lower compared to RIK7, NHA4, and RAI-1 (Table 4). Conversely to CBA-N2a results, the ANOVA analysis reveals significant differences in toxin production estimated by LC/MS/MS between the exponential *vs.* stationary phase ($p < 0.05$; *i.e.*, 0.00032), with a 24 % increase in toxicity in average (*i.e.*, 0.7 pg cell^{-1}) at the stationary phase (Table 4). ANOVA on the differences in toxicity between clones and growth phases indicates that clone RG92 was significantly less toxic than RAI-1, RIK7, and NHA4, and that toxin production of CTXs significantly increased from the exponential to the stationary growth phase (Table 4).

Finally, CTX contents estimated between CBA-N2a (Table 2) and LC-MS/MS (Table 3) in *G. polynesiensis* clones were also compared to evaluate the good agreement between these two detection methods. At the exponential growth phase, CBA-N2a data were in good agreement with those of LC-MS/MS. However, as a significant increase in toxin production with the age of the culture was observed only by LC-MS/MS (ANOVA analysis, $p = 0.0003$; Table 4), there is somewhat more discrepancy between the CBA-N2a results and total concentrations by LC-MS/MS. However, toxicity equivalency factors (TEFs) of all analogs detected by LC-MS/MS are not known to date and thus the differences in total contents (typically in an order of 25 % magnitude) should not be over-interpreted.

Table 4. Results of the ANOVA test relative to the toxicity differences observed between clones and growth phases. A "p value" < 0.05 indicates statistically significant differences in total toxin concentration (LC-MS/MS).

	difference	P value
RG92 – RIK7	-2.18	0.0000004
RG92 – NHA4	-2.65	0.0000000
RG92 – RAI-1	-1.75	0.000005
RIK7 – NHA4	-0.46	0.173
RIK7 – RAI-1	0.44	0.215
NHA4 – RAI-1	0.90	0.004
Stationary - Exponential	0.71	0.0003

2.3.2. Quantification of the Gambierone group compounds

Cell and culture media extracts of strains RIK7, NHA4, RAI-1 and RG92 were also tested for the presence of compounds classically found in *Gambierdiscus* spp. cultures, *i.e.* the gambierone group analogs. All four *G. polynesiensis* were found to produce gambierone and 44-methylgambierone, *e.g.* strain NHA4 (Figure 5).

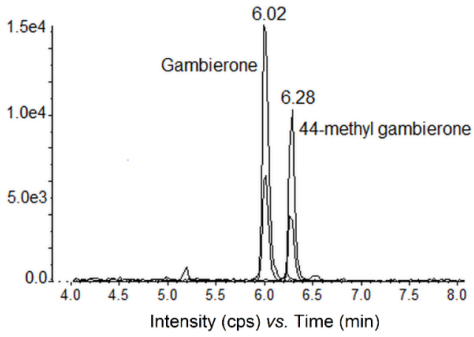


Figure 5. Chromatogram of non-scheduled MRM LC-MS/MS (negative mode) showing the presence of gambierone and 44-methylgambierone in crude methanolic extracts of strain NHA4 at the stationary growth phase.

Table 5 gives the relative abundance of these 2 compounds in cells *vs.* culture media, at the exponential *vs.* stationary phase. Regardless of the growth phase considered, gambierone was consistently produced in higher amounts (2- to 8-fold) than 44-methylgambierone: gambierone and 44-methylgambierone concentrations ranged from 46.1 to 229.8 and 5.8 to 74.1 pg MTX1 eq. cell^{-1}, respectively in *G. polynesiensis* cells, and from 1.3 to 121.3 and 0.0 to 88.1 pg MTX1 eq. cell^{-1}, respectively, in the culture media. As is the case for CTXs, the production pattern reveals an enhanced biosynthesis of these metabolites from the exponential to the stationary growth phase. Of note, NHA4 which yielded the highest cellular biomass at the stationary phase showed the lowest amounts of gambierone. It was also the only strain in which gambierone and 44-methylgambierone concentrations were higher in the culture media (67 % and 84 %, respectively) than in the cells (33 % and 16 %, respectively) at stationary growth phase. Since only one batch culture was analyzed per clonal isolate (in a single run), it was not possible to assess whether the toxicity variations observed among clones were statistically significant.

2.3.3. Quantification of MTXs

None of the four clones produced MTX1, MTX2 or MTX4 in culture.

Table 5. Amounts of 44-methylgambierone (44-methylgamb.) and gambierone (in pg eq. MTX1 cell^{-1}) detected in cells (Cell.) and culture medium (Med.) of *G. polynesiensis* strains, at the exponential (Expo.) *vs.* stationary (Stat.) phases. Only one batch culture was analysed per clonal isolate in a single run. Hence, it was not possible to test for the statistically significance of among-strains variations.

	RIK7 Expo.		**RIK7 Stat.**		**NHA4 Expo.**		**NHA4 Stat.**		**RAI-1 Expo.**		**RAI-1 Stat.**		**RG92 Expo.**		**RG92 Stat.**	
Gambierone (pg eq. MTX1 cell^{-1})	256.5		329.1		58		114.1		135.4		128.2		97.5		235.3	
44-methylgambierone (pg eq. MTX1. cell^{-1})	118.5		139.7		25		35.4		20.8		17		19.3		41.5	
Total (pg eq. MTX1 cell^{-1})	375		468.8		83		149.5		156.2		145.2		116.8		276.8	
	Cell.	Med.	Cell.	Med.	Cell.	Med.	Cell.	Med.	Cell.	Med.	Cell.	Med.	Cell.	Med.	Cell.	Med.
Gambierone (%)	53	47	70	30	79	21	33	67	98	2	90	10	99	1	89	11
44-methylgambierone (%)	26	74	53	47	46	54	16	84	100	-	68	32	100	-	73	27

3. Discussion

The presence of selected, highly toxic species/strains (even if they may not be the numerically dominant ones) in *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* blooms likely play a prominent role in CP outbreaks and severity [9,15,72]. Previous studies by Yogi *et al.* (2014) [57] and Ikehara *et al.* (2017) [2] also suggest that comprehensive data on the toxin profiles encountered in *Gambierdiscus* spp. blooms can provide baseline knowledge on the factors likely to influence fish ciguatoxicity in ciguatera-prone areas, and are therefore useful to inform CP risk models. The species *G. polynesiensis* is regarded as the dominant producer of CTXs in the food webs in French Polynesian lagoons [73]. The aim of the present study was to assess the overall toxin production and to characterize the toxin profiles in four strains of *G. polynesiensis* from distinct localities in French Polynesia, in relation to their growth stages.

In this study, two detection methods were used to evaluate the CTX production in *G. polynesiensis* strains, the functional assay CBA-N2a, and LC-MS/MS. Overall, good agreement was observed between the two methods, although slight quantitation variations were observed, *e.g.*, LC-MS/MS detection method consistently yielded higher concentrations, in particular in the stationary growth phase. LC-MS/MS is designed to detect previously characterized CTX congeners and quantify those for which the corresponding reference standards are available. Here, absolute estimates of total concentrations are confounded by the lack of certified reference compounds (response factor assumption), and also the estimation made in expressing concentrations in P-CTX3C equivalents (TEF = 1 assumption). Still, the increase in total concentrations only observed in LC-MS/MS analyses is clearly due to the increased diversity of P-CTX3C analogs, for which the actual structure and toxicity of some analogs are currently unknown. For RIK7, the overall increase in toxin content is also due to the detection of P-CTX4A and –B above quantitation limit, two known analogs, to a lesser extent also due to P-CTX4A appearing in NHA4 and RG92. A further possible explanation for the differences noted between CBA-N2a and LC-MS/MS data may be that neuro-2a cytotoxicity will actually reflect the complex interactions on voltage-gated sodium channels (VGSCs) exerted by the combination of bioactive compounds present in *G. polynesiensis* culture extracts. In some instances, this may result in structural or chemical competition, as had been demonstrated for brevenal and brevetoxin in *K. brevis* [74].

Factors governing toxin biosynthesis in the genera *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* are not well understood, and the role played by environmental and/or physiological drivers, genetic characteristics and symbiotic bacteria has been largely evoked [38,60]. In particular, the production of CTXs has been shown to significantly vary within and between species of *Gambierdiscus*/*Fukuyoa*. A comprehensive review of the existing literature shows that toxic species in these genera can be classified into three distinct groups: (i) species with very low toxicity (of the order of fg P-CTX3C eq. cell^{-1}), which comprises *G. belizeanus, G. caribaeus, G. carolinianus*, and *G. carpenteri*; (ii) species exhibiting a toxicity at sub-pg range (<1 pg P-CTX3C eq. cell^{-1}), which includes *G. australes, G. pacificus, G. scabrosus, G. silvae, G. toxicus*, and (iii) a third group composed of *G. polynesiensis* and *G. excentricus* characterized by toxicities at pg range [54,75]. Thus, in the present study, CBA-N2a and LC-MS/MS data both confirmed the very high toxicity status of the species *G. polynesiensis* compared to other *Gambierdiscus* species, with all four clones exhibiting an overall toxin content ranging from 1.1 ± 0.1 up to 4.6 ± 0.7 pg P-CTX3C eq. cell^{-1}, depending on the growth phase considered and the toxin detection method used. Based on the literature, only *G. excentricus* strains have shown comparable toxicity levels, *i.e.*, 1.1 pg P-CTX1B eq. cell^{-1} [55], which would be equivalent to 3.5 pg P-CTX3C eq. cell^{-1} according to Dechraoui Bottein *et al.* (2007) [76]. These results are consistent with previously published data on the toxic potency of *G. polynesiensis* strains [24,47,49,56,77]. All these observations tend to reinforce the general belief that this species is likely the dominant source of CTXs entering the food web in the South Pacific region.

Of note, Rhodes *et al.* (2014) [49] even reported a remarkably high CTX production in CAWD212, a Pacific strain of *G. polynesiensis* isolated from the Cook Islands (18.2 pg cell^{-1} as determined by LC-MS/MS). In contrast, so far, only one strain of *G. polynesiensis* isolated from Macauley Island (Kermadec Islands, New Zealand) has been found to produce neither MTX1 nor, unusually, any known CTXs [20].

Based on LC-MS/MS data, an increase in the production of CTXs and gambierone group analogs was observed from the exponential to the stationary phase in all four clones. Numerous studies have evaluated the effects of growth stage on the toxicity of *Gambierdiscus* spp. *in vitro* and have concluded that cellular toxin levels often increase with the age of the culture [24,43,67,68]. This enhanced toxicity noted at the stationary phase supports the common belief that CTXs are secondary metabolites, which are generally accumulated under deteriorating growth conditions such as those in batch cultures entering the stationary phase [68].

An increase in cellular toxin contents during the stationary phase has also been observed in several other dinoflagellates maintained in laboratory culture, *e.g.*, azaspiracids in *Azadinium spinosum* [78] or okadaic acid and pectenotoxins in *Dinophysis* sp. [79].

Another interesting result concerns the intraspecific variations clearly observed in the toxin production and/or toxin composition (*i.e.*, identity and relative abundance of CTXs and gambierone group analogs) of *G. polynesiensis* strains from distinct geographic origins. Screening of toxicity is currently in progress on seven additional clones of *G. polynesiensis*, recently established in the laboratory, and will likely corroborate these preliminary observations. For example, NHA4 has been found to produce approximately four times more CTXs than TIO10 (1.20 ± 0.14 pg P-CTX3C eq. cell^{-1}), a *G. polynesiensis* clone recently isolated from another locality in Nuku Hiva Island [56].

This strain-dependent production of CTXs is well established in *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. Indeed, toxic and nontoxic strains have been reported within the species *G. toxicus, G. australes*, and *G. pacificus* [15,24,41,44,45]. Likewise, Litaker *et al.* (2017) [54] found that the CTX production in *F. ruetzleri* originating from the Caribbean Sea was 27-fold and 3.8-fold more toxic than strains from the Gulf of Mexico and the Atlantic Ocean, respectively. In the same way, a comparison of the average toxicity of *F. paulensis* strains between three studies revealed that isolates from the Mediterranean Sea [22,40] were more potent than strains from the Pacific and Atlantic Oceans, in which no toxicity was detected [49]. However, in this latter case, some of these variations could merely result from differences in culture conditions, growth stage and/or toxin detection methods. Clone RG92 was found significantly less toxic than RAI-1, RIK7, and NHA4. Of note, this clone clearly differed from the other three strains with regards to its age, as it has been held in the Institut Louis Malardé (Papeete, Tahiti, French Polynesia) culture collection since 1992. In contrast, RAI-1 was established in the laboratory in 2008, while clones RIK7 and NHA4 were isolated more recently. Interestingly, earlier studies reported an initial toxin content per cell of 4.3 pg P-CTX3C eq. cell^{-1} in RG92 [24], suggesting a progressive decline in the toxicity of this strain over time. A similar trend is presently observed in long-term cultures of strain TB92, another clonal isolate also established in the laboratory in 1992 [24], and whose composite cytotoxicity initially estimated at 5.8 ± 0.85 pg P-CTX3C eq. cell^{-1} [47] has gradually dropped to 3.6 pg P-CTX3C eq. cell^{-1} [77].

Likewise, Munday *et al.* (2017) [80] also mentioned significant changes in the CTX concentration of clone CAWD 212 from the Cook Islands [49]. All these findings suggest that high toxin production may not be a stable characteristic in long-term cultures of *G. polynesiensis*, contradicting earlier observations by Chinain *et al.* (2010) [24], however, more strains from diverse geographic origins should be examined to ascertain this hypothesis.

Another possible explanation for the decrease in RG92 average toxic potency noted here relates to its growth rate. The average growth rates exhibited by the four highly toxic clones of *G. polynesiensis* ranged from 0.22 ± 0.01 to 0.35 ± 0.09 day^{-1}, and are consistent with those reported in the literature for other species of *Gambierdiscus* spp. when maintained under comparable temperature and salinity conditions [61–65]. Some studies, however, gave significantly lower growth rates such as those of Jang *et al.* (2018) [17] and Sparrow *et al.* (2017) [81] who reported growth rates not exceeding 0.07 and 0.14 day^{-1} in cultures of *G. jejuensis* and *G. carpenteri*, respectively. Of note, in their initial publication on the growth and toxin production of RG92 in culture, Chinain *et al.*

(2010) [24] reported a rather low growth rate (*i.e.*, 0.13 ± 0.03 day^{-1}) and an average CTX production of 2.8 pg P-CTX3C eq. $cell^{-1}$ for this strain, as determined by RBA. In the present study, RG92 exhibited a higher growth rate, *i.e.*, 0.22 ± 0.02 day^{-1}, which was associated with lower toxicity. The enhanced growth rate observed in this study likely results from the stabilization of pH in the cultures over the duration of the experiments. Several studies have examined the toxin production patterns in relation to growth rates in various *Gambierdiscus* species such as *G. polynesiensis*, *G. excentricus, G. australes*, and *G. carpenteri*, and concluded to a higher toxin biosynthesis in strains/species with low reproductive rates [24,44,54,67,82]. These findings suggest a trade-off between investments of cellular resources in growth *vs.* the production of defensive compounds [24,54], a pattern also described in another closely related harmful algal species, *Karenia brevis* [83,84]. In any case, these observations on the potential effects of physiological factors (*e.g.*, cell division rate and age of culture) on *Gambierdiscus* spp. toxin production highlight the importance of considering both the culture conditions and harvest time if the pursued objective is to maximize toxin yields in cultures of toxigenic *Gambierdiscus* spp. The study by Chinain *et al.* (2010) [24], the first to document the toxin profiles in two strains of *G. polynesiensis* (TB92 and RG92), initially reported the production of five of the major CTX congeners previously characterized in the ciguatera food chain, *i.e.*, P-CTX3C, P-CTX3B, P-CTX4A, P-CTX4B, and M-seco-P-CTX3C. Thanks to the significant improvement of LC-MS/MS detection methodology, Sibat *et al.* 2018 [51] further detected four additional CTX derivatives of the P-CTX3C group in cultures of TB92, including three analogs whose structural identification is still pending. Here, the LC-MS/MS analysis of four additional clones of *G. polynesiensis* from distinct geographic origins yielded similar results, suggesting that the toxin profile is a stable characteristic in this species as previously proposed by Chinain *et al.* (2010) [24]. The occurrence of several oxidized toxins in all four clones of *G. polynesiensis*, *e.g.*, 2-OH-P-CTX3C and M-seco-P-CTX3C, substantiate earlier findings by Yasumoto *et al.* (2000; 2001) [25,59], Yogi *et al.* (2011) [26], and Laza-Martinez *et al.* (2016) [40] who also reported oxidized forms in culture extracts of *G. toxicus* and *F. paulensis*, respectively. Rather unusual, Roeder *et al.* (2010) [50] also reported the occurrence of another oxidized form (*i.e.*, 2,3-dihydroxy-P-CTX3C) in several *Gambierdiscus* strains, while no CTX3B or -3C were present in these strains. However, according to Pisapia *et al.* [29], this compound may have been misidentified with 44-methylgambierone. In any case, these observations highlight the need to re-examine the hypothesis that CTXs are mainly oxidized in fish during food chain transmission [26].

In this study, gambierone, a compound first described by Rodriguez *et al.* (2015) [36] in *G. belizeanus*, was demonstrated for the first time in cultures of *G. polynesiensis*. The detection of 44-methylgambierone in all four clones also confirmed the ubiquitous character of this compound that seems to be produced by all *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* species described to date, except for *G. excentricus* [29], as well as *F. yasumotoi* and *G. jejuensis* for which data are not yet available [38]. Conversely, none of the four clones produced MTX1, 2 or -4, a result also consistent with those of Rhodes *et al.* (2014) [49] for *G. polynesiensis* CAWD212 originating from the Cook Islands. These observations suggest that the common belief that almost all *Gambierdiscus* isolates produce MTXs while many fail to produce detectable levels of CTXs needs to be further evaluated. We postulate that the production of MTX analogs is likely to be species-specific within *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* species as well [29].

The production pattern described in many *Gambierdiscus* species, including *G. polynesiensis*, clearly suggests a trade-off between reduced growth and increased toxin synthesis and poses the question of the ecological relevance of the toxins synthesized by *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* spp. The diversity and structural complexity of ciguatera toxins have led to the speculation that allelochemical agents may be used by *Gambierdiscus* to compete with other epiphytic dinoflagellates for space or limit grazing by herbivores [3,24,54,69,85,86]. This hypothesis is strongly supported by the results of several studies that have examined the interactions between *Gambierdiscus* spp. and co-occurring taxa of the thallisphere: for instance, *Prorocentrum concavum* and *G. toxicus* were reciprocally inhibited both in exudate-supplemented cultures and in cross-cultures [87,88]. Moreover, both exudates and CTX extracts of *G. toxicus* were able to inhibit the growth of several diatoms and chlorophytes species [64].

The study by Sugg and Van Dolah (1999) [87] also showed that, in crossed culturing experiments, culture media preconditioned with filtered-exudates of *G. toxicus* were able to inhibit the growth of *Coolia monotis* and *Ostreopsis lenticularis*. However, the exact nature of compounds involved in these complex mechanisms remains to be elucidated. Of note, one study has highlighted the capability of gambieric acids to act as an endogenous growth enhancer toward *G. toxicus* cultures [89]. Interestingly, these compounds, which are excreted in the culture medium by *G. toxicus* at the late growth phase [90], are also known to exhibit potent antifungal activities against filamentous fungi. Gambierone and 44-methylgambierone, which are found in high concentrations in both cells and culture medium of *G. polynesiensis* in the present study, are also known for their bioactive properties on cell membranes: *e.g.*, gambierones seem to share similar biological activities with CTXs, in that they cause VGSC activation in a similar pattern as CTXs, although in much lower intensity [36]. In addition, both gambierone and 44-methylgambierone induce a small rise in the cytosolic calcium concentration in human cortical neurons, like CTXs [34], while the expression of ionotropic glutamate receptor has been shown to be modified by chronic exposure of human neurons to gambierones, an alteration that could be involved in the neurological manifestations observed in human CP [34]. Likewise, the ability of gambieric acids to bind to the site 5 of VGSCs, although with lower affnity than CTXs, has been previously described by Inoue *et al.* (2003) [91].

Taken together, all these observations strongly suggest that, besides CTXs, many of the other metabolites produced by *G. polynesiensis* may be implicated in CP although their structure and effects on cellular membranes seem to differ from those typical of CTXs. The data presented here also clarify the relationship between the diversity of toxic compounds produced by *G. polynesiensis* and the exceptionally high toxic activity of this species.

4. Conclusions

This study examined how toxicity and toxin profiles vary with the growth phase and by geographic origin in four clones of *G. polynesiensis*, the primary source of ciguatoxins in the South Pacific region. Results confirmed the very high toxicity of this species and the high diversity of toxic metabolites produced by *G. polynesiensis* in culture. Besides, an array of CTX analogs (at least nine distinct CTX derivatives), the presence of noticeable amounts of gambierone, and 44-methylgambierone were also observed in cell extracts, whereas no MTX1 or -4 were detected. Results also highlighted significant intraspecific variations in toxin production between these clones, although the relationship between the diversity of toxic compounds produced and regional differences in CP risk remains to be clarified. Confirmation that *G. polynesiensis* toxicity significantly varies with culture age suggests the necessity for further studies on the impact of various stressors such as temperature, pH, availability, and/or source of nitrogen on the *in vitro* toxin production of *G. polynesiensis*.

In fine, such studies will also contribute to decrypting the link between global change (*e.g.*, ocean warming and acidification, eutrophication) and increased CP risk worldwide. Furthermore, they will greatly benefit current efforts aimed at obtaining suitable quantities of certified analytical standards for CP research. Concurrently, in-depth investigations on the compatibility between several detection methods such as LC-MS/MS, CBA-N2a, and RBA that are classically used in CP risk monitoring programs, will provide a better understanding of quantitation differences across methods, and foster trans-regional comparative studies on ciguatera.

5. Materials and Methods

5.1 Source of *G. polynesiensis* isolates

The four clones of *G. polynesiensis* used in this study (RIK7, NHA4, RAI-1 and RG92), originate from different islands of French Polynesia with contrasted CP risk [92–94]: *i.e.* Mangareva Island (Gambier archipelago), Nuku Hiva (Marquesas archipelago), Raivavae (Australes archipelago) and Rangiroa (Tuamotu archipelago) (Table 6). These clones were isolated from macroalgal and/or artificial substrate (window screen) samples collected following the methods described in Chinain *et al.* (2010) [24] and Tester *et al.* (2014) [95], respectively. All four strains are part of the Laboratory of Marine Biotoxins culture collection at the Louis Malardé Institute (Tahiti, French Polynesia), where cultures are deposited.

Table 6. Geographic origin and year of isolation of the four *G. polynesiensis* clones selected for this study. Incidence rates (I.R., number of cases/10,000 population), are derived from the number of CP cases reported in 2016 and are used as a proxy of CP risk.

	RIK7	**NHA4**	**RAI-1**	**RG92**
Year of isolation	2013	2015	2008	1992
Archipelago	Gambier	Marquesas	Australes	Tuamotu
Island	Mangareva	Nuku Hiva	Raivavae	Rangiroa
I.R.	354	51	43	N/A[1]

[1] N/A: data not available

Source of data: Institut Louis Malardé (www.ciguatera.pf)

5.2 *In vitro* cultures

All four *G. polynesiensis* clones selected for this study were acclimated to the culture conditions described hereafter for years prior to experimentation (Table 6). For each clonal isolate, batch cultures of *G. polynesiensis* clones were established in triplicate by inoculating 200 mL of natural seawater in 250 mL Erlenmeyer flasks. Seawater was previously aged for 1 month, filtered through a 0.2 µm porosity filter, and sterilized by autoclaving for 20 min at 120 °C. To optimize cell growth, seawater was supplemented with 200 µL of "f_{10k}" culture medium. Cultures were grown in an incubator (ThermoStable IR250, Wigel, Germany) at 26 ± 1 °C, under 60 ± 10 µmol photons m^{-2} s^{-1} irradiance, in a 12 h light: 12 h dark photoperiod. Flasks were incubated at randomly determined sites in the incubator (flask position was changed on a daily basis). The pH of the culture medium was stabilized at 8.4 by addition of a few drops of 1 M HCl once or twice a day.

5.3 Growth rate

Preliminary assays confirmed a linear correlation between *in vivo* fluorescence (relative fluorescence units or rfu) measured using a spectrophotometer (Victor X2, PerkinElmer, USA) and *G. polynesiensis* cell densities assessed using a Multisizer III™ particle counter fitted with a 280 mm aperture tube and calibrated using protocols provided by the manufacturer (Beckman Coulter, Inc., Brea, California, USA). Standard linear regression lines (rfu *vs.* cell densities) gave R^2 values between 0.95 and 0.98, indicating *in vivo* fluorescence was a good proxy for cell abundance (Figure 6).

Thereby, in all further experiments, cell growth was assessed by measuring culture fluorescence at 485 nm, at two days intervals. To limit error during fluorescence measurements, cultures were mixed fully prior to fluorescence reading then a 100 µL aliquot of each culture was deposited in 96-well plates where cells were lysed with addition of 100 µL diméthylsulfoxyde (DMSO; n = 3 wells per batch culture).

Five fluorescence readings were performed on each well. Growth rates (μ) were determined using the following formula:

$$\mu = [\ln^*(rfu_{t1} / rfu_{t0})] / [\ln (2) * (t_1 - t_0)]$$

in which μ (division day^{-1}) is the growth rate, rfu_{t1} and rfu_{t0} represent the fluorescence measured at times t_1 (days) and t_0, respectively, corresponding to the exponential growth phase portion of the growth curve.

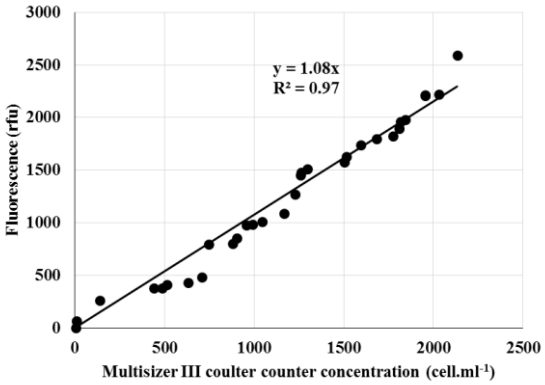


Figure 6. Linear relationship between *G. polynesiensis* RAI-1 cell concentration (cells.mL^{-1}) and *in vivo* fluorescence (rfu, relative fluorescence units). Filled circles represent individual measurements to which a linear regression line has been fitted.

5.4 Cells harvest and toxin extraction

Prior to cell harvest, the total cell yield was determined by automated counting on the Multisizer III™ particle counter. Cultures were harvested by filtration onto 90 mm GF/F Whatman filters (porosity of 0.2 μm) in their late exponential and early stationary growth phase (*i.e.* at t_8 and t_{18} post-inoculation, respectively). Each filter was then transferred into a 50 mL Greiner tube, and freeze-dried for 20 h at -20 °C, 1 mbar, then 4 h at -60 °C, 0.01 mbar (Martin Christ, Beta 1-8 LDplus). Each filter-bearing cell sample was then stored at 4 °C until further extraction.

G. polynesiensis cells were extracted by adding 20 mL of methanol (MeOH) directly into the tubes containing each freeze-dried cell sample. Tubes were then vortexed for a few seconds and then placed in an ultrasound tank for one hour. Following a centrifugation step at 2,800 g for 10 min, the resulting supernatant was recovered in a 250 mL flask. This extraction step was repeated once in MeOH and then twice in aqueous methanol (MeOH: H_2O 1:1). The four supernatants were further pooled and dried under vacuum using a rotary evaporator (Rotavapor RII, Büchi), and the resulting crude cellular extract resuspended in 6 mL of pure methanol.

Half of this solution (3 mL MeOH) was filtered through Sartorius filter (3 cm diameter, 0.45 μm porosity), then evaporated under nitrogen to dryness and reconstituted in 1 mL MeOH to obtain a crude extract destined for the screening of both MTXs and Gambierone group toxins by LC-MS/MS. The remaining 3 mL were further partitioned between 50 mL of dichloromethane (CH_2Cl_2) and 2 x 25 mL of aqueous MeOH (MeOH:H_2O 3:2) according to the procedure previously described in Chinain et al., (2010) [24], to separate lipid-soluble compounds (*e.g.* CTXs) from water-soluble compounds. The resulting dichloromethane-soluble fractions (DSFs) were dried under vacuum, weighed and stored at 4°C until tested for their toxicity using the Neuroblastoma Cell-Based Assay (CBA-N2a).

In addition, following cell harvest, the potential presence of toxic compounds in the culture media was also investigated using the protocol described in Roué *et al.* (2018) [70]. To this end, 2 g of HP20 resin were exposed to each culture medium (200 mL per clonal culture) during 72 h, at room temperature and under permanent stirring. Following filtration, the resin was thoroughly washed with

milliQ water and the toxins extracted with 50 mL pure methanol. The resulting crude extract was dried under vacuum then stored at 4 °C until tested by LC–MS/MS.

5.5 Neuroblastoma Cell-Based Assay (CBA-N2a)

CBA-N2a analyses were conducted following the procedure previously described in Darius *et al.* (2018) [56] with minor modifications. Briefly, a density of 45,000 neuroblastoma (neuro-2a) cells/200 µL/well were seeded in 5 % fetal bovine serum RPMI-1640 supplemented medium, in 96-well microtiter plates further kept at 37 °C in a humidified 5 % CO_2 atmosphere. After 24 h of growth (when the cell layer has reached 100 % confluence), the culture medium was replaced by 200 µL of 2 % fetal bovine serum RPMI-1640 supplemented medium for half of wells, and the same medium containing an ouabain-veratridine solution (OV) at a concentration of 76.2 / 7.62 µM for the other half of the wells.

Untreated cells (*i.e.* without addition of OV solution, OV^- conditions) or treated cells (*i.e.* with addition of OV solution, OV^+ conditions) were first exposed to a serial dilution 1:2 of eight concentrations of P-CTX3C ranging from 0.15 to 19.05 fg μL^{-1}. The maximum concentration of dry extract (MCE) that does not induce unspecific mortalities in neuro-2a cells was established at 9,500 pg μL^{-1} [56]. Thereby, all lipid-soluble fractions (*i.e.* DSFs) were tested in CBA-N2a using a serial dilution 1:2 of eight concentrations ranging from 25.1 to 0.2 pg.μL^{-1} of dry extract, in order to generate a full sigmoidal dose-response curve. Each concentration was tested in OV^- and OV^+ conditions, in triplicate per plate. Following an overnight incubation period, neuro-2a cells viability was assessed using the MTT assay [56]. The absorbance was measured at 570 nm using a plate reader (iMark Microplate Absorbance Reader, BioRad, Marnes la Coquette, France). For all experiments, absorbance values of OV^- and OV^+ control wells were around 1.2, corresponding to 100 % viability. Absorbance data were fitted to a sigmoidal dose-response curve (variable slope) based on the four-parameter logistic model (4PL) allowing the calculation of EC_{50} values (*i.e* the tested cell concentration inducing a loss of 50 % of the higher absorbance value) in cells eq. μL^{-1} of dry extract using Prism v8.1.2 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). The cell toxin content (Tx) for each tested clone was further estimated using the following formula:

$$Tx \text{ (in pg P-CTX3C eq. cell}^{-1}) = (EC_{50} \text{ of P-CTX3C} / EC_{50} \text{ of sample})$$

The limit of detection (LOD = (EC_{80} of P-CTX3C / $CME_{Gambierdiscus}$)) and the limit of quantification (LOQ = (EC_{50} of P-CTX3C / $CME_{Gambierdiscus}$)) of CBA-N2a for *Gambierdiscus* spp. were estimated at 0.17 x10^{-3} fg P-CTX3C eq. $cell^{-1}$ and 0.17 pg P-CTX3C eq. $cell^{-1}$, respectively, according to the method of Roué *et al.* (2016) [47].

5.6 Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) analysis

In this study, two LC-MS/MS acquisition methods were used to determine the toxin profile of the strains of *G. polynesiensis*: method 1 for the P-CTX group based on the protocol by Sibat *et al*, 2018 [51] and method 2 for MTXs and Gambierone group toxins [29]. A brief description is given below.

Both experiments were performed using a UHPLC system (UFLC Nexera, SHIMADZU, Japan) coupled to a hybrid triple quadrupole-linear ion-trap API4000 QTRAP mass spectrometer (SCIEX, CA, USA) equipped with a TurboV® electrospray ionization source (ESI). The instrument control, data processing and analysis were conducted using Analyst software 1.6.2 (Sciex, CA, USA).

5.6.1 Method 1: P-CTXs group

A linear gradient using water as eluent A and MeOH as eluent B, both eluents containing 2 mM ammonium formate and 50 mM formic acid, was run on a Zorbax Eclipse Plus C18 column, 50*2.1 mm, 1.8 µm, 95 Å (Agilent Technologies, CA, USA). The flow rate was of 0.4 mL min^{-1}, the injection volume was 5 µL and the column temperature 40 °C.

The elution gradient was as follows: 78 % B to 88 % B from 0 to 10 min, hold at 88 % B for 4 min, decrease from 88 % to 78 % in 1 min and hold for 5 min at 78 % B. Mass spectrometric detection was performed in positive ionization mode using Multiple Reaction Monitoring (MRM) scanning.

The optimized ESI+ parameters were set as follows: curtain gas at 25 psi, ion spray at 5500 V, turbo gas temperature at 300 °C, gas 1 and 2 were set at 40 and 60 psi respectively and an entrance potential at 10 V.

MRM acquisition method were created using the scheduled MRM algorithm. This algorithm optimizes dwell times and cycle time to provide a better peak detection and improve reproducibility. A detection window of 90 sec and a target scan time of 2 sec were chosen for MRM method. Calibration solution of P-CTX3C (Wako, Japan) were prepared in MeOH, with concentration ranging from 12 to 200 ng mL^{-1}.

5.6.2 Method 2: MTXs and Gambierone group

A linear gradient using water as eluent A and 95 % acetonitrile as eluent B, both eluents containing 2 mM ammonium formate and 50 mM formic acid, was run on a Kinetex C18 column, 50*2.1 mm, 2.6 µm, 100 Å (Phenomenex, CA, USA). The flow rate was of 0.4 mL min^{-1}, the injection volume was 5 µL and the column temperature 40 °C.

The elution gradient was as follows: 10 % B to 95 % B from 0 to 10 min, hold at 95 % B for 2 min, decrease from 95 % to 10 % in 1 min and hold during 3 min to equilibrate. Mass spectrometric detection was performed in negative ionization mode using MRM scanning. The *m/z* transition used were listed in Table 7.

The optimized ESI^- parameters were set as follows: curtain gas at 25 psi, ion spray at -4500 V, turbo gas temperature at 500 °C, gas 1 and 2 at 50 psi, declustering potential at -210 V and an entrance potential at -10 V.

To quantify the MTXs and Gambierone toxins, a calibration solution of MTX1 (Wako, Japan) were prepared in 50 % MeOH with concentration ranging from 0.2 to 5.0 µg mL^{-1}.

Table 7. List of MRM transitions (*m/z*) used for method 2 on API4000 QTrap

Compound	MRM transitions (*m/z*)	
MTX1	1689.8>1689.6	$[M-2H]^{2-}/[M-2H]^{2-}$
	1689.8> 96.9	$[M-2H]^{2-}/[HOSO_3]^{2-}$
	1126.2 > 1126.2	$[M-3H]^{3-}/[M-3H]^{3-}$
	1126.2 > 96.9	$[M-3H]^{3-}/[HOSO_3]^{3-}$
MTX2	1637.5 > 1637.5	$[M-2H]^{2-}/[M-2H]^{2-}$
	1637.5 > 96.9	$[M-2H]^{2-}/[HOSO_3]^{2-}$
	1091.5 > 1091.5	$[M-3H]^{3-}/[M-3H]^{3-}$
	1091.5 > 96.9	$[M-3H]^{3-}/[HOSO_3]^{3-}$
MTX4	1646.2 > 1646.2	$[M-2H]^{2-}/[M-2H]^{2-}$
	1646.2 > 96.9	$[M-2H]^{2-}/[HOSO_3]^{2-}$
Gambierone	1023.5 > 1023.5	$[M-H]^{-}/[M-H]^{-}$
	1023.5 > 96.9	$[M-H]^{-}/[HOSO_3]^{-}$
44-methylgambierone	1037.6 > 1037.6	$[M-H]^{-}/[M-H]^{-}$
	1037.6 > 96.9	$[M-H]^{-}/[HOSO_3]^{-}$

5.7 Statistical analysis

To determine whether growth rates and toxicity differences observed among clones were statistically significant, standard deviations (SD) were calculated, then depending on normality and homoscedasticity of data, an analysis of variance (ANOVA) (normality, homoscedasticity) or a Kruskal-Wallis and Wilcoxon test (non-normality and homoscedasticity) were performed using RStudio v1.0.153 (RStudio, Inc., Boston, MA, USA). Confidence intervals were calculated at 95 % (p value < 0.05).

Author Contributions: Conceptualization, S.L., P.H. and M.C.; methodology, S.L., P.H., and M.C.; validation, S.L., P.H. and M.C.; formal analysis, S.L.; investigation, S.L.; resources, M.S., P.H. and M.C.; data curation, S.L., M.S. and J.V.; writing—original draft preparation, S.L., H.T.D., P.H. and M.C.; writing—review and editing, S.L., M.S., J.V., H.T.D., P.H. and M.C.; visualization, S.L., P.H. and M.C.; supervision, M.S., H.T.D., P.H. and M.C.; project administration and funding acquisition, M.C.

Funding: The authors acknowledge GLOBALCIG, a project co-funded by the Délégation *à* la Recherche de la Polynésie française, the Université de la Polynésie Française and the Institut Louis Malardé (Conv. N 02813/MTF/REC of April 28th 2017).

Acknowledgments: The authors wish to thank Philippe Cruchet, Kévin Henry, André Ung and Taina Revel from LBM for their technical assistance, as well as the two anonymous reviewers who helped improving the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Anderson, D.M.; Lobel, P.S. The Continuing enigma of ciguatera. Biol. Bull. **1987**, 172, 89–107.
2. Ikehara, T.; Kuniyoshi, K.; Oshiro, N.; Yasumoto, T. Biooxidation of ciguatoxins leads to species-specific toxin profiles. *Toxins* **2017**, 9, 11–14.
3. Bienfang, P.; Oben, B.; Defelice, S.; Moeller, P.; Huncik, K.; Oben, P.; Toonen, R.; Daly-Engel, T.; Bowen, B. Ciguatera: the detection of neurotoxins in carnivorous reef fish from the coast of Cameroon, West Africa. *Afr. J. Mar. Sci.* **2008**, 30, 533–540.
4. Friedman, M.; Fernadez, M.; Backer, L.C.; Dickey, R.W.; Bernstein, J.; Schrank, K.; Kibler, S.; Stephan, W.; Gribble, M.O.; Bienfang, P.; et al. An updated review of ciguatera fish poisoning: clinical, epidemiological, environmental, and public health management. *Mar. Drugs* **2017**, 15, 72.
5. Friedman, M.A.; Arena, P.; Levin, B.; Fleming, L.; Fernandez, M.; Weisman, R.; Bernstein, J.; Schrank, K.; Blythe, D.; Backer, L.; et al. Neuropsychological study of ciguatera fish poisoning: A longitudinal case-control study. *Arch. Clin. Neuropsychol.* **2007**, 22, 545–553.
6. Lehane, L.; Lewis, R.J. Ciguatera: recent advances but the risk remains. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, 61, 91–125.
7. Quod, J.P.; Turquet, J. Ciguatera in Reunion Island (SW Indian Ocean): epidemiology and clinical patterns. *Toxicon* **1996**, 34, 779–785.
8. Lewis, R.J. Ciguatera: Australian perspectives on a global problem. *Toxicon* **2006**, 48, 799–809.
9. Litaker,W.R.; Vandersea, M.W.; Faust, M.A.; Kibler, S.R.; Nau, A.W.; Holland,W.C.; Chinain, M.; Holmes, M.J.; Tester, P.A. Global distribution of ciguatera causing dinoflagellates in the genus *Gambierdiscus*. *Toxicon* **2010**, 56, 711–730.

10. Gatti, C.M.I.; Lonati, D.; Darius, H.T.; Zancan, A.; Roué, M.; Schicchi, A.; Locatelli, C.A.; Chinain, M. *Tectus niloticus* (Tegulidae, Gastropod) as a novel vector of Ciguatera Poisoning: Clinical characterization and follow-up of a mass poisoning event in Nuku Hiva Island (French Polynesia). *Toxins* **2018**, 10, 102.
11. Bell, J.D.; Kronen, M.; Vunisea, A.; Nash, W.J.; Keeble, G.; Demmke, A.; Pontifex, S.; Andréfouët, S. Planning the use of fish for food security in the Pacific. *Mar. Policy* **2009**, 33, 64–76.
12. Morin, E.; Gatti, C.; Bambridge, T.; Chinain, M. Ciguatera fish poisoning: Incidence, health costs and risk perception on Moorea Island (Society archipelago, French Polynesia). *Harmful Algae* **2016**, 60, 1–10.
13. Rongo, T.; van Woesik, R. Socioeconomic consequences of ciguatera poisoning in Rarotonga, southern Cook Islands. *Harmful Algae* **2012**, 20, 92–100.
14. Skinner, M.P.; Brewer, T.D.; Johnstone, R.; Fleming, L.E.; Lewis, R.J. Ciguatera fish poisoning in the Pacific Islands (1998 to 2008). *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, 5, 1–7.
15. Chinain, M.; Faust, M.A.; Pauillac, S. Morphology and Molecular Analyses of Three Toxic Species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae): *G. pacificus*, sp. nov., *G. australes*, sp. nov., and *G. polynesiensis*, sp. nov. *J. Phycol.*, **1999**, 35, 1282–1296.
16. Fraga, S.; Rodríguez, F. Genus *Gambierdiscus* in the Canary Islands (NE Atlantic Ocean) with Description of *Gambierdiscus silvae* sp. nov., a new potentially toxic epiphytic benthic dinoflagellate. *Protist* **2014**, 165, 839–853.
17. Jang, S.H.; Jeong, H.J.; Yoo, Y.D. *Gambierdiscus jejuensis* sp. nov., an epiphytic dinoflagellate from the waters of Jeju Island, Korea, effect of temperature on the growth, and its global distribution. *Harmful Algae* **2018**, 80, 149–157.
18. Litaker, R.W.; Vandersea, M.W.; Faust, M.A.; Kibler, S.R.; Chinain, M.; Holmes, M.J.; Holland, W.C.; Tester, P.A. Taxonomy of *Gambierdiscus* including four new species, *Gambierdiscus caribaeus*, *Gambierdiscus carolinianus*, *Gambierdiscus carpenteri* and *Gambierdiscus ruetzleri* (Gonyaulacales, Dinophyceae). *Phycologia* **2009**, 48, 344–390.
19. Nishimura, T.; Sato, S.; Tawong,W.; Sakanari, H.; Yamaguchi, H.; Adachi, A. Morphology of *Gambierdicus scabrosus* sp. nov. (Gonyaulacales): a new epiphytic toxic dinoflagellate from coastal areas of Japan. *J. Phycol.* **2014**, 50, 506–514.
20. Rhodes, L.L.; Smith, K.F.; Murray, S.; Harwood, D.T.; Trnski, T.; Munday, R. The epiphytic genus *Gambierdiscus* (Dinophyceae) in the Kermadec Islands and Zealandia regions of the Southwestern Pacific and the associated risk of Ciguatera Fish Poisoning. *Mar. Drugs* **2017**, 15, 219.
21. Kretzschmar, A.L.; Larsson, M.E.; Hoppenrath, M.; Doblin, M.A.; Murray, S.A. Characterisation of Two Toxic *Gambierdiscus* spp. (Gonyaulacales, Dinophyceae) from the Great Barrier Reef (Australia): *G. lewisii* sp. nov. and *G. holmesii* sp. nov. *Protist* **2019**, 170, 125699.
22. Gómez, F.; Qiu, D.; Lopes, R.M.; Lin, S. *Fukuyoa paulensis* gen. et sp. nov., a new genus for the globular species of the dinoflagellate *Gambierdiscus* (Dinophyceae). *PLoSONE* **2015**, 10, e0119676.
23. Holmes, M.J. *Gambierdiscus yasumotoi* sp. nov. (Dinophyceae), a toxic benthic dinoflagellate from Southeastern Asia. *J. Phycol.* **1998**, 34, 661–668.
24. Chinain, M.; Darius, H.T.; Ung, A.; Cruchet, P.;Wang, Z.; Ponton, D.; Laurent, D.; Pauillac, S. Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (Dinophyceae) in culture. *Toxicon* **2010**, 56, 739–750.

25. Yasumoto, T.; Igarashi, T.; Legrand, A.-M.; Cruchet, P.; Chinain, M.; Fujita, T.; Naoki, H. Structural elucidation of CTXs congeners by fast-atom bombardment tandem mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4988–4989.
26. Yogi, K.; Oshiro, N.; Inafuku, Y.; Hirama, M.; Yasumoto, T. Detailed LC-MS/MS analysis of ciguatoxins revealing distinct regional and species characteristics in fish and causative algae from the Pacific. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 8886–8891.
27. Holmes, M.J.; Lewis, R.J. Purification and characterisation of large and small maitotoxins from cultured *Gambierdiscus toxicus*. *Nat. Toxins* **1994**, 2, 64–72.
28. Murata, M.; Naoki, H.; Iwashita, T.; Matsunaga, S.; Sasaki, M.; Yokoyama, A.; Yasumoto, T. Structure of Maitotoxin. *J. Am. Chem. Soc*. **1993**, 115, 2060–2062.
29. Pisapia, F.; Sibat, M.; Herrenknecht, C.; Lhaute, K.; Gaiani, G.; Ferron, P.; Fessard, V.; Fraga, S.; Nascimento, S.M.; Litaker, R.W.; *et al.* Maitotoxin-4, a novel MTX analog produced by *Gambierdiscus excentricus*. *Mar. Drugs* **2017**, 2, 220.
30. Nagai, H.; Murata, M.; Torigoe, K.; Satake, M.; Yasumoto, T. Gambieric acids, new potent antifungal substances with unprecedented polyether structures from a marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *J. Org. Chem*. **1992**, 57, 5448–5453.
31. Cagide, E.; Louzao, M.C.; Espiña, B.; Ares, I.R.; Vieytes, M.R.; Sasaki, M.; Fuwa, H.; Tsukano, C.; Konno, Y.; Yotsu-Yamashita, M.; et al. Comparative cytotoxicity of gambierol *versus* other marine neurotoxins. *Chem. Res. Toxicol*. **2011**, 24, 835–842.
32. Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T. Gambierol: A new toxic polyether compound isolated from the marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *J. Am. Chem. Soc*. **1993**, 115, 361–362.
33. Watanabe, R.; Uchida, H.; Suzuki, T.; Matsushima, R. Gambieroxide, a novel epoxy polyether compound from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* GTP2 strain. *Tetrahedron* **2013**, 69, 10299–10303.
34. Boente-Juncal, A.; Álvarez, M.; Antelo, Á.; Rodríguez, I.; Calabro, K.; Vale, C.; Thomas, O.P.; Botana, L.M. Structure elucidation and biological evaluation of maitotoxin-3, a homologue of gambierone, from *Gambierdiscus belizeanus*. *Toxins* **2019**, 11, 79.
35. Murray, J.S.; Selwood, A.I.; Harwood, D.T.; van Ginkel, R.; Puddick, J.; Rhodes, L.L.; Rise, F.;Wilkins, A.L. 44-Methylgambierone, a new gambierone analogue isolated from *Gambierdiscus australes*. *Tetrahedron Lett.* **2019**, 60, 621–625.
36. Rodríguez, I.; Genta-Jouve, G.; Alfonso, C.; Calabro, K.; Alonso, E.; Sánchez, J.A.; Alfonso, A.; Thomas, O.P.; Botana, L.M. Gambierone, a ladder-shaped polyether from the dinoflagellate *Gambierdiscus belizeanus*. *Org. Lett.* **2015**, 17, 2392–2395.
37. Holland, W.C.; Litaker, R.W.; Tomas, C.R.; Kibler, S.R.; Place, A.R.; Davenport, E.D.; Tester, P.A. Differences in the toxicity of six *Gambierdiscus* (Dinophyceae) species measured using an *in vitro* human erythrocyte lysis assay. *Toxicon* **2013**, 65, 15–33.
38. Kohli, G.S.; Farrell, H.; Murray, S. *Gambierdiscus*, the cause of ciguatera fish poisoning: an increased human health threat influenced by climate change. In *Climate Change and Marine and Freshwater Toxins*; Botana, L., Louzao, C., Vilariño, N., Eds.; De Gruyter: Boston, MA, USA, 2015; pp. 273–312.
39. Rubiolo, J.A.; Vale, C.; Martín, V.; Fuwa, H.; Sasaki, M.; Botana, L.M. Potassium currents inhibition by gambierol analogs prevents human T lymphocyte activation. *Arch. Toxicol*. **2015**, 89, 1119–1134.

40. Laza-Martínez, A.; David, H.; Riobó, P.; Miguel, I.; Orive, E. Characterization of a Strain of *Fukuyoa paulensis* (Dinophyceae) from the Western Mediterranean Sea. *J. Eukaryot. Microbiol*. **2016**, 63, 481–497.
41. Nishimura, T.; Sato, S.; Tawong, W.; Sakanari, H.; Uehara, K.; Shah, M.M.R.; Suda, S.; Yasumoto, T.; Taira, Y.; Yamagushi, H.; et al. Genetic diversity and distribution of the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae) in coastal areas of Japan. *PLoS ONE* **2013**, 8, e60882.
42. Dai, X.; Mak, Y.L.; Lu, C.K.; Mei, H.H.;Wu, J.J.; Lee,W.H.; Chan, L.L.; Lim, P.T.; Mustapa, N.I.; Lim, H.C.; *et al*. Taxonomic assignment of the benthic toxigenic dinoflagellate *Gambierdiscus* sp. type 6 as *Gambierdiscus balechii* (Dinophyceae), including its distribution and ciguatoxicity. *Harmful Algae* **2017**, 67, 107–118.
43. Lartigue, J.; Jester, E.L.E.; Dickey, R.W.; Villareal, T.A. Nitrogen source effects on the growth and toxicity of two strains of the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Harmful Algae* **2009**, 8, 781–791.
44. Pisapia, F.; Holland,W.C.; Hardison, D.R.; Litaker,R.W.; Fraga, S.; Nishimura, T.; Adachi, M.; Nguyen-Ngoc, L.; Sechet, V.; Amzil, Z.; *et al.* Toxicity screening of 13 *Gambierdiscus* strains using neuro-2a and erythrocyte lysis bioassays. *Harmful Algae* **2017**, 63, 173–183.
45. Xu, Y.; Richlen, M.L.; Morton, S.L.; Mak, Y.L.; Chan, L.L.; Tekiau, A.; Anderson, D.M. Distribution, abundance and diversity of *Gambierdiscus* spp. from a ciguatera-endemic area in Marakei, Republic of Kiribati. *Harmful Algae* **2014**, 34, 56–68.
46. Lewis, R.J.; Inserra, M.; Vetter, I.; Holland, W.C.; Hardison, D.R.; Tester, P.A.; Litaker, R.W. Rapid extraction and identification of maitotoxin and ciguatoxin-like toxins from Caribbean and Pacific *Gambierdiscus* using a new functional bioassay. *PLoS ONE* **2016**, 11, e0160006.
47. Roué, M.; Darius, H.T.; Picot, S.; Ung, A.; Viallon, J.; Gaertner-Mazouni, N.; Sibat, M.; Amzil, Z.; Chinain, M. Evidence of the bioaccumulation of ciguatoxins in giant clams (*Tridacna maxima*) exposed to *Gambierdiscus* spp. cells. *Harmful Algae* **2016**, 57, 78–87.
48. Caillaud, A.; de la Iglesia, P.; Barber, E.; Eixarch, H.; Mohammad-Noor, N.; Yasumoto, T.; Diogène, J. Monitoring of dissolved ciguatoxin and maitotoxin using solid-phase adsorption toxin tracking devices: Application to *Gambierdiscus pacificus* in culture. *Harmful Algae* **2011**, 10, 433–446.
49. Rhodes, L.; Harwood, T.; Smith, K.; Argyle, P.; Munday, R. Production of ciguatoxin and maitotoxin by strains of *Gambierdiscus australes*, *G. pacificus* and *G. polynesiensis* (Dinophyceae) isolated from Rarotonga, Cook Islands. *Harmful Algae* **2014**, 39, 185–190.
50. Roeder, K.; Erler, K.; Kibler, S.; Tester, P.; The, H.V.; Nguyen-Ngoc, L.; Gerdts, G.; Luckas, B. Characteristic profiles of Ciguatera toxins in different strains of *Gambierdiscus* spp. Toxicon **2010**, 56, 731–738.
51. Sibat, M.; Herrenknecht, C.; Darius, H.T.; Roué, M.; Chinain, M.; Hess, P. Detection of pacific ciguatoxins using liquid chromatography coupled to either low or high resolution mass spectrometry (LC-MS/MS). *J. Chromatogr. A* **2018**, 1571, 16–28.
52. Rhodes, L.; Smith, K.F.; Verma, A.; Curley, B.G.; Harwood, D.T.; Murray, S.; Kohli, G.S.; Solomona, D.; Rongo, T.; Munday, R.; *et al*. A new species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae) from the south-west Pacific: *Gambierdiscus honu* sp. nov. *Harmful Algae* **2017**, 65, 61–70.

53. Larsson, M.E.; Laczka, O.F.; Harwood, D.T.; Lewis, R.J.; Himaya, S.W.A.; Murray, S.A.; Doblin, M.A. Toxicology of *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae) from tropical and temperate Australian waters. *Mar. Drugs* **2018**, 16, 7.
54. Litaker, R.W.; Holland,W.C.; Hardison, D.R.; Pisapia, F.; Hess, P.; Kibler, S.R.; Tester, P.A. Ciguatoxicity of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* species from the Caribbean and Gulf of Mexico. *PLoS ONE* **2017**, 12, e0185776.
55. Fraga, S.; Rodríguez, F.; Caillaud, A.; Diogène, J.; Raho, N.; Zapata, M. *Gambierdiscus excentricus* sp. nov. (Dinophyceae), a benthic toxic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *Harmful Algae* **2011**, 11, 10–22.
56. Darius, H.T.; Roué, M.; Sibat, M.; Viallon, J.; Gatti, C.M.I.; Vandersea, M.W.; Tester, P.A.; Litaker, R.W.; Amzil, Z.; Hess, P.; *et al. Tectus niloticus* (Tegulidae, gastropod) as a novel vector of ciguatera poisoning: Detection of pacific ciguatoxins in toxic samples from Nuku Hiva Island (French Polynesia). *Toxins* **2018**, 10, 2.
57. Yogi, K.; Sakugawa, S.; Oshiro, N.; Ikehara, T.; Sugiyama, K.; Yasumoto, T. Determination of toxins involved in Ciguatera Fish Poisoning. *J. AOAC Int.* **2014**, 97, 398–402.
58. Murata, M.; Legrand, A.M.; Ishibashi, Y.; Fukui, M.; Yasumoto, T. Structures and configurations of ciguatoxin from the moray eel *Gymnothorax javanicus* and its likely precursor from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *J. Am. Chem. Soc*. **1990**, 112, 4380–4386.
59. Yasumoto, T. The chemistry and biological function of natural marine toxins. *Chem. Rec*. **2001**, 1, 228–242.
60. Soliño, L.; Costa, P.R. Differential toxin profiles of ciguatoxins in marine organisms: Chemistry, fate and global distribution. *Toxicon* **2018**, 150, 124–143.
61. Kibler, S.R.; Litaker, R.W.; Holland, W.C.; Vandersea, M.W.; Tester, P.A. Growth of eight *Gambierdiscus* (Dinophyceae) species: Effects of temperature, salinity and irradiance. *Harmful Algae* **2012**, 19, 1–14.
62. Xu, Y.; Richlen, M.L.; Liefer, J.D.; Robertson, A.; Kulis, D.; Smith, T.B.; Parsons, M.L.; Anderson, D.M. Influence of environmental variables on *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae) growth and distribution. *PLoS ONE* **2016**, 11, e0153197.
63. Yoshimatsu, T.; Yamaguchi, H.; Iwamoto, H.; Nishimura, T.; Adachi, M. Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of Japanese *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae). *Harmful Algae* **2014**, 35, 29–37.
64. Tawong, W.; Yoshimatsu, T.; Yamaguchi, H.; Adashi, M. Temperature and salinity effects and toxicity of *Gambierdiscus caribeus* (Dinophyceae) from Thailand. *Phycologia* **2016**, 55, 274–278.
65. Bomber, J.W.; Tindall, D.R.; Miller, D.M. Genetic variability in toxin potencies among seventeen clones of *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceaea). *Phycology* **1989**, 25, 615–625.
66. Holmes, M.J.; Lewis, R.J.; Poli, M.A.; Gillespie, N.C. Strain dependent production of ciguatoxin precursors (gambiertoxins) by *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae) in culture. *Toxicon* **1991**, 29, 761–775.
67. Vacarizas, J.; Benico, G.; Austero, N.; Azanza, R. Taxonomy and toxin production of *Gambierdiscus carpenteri* (Dinophyceae) in a tropical marine ecosystem: The first record from the Philippines. *Mar. Pollut. Bull.* **2018**, 137, 430–443.

68. Sperr, A.E.; Doucette, G.J. Variation in growth rate and ciguatera toxin production among geographically distinct isolates of *Gambierdiscus toxicus*. In *Harmful and toxic algal blooms: proceedings of the 7th International Conference on Toxic Phytoplankton (Sendai, Japan)*; Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y., Eds.; Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO: Paris, France, 1996; pp. 309–312.
69. Wang, B.; Yao, M.; Zhou, J.; Tan, S.; Jin, H.; Zhang, F.; Mak, Y.L.; Wu, J.; Chan, L.L.; Cai, Z. Growth and toxin production of *Gambierdiscus* spp. can be regulated by quorum-sensing bacteria. *Toxins* **2018**, 10, 257.
70. Roué, M.; Darius, H.T.; Viallon, J.; Ung, A.; Gatti, C.M.I.; Harwood, D.T.; Chinain, M. Application of solid phase adsorption toxin tracking (SPATT) devices for the field detection of *Gambierdiscus* toxins. *Harmful Algae* **2018**, 71, 40–49
71. Murray, J.S.; Boundy, M.J.; Selwood, A.I.; Harwood, D.T. Development of an LC–MS/MS method to simultaneously monitor maitotoxins and selected ciguatoxins in algal cultures and P-CTX-1B in fish. *Harmful Algae* **2018**, 80, 80–87.
72. Lyu, Y.; Richlen, M.L.; Sehein, T.R.; Chinain, M.; Adachi, M.; Nishimura, T.; Xu, Y.; Parsons, M.L.; Smith, T.B.; Zheng, T.; et al. LSU rDNA based RFLP assays for the routine identification of *Gambierdiscus* species. *Harmful Algae* **2017**, 66, 20–28.
73. Darius, H.T.; Roué, M.; Sibat, M.; Viallon, J.; Gatti, C.M.I.; Vandersea, M.W.; Tester, P.A.; Litaker, R.W.; Amzil, Z.; Hess, P.; *et al.* Toxicological investigations on the sea urchin *Tripneustes gratilla* (Toxopneustidae, Echinoid) from Anaho bay (Nuku Hiva, French Polynesia): Evidence for the presence of pacific ciguatoxins. *Mar. Drugs* **2018**, 16, 122.
74. Gold, E.P.; Jacocks, H.M.; Bourdelais, A.J.; Baden, D.G. Brevenal, a brevetoxin antagonist from *Karenia brevis*, binds to a previously unreported site on mammalian sodium channels. *Harmful Algae* **2013**, 26, 12–19.
75. Chinain, M.; Gatti, C.M.I.; Roué, M.; Darius, H.T. Ciguatera poisoning in French Polynesia: Insights into the novel trends of an ancient disease. *New Microbes New Infect*. **2019**, 31, 100565.
76. Dechraoui Bottein, M.Y.; Wang, Z.; Ramsdell, J.S. Intrinsic potency of synthetically prepared brevetoxin cysteine metabolites BTX-B2 and desoxyBTX-B2. Toxicon **2007**, 50, 825–834.
77. Clausing, R.J.; Losen, B.; Oberhaensli, F.R.; Darius, H.T.; Sibat, M.; Hess, P.; Swarzenski, P.W.; Chinain, M.; Dechraoui Bottein, M.Y. Experimental evidence of dietary ciguatoxin accumulation in an herbivorous coral reef fish. *Aquat. Toxicol.* **2018**, 200, 257–265.
78. Jauffrais, T.; Kilcoyne, J.; Herrenknecht, C.; Truquet, P.; Séchet, V.; Miles, C.O.; Hess, P. Dissolved azaspiracids are absorbed and metabolized by blue mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicon* **2013**, 65, 81–89.
79. García-Portela, M.; Riobó, P.; Franco, J.M.; Bañuelos, R.M.; Rodríguez, F. Genetic and toxinological characterization of North Atlantic strains of the dinoflagellate *Ostreopsis* and allelopathic interactions with toxic and non-toxic species from the genera *Prorocentrum*, *Coolia* and *Gambierdiscus*. *Harmful Algae* **2016**, 60, 57–69.
80. Munday, R.; Murray, S.; Rhodes, L.L.; Larsson, M.E.; Harwood, D.T. Ciguatoxins and maitotoxins in extracts of sixteen *Gambierdiscus* isolates and one *Fukuyoa* isolate from the South Pacific and their toxicity to mice by intraperitoneal and oral administration. *Mar. Drugs* **2017**, 15, 208.

81. Sparrow, L.; Momigliano, P.; Russ, G.R.; Heimann, K. Effects of temperature, salinity and composition of the dinoflagellate assemblage on the growth of *Gambierdiscus carpenteri* isolated from the Great Barrier Reef. *Harmful Algae* **2017**, 65, 52–60.
82. Reverté, L.; Toldrà, A.; Andree, K.B.; Fraga, S.; De Falco, G.; Campàs, M.; Diogène, J. Assessment of cytotoxicity in ten strains of *Gambierdiscus australes* from Macaronesian Islands by neuro-2a cell-based assays. *J. Appl. Phycol.* **2018**, 30, 2447–2461.
83. Hardison, D.R.; Sunda,W.G.; Shea, D.; Litaker,W.R. Increased toxicity of *Karenia brevis* during phosphate limited growth: Ecological and evolutionary implications. *PLoS ONE* **2013**, 8, e58545.
84. Hardison, D.R.; Sunda,W.G.; Tester, P.A.; Shea, D.; Litaker,W.R. Increased cellular brevetoxins in the red tide dinoflagellate *Karenia brevis* under CO2 limitation of growth rate: Evolutionary implications and potential effects on bloom toxicity. *Limnol. Oceanogr.* **2014**, 59, 560–577.
85. Carlson, R.D.; Morey-Gaines, G.; Tindall, D.R.; Dickey, R.W. Effects of macroalgal extracts on growth in culture. In *Seafood Toxins*; American Chemical Society: Washington, DC, USA, 1984; pp. 271–287.
86. Bomber, J.W. Ecology, genetic variability and physiology of the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* Adachi and Fukuyo. Ph.D. Thesis, Florida Institute of Technology, Melbourne, FL, USA; p. 147.
87. Sugg, L.M.; VanDolah, F.M. No evidence for an allelopathic role of okadaic acid among ciguatera-associated dinoflagellates. *J. Phycol.* **1999**, 35, 93–103.
88. Granéli, E.;Weberg, M.; Salomon, P.S. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: The role of eutrophication. *Harmful Algae* **2008**, 8, 94–102.
89. Sakamoto, B.; Nagai, H.; Hokama, Y. Stimulators of *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae) growth: The possible role of gambieric acid-A as an endogenous growth enhancer. *Phycologia* **1996**, 35, 350–353.
90. Morohashi, A.; Satake, M.; Nagai, H.; Oshima, Y.; Yasumoto, T. The absolute configuration of gambieric acids A-D, potent antifungal polyethers, isolated from the marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Tetrahedron* **2000**, 56, 8995–9001.
91. Inoue, M.; Hirama, M.; Satake, M.; Sugiyama, K.; Yasumoto, T. Inhibition of brevetoxin binding to the voltage-gated sodium channel by gambierol and gambieric acid-A. *Toxicon* **2003**, 41, 469–474.
92. Rougerie, F.; Bagnis, R. Bursts of ciguatera and endo-upwelling process on coral reef. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **1992**, 85, 464–466.
93. Chateau-Degat, M.L.; Dewailly, E.; Cerf, N.; Nguyen, N.L.; Huin-Blondey, M.O.; Hubert, B.; Laudon, F.; Chansin, R. Temporal trends and epidemiological aspects of ciguatera in French Polynesia: A 10-year analysis. *Trop. Med. Int. Health* **2007**, 12, 485–492.
94. Chinain, M.; Darius, H.T.; Ung, A.; Tchou Fouc, M.; Revel, T.; Cruchet, P.; Pauillac, S.; Laurent, D. Ciguatera risk management in French Polynesia: The case study of Raivavae Island (Australes Archipelago). *Toxicon* **2009**, 56, 674–690.
95. Tester, P.A.; Kibler, S.R.; Holland, W.C.; Usup, G.; Vandersea, M.W.; Leaw, C.P.; Teen, L.P.; Larsen, J.;
96. Mohammad-Noor, N.; Faust, M.A.; *et al*. Sampling harmful benthic dinoflagellates: Comparison of artificial and natural substrate methods. *Harmful Algae* **2014**, 39, 8–25.
© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerlan



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Les environnements côtiers et océaniques subissent actuellement plusieurs changements majeurs tant au niveau de leur structure que de leur état de santé global, sous l'action de forçages climatiques tels que la hausse des températures, l'acidification et la désoxygénation qui impactent les écosystèmes aquatiques à l'échelle du globe (Griffith & Gobler, 2020). A titre d'exemple, les projections actuelles en termes de changement global font état d'un réchauffement des masses océaniques de l'ordre de +2 °C d'ici 50 ans (Stocker, 2014; Figure 39a), d'une acidification à raison de -0,3 unités pH d'ici 2100 (voir Jiang *et al.*, 2019 pour une revue; Figure 39b), et d'une eutrophisation des zones côtières liée à l'intensification de l'activité humaine sur les littoraux avec en moyenne 24 % des rejets azotés qui atteignent les écosystèmes côtiers (voir Malone & Newton, 2020 pour une revue).

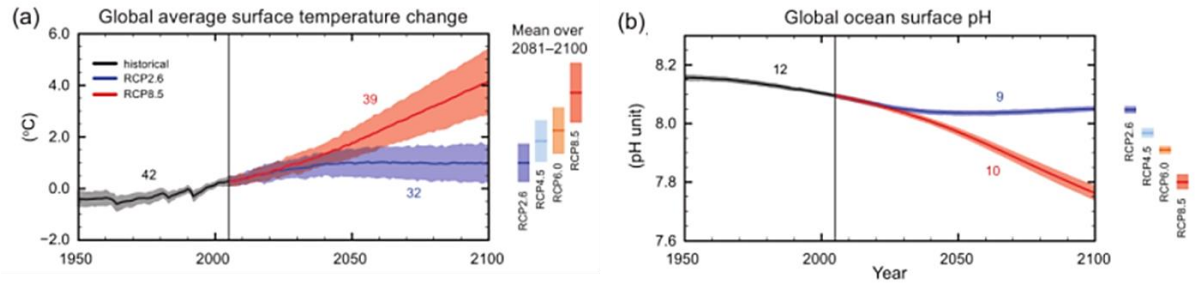


Figure 39 (d'après Stocker, 2014): Modélisation des tendances d'évolution (a) de la température de surface et (b) du pH des océans du glode d'après les différents scénarii (RCP) envisagés.

L'expansion des phénomènes de ciguatéra à l'échelle du globe est une autre conséquence du changement climatique (Llewellyn *et al.*, 2009; Tester *et al.*, 2010; Skinner *et al.*, 2011; Gingold *et al.*, 2014; Kohli *et al.*, 2015a; Chinain *et al.*, 2019, 2020a). En effet, le réchauffement progressif des masses océaniques est considéré comme l'une des causes probables de l'extension des aires de prolifération de *Gambierdiscus* et *Fukuyoa* observée actuellement dans plusieurs régions du globe, y compris dans les régions tempérées. Ainsi, l'augmentation annuelle des eaux de surface en Nouvelle-Zélande et dans le Sud-Est de l'Australie pourrait expliquer le signalement récent de *Gambierdiscus* et *Fukuyoa* aux îles Kermadec et dans la région Nord de la Nouvelle-Zélande (Rhodes *et al.*, 2017a,c; Rhodes *et al.*, 2020) ainsi que dans les eaux plus tempérées de Nouvelle-Galles du Sud en Australie (voir Rhodes *et al.*, 2020 et références). L'ensemble des observateurs s'accorde sur le fait que le réchauffement climatique a très certainement permis l'installation de conditions environnementales favorables à la dispersion et au développement des organismes ciguatérigènes dans ces nouvelles régions (Tester *et al.*, 2013; Nishimura *et al.*, 2016; Rhodes *et al.*, 2017a; Rodríguez *et al.*, 2017; Jang *et al.*, 2018; Larsson *et al.*, 2018; Tudó *et al.*, 2018, 2020). Dans le Pacifique et les Caraïbes, un lien a aussi été relevé entre des épisodes El Niño associés à des températures anormalement élevées des masses océaniques d'une part, et la fréquence des flambées de ciguatéra et/ou les pics enregistrés au niveau du nombre de cas d'intoxication d'autre part (Barton *et al.*, 1995; Hales *et al.*, 1999; Gingold *et al.*, 2014).

Outre la température, l'effet d'autres facteurs abiotiques en lien avec le changement global sur la croissance et la toxicité de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* sont également documentés dans la littérature, tels que l'influence de la salinité (Bomber *et al.*, 1988a; Roeder *et al.*, 2010; Yoshimatsu *et al.*, 2014; Vacarizas *et al.*, 2018), de l'éclairement (Usup *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 2016; Leynse *et al.*, 2017; Vacarizas *et al.*, 2018) ou de la source/disponibilité en nutriments (Sperr et Doucette 1996; Lartigue *et al.* 2009; Okolodkov *et al.*, 2014). En revanche, l'effet de la variable pH, la plus représentative de l'acidification des océans, n'a pour l'heure fait l'objet d'aucune donnée publiée. Ce qu'il faut retenir de ces études, c'est qu'elles ont abouti à des résultats parfois contradictoires qui suggèrent l'intervention probable d'un effet souche directement lié aux caractéristiques génétiques (*i.e.*, l'espèce) des cultures ciblées. A ce propos, il est à noter que certains de ces travaux ont été réalisés à une époque où la

taxonomie de *Gambierdiscus* n'était pas complètement résolue ce qui souligne la nécessité de vérifier tout ou partie des résultats disponibles dans la littérature, sur des souches dont l'identité taxonomique est désormais clairement établie (Parsons *et al.,* 2012). En tout état de cause, aucune de ces études ne s'est encore penchée sur l'écotoxicologie de l'espèce *G. polynesiensis*.

Chez *Gambierdiscus*/*Fukuyoa*, le niveau de toxicité d'une souche donnée dépend à la fois de la teneur totale en CTX produites (toxicité globale) et de la diversité des analogues de CTX présents (notion de profil toxinique) (Roeder *et al.,* 2010; Chinain *et al.,* 2010a, 2020b; Estevez *et al.,* 2020b). S'agissant de l'espèce *G. polynesiensis*, l'étude de Longo *et al.*, 2019 (*cf.* chapitre III pp 100-123) a permis de confirmer que (i) les cultures de *G. polynesiensis* représentent des sources non négligeables de CTX algales (production de l'ordre de plusieurs picogrammes de CTX par cellule, soit 10 à 1 000 fois les niveaux habituellement observés chez d'autres espèces, et (ii) les quantités et analogues produits sont susceptibles de varier de manière substantielle d'une souche à l'autre.

Dans un contexte de pénurie persistante en standards de CTX qui sont âprement recherchés par les nombreux laboratoires en charge des programmes de surveillance de la ciguatéra et/ou de la sécurité alimentaire des produits de la mer (FAO, 2020), les cultures de *G. polynesiensis* représentent donc un formidable atout pour la production à façon d'un large panel de standards de CTX nécessaires au développement et à l'optimisation des méthodes de détection de ces composés. Toutefois, un des pré-requis nécessaires au succès de ce volet R&D est de clarifier les conditions de culture de cette micro-algue compatibles avec une production toxinique optimale (à la fois en termes de concentration totale de CTX et d'identité des congénères produits), tout en garantissant l'obtention de biomasses cellulaires suffisantes.

Dans la continuité du chapitre précédent, le chapitre IV propose donc de s'intéresser à l'influence du pH, des concentrations en nitrates, et de la source d'azote dans le milieu de culture utilisé sur la croissance, la production en CTX et les profils toxiniques de quatre clones de *G. polynesiensis* d'origine géographique distincte. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication en 2020 dans la revue internationale *Toxins*.

CHAPITRE IV: EFFETS DU PH ET DE LA DISPONIBILITE/SOURCE D'AZOTE SUR LA CROISSANCE ET LES PROFILS TOXINIQUES CHEZ LE DINOFLAGELLE CIGUATERIGENE *GAMBIERDISCUS POLYNESIENSIS*

Article

Effects of pH and Nutrients (Nitrogen) on Growth and Toxin Profile of the Ciguatera-Causing Dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (*Dinophyceae*)

Sébastien Longo [1],*, Manoëlla Sibat [2], Hélène Taiana Darius [1], Philipp Hess [2] and Mireille Chinain [1]

[1] Laboratory of Marine Biotoxins, Institut Louis Malardé-UMR241 EIO (IFREMER, ILM, IRD, UPF), 98713 Papeete, Tahiti, French Polynesia ; tdarius@ilm.pf (H.T.D.); mchinain@ilm.pf (M.C.)

[2] Phycotoxins Laboratory, IFREMER, Rue de l'Ile d'Yeu, 44311 Nantes, France; Manoella.Sibat@ifremer.fr (M.S.); Philipp.Hess@ifremer.fr (P.H.)

* Correspondence: slongo@ilm.pf

Received date: 7 October 2020; Accepted date: 25 November 2020; Published date: 4 December 2020

Abstract: Ciguatera poisoning is a foodborne disease caused by the consumption of seafood contaminated with ciguatoxins (CTXs) produced by dinoflagellates in the genera *Gambierdiscus* and *Fukuyoa*. Ciguatera outbreaks are expected to increase worldwide with global change, in particular as function of its main drivers, including changes in sea surface temperature, acidification, and coastal eutrophication. In French Polynesia, *G. polynesiensis* is regarded as the dominant source of CTXs entering the food web. The effects of pH (8.4, 8.2, and 7.9), Nitrogen:Phosphorus ratios (24N:1P *vs.* 48N:1P), and nitrogen source (nitrates *vs.* urea) on growth rate, biomass, CTX levels, and profiles were examined in four clones of *G. polynesiensis* at different culture age (D10, D21, and D30). Results highlight a decrease in growth rate and cellular biomass at low pH when urea is used as N source. No significant effect of pH, N:P ratio, and N source on the overall CTX content was observed. Up to ten distinct analogs of Pacific ciguatoxins (P-CTXs) could be detected by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in clone NHA4 grown in urea, at D21. Amounts of more oxidized P-CTX analogs also increased under lowest pH condition. These data provide interesting leads for the custom production of CTX standards.

Keywords: *Gambierdiscus polynesiensis*; French Polynesia; ciguatera; ciguatoxins; LC-MS/MS; toxin profile; nitrate; urea; culture medium acidification

Key Contribution:

- This study documents for the first time the response of *Gambierdiscus polynesiensis* strains to some key drivers of global change, *i.e.* pH and nutrients availability;
- Both the acidification and the use of different sources and/or concentrations of nitrogen in culture medium had significant effects on *G. polynesiensis* growth and ciguatoxin production;
- The acidification of the culture medium also stimulates the production of more oxidized forms of P-CTXs in *G. polynesiensis*;
- This study may benefit R&D programs aiming at the custom production of CTX standards.

1. Introduction

Ciguatera poisoning (CP) is the most prevalent, phycotoxin-related seafood intoxication affecting mainly populations living in tropical and subtropical areas of the world. CP cases occur after the consumption of seafood contaminated with toxins known as ciguatoxins (CTXs) that are produced by dinoflagellates in the genera *Gambierdiscus* and *Fukuyoa*. Ciguatera toxins enter marine food webs through grazing by herbivores and detritivores and are further accumulated through predation and bio-transformed in carnivores [1,2]. Overall, eighteen species of *Gambierdiscus* are now recognized worldwide [3-14]. The phylogeny of these species based on LSU rDNA D8-D10 region sequences is provided in Kretzschmar *et al* (2019) [11]. Ciguatoxin production has been shown by the neuroblastoma cell based assay (CBA-N2a) to vary considerably according to species [15,16] but, interestingly, has only been confirmed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in *G. polynesiensis* since the genus *Gambierdiscus* has been enlarged from *G. toxicus* to other species [3,17].

Numerous field observations linking the effects of climate change to CP events can be found in the literature [18–24]. In particular, cyclical weather patterns such as El Niño, associated with unusual warming of ocean waters in the Pacific, have resulted in spikes of ciguatera [25], consistent with observations by Gingold *et al.* (2014) [26] who found an association between CP incidence and warmer sea surface temperatures in the Caribbean basin. Many laboratory studies have also investigated *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. growth responses and/or toxin production under varying environmental conditions, including temperature, salinity, and irradiance (for reviews, see [27] and [28], and references therein). Results confirm that differences among strains exist not only across but also within species [15,29–33]. All these observations substantiate the idea that ocean warming as a result of climate change may increase the global distribution of CTX-producing dinoflagellates and, hence, CP incidence worldwide. However, the influence of other environmental drivers commonly associated with global change, such as ocean acidification and increasing eutrophication of coastal marine ecosystems also deserve to be investigated.

Oceans serve as one of the largest carbon reserves on earth, absorbing nearly one third of all carbon dioxide emissions [34]. Increasing amounts of CO_2 diffusing from the atmosphere into the oceans results, among others, in ocean acidification [35], currently estimated as a decrease in seawater pH by 0.11 units since the 1870s [36], with the current pH being 8.06 on average [37]. Following the fifth Intergovernmental Panel on Climate Change report, forecasts predict an additional decrease in ocean pH from 0.07 (Representative Concentration Pathway 2.6; RCP 2.6) to 0.33 units (RCP 8.5) by 2100 [37,38]. Furthermore, over the past decades, there have also been significant increases in marine eutrophication globally [39]. Still, eutrophication should be considered a localized phenomenon and, in some regions, improvements have shown to lead to reduction of harmful algal blooms (HABs), *e.g.* in the Japanese Inland Sea [40]. Nitrogen (N) and phosphorus (P), two major drivers of marine eutrophication, are commonly regarded as key limiting nutrients in most aquatic ecosystems [41]. Eutrophication episodes can lead to hypoxia and anoxia, reduced water quality, alteration of food web structure, habitat degradation, loss of biodiversity, and even HAB events [39,42–44], which in turn may result in health risks and economic losses, including losses of fish and wildlife production and losses of recreational amenities [45,46]. By way of example, French Polynesian lagoons are well known oligotrophic ecosystems characterized by low concentrations of dissolved mineral nitrogen [47–49]. However, more recently, intensified agriculture and aquaculture (*e.g.* pearl-farming) practices, as well as increasing development of coastal activities, have caused major changes in local environments via the release of nutrient-rich inputs [44,50,51].

The influence nutrients and pH have on the ecophysiology and toxicity of ciguatera-causing dinoflagellates is still poorly documented. To our knowledge, no published study has currently investigated the effects of pH on the growth and toxin production of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. However, several studies have shown the effect of pH on various HAB species ([47] and references therein), such as *Alexandrium* and *Pseudo-Nitzschia* spp. [48–57]. Likewise, few field studies have examined the correlation between *Gambierdiscus* cell densities and nutrient levels in various ciguatera-prone areas of the Pacific (French Polynesia, Hawaii)[57–59], Caribbean (British and U.S. Virgin Islands)[60–62], and Indian Ocean (Mauritius)[63]. While some of these studies were limited by non-

detectable nutrient concentrations [63], others gave contradictory results [57–62]. There is also limited data on the role of nutrients in stimulating *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. toxin production [32,64–67]. These studies which examined the effects of both nutrient levels and various nitrogen sources (*i.e.* nitrate, ammonium, urea) showed that species matters as results suggest that the various species of *Gambierdiscus* may have different nutrient physiologies and uptake kinetics.

In French Polynesia, *G. polynesiensis* is regarded as the dominant source of CTXs entering the food web [68]. A recent study conducted on four *G. polynesiensis* isolates originating from distinct geographic locations in French Polynesia, showed these strains produce at least nine distinct P-CTX analogs in culture, namely P-CTX4B, P-CTX4A (52-epi-P-CTX4B), P-CTX3C, P-CTX3B (49-epi-P-CTX3C), 2-hydroxy-P-CTX3C, M-seco-P-CTX3C, and three P-CTX3B/C isomers not fully characterized yet, and confirmed that clonal variation in toxin production exists in this species [33].

As a follow-up study, the present work aimed at assessing the *in vitro* growth and toxin production in *G. polynesiensis* at different growth phases, when cultured under various combinations of pH (8.4, 8.2, and 7.9), Nitrogen:Phosphorus (N:P) ratios (24N:1P *vs.* 48N:1P) while using two distinct N sources, *i.e.* nitrate *vs.* urea. Variations in both overall cellular CTX concentrations and toxin profiles were characterized by LC-MS/MS. How these data can help promote the custom production of algal CTX standards currently needed for the implementation of CP risk and management programs is further discussed.

2. Results

2.1. Effects of Culture Age, pH, Nitrogen Source, and N:P Ratio on *G. polynesiensis* Growth Rate and Biomass

The mean growth rates exhibited by each *G. polynesiensis* strain 10 days (D10) and 21 days (D21), post-inoculation, under three different pH and two N:P ratios using either nitrate or urea as N source are presented in Table 1.

In nitrate growth experiments, all strains displayed a typical growth pattern at pH = 8.4 and 8.2, characterized by a maximum growth rate of 0.2 div day^{-1} on average at the exponential growth phase (from D0 to D10) and a mean growth rate of 0.1 div day^{-1} at the stationary phase (from D10 to D21), whatever the N:P ratio tested. At pH = 7.9, although a similar growth rate around 0.2 div day^{-1} was reached at the exponential growth phase, cultures rapidly declined after 10 days contrarily to cultures maintained at pH 8.4 or 8.2. Overall, for *G. polynesiensis* considered as a whole, statistical analyses revealed no significant effect of pH or N:P ratio on the growth rate in nitrate-based culture media (data not shown).

In urea growth experiments, a different growth pattern was demonstrated in all four strains as compared to nitrate conditions (Table 1). From D0 to D10, growth rates never exceeded 0.14 div day^{-1} (clone RIK7, 48N:1P) at pH = 8.4, for the two N:P ratios tested. At pH = 8.2, strains showed a different growth response characterized by a latency phase from D0 to D10, an exponential phase from D10 to D21 with a maximum growth rate of 0.2 div day^{-1} (RIK7, 48N:1P), followed by a stationary phase from D21 to D30 for all strains (data not shown). At pH = 7.9, a similar growth trend was observed, although growth rates were generally lower than at pH = 8.2 (Table 1).

Table 1. Mean growth rates ± SD (in div day^{-1}, n = 2) of *G. polynesiensis* clones (NHA4, RAI-1, RIK7 and RG92) as assessed at D10 and D21, under three different pH conditions (8.4, 8.2, and 7.9), using either nitrate or urea as N source when tested at two distinct N:P ratios (24N:1P and 48N:1P).

CULTURE AGE	N SOURCE	N:P RATIO	PH	NHA4	RAI-1	RIK7	RG92
D0→D10	Nitrate	24N:1P	8.4	0.20 ± 0.01	0.18 ± 0.00	0.20 ± 0.03	0.15 ± 0.00
			8.2	0.17 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.17 ± 0.00	0.21 ± 0.01
			7.9	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.00	0.22 ± 0.00	0.18 ± 0.00
		48N:1P	8.4	0.23 ± 0.00	0.15 ± 0.00	0.22 ± 0.02	0.19 ± 0.00
			8.2	0.22 ± 0.01	0.20 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.13 ± 0.00
			7.9	0.26 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.00	0.21 ± 0.01
	Urea	24N:1P	8.4	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.03 ± 0.02
			8.2	-0.08 ± 0.01	-0.06 ± 0.03	-0.07 ± 0.00	-0.11 ± 0.07
			7.9	-0.05 ± 0.01	-0.05 ± 0.01	-0.04 ± 0.03	-0.05 ± 0.01
		48N:1P	8.4	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.04 ± 0.01
			8.2	0.02 ± 0.03	-0.06 ± 0.01	0.00 ± 0.02	0.00 ± 0.02
			7.9	0.01 ± 0.01	-0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.01	-0.02 ± 0.00
D10→D21	Nitrate	24N:1P	8.4	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.00	0.08 ± 0.01	0.13 ± 0.00
			8.2	0.15 ± 0.00	0.07 ± 0.03	0.13 ± 0.01	0.09 ± 0.01
			7.9	-0.02 ± 0.02	-0.06 ± 0.04	0.00 ± 0.01	-0.07 ± 0.03
		48N:1P	8.4	0.08 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.11 ± 0.00
			8.2	0.07 ± 0.04	0.04 ± 0.04	0.08 ± 0.02	0.15 ± 0.00
			7.9	0.04 ± 0.08	-0.05 ± 0.02	0.00 ± 0.00	-0.07 ± 0.01
	Urea	24N:1P	8.4	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.07 ± 0.05	0.05 ± 0.01
			8.2	0.15 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.05
			7.9	0.04 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.07	0.02 ± 0.01
		48N:1P	8.4	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.03
			8.2	0.17 ± 0.03	0.16 ± 0.04	0.20 ± 0.03	0.17 ± 0.01
			7.9	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.00	0.13 ± 0.01	0.10 ± 0.01

The cell biomass reached after 30 days of culture are presented in Table 2. It can be noted that data significantly differed between nitrate and urea supply, most notably at 24N:1P ratio (Table 2) with final cell yields in nitrate being 3-fold higher on average than those obtained in urea. At a given pH, no N:P ratio effect on cell biomass was noticed when strains were grown in nitrate, whereas cell yields obtained for all strains at 48N:1P were almost 2-fold higher on average than at 24N:1P in urea. For a given N source, cell yields were also lower at pH = 7.9 than at pH = 8.4 at the two N:P ratios tested. Of note, in nitrate conditions, the lowest cell yields were generally observed in RAI-1 strain.

Table 2. Mean ± SD (n=2) of final cell biomass yielded at D30 for each *G. polynesiensis* clones (NHA4, RAI-1, RIK7 and RG92), under three different pH conditions (8.4, 8.2, and 7.9), and two distinct N:P ratios (24N:1P and 48N:1P) when nitrate or urea were used as N source.

N SOURCE	N:P RATIO	PH	NHA4	RAI-1	RIK7	RG92
Nitrate	24N:1P	8.4	359,210 ± 62,793	235,365 ± 42,083	327,392 ± 27,340	355,867 ± 10,714
		8.2	369,212 ± 16,423	187,680 ± 13,356	351,475 ± 36,808	224,060 ± 33,932
		7.9	130,333 ± 11,857	151,357 ± 17,596	166,912 ± 64,067	171,303 ± 38,440
	48N:1P	8.4	295,035 ± 49,244	222,077 ± 39,746	264,010 ± 49,939	412,392 ± 19,155
		8.2	386,863 ± 69,359	165,353 ± 24,543	299,937 ± 7,630	203,235 ± 17,276
		7.9	189,182 ± 12,229	122,088 ± 23,412	238,283 ± 14,594	169,433 ± 16,245
Urea	24N:1P	8.4	95,207 ± 1,202	102,435 ± 27,400	198,646 ± 48,861	108,437 ± 44,900
		8.2	87,269 ± 21,779	101,969 ± 11,809	100,867 ± 21,885	94,374 ± 2,404
		7.9	59,397 ± 1,465	75,607 ± 17,721	67,019 ± 9,035	55,444 ± 11,268
	48N:1P	8.4	283,196 ± 81,070	259,798 ± 14,566	256,197 ± 8,309	120,589 ± 38,608
		8.2	245,882 ± 23,122	212,219 ± 27,011	249,582 ± 37,724	243,359 ± 13,188
		7.9	125,726 ± 15,384	175,371 ± 18,907	164,946 ± 6,384	110,912 ± 15,593

2.2. Diversity of P-CTX Analogs in *G. polynesiensis*

The LC-MS/MS analyses performed on crude methanol extracts of all four clones revealed that depending on the strain and culture conditions applied, the number of detectable P-CTX analogs in cultures of *G. polynesiensis* could range from four up to ten analogs consisting of: (i) two major compounds, P-CTX3B and P-CTX3C, and (ii) eight minor CTXs analogs: two non-polar analogs from the P-CTX1B group, *i.e.* P-CTX4A and P-CTX4B; two oxidized forms of P-CTX3C *i.e.* 2-OH-P-CTX3C and M-seco-P-CTX3C; and four hitherto undescribed isomers belonging to the P-CTX3B/C group, referred to as P-CTX3B/C group isomers 1, 2, 3, and 4 (Figure 1).

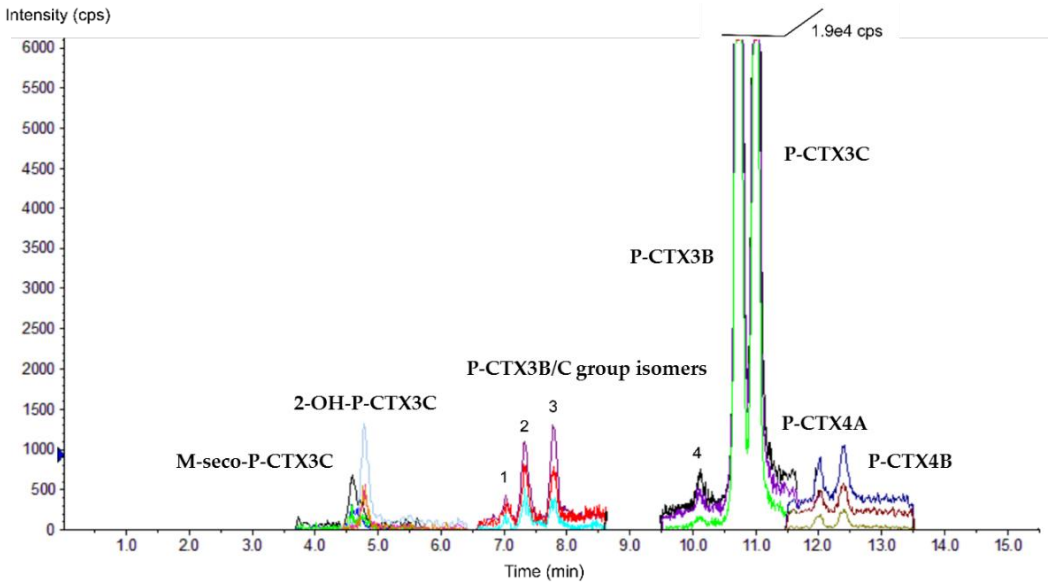


Figure 1. Chromatogram of scheduled Multiple Reaction Monitoring (MRM) LC-MS/MS showing the different P-CTX analogs detected in crude methanol extracts of *G. polynesiensis* strain NHA4 cultivated during 21 days in urea 48N:1P at pH = 7.9. The different colors correspond to the different MRM transitions (m/z) selected for the analysis method, scanning three transitions for each P-CTX analogs (see Table S1 for further information about *m/z* transitions selected).

Of note, only P-CTX3B/C group isomers 2 and 3 were produced at quantifiable amounts, whereas P-CTX3B/C isomers 1 and 4 were consistently present at levels below the limit of quantification (LOQ = 10 ng mL^{-1}) and, therefore, are not represented in the following figures and tables.

Quantitation of the different P-CTXs analogs was carried out using P-CTX3C, the only commercially available reference material. Assuming equal molar response and applying the same LOD and LOQ, the estimated concentrations were calculated against the P-CTX3C calibration curve and expressed in equivalent P-CTX3C. The sum of the estimated concentrations of all analogs allowed estimation of the overall cellular toxin content (expressed in pg P-CTX3C eq $cell^{-1}$).

2.3. Effects of Strain, Culture Age, Nitrogen, and pH on the Overall P-CTX Cell Content in *G. polynesiensis*

The overall P-CTX cell content in the four strains ranged from 0.1 to 4.0 pg P-CTX3C eq $cell^{-1}$, depending on culture age, strain, and culture conditions (Figure 2). Of note, the P-CTX content in NHA4 (*i.e.* 2.12 ± 0.99 pg P-CTX3C eq $cell^{-1}$, on average) was significantly higher than the one measured in the three other clones (p values ranged from < 0.0001 to 0.004). Conversely, RG92 showed the lowest P-CTX content with an average of 0.44 ± 0.24 pg P-CTX3C eq $cell^{-1}$ (Figure 5). Also, P-CTX contents measured at D10 were significantly lower than at D21 and D30 (p value < 0.05). In contrast, the pH, N source, or N:P ratio had no significant effects on the overall cellular CTX content of *G. polynesiensis* strains.

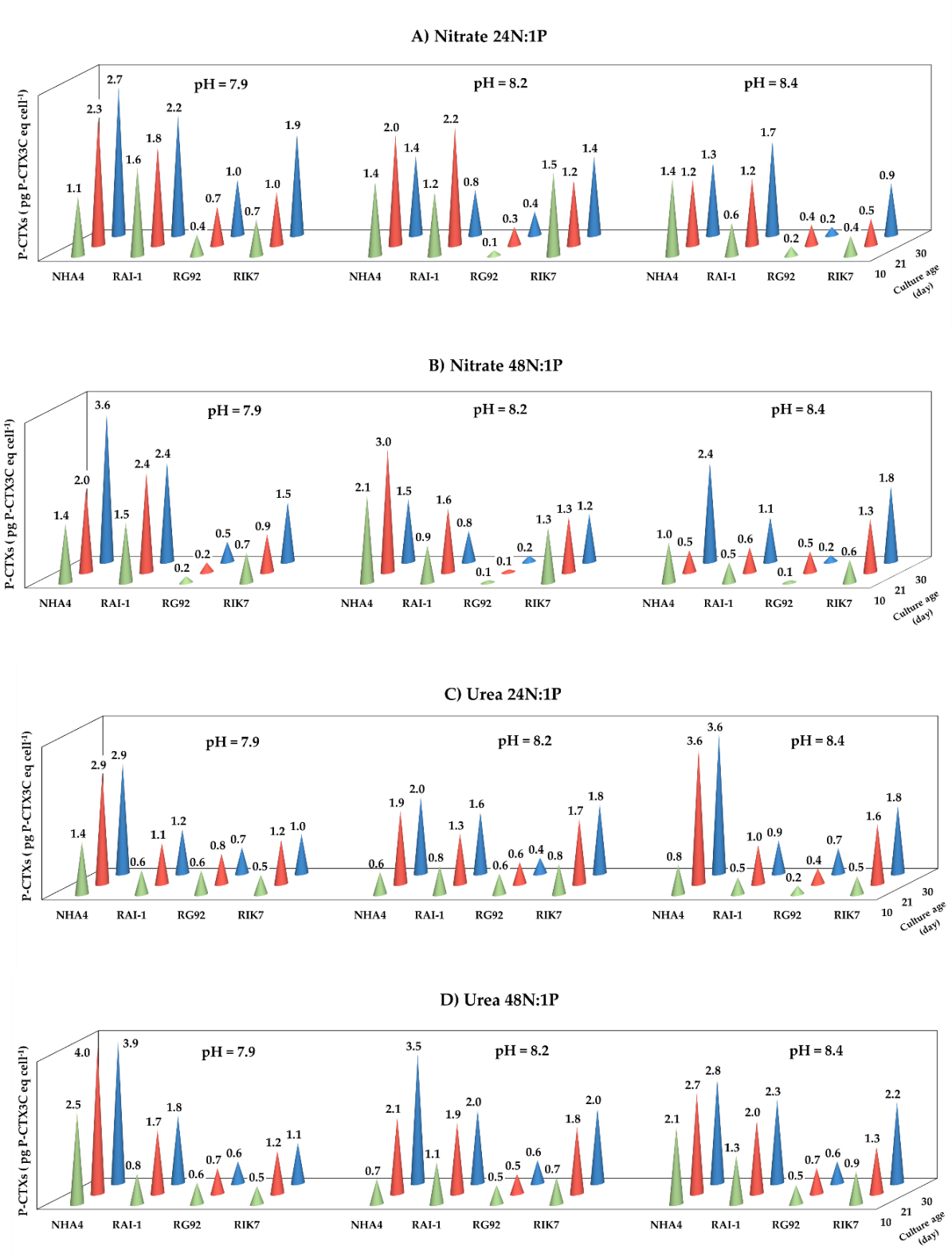


Figure 2. Mean overall P-CTX content (expressed in pg P-CTX3C eq cell^{-1}) measured by LC-MS/MS at three distinct culture ages (D10, D21, and D30) in four *G. polynesiensis* strains (NHA4, RAI-1, RG92, and RIK7) when grown at three different pH (7.9, 8.2 and 8.9), in nitrate: 24N:1P (A) and 48N:1P (B) *vs.* urea: 24N:1P (C) and 48N:1P (D). Data represent the mean P-CTX content in each strain tested in two technical replicates.

2.4. Effects of Strain, Culture Age, Nitrogen, and pH on *G. polynesiensis* Toxin Profiles

a) Clonal variations in P-CTX profiles

While RAI-1 (Australes strain) and RIK7 (Gambier strain) had similar toxin profiles composed of six analogs in all experiments (Figure 3), two additional analogs, *i.e.* 2-OH-P-CTX3C and M-seco-P-CTX3C, were quantified in NHA4 (Marquesas strain) cultures whereas P-CTX4A analog was not quantified in RG92 (Tuamotu strain). Figure 3 shows the amounts of P-CTX3B and P-CTX3C were significantly higher in NHA4 than in the three other clones (p value < 0.0001), and significantly lower in RG92 than in other clones (p value < 0.0001), based on pairwise comparisons.

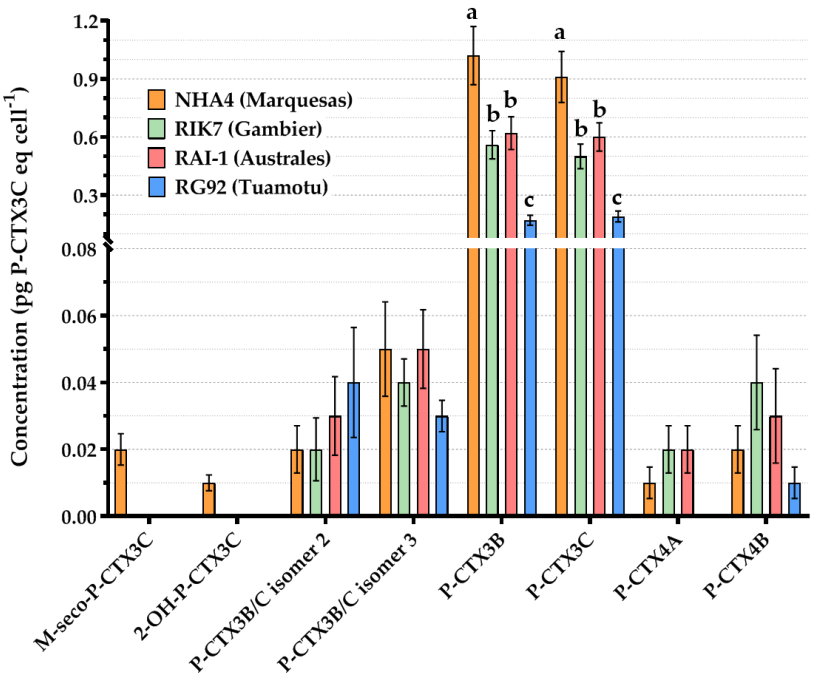


Figure 3. Mean cellular concentrations (expressed in pg P-CTX3C eq cell^{-1}) of each P-CTX analog measured by LC-MS/MS in four *G. polynesiensis* strains (NHA4, RIK7, RAI-1, and RG92). Data represent the mean ± 95 % confidence interval (CI) of n = 72 samples (two technical replicates per strain when grown under three pH conditions and two different N sources tested at two N:P ratios, at three culture ages). The letters a, b and c shown on P-CTX3B and -3C bars indicate statistical differences observed between clones based on pairwise comparisons.

b) Effects of culture age on G. polynesiensis P-CTX concentrations

The concentrations of the different P-CTX analogs detected in each of the four clones at different culture ages, *i.e.* D10, D21, and D30 are presented in Figure 4. Overall, only five analogs could be quantified at D10 *vs.* up to eight analogs at D30 depending on the strain considered (Figure 4). Moreover, a progressive increase in P-CTX3B and -3C concentrations, the two major toxins produced by *G. polynesiensis* strains, was noticed in RIK7 from D10 to D30 (Figure 4B), whereas for the three other clones, no significant differences were observed between D21 and D30 for these two compounds (Figure 4A, C and D). Interestingly, while P-CTX3B/C isomer 2 significantly decreased between D10 and D30 in strain RG92 (Figure 4D), P-CTX4A and -4B concentrations increased in the three other strains (Figure 4A-C).

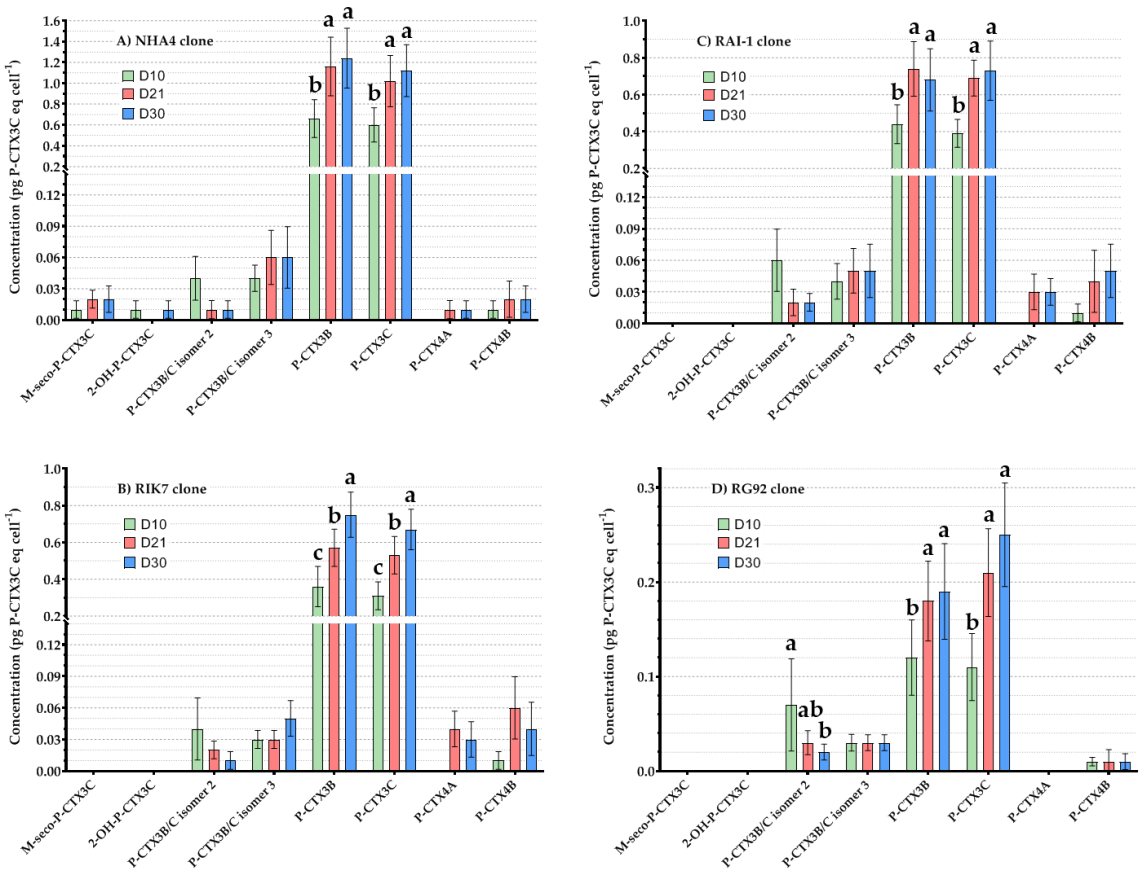


Figure 4. Mean cellular concentrations (expressed in pg P-CTX3C eq cell^{-1}) of P-CTX analogs measured by LC-MS/MS in four *G. polynesiensis* clones at three different culture ages (D10, D21, and D30): A) NHA4, B) RIK7, C) RAI-1, and D) RG92. Data represent the mean ± 95% CI of n=24 samples, (two technical replicates per strain when grown under three pH conditions and two different N sources tested at two N:P ratios). The letters indicate statistical differences observed between samples based on pairwise comparisons.

c) Effects of N source and N:P ratio on G. polynesiensis P-CTXs concentrations

The variations in P-CTX analogs diversity observed between four strains of *G. polynesiensis* when grown under different N sources and N:P ratios are presented in Figure 8. In nitrate-based experiments, only three quantifiable analogs were detected in cultures, *i.e.* P-CTX3B/C isomer 3, P-CTX3B and -3C with no significant effects of N:P ratio on their respective levels, except for clone RG92 (Figure 8D). In urea-based experiments, the number of quantifiable analogs substantially increased to five analogs in RG92 (Figure 8D), six in RAI-1 and RIK7 (Figure 8B-C), and eight in NHA4 (Figure 8A).

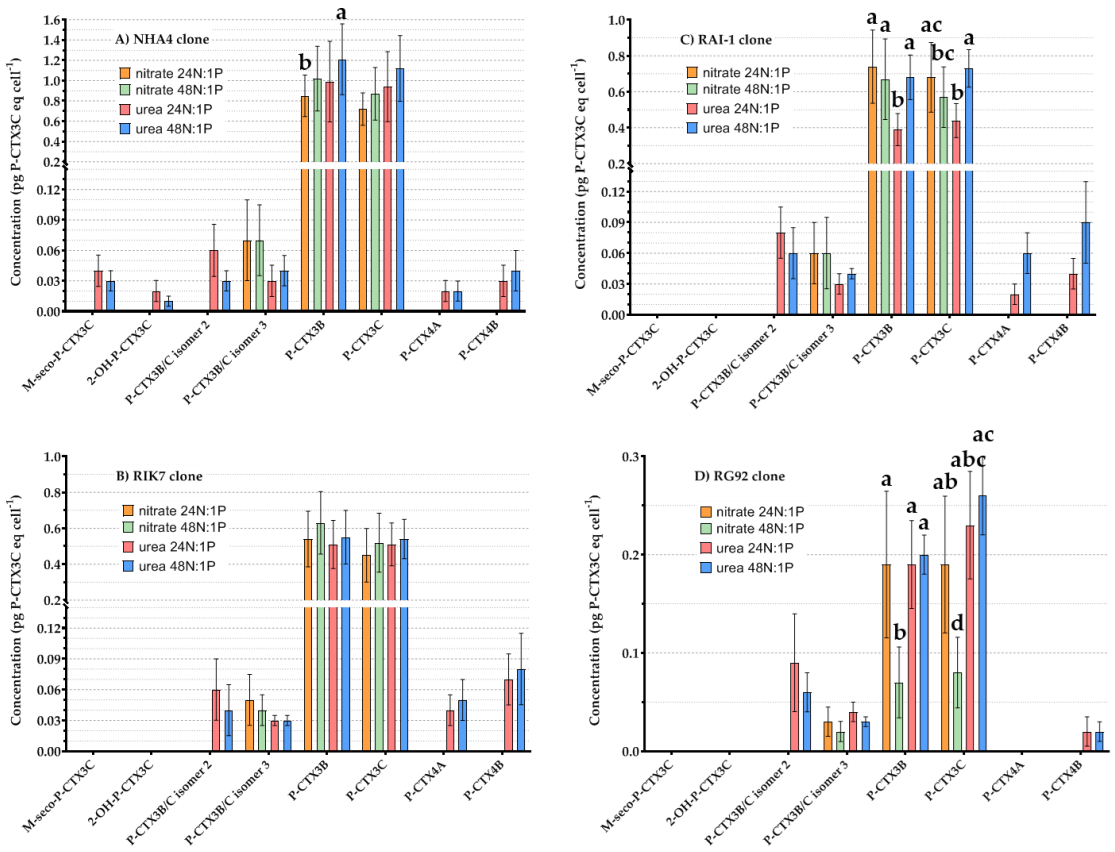


Figure 5. Mean cellular concentrations (expressed in pg P-CTX3C eq cell^{-1}) of P-CTX analogs measured by LC-MS/MS in NHA4 (A), RIK7 (B), RAI-1 (C) and RG92 (D) clones grown in nitrate 24N:1P and 48N:1P *vs.* urea 24N:1P and 48N:1P. Data represent the mean ± 95 % CI of n = 18 samples (two technical replicates analyzed at three culture ages and three pH conditions). The letters indicate statistical differences observed between samples based on pairwise comparisons.

d) Effects of pH on G. polynesiensis P-CTX concentrations

The variations in P-CTX analogs diversity observed in strains of *G. polynesiensis* when grown under different pH conditions are illustrated in Figure 6. It can be seen that in RAI-1, amounts of P-CTX3B increased significantly from pH = 8.4 to pH = 7.9 (Figure 6C). In NHA4 and RG92, amounts of P-CTX3B and -3C did not vary significantly at pH = 8.2 and pH = 8.4 but were significantly higher at pH = 7.9 (Figure 6A and 6D). In RIK7, amounts of P-CTX3B and -3C were significantly higher at pH = 8.2 (Figure 6B). In addition, the levels of a minor, more polar analog, namely P-CTX3B/C isomer 3, tended to increase at pH = 7.9 in all the clones as compared to 8.4 (Figure 6A-D). The same observations apply to two other analogs, *i.e.* 2-OH-P-CTX3C and M-seco-P-CTX3C which were detected at quantifiable amounts only in NHA4 (Figure 6A). In contrast, P-CTX3B/C isomer 2 and P-CTX4A/4B amounts remained stable across all pH values (Figure 6), except for P-CTX3B/C isomer 2 in RG92 which was significantly higher in pH = 8.2 (Figure 6D).

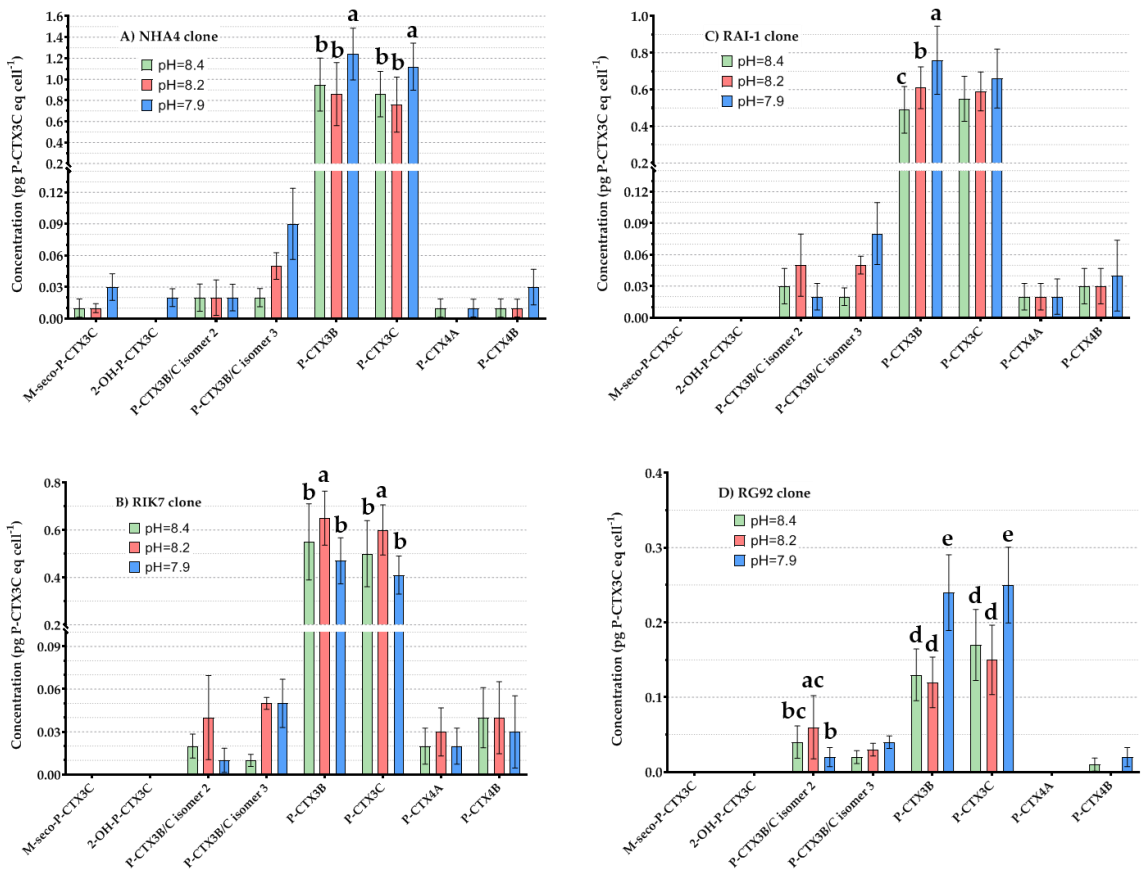


Figure 6. Mean cellular concentrations (expressed in pg P-CTX3C eq cell^{-1}) of P-CTX analogs measured by LC-MS/MS in NHA4 (A), RIK7 (B), RAI-1 (C) and RG92 (D) clones under three different pH conditions. Data represent the mean ± 95 % CI of n = 24 samples (two technical replicates analyzed at three culture ages and two different N sources tested at two N:P ratios). The letters indicate statistical differences observed between samples based on pairwise comparisons.

Table 3 summarizes the different parameters showing significant positive or negative effects on cell yields, overall toxin content and/or individual analog concentrations in *G. polynesiensis* strains, based on multiple statistical comparisons. Results indicate the clonal strain influenced both the diversity (number of analogs) and concentrations of each P-CTX analog produced. The final cell yield, the overall cell toxin content, and the levels of P-CTX analogs with low polarity significantly increased in aged cultures, whereas growth stage had no significant effect on the amounts of more polar analogs, except for P-CTX3B/C isomer 2. Contrastingly, decreasing the pH in the culture medium led to reduce cell yields and stimulated the production of more polar forms of P-CTX analogs, while no significant effect was noticed on less polar analogs except for P-CTX3B. Overall, a 2-fold increase in nitrogen concentrations (from 24N:1P to 48N:1P) resulted in enhanced cell biomass but had little effect (if any) on the overall cell toxin content and the amounts of the various P-CTX analogs composing *G. polynesiensis* toxin profile. Finally, modifying the nitrogen source from nitrate to urea significantly reduced the final cell yields but was highly beneficial to the production of several P-CTX analogs.

Table 3. Effects of strain, culture age, N:P ratio, N source and pH on the cell biomass, overall toxin content, and P-CTXs profile in *G. polynesiensis*. The statistical significance of each of these parameters is indicated. The different P-CTX analogs are listed by increasing polarity. The "→ "symbol indicates which condition comparison has been conducted.

	STRAIN	CULTURE AGE D10→D21/D30	N:P RATIO 24N:1P→48N:1P	N SOURCE Nitrate→Urea	pH 8.4→8.2/7.9
Cell yields at D30	ns	↗ ***	↗ *	↘ ***	↘ **
Overall toxin content	***	↗ *	ns	ns	ns
P-CTX4A	***	↗ ***	↗ *	↗ ***	ns
P-CTX4B	***	↗ ***	↗ **	↗ ***	ns
P-CTX3B	***	↗ ***	ns	ns	↗ *
P-CTX3C	***	↗ ***	ns	↗ *	ns
P-CTX3B/C isomer 2	*	↘ ***	↘ *	↗ ***	↗ ***
P-CTX3B/C isomer 3	***	ns	ns	↘ ***	↗ ***
2-OH-P-CTX3C	***	ns	ns	↗ ***	↗ **
M-seco-P-CTX3C	***	ns	ns	↗ ***	↗ **

* p value < 0.05 ** p value < 0.01 *** p value < 0.001 ns = non significant
↗ increase ↘ decrease.

3. Discussion

Ciguatera occurrences at a global scale depend on a combination of trend drivers. Among them, global ocean warming attributable to global change is often cited as a main driver of the current expansion of CP to novel areas and reportedly increased CP incidence (see [23,24] for reviews and references therein). In contrast, the potential impacts of ocean acidification and eutrophication on CP trends is a topic that remains largely under-studied. The present work aimed at assessing the growth and toxin production in four toxic clones of *G. polynesiensis* isolated from French Polynesia when grown under different combinations of pH, nitrogen ratios and sources, three environmental parameters regarded as representative of ocean acidification and eutrophication. Several experimental constraints were encountered in the course of this study, such as the limited number of technical replicates set up in growth experiments, or the lack of replicate measures and certified reference standards in LC-MS/MS analyses. Also, the direct addition of HCl drops in *G. polynesiensis* culture medium for pH stabilization appears as a less ecologically relevant method than bubbling with CO_2-enriched air. Hence, the data presented here should be regarded as preliminary results pending further confirmatory studies.

Despite these limits, this study yielded interesting novel results. In particular, it was shown for the first time that when grown at pH=7.9, a value close to the predicted ocean pH for the end of this century, cells of *G. polynesiensis* were able to survive, even if they required higher pH to achieve optimal growth. Cellular processes (such as phytoplankton productivity and toxin production) have been shown to be sensitive to shifts in CO_2 concentrations, including in diatoms and dinoflagellates [69–72], but there is still a striking lack of published data on the response of *Gambierdiscus* spp. to varying pH. To our knowledge, only one other study has examined the effects of pH on the growth and toxicity of two strains isolated from Marakei Island (Republic of Kiribati) and identified as *G. balechii* [73] and *Gambierdiscus* sp. type 5 [74] (*Chan, pers. Comm.*). In that study, low pH values stimulated the growth while negatively impacting the toxin production in *Gambierdiscus* sp. type 5, which is in marked contrast with our results on *G. polynesiensis*. These contrasting findings suggest *Gambierdiscus* growth as a response to acidification might differ across species, and that ocean acidification may result in a shift in both the composition and abundance of *Gambierdiscus* spp. in the environment. Regarding the effect of pH on *G. polynesiensis* toxin production, this study showed acidification of the culture medium stimulated the production of more polar (oxidized) forms of P-CTXs in this species, *i.e.* P-CTX3B/C isomer 3 in all four clones, and 2-OH-P-CTX3C and M-seco-P-CTX3C in NHA4. It is well established that the biooxidation undergone by CTXs in the food chain leads to more toxic analogs [2]. Our findings thus suggest that ocean acidification may result in less abundant but also more toxic populations of *G. polynesiensis*, a major contributor to toxin flux in ciguateric biotopes in the Pacific [30,33,68,75,76], which, in turn, may

lead to increased CP risk. Indeed, it is recognized that the toxicity in a given area depends primarily on the presence of selected highly toxic species of *Gambierdiscus* that may not be the numerically dominant species, but which contribute disproportionately to the overall toxicity of the region [33,77]. In any case, since ciguatera occurrence is generally associated with complex assemblages of multiple *Gambierdiscus* species [15,68,78], these preliminary observations warrant further studies on the physiological and toxicological responses of the other *Gambierdiscus* species frequently encountered in benthic assemblages of ciguateric biotopes, in order to inform reliable risk models on CP trends in the context of global change.

The role played by nutrients in ciguatera events remains unclear. Again, very few field studies with reported statistical results have measured nutrient concentrations concurrently to ciguatera dinoflagellate densities. Of these, both Carlson and Tindall (1985) [62] and Loeffler *et al.* (2015) [60] reported a positive correlation between nutrient concentrations and *Gambierdiscus* abundance in the U.S. Virgin Islands. Conversely, Yasumoto *et al.* (1980) [57] and Ichinotsubo *et al.* (1994) [59] found no direct correlation between nutrients and cell densities in French Polynesia and Hawaii, respectively, consistent with the observations by Parsons and Preskitt (2007) [58] in several Hawaiian locations, although according to these authors, the highest cell densities occurred at the site with the highest nutrient concentrations. All this data suggest nutrient loadings in coastal environments may not necessarily lead to *Gambierdiscus* blooms and, in fact, the linkage between increased HAB occurrences and eutrophication remains largely inconclusive for a number of microalgal taxa ([63,78,79] and references therein). However, according to Skinner *et al.* (2013) [80], nutrient inputs can cause a major shift in the distribution and abundance of ciguatera-related dinoflagellates, as evidenced in the Northern Great Barrier Reef (Australia): in several locations affected by on-going coastal eutrophication, benthic assemblages in inshore reefs once dominated by *Gambierdiscus* were composed primarily of *Prorocentrum* and *Ostreopsis*, whilst *Gambierdiscus* was still dominant in offshore locations.

In the present study, the influence of nitrogen (nutrient levels and nitrogen sources) on the growth and toxicity of *G. polynesiensis* was examined in *in vitro* conditions. Nitrogen was selected because French Polynesian lagoons are usually characterized by low concentrations of dissolved mineral nitrogen [47–49]. Our results indicate that growth rates did not significantly vary with N:P ratio, consistent with the findings of Sperr and Doucette (1996) [67] who tested a wide range of N:P ratios from 5:1 to 50:1 on several Caribbean strains. Another main finding was that all four *G. polynesiensis* strains achieved higher growth rates with nitrate rather than with urea. Likewise, the cell biomass yielded at D30 were 3-fold higher on average in nitrate than in urea at 24N:1P for all four strains. These results substantiate previous observations by Lartigue *et al.* (2009) [32] who tested the effects of different nitrogen sources on the growth and toxicity of two *Gambierdiscus* strains subsequently classified as *G. caribaeus* and *Gambierdiscus* ribotype 2 [8,77]. They noted that both strains grew well when the nitrogen source was nitrate while neither species grew on urea. These findings are in marked contrast with those of Durand-Clement (1986, 1987) [65,66] who reported increased growth in *Gambierdiscus* when urea concentration was increased from 0 to 1 mM. Parsons *et al.* (2012) [27] hypothesized that one possible explanation for this apparent contradiction is that Durand-Clément (1987) [66] tested a different species of *Gambierdiscus,* thereby implying that the various *Gambierdiscus* species likely have different nutrient physiologies.

The influence of nutrients in stimulating *Gambierdiscus* toxin production is also poorly documented and remains ambiguous. The field study conducted by Okolodkov *et al.* (2014) [61] in the Yucatan peninsula (Gulf of Mexico) outlined the importance of potential linked effects of various environmental parameters as the authors hypothesized that the greatest potential for ciguatoxin flux into the food web may occur in protected, low turbulence environments, where salinities are high, nutrients abundant, and water temperatures are between 24 and 31 °C.

In cultured-based studies, Lechat *et al.* (1985) [64] showed that variations in media (use of media with a high metallic salt content) resulted in increased ciguatoxin production whereas Lartigue *et al.* (2009) [32] claimed that CTX production in Caribbean *G. toxicus* clones was not affected by organic (nitrate or ammonium) or inorganic (urea, free amino acids or putrescine) nitrogen sources. In the present study, we were able to confirm that the use of either nitrate or urea in the growth medium had no significant effect on the overall toxin yield in *G. polynesiensis* cultures, but did result in a substantial increase of quantifiable analogs, from three to a maximum of eight P-CTX analogs depending on the

strain considered. The reason for this drastic change in *G. polynesiensis* toxin profile following the shift to urea in the culture medium is unclear. Epiphytic/benthic dinoflagellates have classical nitrogen requirements: they are known to readily utilize nitrate and ammonium with some taxa showing an apparent preference for the latter [81,82]. Both Bomber (1991) [83] and Lartigue *et al.* (2009) [32] found an increase in cellular ciguatoxicity of *Gambierdiscus* with increasing NH_4^+, which might indicate a functional role of this compound in the biosynthesis of CTXs. However, the potential role played by intracellular phosphorus utilization in toxin synthesis should not be overlooked [84,85]. Concerning the influence of N:P ratio on toxin production, Durand-Clement (1986) [65] indicated that overall toxin production remained constant with nutrient levels whereas Sperr and Doucette (1996) [67] concluded CTX production can be determined by high N:P ratio (*i.e.* N:P ≥ 30:1) in Caribbean strains of *G. toxicus.*

It should be noted that many of these earlier studies have not evaluated toxicity with CTX-specific protocols and that none of these studies have evaluated individual toxins in the response of *Gambierdiscus* clones to different nutrient regimes. Indeed, quantitation methods used in studies by Durand-Clement [65] and Sperr and Doucette [67] were based on an overall toxins concentration estimate (*i.e.* crude extract evaluated by mouse bioassay) which is not directly comparable with our use of LC-MS/MS method in the present study, which is more specific for P-CTX detection and in which each known P-CTX analog concentration is investigated. Another issue which makes comparisons with previous studies difficult is that much of the early work with *Gambierdiscus* referred solely to *G. toxicus*, while it is now well established that multiple species exist within this genus.

Dinoflagellates in the genus *Gambierdiscus* are the source of a number of non-structurally related groups of secondary metabolites of interest (see [20] for a review and references therein). Of these, CTXs are by far the most studied group due to their direct involvement in ciguatera poisoning. At present, only P-CTX3C is commercially available for detection and quantitation purposes. The current scarcity of CTX analytical standards constitutes a serious hindrance to the quantitation of these compounds in seafood and the implementation of food safety surveillance programs. Hence, significant efforts have been devoted in the past decade to determine which species of *Gambierdiscus* are more toxic than the others, and assess the variations in toxin production in response to different stressors (see [27,28] for reviews and references therein). Not all species of *Gambierdiscus* are known to produce CTXs. Among the eighteen species described to date, *G. polynesiensis* - a species allegedly endemic to the Pacific Ocean - is recognized as the highest CTX producer with published toxicity data ranging from 1.2 up to 20.9 pg P-CTX3C eq $cell^{-1}$ [17,19,30,33,86]. In the present study, we showed that *G. polynesiensis* cellular toxicity could vary by up to 46 order of magnitude in French Polynesian clones from geographically distinct origins. Although part of these variations was attributable to different culture conditions and growth stage, these observations highlight the fact that an adequate selection of the appropriate candidate-strains is preponderant in R&D programs aiming at the custom production of high-value CTX standards. Of note, this strain-dependent production of CTXs demonstrated in *G. polynesiensis* is also well established in other species such as *G. australes*, *G. balechii*, *G. pacificus*, *G. toxicus*, *F. paulensis* and *F. ruetzleri* [3,9,15,74,75,87,88]. In addition, numerous studies have demonstrated that cellular toxin levels often increase with the age of the culture [17,29,32,33,67], implying that the culture conditions for optimal growth of *Gambierdiscus* are likely to differ from the ones ensuring optimal toxin production. The LC-MS/MS data presented here (and those of Longo *et al.*, 2019)[33] also revealed that an increase in the number of CTXs analogs produced in cultures generally takes place from the exponential to the stationary phase. Finally, another important issue that needs to be considered in toxin production programs is the gradual drop in toxin yields likely to affect high toxin producing clones over time, as already reported in *G. polynesiensis* clones isolated from the Cook Islands and French Polynesia, respectively [33,89]. These observations suggest that high toxin production may not be a stable characteristic in long-term cultures of *G. polynesiensis*, contradicting earlier observations by Chinain *et al.* (2010) [17].

4. Conclusions

This study has provided clear evidence that manipulation of environmental variables can result in enhanced growth and toxicity (types of P-CTX analogs in addition to amounts) in *G. polynesiensis*. However, the importance of other factors such as culture age, clonal differences, and harvest time

should not be overlooked if the pursued objective is to maximize toxin yield and diversity. More widely, increasing attention is paid to the secondary metabolites produced by microalgae, particularly dinoflagellates, due to their potential uses in the biological, biomedical, and toxicological fields [90]. *Gambierdiscus* is no exception to the rule. Further studies are needed on the other species of *Gambierdiscus* also regarded as major contributors to toxin flux in CP-prone areas, *e.g. G. excentricus, G. australes,* and possibly *G. silvae* [14,16,91] thereby providing important information that can greatly benefit current efforts to establish a sustainable source of CTX standards. Indeed, numerous studies have shown the ability of *Gambierdiscus* to produce a wide variety of P-CTX analogs as well as their bioaccumulation at each trophic level, from herbivorous to carnivorous fish or marine invertebrates [28,92]. However, despite the identification of several C-CTX and I-CTX analogs in carnivorous fish and sharks [93–100], no study has yet been able to demonstrate the toxin production of C-CTXs or I-CTXs in *Gambierdiscus*. This fact is of major importance as toxin-producing *in vitro* cultures can provide a continuous source of CTX standards. Easier access to a variety of CTX standards will undoubtedly help improve the testing capabilities in ciguatera management and hence, accelerate the implementation of food safety surveillance programs globally. In this process, studies on the complementarity between several detection methods classically used in CP risk monitoring program (*e.g.* LC-MS/MS, CBA-N2a, and Receptor Binding Assay) need to be pursued [92,101–103] to better understand quantitation differences across methods and laboratories, and hence foster trans-regional comparative studies on ciguatera. Concurrently, the recent development of metabolomics appears as a unique opportunity to conduct in-depth investigations on the chemodiversity of these dinoflagellates, in order to *e.g.* describe new compounds (including toxins), assess the variations of their productions in response to different stressors, or identify chemical markers at different taxonomic levels [103].

5. Materials and Methods

5.1. Source of *G. polynesiensis* Isolates

The four clones of *G. polynesiensis* used in this study (RIK7, NHA4, RAI-1, and RG92, originate from different islands of French Polynesia *i.e.* Mangareva Island (Gambier archipelago), Nuku Hiva Island (Marquesas archipelago), Raivavae Island (Australes archipelago), and Rangiroa atoll (Tuamotu Archipelago) (Table 4). These clones were isolated from macro-algal and/or artificial substrate (window screens) samples collected following the methods described in Chinain *et al.* (2010) [17] and Tester *et al.* (2014) [104], respectively. All four strains are part of the Laboratory of Marine Biotoxins culture collection at the *Institut Louis Malardé* (Tahiti, French Polynesia), where cultures are deposited.

Table 4. Geographic origin and year of isolation of the four *G. polynesiensis* clones selected for this study.

ID CODE	RIK7	NHA4	RAI-1	RG92
Year of isolation	2013	2015	2008	1992
Archipelago	Gambier	Marquesas	Australes	Tuamotu
Island	Mangareva	Nuku Hiva	Raivavae	Rangiroa

5.2. *In vitro* Cultures

All four *G. polynesiensis* clones selected for this study had been maintained in natural seawater (pH = 8.4 on average) supplemented with f_{10k} medium [105], at 26 ± 1 °C under 60 ± 10 µmol photons m^{-2} s^{-1} irradiance (12 h light: 12 h dark photoperiod) for years prior to experimentation. When culture conditions were changed, clones were acclimated for 40 days to the ambient regime prior to growth experiments.

Six consecutive experiments were conducted, three using nitrate as N source at three distinct pH, and the other three, using urea (Sigma-Aldrich, MO, USA). For each experiment at a given pH, the four strains were tested under two N:P ratios and at three culture ages in two technical replicates.

Regarding the two N:P ratios tested, *i.e.* N:P of 24 and 48, the composition of the f_{10k} medium was modified accordingly. Practically, N and P concentrations were 0.05 µM and $2.1x10^{-3}$ µM in 24N:1P experiments, respectively, which are consistent with concentrations observed in oligotrophic ocean water [106]. In 48N:1P experiments, concentrations used for N and P elements were 0.1 µM and $2.1x10^{-}$

^{3} µM, respectively. Even though the N:P ratio 24 is significantly higher than the Redfield ratio (16), it was used as the standard condition since it has been used for many years in the maintenance of cultures at *Institut Louis Malardé*. It was also verified to be locally found in Polynesian coastal environment [107,108] and to be comprised between the median N:P ratio measured in warm oligotrophic mid-latitude oceans, *i.e.* 28N:1P [109] and in global ocean water, *i.e.* 22N:1P [106].

In pH experiments, the pH in culture flasks was monitored twice a day and stabilized at three different values, *i.e.* 8.4, 8.2, and 7.9, by direct addition of a few drops of 1 M HCl into the culture medium. Overnight, a +0.3 pH unit variation was observed on average and daily corrected.

Overall, different combinations of culture conditions under varying pH, N:P ratio, and nitrogen sources (N= 144 combinations) were thus tested on *G. polynesiensis* strains. To this end, batch cultures of each of the four clones were established in technical duplicates by inoculating 40,000 cells into 200 mL of seawater supplemented with 200 µl of f_{10k} in 250 mL Erlenmeyer flasks. Seawater was previously aged for 1 month, filtered through a 0.2 µm GF/F Whatman filters (Dutscher, France), and sterilized by autoclaving for 20 mn at 120 °C. All cultures were grown in an incubator (ThermoStable IR250, Wigel, Germany). Flasks were incubated at randomly determined sites in the incubator and flask position was changed on a daily basis.

5.3. Growth Rate

Growth rate was assessed using *in vivo* fluorescence following the method described in Longo *et al.* (2019) [33]. Briefly, cell growth was assessed by measuring chlorophyll fluorescence at 485 nm, at two days intervals, using a spectrophotometer (Victor X2, PerkinElmer, USA). To limit error during fluorescence measurements, cultures were fully mixed prior to fluorescence reading, then a 100 µL aliquot of each culture was deposited in 96-well plates where cells were lysed by the addition of 100 µL dimethyl sulfoxide (DMSO; n=3 wells per batch culture). Five fluorescence readings were performed on each well. Growth rates (µ) were determined using the following formula:

$$\mu = [\ln^*(rfu_{t1} / rfu_{t0})] / [\ln (2) * (t_1 - t_0)]$$

in which µ (division day^{-1}) is the growth rate, rfu_{t1} and rfu_{t0} represent the fluorescence measured at times t_1 (days) and t_0, respectively, corresponding to the exponential growth phase portion of the growth curve.

5.4. Cells Harvest and Toxin Extraction

Cells were harvested at D30 post-inoculation. Prior to cell harvest, the total cell yield was determined by automated counting using a Multisizer III^{TM} particle counter (Beckman Coulter, Inc., Brea, California, USA). Cultures were harvested by filtration onto 40 µm sieve in their late exponential, early stationary, and senescence growth phase (*i.e.* at D10, D21, and D30 post-inoculation, respectively). Each filter was then transferred into a 50 mL Greiner tube using seawater, centrifuged at 2,800 x*g* for 2 min. After discarding the supernatants, filters were freeze-dried for 20 h at -20 °C, 1 mbar, then 4 h at -60 °C, 0.01 mbar (Martin Christ, Beta 1-8 LDplus). Each sample was then stored at -20 °C until further extraction for toxicity screening.

G. polynesiensis cells were extracted by adding 20 mL of methanol (MeOH) directly into the tubes containing each freeze-dried cell sample. Tubes were then vortexed for a few seconds and then placed in an ultrasound tank for one hour. Following a centrifugation step at 2,800 x*g* for 10 min, the resulting supernatant was recovered in a 250 mL flask. This extraction step was repeated once in MeOH and then once in aqueous methanol (MeOH: H_2O 1:1). The three supernatants were further pooled and dried under vacuum using a rotary evaporator (Rotavapor RII, Büchi), and the resulting crude cellular extract suspended in 4 mL of pure methanol.

Half of this solution (2 mL MeOH) was filtered through a Sartorius filter (3 cm diameter, 0.45 µm porosity), then evaporated under nitrogen to dryness to obtain a crude extract destined for the LC-MS/MS analysis. In total, 288 samples have been generated and analyzed.

5.5. Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Analysis

The toxin screening of *G. polynesiensis* cell extracts was performed using a UHPLC system (UFLC Nexera, SHIMADZU, Japan) coupled to a hybrid triple quadrupole-linear ion-trap API4000 QTRAP mass spectrometer (SCIEX, CA, USA) equipped with a TurboV® electrospray ionization source (ESI). The instrument control, data processing, and analysis were conducted using Analyst software 1.6.2 (Sciex, CA, USA). A linear gradient using water as eluent A and MeOH as eluent B, both eluents containing 2 mM ammonium formate and 50 mM formic acid, was run on a Zorbax Eclipse Plus C18 column, 50*2.1 mm, 1.8 µm, 95 Å (Agilent Technologies, CA, USA). The flow rate was 0.4 mL min^{-1}, the injection volume was 5 µL and the column temperature 40 °C.

The elution gradient was as follows: 78% B to 88% B from 0 to 10 min, hold at 88% B for 4 min, decrease from 88% to 78% in 1 min and hold for 5 min at 78% B. Mass spectrometric detection was performed in positive ionization mode using Multiple Reaction Monitoring (MRM) scanning.

The optimized ESI+ parameters were set as follows: curtain gas at 25 psi, ion spray at 5500 V, turbo gas temperature at 300 °C, gas 1 and 2 were set at 40 and 60 psi respectively and an entrance potential at 10 V.

MRM acquisition method was created using the scheduled MRM algorithm. This algorithm optimizes dwell times and cycle time to provide better peak detection and improve reproducibility. A detection window of 90 sec and a target scan time of 2 sec were chosen for the MRM method. In order to quantify P-CTX analog, a calibration solution of P-CTX3C (Wako, Japan) was prepared in MeOH, with concentration ranging from 12 to 200 ng mL^{-1}. LOQ is determined to 10 ng mL^{-1} and LOD to 5 ng mL^{-1}. Due to the lack of analytical standards, contents of each P-CTX analog were quantified from the P-CTX3C calibration curve prepared, assuming equivalent molar response. The sum of the estimated concentrations of all analogs allowed characterization of the respective toxin profiles and calculation of the overall cellular toxin content (expressed in pg P-CTX3C eq $cell^{-1}$).

5.6. Statistical Analyses

To determine whether growth rates and toxin profiles differences observed between the different culture conditions tested (*i.e.* different combinations of pH and N:P ratio values as well as the use of different nitrogen sources in the growth medium) were statistically significant, standard deviations (SD) and 95 % confidence interval (CI; p value < 0.05) were calculated. Then an analysis of variance (ANOVA) (normality, homoscedasticity) was performed using RStudio v1.0.153 (Boston, MA, USA) or GraphPad Prism v8.1.2. (GraphPad, San Diego, CA, USA). In order to ensure more robust analyses about the general effects on toxin production, data were merged to increase sample size and allow parametric analysis even if normality sometimes was not verified. By way of example, to study the effect of geographic origin on P-CTX amounts, results obtained for the 288 samples were grouped into 4 data sets (with $n = 72$ per data set) corresponding to the four *G. polynesiensis* clones, regardless of the pH, cell age and N levels and source. A similar rationale was applied to assess the effects of pH ($n = 24$), culture age ($n = 24$), N:P ratio and N source ($n = 18$) on P-CTX levels of each clone.

Author Contributions: Conceptualization, methodology, and validation, S.L., P.H. and M.C.; formal analysis, S.L., and M.S.; data curation, S.L.; writing-original draft preparation, S.L., and M.C.; writing-review and editing, S.L., H.T.D., M.S., P.H. and M.C.; supervision, M.C., P.H., M.S and H.T.D; project administration and funding acquisition, M.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was conducted in the framework of the GLOBALCIG PhD program which was supported in part by funds from the Délégation à la Recherche de la Polynésie française (Conv. N° 02813/MTF/REC of April 28th 2017) and the University of French Polynesia.

Acknowledgments: The authors wish to thank Philippe Cruchet, Kévin Henry, and André Ung from LBM for their technical assistance, as well as the three anonymous reviewers who helped improving the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Anderson, D.M.; Lobel, P.S. The continuing enigma of ciguatera. *Biol. Bull.* **1987**, *172*, 89–107.
2. Ikehara, T.; Kuniyoshi, K.; Oshiro, N.; Yasumoto, T. Biooxidation of ciguatoxins leads to species-specific toxin profiles. *Toxins* **2017**, *9(7)*, 205.
3. Chinain, M.; Faust, M.; Pauillac, S. Morphology and molecular analyses of three toxic species of *Gambierdiscus* (*Dinophyceae*): *G. pacificus*, sp. nov., *G. australes*, sp. nov., and *G. polynesiensis*, sp. nov. *Journal of Phycology* **1999**, *35(6)*, 1282–1296.
4. Fraga, S.; Rodríguez, F. Genus *Gambierdiscus* in the Canary Islands (NE Atlantic Ocean) with description of *Gambierdiscus silvae* sp. nov., a new potentially toxic epiphytic benthic dinoflagellate. *Protist* **2014**, *165(6)*, 839–853.
5. Fraga, S.; Rodríguez, F.; Riobó, P.; Bravo, I. *Gambierdiscus balechii* sp. nov (*Dinophyceae*), a new benthic toxic dinoflagellate from the Celebes Sea (SW Pacific Ocean). *Harmful Algae* **2016**, *58*, 93–105.
6. S Smith, K.F.; Rhodes, L.; Verma, A.; Curley, B.G.; Harwood, D.T.; Kohli, G.S.; Solomona, D.; Rongo, T.; Munday, R.; Murray, S.A. A new *Gambierdiscus* species (*Dinophyceae*) from Rarotonga, Cook Islands: *Gambierdiscus cheloniae* sp. nov. *Harmful Algae* **2016**, *60*, 45–56.
7. Jang, S.H.; Jeong, H.J.; Yoo, Y.D. *Gambierdiscus jejuensis* sp. nov., an epiphytic dinoflagellate from the waters of Jeju Island, Korea, effect of temperature on the growth, and its global distribution. *Harmful Algae* **2018**, *80*, 149–157.
8. Litaker, R.W.; Vandersea, M.W.; Faust, M.A.; Kibler, S.R.; Chinain, M.; Holmes, M.J.; Holland, W.C.; Tester, P.A. Taxonomy of *Gambierdiscus* including four new species, *Gambierdiscus caribaeus, Gambierdiscus carolinianus, Gambierdiscus carpenteri* and *Gambierdiscus ruetzleri* (Gonyaulacales, *Dinophyceae*). *Phycologia* **2009**, *48(5)*, 344–390.
9. Nishimura, T.; Sato, S.; Tawong, W.; Sakanari, H.; Yamaguchi, H.; Adachi, M. Morphology of *Gambierdiscus scabrosus* sp. nov. (Gonyaulacales): a new epiphytic toxic dinoflagellate from coastal areas of Japan. *Journal of Phycology* **2014**, *50(3)*, 506–514.
10. Rhodes, L.L.; Smith, K.F.; Verma, A.; Curley, B.G.; Harwood, D.T.; Murray, S.; Kohli, G.S.; Solomona, D.; Rongo, T.; Munday, R.; *et al.* A new species of *Gambierdiscus* (*Dinophyceae*) from the south-west Pacific : *Gambierdiscus honu* sp. nov. *Harmful Algae* **2017**, *65*, 61–70.
11. Kretzschmar, A.L.; Larsson, M.E.; Hoppenrath, M.; Doblin, M.A.; Murray, S.A. Characterisation of two toxic *Gambierdiscus* spp. (Gonyaulacales, *Dinophyceae*) from the Great Barrier Reef (Australia): *G. lewisii* sp. nov. and *G. holmesii* sp. nov. *Protist* **2019**, *170(6)*, 125699.
12. Adachi, R.; Fukuyo, Y. The thecal structure of a marine toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* gen. et sp. nov. collected in a ciguatera-endemic area. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.* **1979**, *45*, 67–71.
13. Faust, M.A. Observation of sand-dwelling toxic dinoflagellates (*Dinophyceae*) from widely differing sites, including two new species. *Journal of Phycology* **1995**, *31(6)*, 996–1003.
14. Fraga, S.; Rodríguez, F.; Caillaud, A.; Diogène, J.; Raho, N.; Zapata, M. *Gambierdiscus excentricus* sp. nov. (*Dinophyceae*), a benthic toxic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *Harmful Algae* **2011**, *11*, 10–22.
15. Litaker, R.W.; Holland, W.C.; Hardison, D.R.; Pisapia, F.; Hess, P.; Kibler, S.R.; Tester, P.A. Ciguatoxicity of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* species from the Caribbean and Gulf of Mexico. *PLOS One* **2017**, *12(10)*, e0185776.
16. Pisapia, F.; Holland, W.C.; Hardison, D.R.; Litaker, R.W.; Fraga, S.; Nishimura, T.; Adachi, M.; Nguyen-Ngoc, L.; Séchet, V.; Amzil, Z.; *et al.* Toxicity screening of 13 *Gambierdiscus* strains using neuro-2a and erythrocyte lysis bioassays. *Harmful Algae* **2017**, *63*, 173–183.
17. Chinain, M.; Darius, H.T.; Ung, A.; Cruchet, P.; Wang, Z.; Ponton, D.; Laurent, D.; Pauillac, S. Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (*Dinophyceae*) in culture. *Toxicon* **2010**, *56(5)*, 739–750.
18. Barton, E.D.; Tanner, P.; Turchen, S.G.; Tunget, C.L.; Manoguerra, A.; Clark, R.F. Ciguatera fish poisoning a Southern California epidemic. *Western Journal of Emergency Medecine* **1995**, *163(1)*, 31–35.

19. Chinain, M.; Germain, M.; Deparis, X.; Pauillac, S.; Legrand, A.-M. Seasonal abundance and toxicity of the dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. (*Dinophyceae*), the causative agent of ciguatera in Tahiti, French Polynesia. *Mar. Biol.* **1999**, *135*, 259–267.
20. Tosteson, T.R. Caribbean ciguatera: a changing paradigm.Revista de Biologia Tropical **2004**, *52(1)*, 109–113.
21. Llewellyn, L.E. Revisiting the association between sea surface temperature and the epidemiology of fish poisoning in the South Pacific: Reassessing the link between ciguatera and climate change. *Toxicon* **2010**, *56(5)*, 691–697.
22. Tester, P.A.; Feldman, R.L.; Nau, A.W.; Kibler, S.R.; Litaker, W.R.; Litaker, R.W. Ciguatera fish poisoning and sea surface temperatures in the Caribbean Sea and the West Indies. *Toxicon* **2010**, *56(5)*, 698–710.
23. Tester, P.A.; Berdalet, E.; Litaker, R.W. Climate change and harmful benthic microalgae. *Harmful Algae* **2020**, *91*, 101655.
24. Chinain, M.; Gatti, C.M.; Darius, H.T.; Quod, J.P.; Tester, P.A. Ciguatera Poisonings: a global review of occurences and trends. *Harmful Algae* **2020** (in press).
25. Hales, S.; Weinstein, P.; Woodward, A. Ciguatera (Fish Poisoning), El Niño, and Pacific Sea Surface Temperature. *Ecosystem Health* **1999**, *5(1)*, 20-25.
26. Gingold, D.B.; Strickland, M.J.; Hess, J.J. Ciguatera fish poisoning and climate change: analysis of national poison center data in the United States, 2001–2011. *Environ. Health Perspect.* **2014**, *122(6)*, 580-586.
27. Parsons, M.L.; Aligizaki, K.; Dechraoui Bottein, M.; Fraga, S.; Morton, S.L.; Penna, A.; Rhodes, L. *Gambierdiscus* and *Ostreopsis*: Reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology, and toxicology. *Harmful Algae* **2012**, *14*, 107–129.
28. Chinain, M.; Gatti, C.M.; Roué, M.; Darius, H.T. Ciguatera-causing dinoflagellates in the genera *Gambierdiscus* and *Fukuyoa*: distribution, ecophysiology and toxicology. In *Dinoflagellates: Morphology, Life History and Ecological Significance*; Subba Rao, D.V., Ed.; Nova Science, New York (USA), **2020**, pp 405-457.
29. Vacarizas, J.; Benico, G.; Austero, N.; Azanza, R. Taxonomy and toxin production of *Gambierdiscus carpenteri* (*Dinophyceae*) in a tropical marine ecosystem: the first record from the Philippines. *Marine Pollution Bulletin* **2018**, *137*, 430–443.
30. Rhodes, L.; Harwood, T.; Smith, K.; Argyle, P.; Munday, R. Production of ciguatoxin and maitotoxin by strains of *Gambierdiscus australes*, *G. pacificus* and *G. polynesiensis* (*Dinophyceae*) isolated from Rarotonga, Cook Islands. *Harmful Algae* **2014**, *39*, 185–190.
31. Kibler, S.R.; Litaker, R.W.; Holland, W.C.; Vandersea, M.W.; Tester, P.A. Growth of eight *Gambierdiscus* (*Dinophyceae*) species: Effects of temperature, salinity and irradiance. *Harmful Algae* **2012**, *19*, 1–14.
32. Lartigue, J.; Jester, E.L.E.; Dickey, R.W.; Villareal, T.A. Nitrogen source effects on the growth and toxicity of two strains of the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Harmful Algae* **2009**, *8(5)*, 781–791.
33. Longo, S.; Sibat, M.; Viallon, J.; Darius, H.T.; Hess, P.; Chinain, M. Intraspecific variability in the toxin production and toxin profiles of *in vitro* cultures of *Gambierdiscus polynesiensis* (*Dinophyceae*) from French Polynesia. *Toxins* **2019**, *11(12)*, 735.
34. Zeebe, R.E. History of Seawater Carbonate Chemistry, Atmospheric CO_2, and Ocean Acidification. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **2012**, *40*, 141–165.
35. Doney, S.; Fabry, V.; Feely, R.; Kleypas, J. Ocean acidification: the other CO_2 problem. *Ann Rev Mar Sci.* **2009**, *1*, 169–192.
36. Gattuso, J.-P.; Magnan, A.; Billé, R.; Cheung, W.W.L.; Howes, E.L.; Joos, F.; Allemand, D.; Bopp, L.; Cooley, S.R.; Eakin, C.M.; *et al.* Contrasting futures for ocean and society from different anthropogenic CO_2 emissions scenarios. *Science* **2015**, *349(6243)*, aac4722.
37. Bopp, L.; Resplandy, L.; Orr, J.C.; Doney, S.C.; Dunne, J.P.; Gehlen, M.; Halloran, P.; Heinze, C.; Ilyina, T.; Séférian, R.; *et al.* Multiple stressors of ocean ecosystems in the 21st century: projections with CMIP5 models. *Biogeosciences* **2013**, *10(10)*, 6225–6245.
38. Solomon, S. IPCC (2007): Climate Change The Physical Science Basis. In *Proceedings of the IPCC* (2007) Fall Meeting **2007**.
39. Howarth, R.W. Coastal nitrogen pollution: a review of sources and trends globally and regionally. *Harmful Algae* **2008**, *8(1)*, 14–20.
40. Lassus, P.; Chomérat, N.; Hess., P.; Nézan, E. *Micro-algues toxiques et nuisibles de l'océan mondial*; COI Manuels et Guides, 68, ISSHA (Eds.); Copenhagen **2016**.

41. Elser, J.J.; Bracken, M.E.S.; Cleland, E.E.; Gruner, D.S.; Harpole, W.S.; Hillebrand, H.; Ngai, J.T.; Seabloom, E.W.; Shurin, J.B.; Smith, J.E. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* **2007**, *10(12)*, 1135–1142.
42. Rosenberg, R.; Loo, L.-O. Marine eutrophication induced oxygen deficiency: Effects on soft bottom fauna, Western Sweden. *Ophelia* **1988**, *29(3)*, 213–225.
43. Rabalais, N.N.; Turner, R.E.; Díaz, R.J.; Justić, D. Global change and eutrophication of coastal waters. *ICES J. Mar. Sci.* **2009**, *66(7)*, 1528–1537.
44. Rodier, M.; Longo, S.; Henry, K.; Ung, A.; Lo-Yat, A.; Darius, H.T.; Viallon, J.; Beker, B.; Delesalle, B.; Chinain, M. Diversity and toxic potential of algal bloom-forming species from Takaroa lagoon (Tuamotu, French Polynesia): a field and mesocosm study. *Aquat. Microb. Ecol.* **2019**, *83(1)*, 15–34.
45. Carpenter, S.R.; Caraco, N.F.; Correll, D.L.; Howarth, R.W.; Sharpley, A.N.; Smith, V.H. Nonpoint pollution of surface waters with Phosphorus and Nitrogen. *Ecol. Appl.* **1998**, *8(3)*, 559–568.
46. Wilson, M.A.; Carpenter, S.R. Economic Valuation of Freshwater Ecosystem Services in the United States: 1971-1997. *Ecol. Appl.* **1999**, *9(3)*, 772–783.
47. Dufour, P.; Berland, B. Nutrient control of phytoplanktonic biomass in atoll lagoons and Pacific ocean waters: studies with factorial enrichment bioassays. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **1999**, *234(2)*, 147–166.
48. Dufour, P.; Charpy, L.; Bonnet, S.; Garcia, N. Phytoplankton nutrient control in the oligotrophic South Pacific sub tropical gyre (Tuamotu archipelago). *Marine Ecology Progress Series* **1999**, *179*, 285–290.
49. Charpy, L.; Rodier, M.; Fournier, J.; Langlade, M.J.; Gaertner-Mazouni, N. Physical and chemical control of the phytoplankton of Ahe lagoon, French Polynesia. *Marine Pollution Bulletin* **2012**, *65(10)*, 471–477.
50. Stollsteiner, P. BRGM, Programme ARAI 3. Erosion, transport solide et dynamique torrentielle des rivières de Polynésie française; Rapport final BRGM/RP-60251-FR **2011,** 140p.
51. Gaertner-Mazouni, N.; Lacoste, E.; Bodoy, A.; Peacock, L.; Rodier, M.; Langlade, M.J.; Orempuller, J.; Charpy, L. Nutrient fluxes between water column and sediments: potential influence of the pearl oyster culture. *Marine Pollution Bulletin* **2012**, *65(10)*, 500–505.
52. Raven, J.A.; Gobler, C.J.; Hansen, P.J. Dynamic CO_2 and pH levels in coastal, estuarine, and inland waters: theoretical and observed effects on harmful algal blooms. *Harmful Algae* **2020**, *91*, 101594.
53. Flores-Moya, A.; Rouco, M.; García-Sánchez, M.J.; García-Balboa, C.; González, R.; Costas, E.; López-Rodas, V. Effects of adaptation, chance, and history on the evolution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* under selection of increased temperature and acidification. *Ecol. Evol.* **2012**, *2(6)*, 1251–1259.
54. Hattenrath-Lehmann, T.K.; Smith, J.L.; Wallace, R.B.; Merlo, L.R.; Koch, F.; Mittelsdorf, H.; Goleski, J.A.; Anderson, D.M.; Gobler, C.J. The effects of elevated CO_2 on the growth and toxicity of field populations and cultures of the saxitoxin-producing dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Limnol. Oceanogr.* **2015**, *60(1)*, 198–214.
55. Tatters, A.O.; Fu, F.X.; Hutchins, D.A. High CO_2 and silicate limitation synergistically increase the toxicity of *Pseudo-nitzschia fraudulenta*. *PLOS One* **2012**, *7(2)*, e32116.
56. Sun, J.; Hutchins, D.A.; Feng, Y.; Seubert, E.L.; Caron, D.A.; Fu, F.X. Effects of changing pCO2 and phosphate availability on domoic acid production and physiology of the marine harmful bloom diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. *Limnol. Oceanogr.* **2011**, *56(3)*, 829–840.
57. Yasumoto, T.; Inoue, A.; Ochi, T.; Fujimoto, K.; Oshima, Y.; Fukuyo, Y.; Adachi, R.; Bagnis, R. Environmental studies on a toxic dinoflagellate responsible for ciguatera. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fisheries* **1980**, *46*, 1397–1404.
58. Parsons, M.L.; Preskitt, L.B. A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawaii. *Harmful Algae* **2007**, *6(5)*, 658–669.
59. Ichinotsubo, D.; Asahina, A.Y.; Titus, E.; Chun, S.; Hong, T.W.P.; Shirai, J.L.; Hokama, Y. Survey for ciguatera fish poisoning in West Hawaii. *Memoirs of the Queensland Museum* **1994**, *34*, 513–522.
60. Loeffler, C.R.; Richlen, M.L.; Brandt, M.E.; Smith, T.B. Effects of grazing, nutrients, and depth on the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus* in the US Virgin Islands. *Marine Ecology Progress Series* **2015**, *531*, 91–104.
61. Okolodkov, Y.; Merino-Virgilio, F.; Aké-Castillo, J.; Aguilar-Trujillo, A.; Espinosa-Matías, S.; Herrera-Silveira, J. Seasonal changes in epiphytic dinoflagellate assemblages near the northern coast of the Yucatan peninsula, Gulf of Mexico. *Acta Bot. Mex.* **2014**, *107*, 121–151.

62. Carlson, R.D.; Tindall, D.R. Distribution and periodicity of toxic dinoflagellates in the Virgin Islands. In *Toxic Dinoflagellates*; Anderson, D.M., White, A.W., Baden, D.G., Eds.; Elsevier; Amsterdam, 1985; pp. 171–176.
63. Hurbungs, M.D.; Jayabalan, N.; Chineah, V. Seasonal distribution of potentially toxic benthic dinoflagellates in the lagoon of Trou aux Biches, Mauritius. In *Proceedings of the 5th Annual Meeting of Agricultural Scientists (Reduit, Mauritius)*; Lalouette, J.A., Bachraz, D.Y., (Eds.); The Food and Agricultural Research Council: Reduit, Mauritius, **2002**; pp. 211–217.
64. Lechat, I.; Partenski, F.; Chungue, E. *Gambierdiscus toxicus*: culture and toxin production. In *Proceedings of the 5th International Coral Reef Congress*; Tahiti, **1985**; *4*, pp. 443–448.
65. Durand-Clement, M. A study of toxin production by *Gambierdiscus toxicus* in culture. *Toxicon* **1986**, *24(11-12)*, 1153–1157.
66. Durand-Clement, M. Study of production and toxicity of cultured *Gambierdiscus toxicus*. *Biol. Bull.* **1987**, *172(1)*, 108–121.
67. Sperr, A.E.; Doucette, G. Variation in growth rate and ciguatera toxin production among geographically distinct isolates of *Gambierdiscus toxicus*. *Harmful and Toxic Algal Blooms* **1996**, 309–312.
68. Darius, H.T.; Roué, M.; Sibat, M.; Viallon, J.; Gatti, C.M.I.; Vandersea, M.W.; Tester, P.A.; Litaker, R.W.; Amzil, Z.; Hess, P.; *et al. Tectus niloticus* (Tegulidae, Gastropod) as a novel vector of ciguatera poisoning: detection of pacific ciguatoxins in toxic samples from Nuku Hiva Island (French Polynesia). *Toxins* **2018**, *10(1)*, 2.
69. Hansen, P.; Lundholm, N.; Rost, B. Growth limitation in marine red-tide dinoflagellates: Effects of pH versus inorganic carbon availability. *Marine Ecology -ProG. Ser.* **2007**, *334*, 63–71.
70. Hinga, K.A. Co-occurrence of dinoflagellate blooms and high pH in marine enclosures. *Marine Ecology - ProG. Ser.* **1992**, *86*, 181–187.
71. Lundholm, N.; Hansen, P.J.; Kotaki, Y. Effect of pH on growth and domoic acid production by potentially toxic diatoms of the genera *Pseudo-nitzschia* and *Nitzschia*. *Marine Ecology Progress Series* **2004**, *273*, 1–15.
72. Schippers, P.; Lürling, M.; Scheffer, M. Increase of atmospheric CO_2 promotes phytoplankton productivity. *Ecol. Lett.* **2004**, *7*, 446–451.
73. Dai, X.; Mak, Y.L.; Lu, C.K.; Mei, H.H.; Wu, J.J.; Lee, W.H.; Chan, L.L.; Lim, P.T.; Mustapa, N.I.; Lim, H.C.; *et al.* Taxonomic assignment of the benthic toxigenic dinoflagellate *Gambierdiscus* sp. type 6 as *Gambierdiscus balechii* (*Dinophyceae*), including its distribution and ciguatoxicity. *Harmful Algae* **2017**, *67*, 107–118.
74. Xu, Y.; Richlen, M.L.; Morton, S.L.; Mak, Y.L.; Chan, L.L.; Tekiau, A.; Anderson, D.M.; Ling, Y.; Lai, L. Distribution, abundance and diversity of *Gambierdiscus* spp. from a ciguatera-endemic area in Marakei, Republic of Kiribati. *Harmful Algae* **2014**, *34*, 56–68.
75. Chinain, M.; Darius, H.T.; Ung, A.; Tchou Fouc, M.; Revel, T.; Cruchet, P.; Pauillac, S.; Laurent, D. Ciguatera risk management in French Polynesia: the case study of Raivavae Island (Australes Archipelago). *Toxicon* **2010**, *56(5)*, 674–690.
76. Smith, K.F.; Biessy, L.; Argyle, P.A.; Trnski, T.; Halafihi, T.; Rhodes, L.L. Molecular identification of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* (*Dinophyceae*) from environmental samples. *Mar. Drugs* **2017**, *15(8)*, 243.
77. Litaker, R.W.; Vandersea, M.W.; Faust, M.A.; Kibler, S.R.; Nau, A.W.; Holland, W.C.; Chinain, M.; Holmes, M.J.; Tester, P.A. Global distribution of ciguatera causing dinoflagellates in the genus *Gambierdiscus*. *Toxicon* **2010**, *56(5)*, 711–730.
78. Lyu, Y.; Richlen, M.L.; Sehein, T.R.; Chinain, M.; Adachi, M.; Nishimura, T.; Xu, Y.; Parsons, M.L.; Smith, T.B.; Zheng, T.; *et al.* LSU rDNA based RFLP assays for the routine identification of *Gambierdiscus* species. *Harmful Algae* **2017**, *66*, 20–28.
79. Davidson, K.; Gowen, R.J.; Harrison, P.J.; Fleming, L.E.; Hoagland, P.; Moschonas, *G.* Anthropogenic nutrients and harmful algae in coastal waters. *J. Environ. Manage.* **2014**, *146*, 206–216.
80. Skinner, M.P.; Lewis, R.J.; Morton, S. Ecology of the ciguatera causing dinoflagellates from the Northern Great Barrier Reef: Changes in community distribution and coastal eutrophication. *Marine Pollution Bulletin* **2013**, *77(1-2)*, 210–219.
81. Bomber, J.W.; Aikman, K. The ciguatera dinoflagellates. *Biol. Ocean* **1989**, *6(3-4)*, 291–311.
82. Aikman, K.; Tindall, D.; Morton, S. Physiology and potency of the dinoflagellate *Prorocentrum hoffmannianum* (Faust) during one complete growth cycle. In *5th International conference on toxic marine phytoplankton, Toxic phytoplankton blooms in the sea*; Smayda T.J. and Shimizu Y. Eds.; Elsevier Sci. Publ.; New York (USA), **1993**; 463–468.
83. Bomber, J.W. Toxinogenesis in dinoflagellate : genetic and physiological factors. In *Ciguatera Seafood Toxin*; Miller D.M. Ed.; Boca Raton, Florida (USA), CRC Press, **1991**; pp. 135–170.

84. Tindall, D.; Morton, S. Community dynamics and physiology of epiphytic/benthic dinoflagellates associated with ciguatera. In *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*; Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M., (Eds.); NATO ASI Series, vol G 41; Springer-Verlag; Berlin, **1998**; pp. 291–313.
85. Hardison, D.R.; Holland, W.C.; McCall, J.R.; Bourdelais, A.J.; Baden, D.G.; Darius, H.T.; Chinain, M.; Tester, P.A.; Shea, D.; Quintana, H.A.F.; *et al.* Fluorescent receptor binding assay for detecting ciguatoxins in fish. *PLOS One* **2016**, *11(4)*, e0153348.
86. Pawlowiez, R.; Darius, H.T.; Cruchet, P.; Rossi, F.; Caillaud, A.; Laurent, D.; Chinain, M. Evaluation of seafood toxicity in the Australes Archipelago (French Polynesia) using the neuroblastoma cell-based assay. *Food Additives & Contaminants A* **2013**, *30(3)*, 567–586.
87. Gómez, F.; Qiu, D.; Lopes, R.M.; Lin, S. *Fukuyoa paulensis* gen. et sp. nov., a new genus for the globular species of the dinoflagellate *Gambierdiscus* (*Dinophyceae*). *PLOS One* **2015**, *10(4)*, e0119676.
88. Laza-Martínez, A.; David, H.; Riobó, P.; Miguel, I.; Orive, E. Characterization of a strain of *Fukuyoa paulensis* (*Dinophyceae*) from the Western Mediterranean Sea. *J. Eukaryot. Microbiol.* **2015**, *63(4)*, 481–497.
89. Munday, R.; Murray, S.; Rhodes, L.L.; Larsson, M.E.; Harwood, D.T. Ciguatoxins and maitotoxins in extracts of sixteen *Gambierdiscus* isolates and one *Fukuyoa* isolate from the South Pacific and their toxicity to mice by intraperitoneal and oral administration. *Mar. Drugs* **2017**, *15(7)*, 208.
90. Assunção, J.; Guedes, A.C.; Malcata, F. X. Biotechnological and pharmacological applications of biotoxins and other bioactive molecules from dinoflagellates. *Mar. Drugs* **2017**, *15(12)*, 393.
91. Robertson, A.; Richlen, M.L.; Erdner, D.; Smith, T.B.; Anderson, D.M.; Liefer, J.; Xu, Y.; McCarron, P.; Miles, C.; Parsons, M.L. Toxicity, chemistry, and implications of *Gambierdiscus silvae*: a ciguatoxin superbug in the Greater Caribbean Region. In *Proceedings of the 18th International Conference on Harmful Algae*, Nantes, France, 21-26 October 2018; **2018**.
92. Pasinszki, T.; Lako, J.; Dennis, T.E. Advances in Detecting Ciguatoxins in Fish. *Toxins* **2020**, *12(8),* 494.
93. Vernoux, J.P.; Lewis, R.J. Isolation and characterisation of Caribbean ciguatoxins from the horse-eye jack (*Caranx latus*). *Toxicon* **1997**, *35(6)*, 889–900.
94. Hamilton, B.; Hurbungs, M.; Vernoux, J.P.; Jones, A.; Lewis, R.J. Isolation and characterisation of Indian Ocean ciguatoxin. *Toxicon* **2002**, *40(6)*, 685–693.
95. Hamilton, B.; Hurbungs, M.; Jones, A.; Lewis, R.J. Multiple ciguatoxins present in Indian Ocean reef fish. *Toxicon* **2002**, *40(9)*, 1347–1353.
96. Pottier, I.; Vernoux, J.; Jones, A.; Lewis, R.J. Characterisation of multiple Caribbean ciguatoxins and congeners in individual specimens of horse-eye jack (*Caranx latus*) by high-performance liquid chromatography / mass spectrometry. **2002**, *40(7)*, 929-939.
97. Diogène, J.; Reverté, L.; Rambla-Alegre, M.; del Rio, V.; de la Iglesia, P.; Campas, M.; Palacios, O.; Flores, C.; Caixach, J.; Ralijaona, C.; *et al.* Identification of ciguatoxins in a shark involved in a fatal food poisoning in the Indian Ocean. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 8240.
98. Kryuchkov, F.; Robertson, A.; Miles, C.O.; Mudge, E.M.; Uhlig, S. LC–HRMS and chemical derivatization strategies for the structure elucidation of Caribbean ciguatoxins: identification of C-CTX-3 and -4. *Mar. Drugs* **2020**, *18(4)*, 182.
99. Lewis, R.J.; Vernoux, J.-P.; Brereton, I.M. Structure of Caribbean ciguatoxin isolated from *Caranx latus*. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120(24)*, 5914–5920.
100. Abraham, A.; Jester, E.L.E.; Granade, H.R.; Plakas, S.M.; Dickey, R.W. Caribbean ciguatoxin profile in raw and cooked fish implicated in ciguatera. *Food Chem.* **2012**, *131(1)*, 192–198.
101. Wu, J.J.; Mak, Y.L.; Murphy, M.B.; Lam, J.C.W.; Chan, W.C.H.; Wang, M.; Chan, L.L.; Lam, P.K.S. Validation of an accelerated solvent extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry method for Pacific ciguatoxin-1 in fish flesh and comparison with the mouse neuroblastoma assay. *Anal. BioAnalytical Chemistry* **2011**, *400*, 3165–3175.
102. Reverté, L.; Soliño, L.; Carnicer, O.; Diogène, J.; Campàs, M. Alternative methods for the detection of emerging marine toxins: biosensors, biochemical assays and cell-based assays. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 5719–5763.
103. Hess, P.; Mondeguer, F.; Glauner, T.; Wust, B.; Sibat, M.; Zendong, S.Z.; Herrenknecht, C.; Séchet, V. Metabolomic analysis of marine microalgae using high resolution mass spectrometry for taxonomic comparisons and screening of marine biotoxins. *61st Am. Soc. Mass Spectrom.* 2013, Minneapolis (USA), June 9-13, **2013**.

104. Tester, P.A.; Kibler, S.R.; Holland, W.C.; Usup, G.; Vandersea, M.W.; Leaw, C.P.; Teen, L.P.; Larsen, J.; Mohammad-Noor, N.; Faust, M.A.; *et al.* Sampling harmful benthic dinoflagellates : comparison of artificial and natural substrate methods. *Harmful Algae* **2014**, *39*, 8–25.
105. Holmes, M.J.; Lewis, R.J.; Poli, M.A.; Gillespie, N.C. Strain dependent production of ciguatoxin precursors (gambiertoxins) by *Gambierdiscus toxicus* (*Dinophyceae*) in culture. *Toxicon* **1991**, *29(6)*, 761–775
106. Martiny, A.C.; Pham, C.T.A.; Primeau, F.W.; Vrugt, J.A.; Moore, J.K.; Levin, S.A.; Lomas, M.W. Strong latitudinal patterns in the elemental ratios of marine plankton and organic matter. *Nat. Geosci.* **2013**, *6*, 279–283.
107. Dufour, P.; Andréfouët, S.; Charpy, L.; Garcia, N. Atoll morphometry controls lagoon nutrient regime. *Limnol. Oceanogr.* **2001**, *46*, 456–461.
108. Harris, P.; Fichez, R. *Observations et mécanismes de la crise dystrophique de 1994 dans le lagon de l'atoll d'Hikueru (archipel des Tuamotu, Polynésie française)*; ORSTOM-Tahiti, Ed.; 1995; Vol. 45; 25p.
109. Sharoni, S.; Halevy, I. Nutrient ratios in marine particulate organic matter are predicted by the population structure of well-adapted phytoplankton. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaaw9371.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Avec 50 000 à 500 000 cas estimés par an à l'échelle mondiale (Fleming *et al.,* 1998; Lehane & Lewis, 2000), l'intoxication de type ciguatéra représente la première intoxication non bactérienne liée à la consommation de produits de la mer (poissons, invertébrés) contaminés par des ciguatoxines, des métabolites produits par les dinoflagellés des genres *Gambierdiscus* et *Fukuyoa*. Ces organismes phytoplanctoniques produisent également une multitude d'autres composés, au rôle écologique parfois mal connu, qui sont susceptibles de contribuer au syndrome ciguatérique au sens large. Le changement climatique (Moore *et al.,* 2008), l'eutrophisation des milieux côtiers (Glibert *et al.,* 2005b) et la dissémination d'espèces phytoplanctoniques via les eaux de ballast des transports maritimes (Burkholder *et al.,* 2007), conduisent depuis plusieurs décennies à une modification structurelle des communautés benthiques et à l'augmentation de la fréquence/intensité des phénomènes d'efflorescences (Besnan *et al.*, 2021), impactant fortement les populations insulaires dépendantes des ressources lagonaires (Rongo & van Woesik, 2012 ; Morin *et al.,* 2016). A l'origine limitée à la ceinture tropicale et intertropicale (Chinain *et al.*, 2010b; Parsons *et al.*, 2020; Quod & Turquet, 1996), la ciguatéra s'étend désormais aux régions plus tempérées du globe depuis les années 2000, ce qui a conduit les pays concernés à mettre en place des programmes de suivi du risque ciguatérique par le biais de la surveillance du niveau de contamination des réseaux trophiques par les ciguatoxines en parallèle de l'inventaire exhaustif des espèces de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* présentes dans leurs eaux. Cependant, alors qu'on note une tendance très nette vers une uniformisation des méthodes d'identification taxonomique de la micro-algue selon une approche de type moléculaire (Vandersea *et al.,* 2012; Nishimura *et al.,* 2016; Lyu *et al.,* 2017; Smith *et al.,* 2017; Kretzschmar *et al.,* 2019a,b; Litaker *et al.,* 2019; Pitz *et al.,* 2021), le constat est tout autre en ce qui concerne les méthodes de détection des CTXs utilisés par les laboratoires de recherche pour lesquelles tout reste encore à faire, notamment en raison de l'absence de méthodes consensus (*i.e.* test de référence) et de matériaux de référence (*e.g.* standards de CTXs, matrices contaminées prédosées) (FAO, 2020).

Dans ce contexte, cette thèse poursuivait trois objectifs:

(i) Comparer les performances (*e.g.* les niveaux de sensibilité) des méthodes CBA-N2a, RBA-F et LC-MS/MS pour la détection des CTXs dans des extraits de *Gambierdiscus*. L'analyse d'un même standard de CTX3C et d'extraits purifiés de *G. polynesiensis* au moyen d'une méthode chimique, la LC-MS/MS, et de deux méthodes fonctionnelles, le RBA-F et le CBA-N2a ont permis de mettre en avant les performances respectives de ces tests en termes de sensibilité de détection/quantification des CTXs, tout en soulignant la nécessité de pouvoir disposer de standards de ciguatoxines. Cette thèse a permis de confirmer la haute sensibilité du CBA-N2a, capable de détecter des concentrations toxiniques intracellulaires de l'ordre du fg /cellule et qui s'impose donc comme la méthode à privilégier dans le cadre de la recherche d'activité toxique chez des espèces même très faiblement toxiques. Nos résultats illustrent également la pertinence de combiner un test fonctionnel (*e.g.* la méthode CBA-N2a) avec la LC-MS/MS qui, en plus de sa sensibilité, peut détecter et quantifier chaque congénère connu de CTX et caractériser ainsi les profils toxiniques dans des extraits préalablement identifiés comme toxiques dans le cadre de criblages haut débit via des méthodes fonctionnelles. Enfin, cette thèse a permis d'appliquer pour la première fois la méthode RBA-F à la détection et la quantification de CTX chez *Gambierdiscus*. Cette méthode, très spécifique des CTXs, représente une alternative plus rapide au CBA-N2a mais nécessite de disposer de grandes quantités d'échantillon de standards.

(ii) Caractériser la variabilité intra-spécifique au niveau de la croissance et la production toxinique de *G. polynesiensis*, l'espèce la plus toxique décrite à ce jour. Pour ce faire, quatre clones (NHA4, RIK7, RAI-1 et RG-92) isolés d'îles/archipels au statut ciguatérique contrasté (*i.e.* les Marquises, Gambier, Australes et Tuamotu, respectivement) ont été sélectionnés puis maintenus dans des conditions de culture dites « de référence ». Nos résultats ont permis de confirmer que des différences sont effectivement observées entre ces souches au niveau des biomasses finales récoltées, leur toxicité globale, et la diversité des analogues de CTXs produits. En particulier, NHA4 est le clone qui a donné les biomasses cellulaires les plus importantes, avec une toxicité deux fois plus élevée que celle du clone RG-92, caractérisée par des analogues deux fois plus diversifiés que chez la souche RAI-1 (*i.e.* sept analogues chez NHA4 *vs.* quatre chez RAI-1). A l'inverse, ces quatre clones ont en commun la capacité de produire des quantités notables de 44-méthyl-gambiérone mais aucune maitotoxine.

(iii) Evaluer l'effet de plusieurs facteurs abiotiques caractéristiques du changement global, tels que l'acidité du milieu de culture (acidification des océans) et la source/disponibilité en azote (eutrophisation) sur la croissance et la production de CTX chez ces quatre clones *G. polynesiensis*. Si l'ensemble des prévisions actuelles en faveur d'une acidification et d'une eutrophisation de plus en marquée des environnements côtiers se confirmait, nos travaux indiquent qu'en dépit de taux de croissance qui deviendraient plus faibles, les souches de *G. polynesiensis* originaires de Polynésie française verraient leur production toxinique stimulée, avec notamment une diversification des analogues de CTXs les plus polaires. En revanche, la température dans un contexte de réchauffement climatique ne semble pas affecter significativement la croissance et/ou la production toxinique de cette espèce (données non publiées *cf.* Figure 40 p 156).

Ces travaux s'inscrivent directement dans la démarche initiée dans le cadre de la Global Ciguatera Strategy (*cf.* p 49) coordonnée conjointement par l'ILM, l'Ifremer et l'AIEA depuis 2016. Elle vise à mettre en œuvre une stratégie commune en matière de recherches sur la ciguatéra, afin d'améliorer: (i) la détection des espèces phytoplanctoniques à risque, (ii) la collection d'échantillons, (iii) la détection des toxines impliquées dans la ciguatéra et (iv) la collecte et la notification des données épidémiologiques.

Plusieurs pistes de recherche sont à privilégier pour poursuivre ces efforts d'amélioration. Par exemple, la mise en évidence d'une variabilité intra-spécifique au sein du genre *Gambierdiscus* (Chinain *et al.*, 2010a; Xu *et al.*, 2016; Pisapia *et al.*, 2017a), souligne la nécessité d'accélérer le travail d'inventaire des espèces présentes dans les régions pour lesquelles les données sur la diversité taxonomique des espèces de *Gambierdiscus* et/ou *Fukuyoa* demeurent encore très parcellaires, comme c'est le cas pour l'Océan Indien par rapport aux régions Pacifique et Atlantique-Nord (voir références dans Chinain *et al.*, 2020a pour une revue). Outre une intensification de ces travaux de prospection sur le terrain, il apparait tout aussi important d'étoffer nos connaissances sur le degré de dangerosité (*i.e.* toxicité globale et profils toxiniques) de ces espèces au laboratoire (*cf.* Tableau 1 p 26). Or, pour l'heure, seule l'espèce *G. polynesiensis* dispose d'un profil toxinique bien établi par LC-MS/MS (Chinain *et al.*, 2010a), que la présente thèse a permis de réactualiser (Longo *et al.*, 2019, 2020). De telles données s'avèrent en effet essentielles pour les travaux visant à modéliser le risque ciguatérique à l'échelle du globe.

De nombreuses études ont souligné l'intérêt d'utiliser les espèces *G. polynesiensis* et *G. excentricus* comme biomarqueurs de risque dans les programmes de surveillance du risque ciguatérique, en raison de leur production toxinique élevée (*cf.* tableau 1 p 26 et Chinain *et al.*, 2020b). En pratique, cela signifie que dans un souci de rationaliser les coûts de surveillance, il est possible de cibler en priorité ces espèces dans les campagnes de terrain menées respectivement dans le Pacifique et dans

l'Atlantique Nord. Toutefois, ce statut reste à être confirmé pour d'autres espèces-clés telles que *G. scabrosus* au Japon, et *G. silvae*, dans les Caraïbes.

Par ailleurs, nos résultats confirment le caractère ubiquitaire de la 44-méthyl-gambiérone qui a été détecté à des teneurs très élevées (plusieurs dizaines de pg/cellule) dans le milieu extracellulaire des souches de *G. polynesiensis*. Dans la mesure où ce composé est systématiquement retrouvé dans les cultures de toutes les espèces connues de *Gambierdiscus*, certains auteurs ont avancé l'hypothèse qu'il pourrait représenter un biomarqueur fiable de la présence de *Gambierdiscus* dans une zone ciguatérigène (Murray *et al.*, 2020). En outre, bien que quelques études se soient penchées sur les activités biologiques de ce composé (Rodríguez *et al.*, 2015; Boente-Juncal *et al.*, 2019), il reste encore beaucoup à faire s'agissant des autres familles de toxines produites par *Gambierdiscus*.

Plusieurs autres genres de micro-algues potentiellement toxiques sont également signalés dans les eaux polynésiennes, que ce soit au sein des assemblages benthiques à *Gambierdiscus*, ou plus largement dans les communautés phytoplanctoniques des lagons. Rodier *et al.*, 2019 ont notamment montré en Polynésie française à l'occasion d'une efflorescence algale sans précédent en 2013-2014 dans le lagon de l'atoll de Takaroa (Tuamotu), que plusieurs taxons à potentiel efflorescent *(i.e., Prorocentrum lima*, *Pyramimonas* sp. et *Cryptomonas* sp.) seraient capables de produire des toxines de type imines cycliques (*e.g.* azaspiracides, gymnodimines, pinnatoxines et spirolides) sous haute surveillance en Europe depuis 2010 car signalées de plus en plus fréquemment dans les coquillages et l'eau de mer environnante (Aráoz *et al.*, 2012). De par leur activité biologique sur les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine, beaucoup de ces composés sont considérés comme contributeurs potentiels des maladies neuro-dégénératives de type Alzheimer et Parkinson. La production d'acide okadaïque, responsable des intoxications de type DSP en Europe, a également été suspectée par ces auteurs chez *Prorocentrum lima*. A noter également le signalement inédit depuis 2015 à Nuku-Hiva du dinoflagellé *Azadinium* sp. (Tillmann et al., 2016), un autre progéniteur connu des azaspiracides, toxines responsables d'intoxications diarrhéiques croissantes sur les côtes européennes.

Dans la mesure où ces métabolites sont également susceptibles de contribuer aux intoxications par consommation de produits lagonaires (en cas de bioaccumulation avérée dans les réseaux trophiques lagonaires), élargir le champ de nos recherches à ces autres familles de toxines permettrait, à terme, de poser les bases d'un diagnostic différentiel des différentes formes d'intoxication répertoriées en Polynésie française. Dans le cadre de la surveillance de ces risques phycotoxiniques émergents dans les lagons de Polynésie, le CBA-N2a s'avère un outil de choix en raison de sa remarquable modularité vis-à-vis d'un large panel de familles toxiniques.

Ces travaux ont également souligné l'importance de disposer, en amont de l'étape d'analyse, d'un protocole d'extraction adapté aux familles de composés recherchées, à savoir (i) un protocole assurant une purification suffisamment poussée des CTXs pour limiter les risques de réponses non-spécifiques, et (ii) qui soit compatible avec l'utilisation de n'importe quelle méthode de détection. Or, si l'on prend l'exemple des protocoles d'extraction actuellement recommandés pour l'analyse d'extraits pisciaires par six laboratoires-experts de pays différents (*i.e.*, Australie, Chine, France, Japon, Nouvelle-Zélande et Polynésie française), on constate qu'ils diffèrent très significativement d'un laboratoire à un autre (Mak *et al.* 2013; Yogi *et al.*, 2014; Meyer *et al.*, 2015; Murray *et al.*, 2018; Sibat *et al.*, 2018; Darius *et al.*, 2018a), avec comme principal inconvénient de conduire à des rendements très différents selon la polarité des analogues de CTX ciblés. Cette variabilité des rendements d'extraction risque fort d'impacter les niveaux de CTX qui seront estimés par une ou plusieurs méthodes de détection rendant les comparaisons inter-laboratoires compliquées. A l'inverse, être en mesure de proposer un protocole de référence constituerait une avancée très significative vers une standardisation inter-laboratoire de cette étape-clé (Park, 1994, 2012; Lewis 2001; Díaz-Asencio *et al.*, 2018).

Cette nécessité d'une plus grande standardisation inter-laboratoire des techniques en vigueur dans l'analyse des toxines de la ciguatéra s'applique également aux méthodes de détection, car pour l'heure, la multiplication de protocoles « maison » (Suzuki *et al.*, 2017; Sibat *et al.*, 2018; voir références dans Viallon *et al.*, 2020), ainsi que l'absence d'informations chiffrées concernant *e.g.* les LOD, LOQ,

CME, valeurs d'absorbance obtenues en CBA-N2a, traitement OV appliqué, CE_{50} des échantillons, volumes d'injection en LC-MS/MS, etc. dans la plupart des publications disponibles, rend quasi impossible une évaluation objective de la performance de chacune de ces méthodes. Toutefois, des efforts en ce sens commencent à émerger au niveau des modes opératoires de la LC-MS/MS et du CBA-N2a (Murray *et al.*, 2018 ; Viallon *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). En particulier, l'étude de Murray *et al.*, 2018 se targue de pouvoir détecter à l'aide d'une même méthode analytique par LC-MS/MS les CTX et les MTX présentes dans un extrait de poisson ou de *Gambierdiscus*.

Malheureusement, ces efforts vers une plus grande standardisation des méthodes se heurtent à un problème de taille, à savoir la faible disponibilité actuelle en standards de référence (FAO, 2020). En effet, disposer d'une large gamme de standards en CTXs permettrait non seulement de standardiser les matériaux de référence utilisés par les différents laboratoires, mais permettrait également d'affiner les quantifications obtenues via l'utilisation des standards appropriés à chaque région d'endémie. Or pour l'heure, la communauté scientifique ne dispose que de quelques standards de P-CTXs, tandis que les CTXs spécifiques des Caraïbes et de l'Océan Indien demeurent indisponibles. Plus largement, ces standards permettraient une réactualisation des valeurs de TEF (facteurs d'équivalence toxique (*cf.* p 63) proposés en 2010 sur la base de tests souris (EFSA, 2010), ou d'approfondir les recherches visant à une meilleure compréhension des processus de bio-transformation des CTXs (Ikehara *et al.*, 2017). Dans ce contexte, Nos travaux, en identifiant les paramètres de culture (*e.g.* pH, source d'azote) susceptibles d'orienter la production toxinique de *G. polynesiensis* vers des analogues de CTXs qui sont généralement minoritaires dans les extraits de culture (*e.g.* CTXs plus polaires), ouvrent la voie vers une production « à façon » des standards de CTXs à forte valeur ajoutée. C'est l'objet du programme en R&D CIGUAPROD actuellement mené au sein du laboratoire, qui vise à commercialiser plusieurs standards certifiés issus de cultures *in vitro* de *G. polynesiensis*. A noter que ces travaux de thèse auront également permis d'identifier le clone NHA4 comme la meilleure souche-candidate pour la production en masse de CTXs algales.

Enfin, il ne faut pas perdre de vue que la ciguatéra est avant tout une problématique de santé humaine. Or, les études biomédicales visant à améliorer le diagnostic et le traitement de cette pathologie restent encore anecdotiques dans la littérature. Ainsi, les recherches ayant pour objectif le développement d'outils-diagnostique via par exemple la détection des CTX dans le sang ou l'urine des patients pour confirmer l'exposition aux toxines de la ciguatéra, ou encore la recherche d'un traitement spécifique et efficace dans la pharmacopée traditionnelle largement utilisée par les communautés insulaires (Kumar-Roiné, 2009; Rossi *et al.*, 2012; Braidy *et al.*, 2014), apparaissent comme autant de pistes de recherches opérationnelles, avec des retombées pratiques permettant d'assurer une plus grande sécurité alimentaire pour les populations les plus vulnérables à la ciguatéra.

VALORISATIONS SCIENTIFIQUES

Communications orales

Doctoriales de l'UPF, 1-3 mai 2018: Ciguatéra et changement global, vers une accentuation du risque ciguatérique?

Doctoriales de l'UPF, 13-15 mai 2019: Variabilité de la production toxinique chez la micro-algue ciguatérigène *Gambierdiscus polynesiensis*: effet-souche et âge des cellules. Prix de la communication orale offrant les meilleures perspectives de valorisation économique et/ou culturelle.

Communication affichée

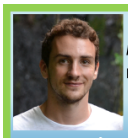
Longo, S., Henry, K., Viallon, J., Ung, A., Tchong, T., Cruchet, P., Darius, H. T., Hess, P., & Chinain, M. Effects of temperature and nutrients availability on the growth and toxicity of *Gambierdiscus polynesiensis*. The 18th International Conference on Harmful Algae (ICHA), 21-26 octobre 2018, Nantes, France (Figure 40).

Publications

Rodier, M., **Longo, S**., Henry, K., Ung, A., Lo-Yat, A., Darius, H. T., Viallon, J., Beker, B., Delesalle, B., & Chinain, M. (2019). Diversity and toxic potential of algal bloom-forming species from Takaroa lagoon (Tuamotu, French Polynesia): a field and mesocosm study. Aquatic Microbial Ecology, 83(1), 15–34.

Longo, S., Sibat, M., Viallon, J., Darius, H. T., Hess, P., & Chinain, M. (2019). Intraspecific variability in the toxin production and toxin profiles of *in vitro* cultures of *Gambierdiscus polynesiensis* (*Dinophyceae*) from French Polynesia. Toxins, 11(12), 735.

Longo, S., Sibat, M., Darius, H. T., Hess, P., & Chinain, M. (2020). Effects of pH and nutrients (nitrogen) on growth and toxin profile of the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (*Dinophyceae*). Toxins, 12(12), 767.



Mail: slongo@ilm.pf
Phone: +33 06 34 95 42 21

EFFECTS OF TEMPERATURE AND NUTRIENTS AVAILABILITY ON THE GROWTH AND TOXICITY OF *GAMBIERDISCUS POLYNESIENSIS*

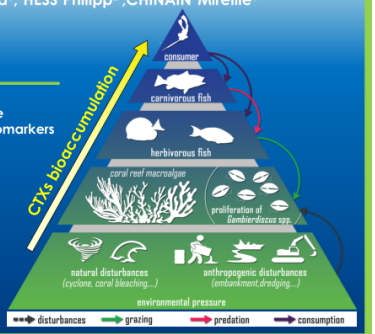
GLOBALCIG Program

LONGO Sébastien[1], HENRY Kévin[1], VIALLON Jérôme[1],Ung André[1], TCHONG Tiriana[1], CRUCHET Philippe[1], DARIUS Taiana[1], HESS Philipp[2] ,CHINAIN Mireille[1]
(1) Laboratoire des Micro-algues Toxiques LMT, Institut Louis Malardé - Papeete (French Polynesia)
(2) Laboratoire Phycotoxines, IFREMER – Nantes (France)

CIGUATERA POISONING

Non bacterial food-borne poisoning linked to the consumption of seafood and fish contaminated with ciguatoxins (CTXs)
A major threat to food sustainability and food security in French Polynesia: 333 poisonings reported in 2017 but high underreporting rate
Toxin source: *Gambierdiscus*[1] (15 species described to date, including *G. polynesiensis* and *G. excentricus* useful as ciguatera risk biomarkers

Since 2004, geographical expansion of ciguatera to temperate areas (Madeira, Canary Islands)[2]



GLOBAL CHANGE

A major threat to marine ecosystems biodiversity[3]

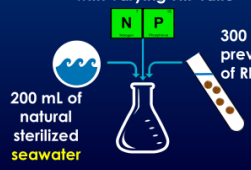
- Ocean warming: + 0,1°C / century
- Ocean acidification: - 0,4 pH unit / century
- Eutrophication of coastal and lagoon environments
- Invasive species introduction

OBJECTIVE OF THIS STUDY

Examine the effects of temperature and organic nitrogen availability on *G. polynesiensis* growth rate and CTXs cell content.

METHODS

Study of 2 highly toxic clones in the species *G. polynesiensis* isolated from the Gambier (RIK7) and the Australes (RVVRF1) archipelagoes. Cultures are maintained for 23 days under 3 different temperatures (22°C, 26°C, 30°C) and N:P ratio (5:1, 24:1, 50:1), using 26°C and N:P = 24:1 as the "reference" eco-physiological conditions



200 µL of "f10k" nutrient solution with varying N:P ratio

200 mL of natural sterilized seawater

300 cell/mL inoculum of previously acclimated cells of RIK7 and RVVRF1 clones

Growth rate $\mu = \ln(F_2/F_1) / (T_2-T_1)$
F_1 and F_2 represent fluorescence values (rfu) at T_1 and T_2 time points (day), respectively

Chemical extraction[4]
Solvent : dichloromethane for lipophilic toxins (CTXs) vs. aqueous methanol for soluble toxins

Drying : Rotary evaporator and nitrogen drying

In vitro assay using CBA-N2a[4]

Toxin standard used : P-CTX3C

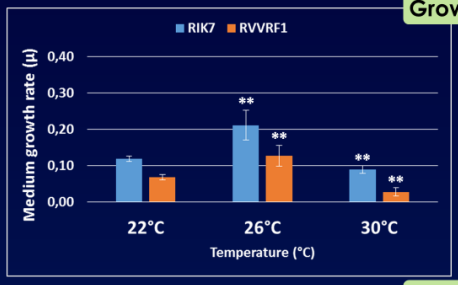
RESULTS

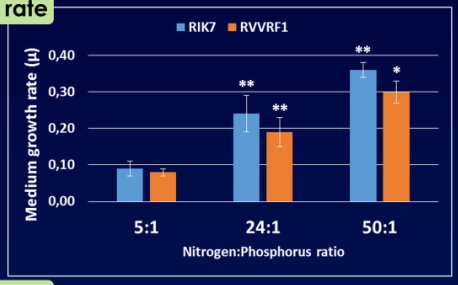
EFFECTS OF TEMPERATURE ON CELL GROWTH AND TOXICITY

EFFECTS OF NITROGEN AVAILABILITY ON CELL GROWTH AND TOXICITY

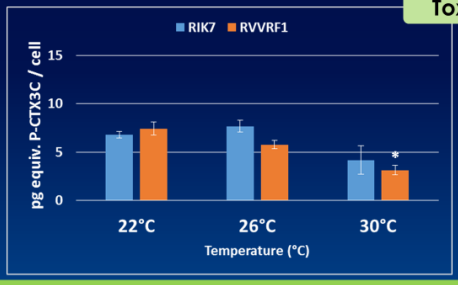
* p value < 0,05 ** p value < 0,01 *** p value < 0,001 n = 3
Statistical analysis with the non-parametric Wilcoxon test

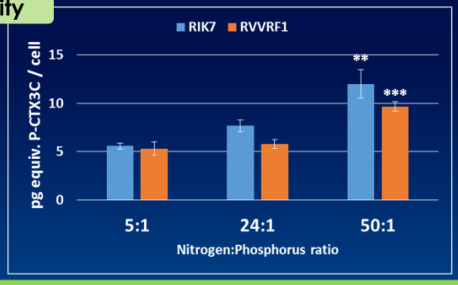
Growth rate





Toxicity





CONCLUSIONS

Observations

TEMPERATURE

Optimal growth rate at 26°C but RIK7 and RVVRF1 are tolerant to cooler/warmer temperatures (µ > 0)
Significant effect of high temperature values on CTXs cell content of RVVRF1 (native from the Australes)

NITROGEN

N-repleted conditions : significant increase in growth rate and CTXs cell content of both strains
N-depleted conditions : significant decrease in growth rate of both strains. No effects on CTXs cell content of both strains

Implications in terms of risk management

Potential geographical expansion of *G. polynesiensis* to temperate areas leading to acute poisoning risk as the one currently reported in tropical locations ?

Towards a potential increase of ciguatera risk in French Polynesian lagoon highly exposed to eutrophication process ?

REFERENCES

[1] Chinain, M. and al. (2014). Ciguatéra: Aspects écologiques, biologiques et toxicologiques. *Revue Francophone Des Laboratoires*, (460), 27–39. https://doi.org/10.1016/S1773-035X(14)72403-7
[2] Boada, L. D. and al. (2010). Ciguatera fish poisoning on the West Africa Coast: An emerging risk in the Canary Islands (Spain). *Toxicon*, 56(8), 1516–1519. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.07.021
[3] Elias, S. A. (2018). *Global Change Impacts on the Biosphere. Encyclopedia of the Anthropocene*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809665-9.09532-X
[4] Roué, M. and al. (2016). Evidence of the bioaccumulation of ciguatoxins in giant clams (*Tridacna maxima*) exposed to *Gambierdiscus* spp. cells. Harmful Algae, 57, 78–87. https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.05.007

FUNDINGS

Délégation à la Recherche de la Polynésie Française

Figure 40: Poster présenté à l'occasion de l'ICHA 2018 (Nantes, France).

REFERENCES

Abd-Elhaleem, Z. A., & Abd-Elkarim, M. A. (**2011**). Pattern of food poisoning in Egypt, a retrospective study. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, *6*(5), 505–515.

Abe, K., & Matsuki, N. (**2000**). Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neuroscience Research, 38*(4), 325–329.

Abraham, A., Jester, E. L. E., Granade, H. R., Plakas, S. M., & Dickey, R. W. (**2012**). Caribbean ciguatoxin profile in raw and cooked fish implicated in ciguatera. *Food Chemistry*, *131*(1), 192–198.

Adachi, R., & Fukuyo, Y. (**1979**). The thecal structure of a marine toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* gen. et sp. nov. collected in a ciguatera-endemic area. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisherie*, *45*(1), 67–71.

Adams, H., Blair Jr, M. R., & Takman, B. H. (**1976**). The local anesthetic activity of saxitoxin alone and with vasoconstrictor and local anesthetic agents. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, *224*(2), 275–282.

Al Sabi, A., McArthur, J., Ostroumov, V., & French, R. J. (**2006**). Marine toxins that target voltage-gated sodium channels. *Marine Drugs*, *4*, 157–192.

Aligizaki, K., & Nikolaidis, *G.* (**2008**). Morphological identification of two tropical dinoflagellates of the genera *Gambierdiscus* and *Sinophysis* in the Mediterranean Sea. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, *9*, 75–82.

Alizadeh, S., Barzegari, A., Esmaeili, A., & Omidi, Y. (**2020**). Designing a light-activated recombinant alpha hemolysin for colorectal cancer targeting. *BioImpacts*, *10*(3), 187.

Allsop, J. L., Martini, L., Lebris, H., Pollard, J., & Walsh, J. (**1986**). Les manifestations neurologiques de la Ciguatera: trois cas avec étude neurophysiologique et examen d'une biopsie nerveuse. *Revue Neurologique (Paris)*, *142*(6–7), 590–597.

Alonso, E., Fuwa, H., Vale, C., Suga, Y., Goto, T., Konno, Y., Sasaki, M., LaFerla, F. M., Vieytes, M. R., & Giménez-Llort, L. (**2012**). Design and synthesis of skeletal analogues of gambierol: attenuation of amyloid-β and tau pathology with voltage-gated potassium channel and N-methyl-D-aspartate receptor implications. *Journal of the American Chemical Society*, *134*(17), 7467–7479.

Alonso, E., Vieira, A. C., Rodriguez, I., Alvariño, R., Gegunde, S., Fuwa, H., Suga, Y., Sasaki, M., Alfonso, A., & Cifuentes, J. M. (**2017**). Tetracyclic truncated analogue of the marine toxin gambierol modifies NMDA, tau, and amyloid β expression in mice brains: implications in AD pathology. *ACS Chemical Neuroscience*, *8*(6), 1358–1367.

Alvarenga, D., Fiore, M. F., & Varani, A. M. (**2017**). A metagenomic approach to cyanobacterial genomics. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 809.

Amzil, Z., Sibat, M., Chomerat, N., Grossel, H., Marco-Miralles, F., Lemee, R., Nezan, E., & Sechet, V. (**2012**). Ovatoxin-a and Palytoxin accumulation in seafood in relation to *Ostreopsis cf. ovata* blooms on the french mediterranean coast. *Marine Drugs*, *10*(2), 477–496.

Aráoz, R., Ramos, S., Pelissier, F., Guérineau, V., Benoit, E., Vilariño, N., Botana, L. M., Zakarian, A., & Molgó, J. (**2012**). Coupling the Torpedo microplate-receptor binding assay with mass spectrometry to detect cyclic imine neurotoxins. *Analytical Chemistry*, *84*(23), 10445–10453.

Arias, H. R. (**2006**). Marine toxins targeting ion channels. *Marine Drugs, Special Issue on "Marine Drugs and Ion Channels" Arias, H. (Ed.)*, *4*, 37–69.

Assunção, J., Guedes, A. C., & Malcata, F. . (**2017**). Biotechnological and pharmacological applications of biotoxins and other bioactive molecules from dinoflagellates. *Marine Drugs*, *15*(12), 393.

Babinchak, J. A., Doucette, *G.* J., & Ball, R. M. (**1996**). Partial characterization of the LSU rRNA gene from the ciguatoxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. In Y. Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms* (pp. 459–462).

Baden, D. G., Fleming, L. E., & Bean, J. A. (**1995**). Marine toxins. *Handbook of Clinical Neurology*, *21*(65), 141–175.

Bagnis, R. (**1967**). Apropos of several cases of poisoning by a mollusc of the genus Benitier, in one of the Society Islands. *Bulletin de La Societe de Pathologie Exotique et de Ses Filiales*, *60*(6), 580–592.

Bagnis, R. (**1968**). Clinical aspects of ciguatera (fish poisoning) in French Polynesia. *Hawaii Medical Journal*, *28*(1), 25–28.

Bagnis, R. (**1970**). Concerning a fatal case of ciguatera poisoning in the Tuamotu Islands. *Clinical Toxicology*, *3*(4), 579–583.

Bagnis, R., Kuberski, T., & Laugier, S. (**1979**). Clinical observations on 3,009 cases of ciguatera (fish poisoning) in the South Pacific. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *28*(6), 1067–1073.

Bagnis, R., Chanteau, S., Chungue, E., Hurtel, J. ., Yasumoto, T., & Inoue, A. (**1980**). Origins of ciguatera fish poisoning: a new dinoflagellate, *Gambierdiscus toxicus* Adachi and Fukuyo, definitively involved as a causal agent. *Toxicon*, *18*(2), 199–208.

Bagnis, R., Bennet, J., Barsinas, M., Chebret, M., Jacquet, G., Lechat, I., Mitermite, Y., Perolat, P. H., & Rongeras, S. (**1985a**). Epidemiology of ciguatera in French Polynesia from 1960 to 1984. *Fifth International Coral Reef Congress*, *4*, 475–482.

Bagnis, R., Chanteau, S., Chungue, E., Drollet, J. H., Lechat, I., Legrand, A.-M., Pompon, A., Prieur, C., Roux, J., & Tetaria, C. (**1985b**). *Comparison of the cat bioassay, the mouse bioassay and the mosquito bioassay to detect ciguatoxicity in fish*.

Bagnis, R., Barsinas, M., Prieur, C., Pompon, A., Chungue, E., & Legrand, A.-M. (**1987**). The use of the mosquito bioassay for determining the toxicity to man of ciguateric fish. *Biological Bulletin*, *172*, 137–143.

Bagnis, R., Legrand, A. M., Cruchet, P., DeDecker, F., Genthon, J. N., & Pascal, H. (**1989**). Human intoxications by ciguateric phycotoxins in French Polynesia: incidence, clinical and epidemiological features in 1987. *Mycotoxins and Phycotoxins*, 227–288.

Bagnis, R. (**1993**). Ciguatera fish poisoning. *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, 105–115.

Bagnis, R. (**1994**). Natural versus anthropogenic disturbances to coral reefs: comparison in epidemiological patterns of ciguatera. *Memoirs of the Queensland Museum. Brisbane*, *34*(3), 455–460.

Banner, A., Scheuer, P. J., Sasaki, S., Helfrich, P., & Alender, C. B. (**1960**). Observations on ciguatera-type toxin in fish. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *90*(3), 770–787.

Banner, A. H., Helfrich, P., & Piyakarnchana, T. (**1966**). Retention of ciguatera toxin by the red snapper, *Lutjanus bohar*. *Copeia*, 297–301.

Banner, A. H. (**1976**). Ciguatera: a disease from coral reef fish. In O. Jones & R. Endean (Eds.), *Biology and geology of coral reefs Vol.3* (pp. 177–213). Academic Press.

Barnett, J. (**2011**). Dangerous climate change in the Pacific Islands: food production and food security. *Regional Environmental Change*, *11*(supp 1).

Barton, E., Tanner, P., Turchen, S. G., Tunget, C. L., Manoguerra, A., & Clark, R. F. (**1995**). Ciguatera fish poisoning a Southern California epidemic. *Western Journal of Emergency Medecine*, *163*(1), 31–35.

Bauman, A. G., Burt, J. A., Feary, D. A., Marquis, E., & Usseglio, P. (**2010**). Tropical harmful algal blooms: An emerging threat to coral reef communities? *Marine Pollution Bulletin*, *60*(11), 2117–2122.

Baumann, F., Bourrat, M. B., & Pauillac, S. (**2010**). Prevalence, symptoms and chronicity of ciguatera in New Caledonia: results from an adult population survey conducted in Noumea during 2005. *Toxicon*, *56*, 662–667.

Begier, E., Backer, L. C., Weisman, R. S., Hammond, R. M., Fleming, L. E., & Blythe, D. (**2006**). Outbreak bias in illness reporting and case confirmation in ciguatera fish poisoning surveillance in south Florida. *Public Health Reports*, *121*(6), 658–665.

Bell, J. D., Kronen, M., Vunisea, A., Nash, W. J., Keeble, G., Demmke, A., Pontifex, S., & Andréfouët, S. (**2009**). Planning the use of fish for food security in the Pacific. *Marine Policy*, *33*(1), 64–76.

Bellwood, D. R., Hughes, T. P., Folke, C., & Nyström, M. (**2004**). Confronting the coral reef crisis. *Nature*, *429*(6994), 827–833.

Besada, E. G., Loeblich, L. A., & Loeblich III, A. R. (**1982**). Observations on tropical, benthic dinoflagellates from ciguatera-endemic areas: *Coolia*, *Gambierdiscus*, and *Ostreopsis*. *Bulletin of Marine Science*, *32*(3), 723–735.

Bidard, J.-N., Vijverberg, P. M., Frelin, C., Chungue, E., Legrand, A.-M., Bagnis, R., & Lazdunski, M. (**1984**). Ciguatoxin is a novel type of Na+ channel toxin. *The Journal of Biological Chemistry*, *259*(13), 8353–8357.

Bienfang, P. K., Parsons, M. L., Bidigare, R. R., Laws, E. A., & Moeller, P. D. R. (**2008a**). Ciguatera Fish Poisoning. *Oceans and Human Health: Risks and Remedies from the Seas*, 257.

Bienfang, P. K., Oben, B., DeFelice, S., Moeller, P., Huncik, K., Oben, P., Toonen, R., Daly-Engel, T., & Bowen, B. (**2008b**). Ciguatera: the detection of neurotoxins in carnivorous reef fish from the coast of Cameroon, West Africa. *African Journal of Marine Science*, *30*(3), 533–540.

Bienfang, P. K., DeFelice, S., & Dowling, A. (**2011**). Quantitative evaluation of commercially available test kit for ciguatera in fish. *Food and Nutrition Sciences*, *2*(6), 594.

Bienfang, P. K., Trapido-Rosenthal, H., & Laws, E. A. (**2013**). Bioaccumulation/Biomagnifications in food chains. In E. Laws (Ed.), *Environmental Toxicology* (pp. 35–69). Springer.

Bignami, *G.* (**1993**). A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for palytoxin. *Toxicon*, *31*(6), 817–820.

Blythe, D., & de Sylva, D. P. (**1990**). Mother's milk turns toxic following fish feast. *Jama*, *264*(16), 2074.

Boada, L., Zumbado, M., Luzardo, O. P., Almeida-González, M., Plakas, S. M., Granade, H. R., Abraham, A., Jester, E. L. E., & Dickey, R. W. (**2010**). Ciguatera fish poisoning on the West Africa Coast: An emerging risk in the Canary Islands (Spain). *Toxicon*, *56*(8), 1516–1519.

Boente-Juncal, A., Álvarez, M., Antelo, Á., Rodríguez, I., Calabro, K., Vale, C., Thomas, O. P., & Botana, L. M. (**2019**). Structure elucidation and biological evaluation of maitotoxin-3, a homologue of gambierone, from *Gambierdiscus belizeanus*. *Toxins*, *11*(2), 79.

Boisnoir, A., Pascal, P.-Y., Cordonnier, S., & Lemée, R. (**2018**). Depth distribution of benthic dinoflagellates in the Caribbean Sea. *Journal of Sea Research*, *135*, 74–83.

Boisnoir, A., Pascal, P.-Y., Cordonnier, S., & Lemée, R. (**2019**). Spatio-temporal dynamics and biotic substrate preferences of benthic dinoflagellates in the Lesser Antilles, Caribbean sea. *Harmful Algae*, *81*, 18–29.

Bomber, J. W., Guillard, R. R. L., & Nelson, W. *G.* (**1988a**). Roles of temperature, salinity, and light in seasonality, growth, and toxicity of ciguatera-causing *Gambierdiscus toxicus* Adachi et Fukuyo (*Dinophyceae*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *115*, 53–65.

Bomber, J. W., Morton, S. L., Babinchak, J. A., Norris, D. R., & Morton, J. *G.* (**1988b**). Epiphytic dinoflagellates of drift algae - another toxigenic community in the ciguatera food chain. *Bulletin of Marine Science*, *43*(2), 204–214.

Bomber, J. W., Tindall, D. R., & Miller, D. M. (**1989**). Genetic variability in toxin potencies among seventeen clones of *Gambierdiscus toxicus* (Dinophceae). *Journal of Phycology*, *25*(4), 617–625.

Bomber, J. W. (**1990**). Toxigenesis in dinoflagellates: Genetic and physiologic factors. *Ciguatera Seafood Toxins*, 135–170.

Botana, L. M., Alfonso, A., Botana, A., Vieytes, M. R., Vale, C., Vilarino, N., & Louzao, C. (**2009**). Functional assays for marine toxins as an alternative, high-throughput-screening solution to animal tests. *Trends in Analytical Chemistry*, *28*(5), 603–611.

Bourdy, G., Cabalion, P., Amade, P., & Laurent, D. (**1992**). Traditional remedies used in the Western Pacific for the treatment of ciguatera poisoning. *Journal of Ethnopharmacology*, *36*(2), 163–174.

Bourrelly, P. (**1970**). *Les algues d'eau douce: initiation à la systématique* (Boudée & C, Issue Tome III).

Bouvy, M., Dupuy, C., Pagano, M., Barani, A., & Charpy, L. (**2012**). Do human activities affect the picoplankton structure of the Ahe atoll lagoon (Tuamotu Archipelago, French Polynesia)? *Marine Pollution Bulletin*, *65*(10–12), 516–524.

Boydron-Le Garrec, R., Benoit, E., Sauviat, M. P., Lewis, R. J., Molgo, J., & Laurent, D. (**2005**). Ability of some plant extracts, traditionally used to treat ciguatera fish poisoning, to prevent the *in vitro* neurotoxicity produced by sodium channel activators. *Toxicon*, *46*(6), 625–634.

Bradford, M. M. (**1976**). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1–2), 248–254.

Braidy, N., Martin, A., Rossi, F., Chinain, M., Laurent, D., & Guillemin, *G.* J. (**2014**). Neuroprotective effects of rosmarinic acid on ciguatoxin in primary human neurons. *Neurotoxicity Research*, *25*(2), 226–234.

Bravo, I., Figueroa, R. I., & Fraga, S. (**2014**). Cellular and nuclear morphological variability within a single species of the toxigenic dinoflagellate genus *Gambierdiscus*: relationship to life-cycle processes. *Harmful Algae*, *40*, 1–8.

Bravo, I., Rodríguez, F., Ramilo, I., & Afonso-Carrillo, J. (**2020**). Epibenthic harmful marine dinoflagellates from Fuerteventura (Canary Islands), with special reference to the ciguatoxin-producing *Gambierdiscus*. *Journal of Marine Science and Engineering*, *8*(11), 909.

Bravo, J., Suarez, F. C., Ramirez, A. S., & Acosta, F. (**2015**). Ciguatera, an emerging human poisoning in Europe. *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, *3*(1), 1–6.

Brereton, H., Chen, J., Rychkov, G., Harland, M. L., & Barritt, *G.* J. (**2001**). Maitotoxin activates an endogenous non-selective cation channel and is an effective initiator of the activation of the heterologously expressed hTRPC-1 (transient receptor potential) non-selective cation channel in H4-IIE liver cells. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, *1540*(2), 107–126.

Brodie, J. E., Kroon, F. J., Schaffelke, B., Wolanski, E. C., Lewis, S. E., Devlin, M. J., Bohnet, I. C., Bainbridge, Z. T., Waterhouse, J., & Davis, A. M. (**2012**). Terrestrial pollutant runoff to the Great Barrier Reef: an update of issues, priorities and management responses. *Marine Pollution Bulletin*, *65*(4–9), 81–100.

Burkholder, J., Hallegraeff, *G.* M., Melia, G., Cohen, A., Bowers, H. A., Oldach, D. W., Parrow, M. W., Sullivan, M. J., Zimba, P. V, & Allen, E. H. (**2007**). Phytoplankton and bacterial assemblages in ballast water of US military ships as a function of port of origin, voyage time, and ocean exchange practices. *Harmful Algae*, *6*(4), 486–518.

Bylund, D. B., & Yamamura, H. I. (**1990**). Methods for receptor binding. *Methods in Neurotransmitter Receptor Analysis*, 1–35.

Caillaud, A., de la Iglesia, P., Darius, H. T., Pauillac, S., Aligizaki, K., Fraga, S., Chinain, M., & Diogène, J. (**2010**). Update on methodologies available for ciguatoxin determination: perspectives to confront the onset of ciguatera fish poisoning in Europe. *Marine Drugs*, *8*(6), 1838–1907.

Caillaud, A., de la Iglesia, P., Barber, E., Eixarch, H., Mohammad-Noor, N., Yasumoto, T., & Diogene, J. (**2011**). Monitoring of dissolved ciguatoxin and maitotoxin using solid-phase adsorption toxin tracking devices: application to *Gambierdiscus pacificus* in culture. *Harmful Algae*, *10*(5), 433–446.

Caillaud, A., Eixarch, H., de la Iglesia, P., Rodriguez, M., Dominguez, L., Andree, K. B., & Diogène, J. (**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 A*, *29*(6), 1000–1010.

Caire, J. F., Raymond, A., & Bagnis, R. (**1985**). Ciguatera: study of the setting up and the evolution of *Gambierdiscus toxicus* population on an artificial substrate introduced in an atoll lagoon with follow up of associated environmental factors. *Proceedings of the Fifth International Coral Reef Congress: French Polynesian Coral Reefs*, *1*, 429–435.

Caires, R. (**2010**). Alegada intoxicação por "ciguatera" na Ribeira Brava. In *Diário de Notícias*.

Cameron, J., & Capra, M. (**1991**). *Neurological studies on the effect of ciguatoxin on mammalian nerve* (CRC Press).

Campora, C. E., Dierking, J., Tamaru, C. S., Hokama, Y., & Vincent, D. (**2008a**). Detection of ciguatoxin in fish tissue using sandwich Elisa and neuroblastoma cell bioassay. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *22*(4), 246–253.

Campora, C. E., Hokama, Y., Yabusaki, K., & Isobe, M. (**2008b**). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of ciguatoxin in fish tissue using chicken immunoglobulin Y. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *22*, 239–245.

Cañete, E., & Diogène, J. (**2008**). Comparative study of the use of neuroblastoma cells (Neuro-2a) and neuroblastoma × glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins. *Toxicon*, *52*(4), 541–550.

Cañete, E., & Diogène, J. (**2010**). Improvements in the use of neuroblastoma x glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins. *Toxicon*, *55*(2–3), 381–389.

Carlson, R. D., & Tindall, D. R. (**1985**). Distribution and periodicity of toxic dinoflagellates in the Virgin Islands. In D. M. Anderson, A. W. White, & D. *G.* Baden (Eds.), *Toxic Dinoflagellates* (pp. 171–176). Elsevier.

Carty, S., & Parrow, M. W. (**2015**). Dinoflagellates. In J. D. Wehr, R. *G.* Sheath, & J. Kociolek (Eds.), *Aquatic Ecology* (pp. 773–807). Academic Press.

Catterall, W. A., & Nirenberg, M. (**1973**). Sodium Uptake Associated with Activation of Action Potential Ionophores of Cultured Neuroblastoma and Muscle Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *70*(12), 3759–3763.

Catterall, W. A., & Gainer, M. (**1985**). Interaction of brevetoxin A with a new receptor site on the sodium channel. *Toxicon*, *23*(3), 497–504.

Catterall, W. A, & Risk, M. (**1981**). Toxin T446 from *Ptychodiscus brevis* (formerly *Gymnodinium breve*) enhances activation of voltage-sensitive sodium channels by veratridine. *Molecular Pharmacology*, *19*(2), 345–348.

Catterall, W. A, Trainer, V., & Baden, D. *G.* (**1992**). Molecular properties of the sodium channel: a receptor for multiple neurotoxins. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, *85*(5 Pt 2), 481–485.

Catterall, W. A., Cestele, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F. H., Konoki, K., & Scheuer, T. (**2007**). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, *49*, 124–141.

Cestele, S., & Catterall, W. A. (**2000**). Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*, *82*(9–10), 883–892.

Chan, T. (**2015**). Ciguatera fish poisoning in East Asia and southeast Asia. *Marine Drugs*, *13*(6), 3466–3478.

Chan, T. (**2016**). Characteristic features and contributory factors in fatal ciguatera fish poisoning-implications for prevention and public education. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *94*(4), 704–709.

Chan, W. H., Mak, Y. L., Wu, J. J., Jin, L., Sit, W. H., Lam, J. C. W., Sadovy de Mitcheson, Y., Chan, L. L., Lam, P. K. S., & Murphy, M. B. (**2011**). Spatial distribution of ciguateric fish in the Republic of Kiribati. *Chemosphere*, *84*(1), 117–123.

Chateau-Degat, M. L., Dewailly, E., Cerf, N., Nguyen, N. L., Huin-Blondey, M. O., Hubert, B., Laudon, F., & Chansin, R. (**2007**). Temporal trends and epidemiological aspects of ciguatera in French Polynesia: A 10-year analysis. *Tropical Medicine and International Health*, *12*(4), 485–492.

Chateau-Degat, M. L., Chinain, M., Darius, H. T., Dewailly, E., & Mallet, H. P. (**2009**). Surveillance épidémiologique de la ciguatera en Polynésie française. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire*, *48–50*, 522–525.

Chinain, M., Germain, M., Sako, Y., Pauillac, S., & Legrand, A. (**1997**). Intraspecific variation in the dinoflagellate Gambirdiscus *toxicus* (*Dinophyceae*). *Journal of Phycology*, *33*(1), 36–43.

Chinain, M., Faust, M., & Pauillac, S. (**1999a**). Morphology and molecular analyses of three toxic species of *Gambierdiscus* (*Dinophyceae*): *G. pacificus*, sp. nov., *G. australes*, sp. nov., and *G. polynesiensis*, sp. nov. *Journal of Phycology*, *35*(6), 1282–1296.

Chinain, M., Germain, M., Deparis, X., Pauillac, S., & Legrand, A.-M. (**1999b**). Seasonal abundance and toxicity of the dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. (*Dinophyceae*), the causative agent of ciguatera in Tahiti, French Polynesia. *Marine Biology*, *135*(2), 259–267.

Chinain, M., Darius, H. T., Ung, A., Cruchet, P., Wang, Z., Ponton, D., Laurent, D., & Pauillac, S. (**2010a**). Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (*Dinophyceae*) in culture. *Toxicon*, *56*(5), 739–750.

Chinain, M., Darius, H. T., Ung, A., Tchou Fouc, M., Revel, T., Cruchet, P., Pauillac, S., & Laurent, D. (**2010b**). Ciguatera risk management in French Polynesia: the case study of Raivavae Island (Australes Archipelago). *Toxicon*, *56*(5), 674–690.

Chinain, M., Gatti, C. M. i., Roué, M., Laurent, D., & Darius, H. T. (**2014**). Ciguatera: aspects écologiques, biologiques et toxicologiques. *Revue Francophone Des Laboratoires*, *2014*(460), 27–39.

Chinain, M., Darius, H. T., Gatti, C. M. i., & Roué, M. (**2016**). Update on ciguatera research in French Polynesia. *SPC Fisheries Newsletter*, *150*, 42–51.

Chinain, M., Gatti, C. M. i., Roué, M., & Darius, H. T. (**2019**). Ciguatera poisoning in French Polynesia: insights into the novel trends of an ancient disease. *New Microbes and New Infections*, *31*, 100565.

Chinain, M., Gatti, C. M. i., Darius, H. T., Quod, J.-P., & Tester, P. A. (**2020a**). Ciguatera poisonings: A global review of occurrences and trends. *Harmful Algae*, 101873.

Chinain, M., Gatti, C. M. i., Roué, M., & Darius, H. T. (**2020b**). Ciguatera-causing dinoflagellates in the genera *Gambierdiscus* and *Fukuyoa*: Distribution, ecophysiology and toxicology. In D. Subba Rao (Ed.), *Dinoflagellates: Morphology, Life History and Ecological Significance* (pp. 405–457).

Chinain, M., Ung, A., Cruchet, P., Revel, T., Viallon, J., Sibat, M., Varney, P., Laurent, V., Hess, P., & Darius, H. T. (**2020c**). Evidence for the Range Expansion of Ciguatera in French Polynesia: A Revisit of the 2009 Mass-Poisoning Outbreak in Rapa Island (Australes Archipelago). *Toxins*, *12*(12), 759.

Chisholm, S. W., & Brand, L. E. (**1981**). Persistence of cell division phasing in marine phytoplankton in continuous light after entrainment to light: dark cycles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *51*(2–3), 107–118.

Chiu, D., Vichinsky, E., Yee, M., Kleman, K., & Lubin, B. (**1982**). Peroxidation, vitamin E, and sickle-cell anemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *393*, 323–335.

Cho, K., Heo, J., Han, J., Hong, H. D., Jeon, H., Hwang, H.-J., Hong, C.-Y., Kim, D., Han, J. W., & Baek, K. (**2020**). Industrial Applications of Dinoflagellate Phycotoxins Based on Their Modes of Action: A Review. *Toxins*, *12*(12), 805.

Chungue, E., Bagnis, R., Fusetani, N., & Hashimoto, Y. (**1977**). Isolation of two toxins from a parrotfish *Scarus gibbus*. *Toxicon*, *15*(1), 89–93.

Chungue, E., Bagnis, R., & Parc, F. (**1984**). The use of mosquitoes (Aedes aegypti) to detect ciguatoxin in surgeon fishes (*Ctenochaetus striatus*). *Toxicon*, *22*(1), 161–164.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, *G.* S., Tartaglione, L., Grillo, C., & Melchiorre, N. (**2006**). The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Analytical Chemistry*, *78*(17), 6153–6159.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E. Dello, Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Benedettini, G., Onorari, M., Serena, F., & Battocchi, C. (**2014**). First finding of *Ostreopsis cf. ovata* toxins in marine aerosols. *Environmental Science & Technology*, *48*(6), 3532–3540.

Clark, K. E., Gobas, F. A. P. C., & Mackay, D. (**1990**). Model of organic chemical uptake and clearance by fish from food and water. *Environmental Science & Technology*, *24*(8), 1203–1213.

Clausing, R. J., Losen, B., Oberhaensli, F. R., Darius, H. T., Sibat, M., Hess, P., Swarzenski, P. W., Chinain, M., & Dechraoui Bottein, M.-Y. (**2018**). Experimental evidence of dietary ciguatoxin accumulation in an herbivorous coral reef fish. *Aquatic Toxicology*, *200*, 257–265.

Clua, E., Brena, P. F., Lecasble, C., Ghnassia, R., & Chauvet, C. (**2011**). Prevalence and proposal for cost-effective management of the ciguatera risk in the Noumea fish market, New Caledonia (South Pacific). *Toxicon*, *58*(6–7), 591–601.

Coccini, T., Caloni, F., & De Simone, U. (**2017**). Human neuronal cell based assay - A new *in vitro* model for toxicity evaluation of ciguatoxin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *52*, 200–213.

Cohen, R. A., & Fong, P. (**2004**). Nitrogen uptake and assimilation in *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link (Chlorophyta): using 15N to determine preference during simultaneous pulses of nitrate and ammonium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *309*(1), 67–77.

Commission delegated regulation (EU). (**2019**). Specific rules for the performance of official controls on the production of meat and for production and relaying areas of live bivalve molluscs in accordance with Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council, (EU) 2019/624 of 8 . *Journal Officiel de l'Union Européenne*, *Annexe V*(Chap III), L131/94.

Cooke, S. J., Allison, E. H., Beard, T. D., Arlinghaus, R., Arthington, A. H., Bartley, D. M., Cowx, I. G., Fuentevilla, C., Leonard, N. J., & Lorenzen, K. (**2016**). On the sustainability of inland fisheries: Finding a future for the forgotten. *Ambio*, *45*(7), 753–764.

Costa, P. R., Estevez, P., Castro, D., Soliño, L., Gouveia, N., Santos, C., Rodrigues, S. M., Leao, J. M., & Gago-Martínez, A. (**2018**). New insights into the occurrence and toxin profile of ciguatoxins in Selvagens Islands (Madeira, Portugal). *Toxins*, *10*(12), 524.

Cousseau, A., Siano, R., Probert, I., Bach, S., & Mehiri, M. (**2020**). Marine dinoflagellates as a source of new bioactive structures. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 65, pp. 125–171). Elsevier.

Cruz-Rivera, E., & Villareal, T. A. (**2006**). Macroalgal palatability and the flux of ciguatera toxins through marine food webs. *Harmful Algae*, *5*(5), 452–497.

Daguer, H., Hoff, R. B., Molognoni, L., Kleemann, C. R., & Felizardo, L. V. (**2018**). Outbreaks, toxicology, and analytical methods of marine toxins in seafood. *Current Opinion in Food Science*, *24*, 43–55.

Dai, X., Mak, Y. L., Luc, C.-K., Mei, H.-H., Wu, J. J., Lee, W. H., Chan, L. L., Lim, P. T., Mustapa, N. I., Lim, H. C., Wolf, M., Li, D., Luo, Z., Gu, H., Leaw, C. P., & Lu, D. (**2017**). Taxonomic assignment of the benthic toxigenic dinoflagellate *Gambierdiscus* sp. type 6 as *Gambierdiscus balechii* (*Dinophyceae*), including its distribution and ciguatoxicity. *Harmful Algae*, *67*, 107–118.

Dalzell, P., & Adam, T. J. H. (**1996**). Sustainability and management of reef fisheries in the Pacific Islands. *8th International Coral Reef Symposium*.

Daneshian, M., Botana, L. M., Dechraoui Bottein, M.-Y., Buckland, G., Campàs, M., Dennison, N., Dickey, R. W., Diogène, J., Fessard, V., Hartung, T., Humpage, A., Leist, M., Molgó, J., Quilliam, M. A., Rovida, C., Suarez-Isla, B. A., Tubaro, A., Wagner, K., Zoller, O., & Dietrich, D. (**2013**). T4 Report: A roadmap for hazard monitoring and risk assessment of marine biotoxins on the basis of chemical and biological test systems. *Altex*, *30*(4), 487–545.

Darius, H. T., Ponton, D., Revel, T., Cruchet, P., Ung, A., Tchou Fouc, M., & Chinain, M. (**2007**). Ciguatera risk assessment in two toxic sites of French Polynesia using the receptor-binding assay. *Toxicon*, *50*(5), 612–626.

Darius, H. T., Drescher, O., Ponton, D., Pawlowiez, R., Laurent, D., Dewailly, E., & Chinain, M. (**2013**). Use of folk tests to detect ciguateric fish: A scientific evaluation of their effectiveness in Raivavae Island (Australes, French Polynesia). *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, *30*(3), 550–566.

Darius, H. T., Roué, M., Sibat, M., Viallon, J., Gatti, C. M. i., Vandersea, M. W., Tester, P. A., Litaker, R. W., Amzil, Z., Hess, P., & Chinain, M. (**2018a**). *Tectus niloticus* (Tegulidae, Gastropod) as a novel vector of ciguatera poisoning: detection of pacific ciguatoxins in toxic samples from Nuku Hiva Island (French Polynesia). *Toxins*, *10*(1), 2.

Darius, H. T., Roué, M., Sibat, M., Viallon, J., Vandersea, M. W., Tester, P. A., Litaker, R. W., Amzil, Z., Hess, P., & Chinain, M. (**2018b**). Toxicological investigations on the sea urchin *Tripneustes gratilla* (*Toxopneustidae*, Echinoid) from Anaho Bay (Nuku Hiva, French Polynesia): Evidence for the presence of Pacific ciguatoxins. *Marine Drugs*, *16*(4), 122.

Darius, H. T., Paillon, C., Mou-Tham, G., Ung, A., Cruchet, P., Revel, T., Viallon, J., Vigliola, L., Ponton, D., & Chinain, M. (**2021**). Linking estimated age to ciguatoxicity of coral reef fish from French Polynesia. *Science of the Total Environment*, *(in prep)*.

Davis-Lewis, N. (**1983**). Ciguatera - Implications for Nutrition and Marine Resource Development in the Pacific Islands. In *Journal de la Société des océanistes* (Vol. 39, Issue 77, pp. 89–104).

de Boer, M. K., Tyl, M. R., Fu, M., Kulk, G., Liebezeit, G., Tomas, C. R., Lenzi, A., Naar, J., Vrieling, E. G., & van Rijssel, M. (**2009**). Haemolytic activity within the species *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae). *Harmful Algae*, *8*(5), 699–705.

de Haro, L., Pommier, P., & Valli, M. (**2003**). Emergence of imported ciguatera in Europe: report of 18 cases at the Poison Control Centre of Marseille. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, *41*(7), 927–930.

De Nobel, J. G., & Barnett, J. A. (**1991**). Passage of molecules through yeast cell walls: A brief essay-review. *Yeast*, *7*(4), 313–323.

Dechraoui, M.-Y., Naar, J., Pauillac, S., & Legrand, A. M. (**1999**). Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels. *Toxicon*, *37*(1), 125–143.

Dechraoui-Bottein, M.-Y., & Ramsdell, J. S. (**2003**). Type B brevetoxins show tissue selectivity for voltage-gated sodium channels: comparison of brain, skeletal muscle and cardiac sodium channels. *Toxicon*, *41*(7), 919–927.

Dechraoui-Bottein, M.-Y., Tiedeken, J. A., Persad, R., Wang, Z., Granade, H. R., Dickey, R. W., & Ramsdell, J. S. (**2005**). Use of two detection methods to discriminate ciguatoxins from brevetoxins: Application to great barracuda from Florida Keys. *Toxicon*, *46*(3), 261–270.

Dechraoui-Bottein, M.-Y., Wang, Z., & Ramsdell, J. S. (**2007**). Optimization of ciguatoxin extraction method from blood for Pacific ciguatoxin (P-CTX-1). *Toxicon*, *49*(1), 100–105.

Dechraoui-Bottein, M.-Y., Kashinsky, L., Wang, Z., Littnan, C., & Ramsdell, J. S. (**2011**). Identification of ciguatoxins in Hawaiian monk seals *Monachus schauinslandi* from the Northwestern and Main Hawaiian Islands. *Environmental Science & Technology*.

Dechraoui-Bottein, M.-Y., & Clausing, R. J. (**2017**). Receptor-binding assay for the analysis of marine toxins: detection and mode of action. *Comprehensive Analytical Chemistry*, *78*.

Delgado, G., Lechuga-Devéze, C. H., Popowski, G., Troccoli, L., & Salinas, C. A. (**2006**). Epiphytic dinoflagellates associated with ciguatera in the northwestern coast of Cuba. *Revista de Biologia Tropical*, *54*(2), 299–310.

Dewailly, E., Chateau-Degat, L., & Suhas, E. (**2008**). Fish consumption and health in French Polynesia. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, *17*(1), 86–93.

Díaz-Asencio, L., Clausing, R. J., Rañada, M. L., Alonso-Hernández, C. M., & Dechraoui Bottein, M.-Y. (**2018**). A radioligand receptor binding assay for ciguatoxin monitoring in environmental samples: Method development and determination of quality control criteria. *Journal of Environmental Radioactivity*, *192*, 289–294.

Díaz-Asencio, L., Clausing, R. J., Vandersea, M., Chamero-Lago, D., Gómez-Batista, M., Hernández-Albernas, J. I., Chomérat, N., Rojas-Abrahantes, G., Litaker, R. W., & Tester, P. (**2019a**). Ciguatoxin occurrence in food-web components of a cuban coral reef ecosystem: Risk-assessment implications. *Toxins*, *11*(12), 722.

Díaz-Asencio, L., Vandersea, M., Chomérat, N., Fraga, S., Clausing, R. J., Litaker, R. W., Chamero-Lago, D., Gómez-Batista, M., Moreira-González, A., Tester, P., Alonso-Hernández, C., & Dechraoui-Bottein, M.-Y. (**2019b**). Morphology, toxicity and molecular characterization of *Gambierdiscus* spp. towards risk assessment of ciguatera in South Central Cuba. *Harmful Algae*, *86*, 119–127.

Dick, I., Brochu, R. M., Purohit, Y., Kaczorowski, *G.* J., Martin, W. J., & Priest, B. T. (**2007**). Sodium channel blockade may contribute to the analgesic efficacy of antidepressants. *The Journal of Pain*, *8*(4), 315–324.

Dickey, R. W., Bencsath, F. A., Granade, H. R., & Lewis, R. J. (**1992**). Liquid chromatographic mass spectrometric methodsfor the determination of marine polyether toxins. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, *85*, 514–515.

Dickey, R. W., Plakas, S. M., Jester, E. L. E., El Said, K. R., Johannessen, J. N., Flewelling, L. J., Scott, P., Hammond, D. G., Van Dolah, F. M., & Leighfield, T. A. (**2004**). Multi-laboratory study of five methods for the determination of brevetoxins in shellfish tissue extracts. In K. A. Steidinger (Ed.), *International Conference on Harmful Algae, 2002* (Vol. 10, p. 300). NIH Public Access.

Dickey, R. W. (**2008**). Ciguatera Toxins: Chemistry, Toxicology, and Detection. In L. M. Botana (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection* (pp. 479–500). CRC Press Inc.

Dierking, J., & Campora, C. E. (**2009**). Ciguatera in the Introduced Fish *Cephalopholis argus* (Serranidae) in Hawaii and Implications for Fishery Management1. *Pacific Science*, *63*(2), 193–204.

Diogène, J., Reverté, L., Rambla-Alegre, M., Del Río, V., De La Iglesia, P., Campàs, M., Palacios, O., Flores, C., Caixach, J., & Ralijaona, C. (**2017**). Identification of ciguatoxins in a shark involved in a fatal food poisoning in the Indian Ocean. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–8.

Dodd, P. R., Hardy, J. A., Oakley, A. E., Edwardson, J. A., Perry, E. K., & Delaunoy, J.-P. (**1981**). A rapid method for preparing synaptosomes: comparison, with alternative procedures. *Brain Research*, *226*(1–2), 107–118.

Draisci, R., Ferretti, E., Palleschi, L., Marchiafava, C., Poletti, R., Milandri, A., Ceredi, A., & Pompei, M. (**1999**). High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea. *Toxicon*, *37*(8), 1187–1193.

Dufour, P., Charpy, L., Bonnet, S., & Garcia, N. (**1999**). Phytoplankton nutrient control in the oligotrophic South Pacific sub tropical (Tuamotu archipelago). *Marine Ecology Progress Series*, *179*, 285–290.

Durand-Clement, M. (**1986**). A study of toxin production by *Gambierdiscus toxicus* in culture. *Toxicon*, *24*(11–12), 1153–1157.

Ebesu, J. S. M., & Campora, C. E. (**2012**). Comment on "Quantitative Evaluation of Commercially Available Test Kit for Ciguatera in Fish." *Food and Nutrition Sciences*, *3.*

EFSA. (**2010**). Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish–Emerging toxins: Ciguatoxin group. *European Food and Safety Agency Journal*, *8*(6), 1627.

Emura, A., Matsuyama, Y., & Oda, T. (**2004**). Evidence for the production of a novel proteinaceous hemolytic exotoxin by dinoflagellate *Alexandrium taylori*. *Harmful Algae*, *3*(1), 29–37.

Ennaffah, B., & Chaira, K. (**2015**). First report of *Gambierdiscus* in Moroccan Atlantic waters. *HAN*, *50*.

Errera, R. M., & Campbell, L. (**2011**). Osmotic stress triggers toxin production by the dinoflagellate *Karenia brevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(26), 10597–10601.

Eschbach, E., Scharsack, J. P., John, U., & Medlin, L. K. (**2001**). Improved erythrocyte lysis assay in microtitre plates for sensitive detection and efficient measurement of haemolytic compounds from ichthyotoxic algae. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, *21*(6), 513–519.

Estevez, P., Castro, D., Pequeño-Valtierra, A., Leao, M. J., Vilariño, O., Diogène, J., & Gago-Martínez, A. (**2019a**). An attempt to characterize the ciguatoxin profile in *Seriola fasciata* causing ciguatera fish poisoning in Macaronesia. *Toxins*, *11*(4), 221.

Estevez, P., Castro, D., Pequeño-Valtierra, A., Giraldez, J., & Gago-Martinez, A. (**2019b**). Emerging marine biotoxins in seafood from European coasts: incidence and analytical challenges. *Foods*, *8*(5), 149.

Estevez, P., Sibat, M., Leão-Martins, J. M., Reis Costa, P., Gago-Martínez, A., & Hess, P. (**2020a**). Liquid Chromatography coupled to High-Resolution Mass Spectrometry for the confirmation of Caribbean ciguatoxin-1 as the main toxin responsible for ciguatera poisoning caused by fish from European Atlantic coasts. *Toxins*, *12*(4), 267.

Estevez, P., Sibat, M., Leão-Martins, J. M., Tudó, A., Rambla-Alegre, M., Aligizaki, K., Diogène, J., Gago-Martinez, A., & Hess, P. (**2020b**). Use of mass spectrometry to determine the diversity of toxins produced by *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* species from Balearic Islands and Crete (Mediterranean Sea) and the Canary Islands (Northeast Atlantic). *Toxins*, *12*(5), 305.

Fabricius, K. E. (**2005**). Effects of terrestrial runoff on the ecology of corals and coral reefs: review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, *50*(2), 125–146.

Fairey, E., Dechraoui Bottein, M.-Y., Sheets, M. F., & Ramsdell, J. S. (**2001**). Modification of the cell based assay for brevetoxins using human cardiac voltage dependent sodium channels expressed in HEK-293 cells. *Biosensors and Bioelectronics*, *16*(7–8), 579–586.

Falkowski, P. G., Katz, M. E., Knoll, A. H., Quigg, A., Raven, J. A., Schofield, O., & Taylor, F. J. R. (**2004**). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science*, *305*(5682), 354–360.

FAO, (**2020**). *Report of the Expert Meeting on Ciguatera Poisoning* (FAO & WHO (eds.)). Food Safety and Quality No. 9.

Farrell, H., Murray, S. A., Zammit, A., & Edwards, A. W. (**2017**). Management of ciguatoxin risk in eastern Australia. *Toxins*, *9*(11), 367.

Faust, M. A. (**1995**). Observation of sand-dwelling toxic dinoflagellates (*Dinophyceae*) from widely differing sites, including two new species. *Journal of Phycology*, *31*(6), 996–1003.

Faust, M. A., & Gulledge, R. A. (**2002**). Identifying harmful marine dinoflagellates. *Smithsonian Institutional Contributions from United States National Herbarium*, *42*, 1–144.

Faust, M. A. (**2009**). Ciguatera-causing dinoflagellates in a coral-reef mangrove ecosystem, Belize. *Atoll Research Bulletin*.

FDA. (**2011**). *Fish and Fishery Products Hazards and Control Guidance* (US Food and Drug Administration (FDA) (Ed.)).

Fenchel, T. (**2001**). How Dinoflagellates Swim. *Protist*, *152*(4), 329–338.

Fistarol, *G.* O., Legrand, C., Selander, E., Hummert, C., Stolte, W., & Granéli, E. (**2004**). Allelopathy in *Alexandrium* spp.: effect on a natural plankton community and on algal monocultures. *Aquatic Microbial Ecology*, *35*(1), 45–56.

Fleming, L., Blythe, D., & Baden, D. (**1997**). Ciguatera fish poisoning. *Shoreman's Travel Medicine Monthly*, *1*, 1–5.

Fleming, L., Baden, D. G., Bean, J. a, Weisman, R., & Blythe, D. *G.* (**1998**). Marine seafood toxin diseases: issues in epidemiology & community outreach. *Environmental Health*, 245–248.

Flores, P., Rodríguez, E., Zapata, E., Carbó, R., Farías, J. M., & Martínez, M. (**2017**). Maitotoxin is a potential selective activator of the endogenous transient receptor potential canonical Type 1 channel in *Xenopus laevis* oocytes. *Marine Drugs*, *15*(7), 198.

Fong, C. R., Gaynus, C. J., & Carpenter, R. C. (**2020**). Extreme rainfall events pulse substantial nutrients and sediments from terrestrial to nearshore coastal communities: a case study from French Polynesia. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–8.

Forsyth, C., Dounay, A. B., Sabes, S. F., & Urbanek, R. A. (**2000**). Biotherapeutic potential and synthesis of okadaic acid. In Springer (Ed.), *Ernst Schering Research Foundation Workshop Seriese, Volume 32, The Role of Natural Products in Drug Discovery* (pp. 57–102). Springer.

Fraga, S., Rodríguez, F., Caillaud, A., Diogène, J., Raho, N., & Zapata, M. (**2011**). *Gambierdiscus excentricus* sp. nov. (*Dinophyceae*), a benthic toxic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *Harmful Algae*, *11*, 10–22.

Fraga, S., & Rodriguez, F. (**2014**). Genus *Gambierdiscus* in the Canary Islands (NE Atlantic Ocean) with description of *Gambierdiscus silvae* sp. nov., a new potentially toxic epiphytic benthic dinolflagellate. *Protist*, *165*(6), 839–853.

Fraga, S., Rodríguez, F., Riobó, P., & Bravo, I. (**2016**). *Gambierdiscus balechii* sp. nov (*Dinophyceae*), a new benthic toxic dinoflagellate from the Celebes Sea (SW Pacific Ocean). *Harmful Algae*, *58*, 93–105.

Frew, R., Wang, Y., Weiss, T. M., Nelson, P., & Sawyer, T. W. (**2008**). Attenuation of maitotoxin-induced cytotoxicity in rat aortic smooth muscle cells by inhibitors of Na+/Ca2+ exchange, and calpain activation. *Toxicon*, *51*(8), 1400–1408.

Friedemann, M. (**2016**). First ciguatera outbreak in Germany in 2012. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, *59*(12), 1556–1565.

Friedman, M. A., Fleming, L. E., Fernandez, M., Bienfang, P., Schrank, K., Dickey, R., Dechraoui Bottein, M.-Y., Backer, L., Ayyar, R., Weisman, R., Watkins, S., Granade, R., & Reich, A. (**2008**). Ciguatera fish poisoning: treatment, prevention and management. *Marine Drugs*, *6*(3), 456–479.

Friedman, M. A., Fernandez, M., Backer, L. C., Dickey, R. W., Bernstein, J., Schrank, K., Kibler, S., Stephan, W., Gribble, M. O., Bienfang, P., Bowen, R. E., Degrasse, S., Flores Quintana, H. A., Loeffler, C. R., Weisman, R., Blythe, D., Berdalet, E., Ayvar, R., Clarkson-Townsend, D., … Fleming, L. E. (**2017**). An updated review of ciguatera fish poisoning: clinical, epidemiological, environmental, and public health management. *Marine Drugs*, *15*(3), 72.

Fujiki, H., Suganuma, M., Suguri, H., Yoshizawa, S., Takagi, K., Uda, N., Wakamatsu, K., Yamada, K., Murata, M., & Yasumoto, T. (**1988**). Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin. *Japanese Journal of Cancer Research*, *79*, 1089–1093.

Fukuyo, Y. (**1981**). Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisherie*, *47*(8), 967–978.

Gaboriau, M., Ponton, D., Darius, H. T., & Chinain, M. (**2014**). Ciguatera fish toxicity in French Polynesia: Size does not always matter. *Toxicon*, *84*, 41–50.

Gaertner-Mazouni, N., Lacoste, E., Bodoy, A., Peacock, L., Rodier, M., Langlade, M. J., Orempuller, J., & Charpy, L. (**2012**). Nutrient fluxes between water column and sediments: Potential influence of the pearl oyster culture. *Marine Pollution Bulletin*, *65*(10–12), 500–505.

García-Portela, M., Riobó, P., Franco, J. M., Bañuelos, R. M., & Rodríguez, F. (**2016**). Genetic and toxinological characterization of North Atlantic strains of the dinoflagellate *Ostreopsis* and allelopathic interactions with toxic and non-toxic species from the genera *Prorocentrum*, *Coolia* and *Gambierdiscus*. *Harmful Algae*, *60*, 57–69.

Gatti, C. M. i., Oelher, E., & Legrand, A. M. (**2008**). Severe seafood poisoning in French Polynesia: A retrospective analysis of 129 medical files. *Toxicon*, *51*(5), 746–753.

Gatti, C. M. i., Lonati, D., Darius, H. T., & Chinain, M. (**2015**). First report of a mass-poisoning outbreak following the consumption of *Tectus niloticus* (Gastropod) in French Polynesia: A novel pathway of ciguatera shellfish poisoning. *Harmful Algae News*, *50*, 19–20.

Gatti, C. M. i., Lonati, D., Darius, H. T., Zancan, A., Roué, M., Schicchi, A., Locatelli, C. ., & Chinain, M. (**2018**). *Tectus niloticus* (Tegulidae, Gastropod) as a novel vector of Ciguatera Poisoning: clinical characterization and follow-up of a mass poisoning event in Nuku Hiva Island (French Polynesia). *Toxins*, *10*(102), 1–16.

Geller, R., Olson, K. R., & Senécal, P. E. (**1991**). Ciguatera fish poisoning in San Francisco, California, caused by imported barracuda. *Western Journal of Emergency Medecine*, *155*(6), 639–642.

Gémin, M.-P., Réveillon, D., Hervé, F., Pavaux, A.-S., Tharaud, M., Séchet, V., Bertrand, S., Lemée, R., & Amzil, Z. (**2020**). Toxin content of *Ostreopsis cf. ovata* depends on bloom phases, depth and macroalgal substrate in the NW Mediterranean Sea. *Harmful Algae*, *92*, 101727.

Ghiaroni, V., Sasaki, M., Fuwa, H., Rossini, G., Scalera, G., Yasumoto, T., Pietra, P., & Bigiani, A. (**2005**). *Inhibition of voltage-gated potassium currents by gambierol in mouse taste cells* (Vol. 85).

Gillespie, N., Lewis, R. J., Holmes, M. J., Bourke, J. B., Pearn, J. H., Bourke, A. T. C., & Shields, W. J. (**1986**). Ciguatera in Australia: occurrence, clinical features, pathophysiology and management. *Medical Journal of Australia*, *145*(11–12), 584–590.

Gingold, D. B., Strickland, M. J., & Hess, J. J. (**2014**). Ciguatera fish poisoning and climate change: analysis of national poison center data in the United States, 2001–2011. *Environmental Health Perspectives*, *122*(6), 580–586.

Glaziou, P., & Martin, P. (**1993**). Study of factors that influence the clinical response to ciguatera fish poisoning. *Toxicon*, *31*(9), 1151–1154.

Glaziou, P., & Legrand, A. M. (**1994**). The epidemiology of ciguatera fish poisoning. *Toxicon*, *32*(8), 863–873.

Glibert, P. M., Anderson, D. M., Gentien, P., Granéli, E., & Sellner, K. *G.* (**2005a**). The Global, complex phenomena of Harmful Algal Blooms. *Oceanography*, *18*(2), 136–147.

Glibert, P. M., Seitzinger, S., Heil, C. A., Burkholder, J. M., Parrow, M. W., Codispoti, L. A., & Kelly, V. (**2005b**). The role of eutrophication in the global Proliferation of Harmful Algal Blooms. *Oceanography*, *18*(2), 198–209.

Goater, S., Derne, B., & Weinstein, P. (**2011**). Critical issues in the development of health information systems in supporting environmental health: A case study of ciguatera. *Environmental Health Perspectives*, *119*(5), 585–590.

Gómez, F. (**2005**). A list of free-living dinoflagellate species in the world's oceans. *Acta Botanica Croatica*, *64*(1), 129–212.

Gómez, F. (**2014**). Problematic biases in the availability of molecular markers in protists: the example of the dinoflagellates. *Acta Protozoologica*, *53*(1).

Gómez, F, Qiu, D., Lopes, R. M., & Lin, S. (**2015**). *Fukuyoa paulensis* gen. et sp. nov., a new genus for the globular species of the dinoflagellate *Gambierdiscus* (*Dinophyceae*). *PLOS ONE*, *10*(4), e0119676.

Görögh, T., Bèress, L., Quabius, E. S., Ambrosch, P., & Hoffmann, M. (**2013**). Head and neck cancer cells and xenografts are very sensitive to palytoxin: decrease of c-jun n-terminale kinase-3 expression enhances palytoxin toxicity. *Molecular Cancer*, *12*(1), 1–11.

Gouveia, N. N., Vale, P., Gouveia, N., & Delgado, J. (**2010**). Primeiro registo da ocorrência de episódios do tipo ciguatérico no Arquipélago da Madeira. *Algas Tóxicas e Biotoxinas Nas Águas Da Península Ibérica 2009.*, 152–157.

Graber, N., Stavinsky, F., Hoffman, R., Button, J., Clark, N., Martin, S., Robertson, A., & Hustedt, J. (**2013**). Ciguatera fish poisoning—New York City, 2010–2011. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *62*(4), 61.

Granade, H. R., Cheng, P. C., & Doorenbos, N. J. (**1976**). Ciguatera. Brine shrimp (*Artemia salina*) larval asay for ciguatera toxins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *65*, 1414–1415.

Granéli, E., & Hansen, P. J. (**2006**). Allelopathy in harmful algae: a mechanism to compete for resources? In *Ecology of harmful algae* (pp. 189–201). Springer.

Granéli, E., Weberg, M., & Salomon, P. S. (**2008**). Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: the role of eutrophication. *Harmful Algae*, *8*(1), 94–102.

Griffith, A. W., & Gobler, C. J. (**2020**). Harmful algal blooms: a climate change co-stressor in marine and freshwater ecosystems. *Harmful Algae*, *91*, 101590.

Hales, S., Weinstein, P., & Woodward, A. (**1999**). Ciguatera (fish poisoning), El Niño, and Pacific sea surface temperatures. *Ecosystem Health*, *5*(1), 20–25.

Halstead, B. W. (**1965**). *Poisonous and venomous marine animals of the world vol. 1* (US. Government Printing 1967 Office (ed.)).

Halstead, B. W. (**1967**). *Poisonous and venomous marine animals of the world vol. 2* (US. Government Printing 1967 Office (ed.)).

Halstead, B. W. (**1988**). *Poisonous and venomous marine animals of the world*.

Hamilton, B., Hurbungs, M., Vernoux, J.-P., Jones, A., & Lewis, R. J. (**2002**). Isolation and characterisation of Indian Ocean ciguatoxin. *Toxicon*, *40*(6), 685–693.

Hardison, D. R., Holland, W. C., McCall, J. R., Bourdelais, A. J., Baden, D. G., Darius, H. T., Chinain, M., Tester, P. A., Shea, D., Flores Quintana, H. A., Morris Jr., J. A., Litaker, R. W., Quintana, H. A. F., Morris, J. A., & Litaker, R. W. (**2016**). Fluorescent Receptor Binding Assay for detecting ciguatoxins in fish. *PLOS One*, *11*(4), e0153348.

Hardison, D. R., Holland, W. C., Darius, H. T., Chinain, M., Tester, P. A., Shea, D., Bogdanoff, A. K., Morris Jr., J. A., Flores Quintana, H. A., Loeffler, C. R., Buddo, D., & Litaker, R. W. (**2018**). Investigation of ciguatoxins in invasive lionfish from the greater caribbean region: Implications for fishery development. *PLOS One*, *13*(6), e0198358.

Harwood, D. T., Murray, S., & Boundy, M. J. (**2017**). Sample Preparation Prior to Marine Toxin Analysis. In Elsevier (Ed.), *Recent Advances in the Analysis of Marine Toxins* (Vol. 78).

Haßler, K., Dähnke, K., Kölling, M., Sichoix, L., Nickl, A.-L., & Moosdorf, N. (**2019**). Provenance of nutrients in submarine fresh groundwater discharge on Tahiti and Moorea, French Polynesia. *Applied Geochemistry*, *100*, 181–189.

Helfrich, P., & Banner, A. H. (**1963**). Experimental induction of ciguatera toxicity in fish through diet. *Nature*, *197*(4871), 1025–1026.

Hertweck, C. (**2009**). The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie - International Edition*, *48*(26), 4688–4716.

Hess, P., Mondeguer, F., Glauner, T., Wust, B., Sibat, M., Zendong, S. Z., Herrenknecht, C., & Séchet, V. (**2013**). Metabolomic analysis of marine microalgae using high resolution mass spectrometry for taxonomic comparisons and screening of marine biotoxins. *61st American Society for Mass Spectrometry*.

Hoffman, P., Granade, H. R., & McMillan, J. P. (**1983**). The mouse ciguatoxin bioassay: A dose - response curve and symptomatology analysis. *Toxicon*, *21*(3), 363–369.

Hokama, Y. (**1985**). A rapid, simplified enzyme immunoassay stick test for the detection of ciguatoxin and related polyethers from fish tissues. *Toxicon*, *23*(6), 939–946.

Hokama, Y. (**1988**). Ciguatera fish poisoning. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *2*(1), 44–50.

Hokama, Y. (**1989**). *Rapid stick test for detection of ciguatoxin and other polyether toxins from tissues*.

Hokama, Y., Ebesu, J. S. M., Asuncion, D. A., & Nagai, H. (**1996**). Growth and cyclic studies of *Gambierdiscus toxicus* in the natural environment and in culture. *Harmful and Toxic Algal Blooms.*, 313–315.

Holland, W. C., Litaker, R. W., Tomas, C. R., Kibler, S. R., Place, A. R., Davenport, E. D., & Tester, P. A. (**2013**). Differences in the toxicity of six *Gambierdiscus* (*Dinophyceae*) species measured using an *in vitro* human erythrocyte lysis assay. *Toxicon*, *65*, 15–33.

Holmes, M. J., Lewis, R. J., & Gillespie, N. C. (**1990**). Toxicity of Australian and French Polynesian strains of *Gambierdiscus toxicus* (*Dinophyceae*) grown in culture: Characterization of a new type of maitotoxin. *Toxicon*, *28*(10), 1159–1172.

Holmes, M. J., Lewis, R. J., Poli, M. A., & Gillespie, N. C. (**1991**). Strain dependent production of ciguatoxin precursors (gambiertoxins) by *Gambierdiscus toxicus* (*Dinophyceae*) in culture. *Toxicon*, *29*(6), 761–775.

Holmes, M. J., Lewis, R. J., Jones, A., & Hoy, A. W. W. (**1995**). Cooliatoxin, the first toxin from *Coolia monotis* (*Dinophyceae*). *Natural Toxins*, *3*(5), 355–362.

Holmes, M. J. (**1998**). *Gambierdiscus yasumotoi* sp. nov. (*Dinophyceae*), a toxic benthic dinoflagellate from Southeastern Asia. *Journal of Phycology*, *34*(4), 661–668.

Hoppenrath, M., Elbrächter, M., & Drebes, *G.* (**2009**). *Marine Phytoplankton*. Schweizerbart Science Publishers.

Hoppenrath, M., Murray, S. A., Chomérat, N., & Horiguchi, T. (**2014**). *Marine benthic dinoflagellates-unveiling their worldwide biodiversity*. Schweizerbart Science Publishers.

Hoppenrath, M., & Elbrächter, M. (**2015**). *Center of Excellence for Dinophyte Taxonomy (CEDiT)*.

Hoppenrath, M., Kretzschmar, A. L., Kaufmann, M. J., & Murray, S. A. (**2019**). Morphological and molecular phylogenetic identification and record verification of *Gambierdiscus excentricus* (*Dinophyceae*) from Madeira Island (NE Atlantic Ocean). *Marine Biodiversity Records*, *12*(1), 16.

Hopwood, D. A., & Sherman, D. H. (**1990**). Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annual Review of Genetics*, *24*(1), 37–62.

Hopwood, D. A. (**1997**). Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chemical Reviews*, *97*(7), 2465–2498.

Hossen, V., Soliño, L., Leroy, P., David, E., Velge, P., Dragacci, S., Krys, S., Flores Quintana, H., & Diogène, J. (**2015**). Contribution to the risk characterization of ciguatoxins: LOAEL estimated from eight ciguatera fish poisoning events in Guadeloupe (French West Indies). *Environmental Research*, *143*, 100–108.

Ichinotsubo, D., Asahina, A. Y., Titus, E., Chun, S., Hong, T. W. P., Shirai, J. L., & Hokama, Y. (**1994**). Survey for ciguatera fish poisoning in West Hawaii. *Memoirs of the Queensland Museum*, *34*, 513–522.

Ikehara, T., Kuniyoshi, K., Oshiro, N., & Yasumoto, T. (**2017**). Biooxidation of ciguatoxins leads to species-specific toxin profiles. *Toxins*, *9*(7), 205.

Indelicato, S., & Watson, D. (**1986**). Identification of the photosynthetic pigments of the tropical benthic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Marine Fisheries Review*, *48*(4), 44–47.

Inoue, M., Hirama, M., Satake, M., Sugiyama, K., & Yasumoto, T. (**2003**). Inhibition of brevetoxin binding to the voltage-gated sodium channel by gambierol and gambieric acid-A. *Toxicon*, *41*(4), 469–474.

Inoue, M., Lee, N., Tsumuraya, T., Fujii, I., & Hirama, M. (**2009**). Use of monoclonal antibodies as an effective strategy for treatment of ciguatera poisoning. *Toxicon*, *53*(7–8), 802–805.

Ito, E., Suzuki-Toyota, F., Toshimori, K., Fuwa, H., Tachibana, K., Satake, M., & Sasaki, M. (**2003**). Pathological effects on mice by gambierol, possibly one of the ciguatera toxins. *Toxicon*, *42*(7), 733–740.

Jang, S. H., Jeong, H. J., & Yoo, Y. D. (**2018**). *Gambierdiscus jejuensis* sp. nov., an epiphytic dinoflagellate from the waters of Jeju Island, Korea, effect of temperature on the growth, and its global distribution. *Harmful Algae*, *80*, 149–157.

Jeong, H. J., Lim, A. S., Jang, S. H., Yih, W. H., Kang, N. S., Lee, S. Y., Yoo, Y. Du, & Kim, H. S. (**2012**). First report of the epiphytic Dinoflagellate *Gambierdiscus caribaeus* in the temperate waters off Jeju Island, Korea: Morphology and molecular characterization. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *59*(6), 637–650.

Jiang, L.-Q., Carter, B. R., Feely, R. A., Lauvset, S. K., & Olsen, A. (**2019**). Surface ocean pH and buffer capacity: past, present and future. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–11.

Jiang, X. W., Li, X., Lam, P. K. S., Cheng, S. H., Schlenk, D., Mitcheson, Y. S. de, Li, Y., Gu, J. D., & Chan, L. L. (**2012**). Proteomic analysis of hepatic tissue of ciguatoxin (CTX) contaminated coral reef fish *Cephalopholis argus* and moray eel *Gymnothorax undulatus*. *Harmful Algae*, *13*, 65–71.

Joh, Y., & Scheuer, P. (**1986**). The chemical nature of scaritoxin. *Marine Fisheries Review*, *48*(4), 19–22.

Juranovic, L., & Park, D. L. (**1991**). Foodborne toxins of marine origin: ciguatera. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 51–94.

Kaly, U. L., & Jones, *G*. P. (**1994**). Test of the effect of disturbance on ciguatera in Tuvalu. *Memoirs of the Queensland Museum*, *34*(3), 523–532.

Kamat, P., Rai, S., Swarnkar, S., Shukla, R., & Nath, C. (**2014**). Molecular and cellular mechanism of okadaic acid (OKA)-induced neurotoxicity: a novel tool for Alzheimer's disease therapeutic application. *Molecular Neurobiology*, *50*(3), 852–865.

Kanno, K., Kotaki, Y., & Yasumoto, T. (**1976**). Distribution of toxins in molluscs associated with coral reefs. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fisheries*, *42*(12), 1395–1398.

Kato, T., & Yasumoto, T. (**2017**). Quantification of representative ciguatoxins in the Pacific using quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Marine Drugs*, *15*(10), 309.

Kellmann, R., Stüken, A., Orr, R. J. S., Svendsen, H. M., & Jakobsen, K. S. (**2010**). Biosynthesis and molecular genetics of polyketides in marine dinoflagellates. *Marine Drugs*, *8*(4), 1011–1048.

Kennison, R. L., Kamer, K., & Fong, P. (**2011**). Rapid nitrate uptake rates and large short-term storage capacities may explain why opportunistic green macroalgae dominate shallow eutrophic estuaries 1. *Journal of Phycology*, *47*(3), 483–494.

Kerbrat, A. S., Amzil, Z., Pawlowiez, R., Golubic, S., Sibat, M., Darius, H. T., Chinain, M., & Laurent, D. (**2011**). First evidence of palytoxin and 42-hydroxy-palytoxin in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Marine Drugs*, *9*, 543–560.

Kibler, S. R., Litaker, R. W., Holland, W. C., Vandersea, M. W., & Tester, P. A. (**2012**). Growth of eight *Gambierdiscus* (*Dinophyceae*) species: Effects of temperature, salinity and irradiance. *Harmful Algae*, *19*, 1–14.

Kibler, S. R., Tester, P. A., Kunlec, K. E., Moored, S. K., & Litaker, W. R. (**2015**). Effects of ocean warming on growth and distribution of dinoflagellates associated with ciguatera fish poisoning in the Caribbean. *Ecological Modelling*, *316*, 194–210.

Kim, G., Kim, W.-J., & Choi, Y. H. (**2011**). Pectenotoxin-2 from marine sponges: A potential anti-cancer agent—A review. *Marine Drugs*, *9*(11), 2176–2187.

Kimura, L. H., Hokama, Y., Abad, M. A., Oyama, M., & Miyahara, J. T. (**1982**). Comparison of three different assays for the assessment of ciguatoxin in fish tissues: Radioimmunoassay, mouse bioassay and *In vitro* guinea pig atrium assay. *Toxicon*, *20*(5), 907–912.

Klis, F. M., Boorsma, A., & De Groot, P. W. J. (**2006**). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *23*(3), 185–202.

Kodama, A., & Hokama, Y. (**1989**). Variations in symptomatology of ciguatera poisoning. *Toxicon*, *27*(5), 593–595.

Kofoid, C. A. (**1907**). The limitations of isolation in the origin of species. *Science*, *25*(639), 500–506.

Kogure, K., Tamplin, M. L., Simidu, U., & Colwell, R. R. (**1988**). A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. *Toxicon*, *26*(2), 191–197.

Kohli, G., Papiol, *G.* G., Rhodes, L. L., Harwood, T. D., Selwood, A., Jerrett, A., Murray, S. A., & Neilan, B. A. (**2014**). A feeding study to probe the uptake of maitotoxin by snapper (*Pagrus auratus*). *Harmful Algae*, *37*, 125–132.

Kohli, G., Farrell, H., & Murray, S. A. (**2015a**). *Gambierdiscus*, the cause of ciguatera fish poisoning: an increased human health threat influenced by climate change. In *Climate Change and Marine and Freshwater Toxins* (pp. 273–312). De Gruyter.

Kohli, G., John, U., Figueroa, R. L., Rhodes, L. L., Harwood, T. D., Groth, M., S., B. C. J., & A., M. S. (**2015b**). Polyketide synthesis genes associated with toxin production in two species of *Gambierdiscus* (*Dinophyceae*). *BMC Genomics*, *16*(1), 1–10.

Kohli, G., Campbell, K., John, U., Smith, K. F., Fraga, S., Rhodes, L. L., & Murray, S. A. (**2017a**). Role of Modular Polyketide Synthases in the Production of Polyether Ladder Compounds in Ciguatoxin-Producing *Gambierdiscus polynesiensis* and *G. excentricus* (*Dinophyceae*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *64*(5), 691–706.

Kohli, G., Haslauer, K., Sarowar, C., Kretzschmar, A. L., Boulter, M., Harwood, D. T., Laczka, O., & Murray, S. A. (**2017b**). Qualitative and quantitative assessment of the presence of ciguatoxin, P-CTX-1B, in Spanish Mackerel (*Scomberomorus commerson*) from waters in New South Wales (Australia). *Toxicology Reports*, *4*, 328–334.

Kopljar, I., Labro, A. J., de Block, T., Rainier, J. D., Tytgat, J., & Snyders, D. J. (**2013**). The ladder-shaped polyether toxin gambierol anchors the gating machinery of Kv3. 1 channels in the resting state. *Journal of General Physiology*, *141*(3), 359–369.

Kremp, A. (**2013**). Diversity of dinoflagellate life cycles: facets and implications of complex strategies. In J. Lewis, F. Marret, & L. Bradley (Eds.), *Biological and Geological Perspectives of Dinoflagellates* (pp. 189–198). Geological Society.

Kretzschmar, A. L., Verma, A., Harwood, D. T., Hoppenrath, M., & Murray, S. (**2017**). Characterization of *Gambierdiscus lapillus* sp. nov. (Gonyaulacales, *Dinophyceae*): a new toxic dinoflagellate from the Great Barrier Reef (Australia). *Journal of Phycology*, *53*(2), 283–297.

Kretzschmar, A. L., Larsson, M. E., Hoppenrath, M., Doblin, M. A., & Murray, S. A. (**2019a**). Characterisation of two toxic *Gambierdiscus* spp. (Gonyaulacales, *Dinophyceae*) from the Great Barrier Reef (Australia): *G. lewisii* sp. nov. and *G. holmesii* sp. nov. *Protist*, *170*(6), 125699.

Kretzschmar, A. L., Verma, A., Kohli, G., & Murray, S. (**2019b**). *Development of a quantitative PCR assay for the detection and enumeration of a potentially ciguatoxin-producing dinoflagellate, Gambierdiscus lapillus (Gonyaulacales, Dinophyceae)*.

Kronen, M., Pinca, S., Magron, F., McArdle, B., Vunisea, A., Vigliola, L., Kulbicki, M., & Andréfouët, S. (**2012**). Socio-economic and fishery indicators to identify and monitor artisanal finfishing pressure in Pacific Island countries and territories. *Ocean & Coastal Management*, *55*, 63–73.

Kryuchkov, F., Robertson, A., Miles, C., Mudge, E., & Uhlig, S. (**2020**). LC–HRMS and chemical derivatization strategies for the structure elucidation of caribbean ciguatoxins: identification of C-CTX-3 and -4. *Marine Drugs*, *18*(4), 182.

Kubanek, J., Hicks, M. K., Naar, J., & Villareal, T. A. (**2005**). Does the red tide dinoflagellate *Karenia brevis* use allelopathy to outcompete other phytoplankton? *Limnology and Oceanography*, *50*(3), 883–895.

Kulsawat, W., Porntepkasemsan, B., & Nochit, P. (**2018**). Application of a receptor binding assay to the analyses of ciguatera toxin in reef fish, Thailand. *Harmful Algae*, 135.

Kumar-Roiné, S., Matsui, M., Chinain, M., Laurent, D., & Pauillac, S. (**2008**). Modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in RAW 264.7 murine macrophages by Pacific ciguatoxin. *Nitric Oxide*, *19*(1), 21–28.

Kumar-Roiné, S. (**2009**). *Valorisation de remèdes traditionnels utiles dans le traitement de la ciguatéra dans le Pacifique*. Université de la Nouvelle-Calédonie.

Kumar-Roiné, S., Matsui, M., Reybier, K., Darius, H. T., Chinain, M., Pauillac, S., & Laurent, D. (**2009**). Ability of certain plant extracts traditionally used to treat ciguatera fish poisoning to inhibit nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, *123*(3), 369–377.

Kumar-Roiné, S., Matsui, M., Pauillac, S., & Laurent, D. (**2010**). Ciguatera fish poisoning and other seafood intoxication syndromes: A revisit and a review of the existing treatments employed in ciguatera fish poisoning. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, *28*(1), 1–26.

Kumar-Roiné, S., Darius, H. T., Matsui, M., Fabre, N., Haddad, M., Chinain, M., Pauillac, S., & Laurent, D. (**2011**). A review of traditional remedies of ciguatera fish poisoning in the Pacific. *Phytotherapy Research*, *25*(7), 947–958.

Labrousse, H., & Matile, L. (**1996**). Toxicological biotest on Diptera larvae to detect ciguatoxins and various other toxic substances. *Toxicon*, *34*(8), 881–891.

Lacoste, E., Gueguen, Y., Le Moullac, G., Koua, M. S., & Gaertner-Mazouni, N. (**2014**). Influence of farmed pearl oysters and associated biofouling communities on nutrient regeneration in lagoons of French Polynesia. *Aquaculture Environment Interactions*, *5*(3), 209–219.

Lange, R., Lipkin, M., & Yang, *G.* (**1989**). Can ciguatera be a sexually transmitted disease ? *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, *27*(3), 193–197.

Lange, R., Snyder, F. R., & Fudala, P. J. (**1992**). Travel and ciguatera fish poisoning. *Archives of Internal Medicine*, *152*(10), 2049–2053.

Larsson, M. E., Laczka, O., Harwood, D. T., Lewis, R. J., Himaya, S., Murray, S. A., & Doblin, M. A. (**2018**). Toxicology of *Gambierdiscus* spp. (*Dinophyceae*) from tropical and temperate Australian waters. *Marine Drugs*, *16*(1), 7.

Larsson, M. E., Harwood, T. D., Lewis, R. J., Himaya, S. W. A., & Doblin, M. A. (**2019**). Toxicological characterization of *Fukuyoa paulensis* (*Dinophyceae*) from temperate Australia. *Phycological Research*, *67*(1), 65–71.

Lartigue, J., Jester, E. L. E., Dickey, R. W., & Villareal, T. A. (**2009**). Nitrogen source effects on the growth and toxicity of two strains of the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Harmful Algae*, *8*(5), 781–791.

Laurent, D, Bourdy, G., & Cabalion, P. (**1993**). *La gratte ou ciguatera: ses remèdes traditionnels dans le Pacifique Sud* (Vol. 1). IRD Editions.

Laurent, D., Kerbrat, A. S., Darius, H. T., Girard, E., Golubic, S., Benoit, E., Sauviat, M. P., Chinain, M., Molgo, J., & Pauillac, S. (**2008**). Are cyanobacteria involved in Ciguatera Fish Poisoning-like outbreaks in New Caledonia? *Harmful Algae*, *7*(6), 827–838.

Laurent, D, Kerbrat, A. S., Darius, H. T., Rossi, F., Yeeting, B., Haddad, M., Golubic, S., Pauillac, S., & Chinain, M. (**2012**). Ciguatera shellfish poisoning (CSP): a new ecotoxicological phenomenon from cyanobacteria to humans via giant clams. In M. A. Jensen *et al*, (Eds.), *Food Chains: New Research: Chapter 1* (pp. 1-43.). Nova Science Publishers, Inc.

Lawrence, D. N., Enriquez, M. B., Lumish, R. M., & Maceo, A. (**1980**). Ciguatera fish poisoning in Miami. *Jama*, *244*(3), 254–258.

Laza-Martínez, A., David, H., Riobó, P., Miguel, I., & Orive, E. (**2016**). Characterization of a strain of *Fukuyoa paulensis* (*Dinophyceae*) from the Western Mediterranean Sea. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *63*(4), 481–497.

Le Bescot, N., Mahé, F., Audic, S., Dimier, C., Garet, M., Poulain, J., Wincker, P., de Vargas, C., & Siano, R. (**2016**). Global patterns of pelagic dinoflagellate diversity across protist size classes unveiled by metabarcoding. *Environmental Microbiology*, *18*(2), 609–626.

Leaw, C.-P., Lim, P.-T., Tuan-Halim, T. N., Cheng, K.-W., Ng, B.-K., & Usup, *G.* (**2011**). First report of the benthic dinoflagellate *Gambierdiscus belizeanus* (Gonyaulacales: *Dinophyceae*) for the east coast of Sabah, Malaysian Borneo. *Phycological Research*, *59*(3), 143–146.

Ledreux, A., Krys, S., & Bernard, C. (**2009**). Suitability of the Neuro-2a cell line for the detection of palytoxin and analogues (neurotoxic phycotoxins). *Toxicon*, *53*(2), 300–308.

Ledreux, A., Sérandour, A. L., Morin, B., Derick, S., Lanceleur, R., Biré, R., Krys, S., Fessard, V., Troussellier, M., & Bernard, C. (**2012**). Collaborative study for the detection of toxic compounds in shellfish extracts using cell-based assays. Part II: application to shellfish extracts spiked with lipophilic marine toxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *403*(7), 1995–2007.

Ledreux, A., Brand, H., Chinain, M., Dechraoui-Bottein, M.-Y., & Ramsdell, J. S. (**2014**). Dynamics of ciguatoxins from *Gambierdiscus polynesiensis* in the benthic herbivore *Mugil cephalus*: trophic transfer implications. *Harmful Algae*, *39*, 165–174.

Lee, C. (**1980**). Fish poisoning with particular reference to ciguatera. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *83*(3), 93–97.

Lee, H., Leaw, C. P., Lim, P. T., & Jipanin, S. J. (**2019**). Ciguatera fish poisoning: first reported case in Sabah, Malaysia. *The Medical Journal of Malaysia*, *74*(6), 545–546.

Lee, S., Kim, N.-H., Jeong, E. J., & Rho, J.-R. (**2020**). Cytotoxic 4-hydroxyprorocentrolide and prorocentrolide C from cultured Dinoflagellate *Prorocentrum lima* induce human cancer cell death through apoptosis and cell cycle arrest. *Toxins*, *12*, 304.

Legrand, A. M., Litaudon, M., Genthon, J. N., BagnisS, R., & Yasumoto, T. (**1989**). Isolation and some properties of ciguatoxin. *Journal of Applied Phycology*, *1*, 183–188.

Legrand, A. M., Pauillac, S., & Chinain, M. (**1992**). Ciguatera in French Polynesia. In C. Debitus, P. Amade, & D. Laurent (Eds.), *Troisième symposium sur les substances naturelles d'intérêt biologique de la région Pacifique-Asie* (pp. 319–325). ORSTOM.

Legrand, A. M., Teai, T., Cruchet, P., & Bracchi, T. (**1997**). Toxins involved in ciguatera fish poisoning in French Polynesia: ciguatoxin profiles of herbivorous and carnivorous fish muscles from highly endemic areas. *Toxicon*, *35*, 1667.

Lehane, L., & Lewis, R. J. (**2000**). Ciguatera: recent advances but the risk remains. *International Journal of Food Microbiology*, *61*(2–3), 91–125.

Leonardo, S., Gaiani, G., Tsumuraya, T., Hirama, M., Turquet, J., Sagristà, N., Rambla-Alegre, M., Flores, C., Caixach, J., & Diogene, J. (**2020**). Addressing the analytical challenges for the detection of ciguatoxins using an electrochemical biosensor. *Analytical Chemistry*.

LePage, K. T., Rainier, J. D., Johnson, H. W., Baden, D. G., & Murray, T. F. (**2007**). Gambierol acts as a functional antagonist of neurotoxin site 5 on voltage-gated sodium channels in cerebellar granule neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *323*(1), 174–179.

Leung, P., Yan, M., Lam, V. T. T., Yiu, S. K. F., Chen, C.-Y., Murray, J. S., Harwood, D. T., Rhodes, L. L., Lam, P. K. S., & Wai, T.-C. (**2018**). Phylogeny, morphology and toxicity of benthic dinoflagellates of the genus *Fukuyoa* (Goniodomataceae, *Dinophyceae*) from a subtropical reef ecosystem in the South China Sea. *Harmful Algae*, *74*, 78–97.

Lewis, N. D. (**1983**). Ciguatera-implications for nutrition and marine resource development in the Pacific islands. *Journal de La Société Des Océanistes*, *39*(77), 89–104.

Lewis, N. D. (**1986**a). Disease and development: ciguatera fish poisoning. *Social Science & Medicine*, *23*(10), 983–993.

Lewis, N. D. (**1986**b). Epidemiology and impact of ciguatera in the Pacific: a review. *Marine Fisheries Review*, *48*(4), 6–13.

Lewis, R. J., Sellin, M., Poli, M. A., Norton, R. S., MacLeod, J. K., & Sheil, M. M. (**1991**). Purification and characterization of ciguatoxins from moray eel (*Lycodontis javanicus*, Muraenidae). *Toxicon*, *29*(9), 1115–1127.

Lewis, R. J., Sellin, M., Street, R., Holmes, M. J., & Gillespie, N. C. (**1992**). Excretion of ciguatoxin from moray eels (Muraenidae) of the central pacific. In T. R. Tosteson (Ed.), *Proceedings of the Third International Conference on Ciguatera Fish Poisoning* (pp. 131–143).

Lewis, R. J., & Holmes, M. J. (**1993**). Origin and transfer of toxins involved in ciguatera. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, *106*(3), 615–628.

Lewis, R. J., & Ruff, T. A. (**1993**). Ciguatera: Ecological, clinical, and socioeconomic perspectives. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *23*(2), 137–156.

Lewis, R. J., & Sellin, M. (**1993**). Recovery of ciguatoxin from fish flesh. *Toxicon*, *31*(10), 1333–1336.

Lewis, R. J., Wong Hoy, A. W., & Sellin, M. (**1993**). Ciguatera and mannitol: *In Vivo* and *In vitro* assessment in mice. *Toxicon*, *31*(8), 1039–1050.

Lewis, R. J., Holmes, M. J., Alewood, P. F., & Jones, A. (**1994**). Lonspray mass spectrometry of ciguatoxin-1, maitotoxin-2 and-3, and related marine polyether toxins. *Natural Toxins*, *2*(2), 56–63.

Lewis, R. J., & Jones, A. (**1997**). Characterization of ciguatoxins and ciguatoxin congeners present in ciguateric fish by gradient reverse-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Toxicon*, *35*(2), 159–168.

Lewis, R. J., Vernoux, J.-P., & Brereton, I. M. (**1998**). Structure of Caribbean ciguatoxin Isolated from *Caranx latus*. *Journal of the American Chemical Society*, *120*(24), 5914–5920.

Lewis, R. J. (**2001**). The changing face of ciguatera. *Toxicon*, *39*(1), 97–106.

Lewis, R. J., Inserra, M., Vetter, I., Holland, W. C., Hardison, D. R., Tester, P. A., & Litaker, R. W. (**2016**). Rapid extraction and identification of maitotoxin and ciguatoxin-like toxins from Caribbean and Pacific *Gambierdiscus* using a new functional bioassay. *PLOS One*, *11*(7), e0160006.

Leynse, A. K., Parsons, M. L., & Thomas, S. E. (**2017**). Differences in the photoacclimation and photoprotection exhibited by two species of the ciguatera causing dinoflagellate genus, *Gambierdiscus*. *Harmful Algae*, *70*, 90–97.

Li, J., Mak, Y. L., Chang, Y.-H., Xiao, C., Chen, Y.-M., Shen, J., Wang, Q., Ruan, Y., & Lam, P. K. S. (**2020**). Uptake and depuration kinetics of pacific ciguatoxins (P-CTXs) in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Environmental Science & Technology*, *54*(7), 4475–4483.

Litaker, R. W., Vandersea, M. W., Kibler, S. R., Reece, K. S., Stokes, N. A., Lutzoni, F. M., Yonish, B. A., West, M. A., Black, M. N. D., & Tester, P. A. (**2007**). Recognizing dinoflagellate species using ITS rDNA sequences 1. *Journal of Phycology*, *43*(2), 344–355.

Litaker, R. W., Vandersea, M. W., Faust, M. A., Kibler, S. R., Chinain, M., Holmes, M. J., Holland, W. C., & Tester, P. A. (**2009**). Taxonomy of *Gambierdiscus* including four new species, *Gambierdiscus caribaeus*, *Gambierdiscus carolinianus*, *Gambierdiscus carpenteri* and *Gambierdiscus ruetzleri* (Gonyaulacales, *Dinophyceae*). *Phycologia*, *48*(5), 344–390.

Litaker, R. W., Vandersea, M. W., Faust, M. A., Kibler, S. R., Nau, A. W., Holland, W. C., Chinain, M., Holmes, M. J., & Tester, P. A. (**2010**). Global distribution of ciguatera causing dinoflagellates in the genus *Gambierdiscus*. *Toxicon*, *56*(5), 711–730.

Litaker, R. W., Holland, W. C., Hardison, D. R., Pisapia, F., Hess, P., & Kibler, S. R. (**2017**). Ciguatoxicity of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* species from the Caribbean and Gulf of Mexico. *PLOS One*, *12*(10), e0185776.

Litaker, R. W., Tester, P. A., & Vandersea, M. W. (**2019**). Species-specific PCR assays for *Gambierdiscus excentricus* and *Gambierdiscus silvae* (Gonyaulacales, *Dinophyceae*). *Journal of Phycology*, *55*(3), 730–732.

Llewellyn, L. E. (**2009**). Revisiting the association between sea surface temperature and the epidemiology of fish poisoning in the South Pacific: Reassessing the link between ciguatera and climate change. *Toxicon*.

Loader, J. I., Hawkes, A. D., Beuzenberg, V., Jensen, D. J., Cooney, J. M., Wilkins, A. L., Fitzgerald, J. M., Briggs, L. R., & Miles, C. O. (**2007**). Convenient large-scale purification of yessotoxin from *Protoceratium reticulatum* culture and isolation of a novel furanoyessotoxin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(26), 11093–11100.

Loeffler, C. R., Richlen, M. L., Brandt, M. E., & Smith, T. B. (**2015**). Effects of grazing, nutrients, and depth on the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus* in the US Virgin Islands. *Marine Ecology Progress Series*, *531*, 91–104.

Loeffler, C. R., Robertson, A., Flores Quintana, H. A., Silander, M. C., Smith, T. B., & Olsen, D. (**2018**). Ciguatoxin prevalence in 4 commercial fish species along an oceanic exposure gradient in the US Virgin Islands. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *37*(7), 1852–1863.

Loeffler, C. R., Bodi, D., Tartaglione, L., Dell'Aversano, C., & Preiss-Weigert, A. (**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*, 101994.

Lombet, A., Bidard, J.-N., & Lazdunski, M. (**1987**). Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na+ channel. *Federation of European Biochemical Societies*, *219*(2), 355–359.

Lonati, D., Gatti, C. M. i., Zancan, A., Darius, H. T., Fleure, M., Chinain, M., & Locatelli, C. A. (**2015**). Novel ciguatera shellfish poisoning (CSP) cluster after consumption of *Tectus niloticus*, a gastropod, in Nuku-Hiva, French Polynesia. *Clinical Toxicology*, *53*(4), 278.

Longo, S., Sibat, M., Viallon, J., Darius, H. T., Hess, P., & Chinain, M. (**2019**). Intraspecific variability in the toxin production and toxin profiles of *in vitro* cultures of *Gambierdiscus polynesiensis* (*Dinophyceae*) from French polynesia. *Toxins*, *11*(12), 735.

Longo, S., Sibat, M., Darius, H. T., Hess, P., & Chinain, M. (**2020**). Effects of pH and nutrients (nitrogen) on growth and toxin profile of the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (*Dinophyceae*). *Toxins*, *12*(12), 767.

Louzao, M. C., Vieytes, M. R., Yasumoto, T., & Botana, L. M. (**2004**). Detection of sodium channel activators by a rapid fluorimetric microplate assay. *Chemical Research in Toxicology*, *17*(4), 572–578.

Louzao, M. C., Cagide, E., Vieytes, M. R., Sasaki, M., Fuwa, H., Yasumoto, T., & Botana, L. M. (**2006**). The sodium channel of human excitable cells is a target for gambierol. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *17*(5–6), 257–268.

Lyu, Y., Richlen, M. L., Sehein, T. R., Chinain, M., Adachi, M., Nishimura, T., Xu, Y., Parsons, M. L., Smith, T. B., Zheng, T., & Anderson, D. M. (**2017**). LSU rDNA based RFLP assays for the routine identification of *Gambierdiscus* species. *Harmful Algae*, *66*, 20–28.

Mak, Y. L., Wai, T.-C., Murphy, M. B., Chan, W. H., Wu, J. J., Lam, J. C. W., Chan, L. L., & Lam, P. K. S. (**2013**). Pacific ciguatoxins in food web components of coral reef systems in the Republic of Kiribati. *Environmental Science & Technology*, *47*(24), 14070–14079.

Malone, T. C., & Newton, A. (**2020**). The globalization of cultural eutrophication in the coastal ocean: causes and consequences. *Frontiers in Marine Science*, *7*, 670.

Manger, R. L., Leja, L. S., Lee, S. Y., Hungerford, J. M., & Wekell, M. M. (**1993**). Tetrazolium-Based Cell Bioassay for neurotoxins active on Voltage-Sensitive Sodium Channels: Semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins, and ciguatoxins. *Analytical Biochemistry*, *214*(1), 190–194.

Manger, R. L., Leja, L. S., Lee, S. Y., Hungerford, J. M., Hokama, Y., Dickey, R. W., Granade, H. R., Lewis, R., Yasumoto, T., & Wekell, M. M. (**1995**). Detection of sodium channel toxins: directed cytotoxicity assays of purified ciguatoxins, brevetoxins, saxitoxins, and seafood extracts. *Journal of AOAC International*, *78*(2), 521–527.

Manríquez, V., Caperan, D. C., Guzmán, R., Naser, M., Iglesia, V., & Lagos, N. (**2015**). First evidence of neosaxitoxin as a long-acting pain blocker in bladder pain syndrome. *International Urogynecology Journal*, *26*(6), 853–858.

Martin-Yken, H., Gironde, C., Derick, S., Darius, H. T., Furger, C., Laurent, D., & Chinain, M. (**2018**). Ciguatoxins activate the Calcineurin signalling pathway in Yeasts: Potential for development of an alternative detection tool? *Environmental Research*, *162*, 144–151.

Martín, V., Vale, C., Hirama, M., Yamashita, S., Rubiolo, J. A., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (**2015**). Synthetic ciguatoxin CTX3C induces a rapid imbalance in neuronal excitability. *Chemical Research in Toxicology*, *28*(6), 1095–1108.

Martínez-Morales, E., Kopljar, I., Rainier, J. D., Tytgat, J., Snyders, D. J., & Labro, A. J. (**2016**). Gambierol and n-alkanols inhibit Shaker Kv channel via distinct binding sites outside the K+ pore. *Toxicon*, *120*, 57–60.

Matsui, M., Kumar-roine, S., Darius, H. T., Chinain, M., Laurent, D., & Pauillac, S. (**2010**). Pacific ciguatoxin 1B-induced modulation of inflammatory mediators in a murine macrophage cell line. *Toxicon*, *56*(5), 776–784.

Mattei, C., Molgó, J., Marquais, M., Vernoux, J. P., & Benoit, E. (**1999**). Hyperosmolar D-mannitol reverses the increased membrane excitability and the nodal swelling caused by Caribbean ciguatoxin-1 in single frog myelinated axons. *Brain Research*, *847*(1), 50–58.

Mattei, C., Molgo, J., & Benoit, E. (**2011**). An overview of the ion channel modulation and neurocellular disorders induced by ciguatoxins. *Toxins and Ion Transfers*.

Mattei, C., Vetter, I., Eisenblatter, A., Krock, B., Ebbecke, M., Desel, H., & Zimmermann, K. (**2014**). Ciguatera fish poisoning: a first epidemic in Germany highlights an increasing risk for European Countries. *Toxicon*, *91*, 76–83.

Mazzola, E., Deeds, J. R., Stutts, W. L., Ridge, C. D., Dickey, R. W., White, K. D., Williamson, R. T., & Martin, *G.* E. (**2019**). Elucidation and partial NMR assignment of monosulfated maitotoxins from the Caribbean. *Toxicon*, *164*, 44–50.

McCall, J. R., Jacocks, H. M., Baden, D. G., & Bourdelais, A. J. (**2012**). Development of a competitive fluorescence-based synaptosome binding assay for brevetoxins. *Harmful Algae*, *19*, 85–91.

McCall, J. R., Elliott, E. A., & Bourdelais, A. J. (**2014**). A new cytotoxicity assay for brevetoxins using fluorescence microscopy. *Marine Drugs*, *12*, 4868–4882.

Medina, M., Avila, J., & Villanueva, N. (**2013**). Use of okadaic acid to identify relevant phosphoepitopes in pathology: a focus on neurodegeneration. *Marine Drugs*, *11*(5), 1656–1668.

Mejean, A., Mann, S., Vassiliadis, G., Lombard, B., Loew, D., & Ploux, O. (**2010**). *In vitro* reconstitution of the first steps of anatoxin-a biosynthesis in *Oscillatoria* PCC 6506: from free L-proline to acyl carrier protein bound dehydroproline. *Biochemistry*, *49*(1), 103–113.

Merritt, J. E., Armstrong, W. P., Benham, C. D., Hallam, T. J., Jacob, R., Jaxa-Chamiec, A., Leigh, B. K., McCarthy, S. A., Moores, K. E., & Rink, T. J. (**1990**). SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochemical Journal*, *271*(2), 515–522.

Meunier, F., Mattei, C., & Molgó, J. (**2009**). Marine toxins potently affecting neurotransmitter release. *Marine Toxins as Research Tools*, 159–186.

Micouin, L., Chinain, M., Asin, P., & Legrand, A.-M. (**1992**). Toxicity of French Polynesian strains of *Gambierdiscus toxicus* in cultures. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, *85*, 474–477.

Mines, D., Stahmer, S., & Shepherd, S. M. (**1997**). Poisonings: food, fish, shellfish. *Emergency Medicine Clinics of North America*, *15*(1), 157–177.

Mitchell, *G.* (**2005**). Treatment of a mild chronic case of ciguatera fish poisoning with intravenous mannitol, a case study. *Pacific Health Dialog*, *12*(1), 155–157.

Molgó, J., Schlumberger, S., Sasaki, M., Fuwa, H., Louzao, M. C., Botana, L. M., Servent, D., & Benoit, E. (**2020**). Gambierol potently increases evoked quantal transmitter release and reverses pre- and post-synaptic blockade at vertebrate neuromuscular junctions. *Neuroscience*, *439*, 106–116.

Monroe, E. A., & Van Dolah, F. M. (**2008**). The toxic dinoflagellate *Karenia brevis* encodes novel type I-like polyketide synthases containing discrete catalytic domains. *Protist*, *159*(3), 471–482.

Montojo, U., Tanyag, B. E., Perelonia, K. B. S., Cambia, F. D., & Oshiro, N. (**2020**). Ciguatera in the Philippines: examining reef fish vectors and its causative benthic dinoflagellates in Visayan and Sibuyan Seas. *The Philippine Journal of Fisheries*, *27*(1), 19–29.

Moore, S. K., Trainer, V. L., Mantua, N. J., Parker, M. S., Laws, E. A., Backer, L. C., & Fleming, L. E. (**2008**). Impacts of climate variability and future climate change on harmful algal blooms and human health. *Environmental Health*, *7*(2), S4.

Morin, E., Gatti, C. M. i., Bambridge, T., & Chinain, M. (**2016**). Ciguatera fish poisoning: Incidence, health costs and risk perception on Moorea Island (Society archipelago, French Polynesia). *Harmful Algae*, *60*, 1–10.

Morohashi, A., Satake, M., & Yasumoto, T. (**1999**). The absolute configuration of gambierol, a toxic marine polyether from the dinoflagellate, *Gambierdiscus toxicus*. *Tetrahedron Letters*, *40*(1), 97–100.

Morris, J., Lewis, P., Hargrett, N. T., Smith, W., Blake, P. A., & Schneider, R. (**1982**). Clinical features of ciguatera fish poisoning: a study of the disease in the US Virgin Islands. *Archives of Internal Medicine*, *141*(6), 1090–1092.

Morton, S. L., Norris, D. R., & Bomber, J. W. (**1992**). Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with ciguatera. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *157*(1), 79–90.

Morton, S. L., & Faust, M. A. (**1997**). Survey of toxic epiphytic dinoflagellates from the Belizean barrier reef ecosystem. *Bulletin of Marine Science*, *61*(3), 899–906.

Mullins, M. E., & Hoffman, R. S. (**2017**). Is mannitol the treatment of choice for patients with ciguatera fish poisoning ? *Clinical Toxicology*, *55*(9), 947–955.

Munday, R., Murray, S., Rhodes, L., Larsson, M., & Harwood, D. (**2017**). Ciguatoxins and maitotoxins in extracts of sixteen *Gambierdiscus* isolates and one *Fukuyoa* isolate from the South Pacific and their toxicity to mice by intraperitoneal and oral administration. *Marine Drugs*, *15*(7), 208.

Murata, M., Kumagai, M., Lee, J. S., & Yasumoto, T. (**1987**). Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Letters*, *28*(47), 5869–5872.

Murata, M., Legrand, A. M., Ishibashi, Y., & Yasumoto, T. (**1989**). Structures of ciguatoxin and its congener. *Journal of the American Chemical Society*, *111*(24), 8929–8931.

Murata, M., Legrand, A.-M., Ishibashi, Y., Fukui, M., & Yasumoto, T. (**1990**). Structures and configurations of ciguatoxin from the moray eel *Gymnothorax javanicus* and its likely precursor from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Journal of the American Chemical Society*, *112*(11), 4380–4386.

Murata, M., Naoki, H., Iwashita, T., Matsunaga, S., Sasaki, M., Yokoyama, A., & Yasumoto, T. (**1993**). Structure of maitotoxin. *Journal of the American Chemical Society*, *115*(5), 2060–2062.

Murata, M., Matsumori, N., Konoki, K., & Oishi, T. (**2008**). Structural features of dinoflagellate toxins underlying biological activity as viewed by NMR. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, *81*(3), 307–319.

Murata, K., & Yasumoto, T. (**2019**). Chemiluminescent Receptor Binding Assay for Ciguatoxins and Brevetoxins Using *Acridinium* Brevetoxin-B2. *Toxins*, *11*(10).

Murray, S., Momigliano, P., & Heimann Blair, D., K. (**2014**). Molecular phylogenetics and morphology of *Gambierdiscus yasumotoi* from tropical Eastern Australia. *Harmful Algae*, *39*, 242–252.

Murray, J. S., Boundy, M. J., Selwood, A. I., & Harwood, D. T. (**2018**). Development of an LC–MS/MS method to simultaneously monitor maitotoxins and selected ciguatoxins in algal cultures and P-CTX-1B in fish. *Harmful Algae*, *80*, 80–87.

Murray, J. S., Selwood, A. I., Harwood, D. T., van Ginkel, R., Puddick, J., Rhodes, L. L., Rise, F., & Wilkins, A. L. (**2019**). 44-Methylgambierone, a new gambierone analogue isolated from *Gambierdiscus australes*. *Tetrahedron Letters*, *60*(8), 621–625.

Murray, J. S., Nishimura, T., Finch, S. C., Rhodes, L. L., Puddick, J., Harwood, D. T., Larsson, M. E., Doblin, M. A., Leung, P., Yan, M., Rise, F., Wilkins, A. L., & Prinsep, M. R. (**2020**). The role of 44-methylgambierone in ciguatera fish poisoning: acute toxicity, production by marine microalgae and its potential as a biomarker for *Gambierdiscus* spp. *Harmful Algae*, *97*, 101853.

Mustapa, N. I., Yong, H. L., Lee, L. K., Lim, Z. F., Lim, H. C., Teng, S. T., Luo, Z., Gu, H., Leaw, C. P., & Lim, P. T. (**2019**). Growth and epiphytic behavior of three *Gambierdiscus* species (*Dinophyceae*) associated with various macroalgal substrates. *Harmful Algae*, *89*, 101671.

Naar, J., Bourdelais, A., Tomas, C., Kubanek, J., Whitney, P. L., Flewelling, L., Steidinger, K., Lancaster, J., & Baden, D. *G.* (**2002**). A competitive ELISA to detect brevetoxins from *Karenia brevis* (formerly *Gymnodinium breve*) in seawater, shellfish, and mammalian body fluid. *Environmental Health Perspectives*, *110*(2), 179–185.

Nagai, H., Murata, M., Torigoe, K., Satake, M., & Yasumoto, T. (**1992**). Gambieric acids, new potent antifungal substances with unprecedented polyether structures from a marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *The Journal of Organic Chemistry*, *57*(20), 5448–5453.

Nagai, H., Mikami, Y., Yazawa, K., Gonoi, T., & Yasumoto, T. (**1993**). Biological activities of novel polyether antifungals, gambieric acids A and B from a marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *The Journal of Antibiotics*, *46*(3), 520–522.

Nagumo, Y., Oguri, H., Tsumoto, K., Shindo, Y., Hirama, M., Tsumuraya, T., Fujii, I., Tomioka, Y., Mizugaki, M., & Kumagai, I. (**2004**). Phage-display selection of antibodies to the left end of CTX3C using synthetic fragments. *Journal of Immunological Methods*, *289*, 137–146.

Nakada, M., Hatayama, Y., Ishikawa, A., Ajisaka, T., & Sawayama, S. (**2018**). Seasonal distribution of *Gambierdiscus* spp . in Wakasa Bay , the Sea of Japan , and antagonistic relationships with epiphytic pennate diatoms. *Harmful Algae*, *76*, 58–65.

Nascimento, S. M., Corre, E. V, Menezes, M., Varela, D., Paredes, J., & Morris, S. (**2012**). Growth and toxin profile of *Ostreopsis cf. ovata* (Dinophyta) from Rio de Janeiro, Brazil. *Harmful Algae*, *13*, 1–9.

Nau, A. (**2007**). *Global economic cost of harmful algal blooms*. Duke University.

Neves, R. A. F., Pardal, M. A., Nascimento, S. M., Silva, A., Oliveira, P. J., & Rodrigues, E. T. (**2020**). High sensitivity of rat cardiomyoblast H9c2(2-1) cells to *Gambierdiscus* toxic compounds. *Aquatic Toxicology*, *223*, 105475.

Nicholson, *G.* M., & Lewis, R. J. (**2006**). Ciguatoxins: Cyclic polyether modulators of voltage-gated ion channel function. *Marine Drugs*, *4*(3), 82–118.

Nicolas, J., Hendriksen, P. J. M., Gerssen, A., Bovee, T. F. H., & Rietjens, I. M. C. M. (**2014**). Marine neurotoxins: State of the art, bottlenecks, and perspectives for mode of action based methods of detection in seafood. *Molecular Nutrition & Food Research*, *58(1)*, 87–100.

Nicolas, J., Hoogenboom, R. L. A. P., Hendriksen, P. J. M., Bodero, M., Bovee, T. F. H., Rietjens, I. M. C. M., & Gerssen, A. (**2017**). Marine biotoxins and associated outbreaks following seafood consumption: Prevention and surveillance in the 21st century. *Global Food Security*, *15*, 11–21.

Nishimura, T., Sato, S., Tawong, W., Sakanari, H., Yamaguchi, H., & Adachi, M. (**2014**). Morphology of *Gambierdiscus scabrosus* sp. nov.(Gonyaulacales): a new epiphytic toxic dinoflagellate from coastal areas of Japan. *Journal of Phycology*, *50*(3), 506–514.

Nishimura, T., Hariganeya, N., Tawong, W., Sakanari, H., Yamaguchi, H., & Adachi, M. (**2016**). Quantitative PCR assay for detection and enumeration of ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. (Gonyaulacales) in coastal areas of Japan. *Harmful Algae*, *52*, 11–22.

Nuñez, D., Matute, P., Garcia, A., Garcia, P., & Abadía, N. (**2012**). Outbreak of ciguatera food poisoning by consumption of amberjack (*Seriola* spp.) in the Canary Islands , May 2012. *Eurosurveillance*, *17*(23), 20188.

O'Toole, A., Dechraoui-Bottein, M.-Y., Danylchuk, A. J., Ramsdell, J. S., & Cooke, S. J. (**2012**). Linking ciguatera poisoning to spatial ecology of fish: A novel approach to examining the distribution of biotoxin levels in the great barracuda by combining non-lethal blood sampling and biotelemetry. *Science of the Total Environment*, *427*, 98–105.

Okolodkov, Y., Merino-Virgilio, F., Aké-Castillo, J., Aguilar-Trujillo, A., Espinosa-Matías, S., & Herrera-Silveira, J. (**2014**). Seasonal changes in epiphytic dinoflagellate assemblages near the northern coast of the Yucatan peninsula, Gulf of Mexico. *Acta Botanica Mexicana*, *107*, 121–151.

Oliveira, C. Y. B., Oliveira, C. D. L., Müller, M. N., Santos, E. P., Dantas, D. M., & Gálvez, A. O. (**2020**). A Scientometric Overview of Global Dinoflagellate Research. *Publications*, *8*(4), 50.

Oshiro, N., Yogi, K., Asato, S., Sasaki, T., Tamanaha, K., Hirama, M., Yasumoto, T., & Inafuku, Y. (**2010**). Ciguatera incidence and fish toxicity in Okinawa, Japan. *Toxicon*, *56*(5), 656–661.

Oshiro, N., Tomikawa, T., Kuniyoshi, K., Ishikawa, A., Toyofuku, H., Kojima, T., & Asakura, H. (**2021**). LC–MS/MS analysis of ciguatoxins revealing the regional and species distinction of fish in the tropical Western Pacific. *Journal of Marine Science and Engineering, 9*(3), 299.

Osswald, J., Rellán, S., Gago, A., & Vasconcelos, V. (**2007**). Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria , anatoxin-a. *Environment International*, *33*(8), 1070–1089.

Otero, P., Pérez, S., Alfonso, A., Vale, C., Rodriguez, P., Gouveia, N. N., Gouveia, N., Delgado, J., Vale, P., Hirama, M., Ishihara, Y., Molgo, J., & Botana, L. M. (**2010**). First toxin profile of ciguateric fish in Madeira Arquipelago (Europe). *Analytical Chemistry*, *82*(14), 6032–6039.

Palafox, N., Jain, L. G., Pinano, A. Z., Gulick, T. M., Williams, R. K., & Schatz, I. J. (**1988**). Successful treatment of ciguatera fish poisoning with intravenous mannitol. *Jama*, *259*(18), 2740–2742.

Palafox, N., & Buenconsejo-Lum, L. E. (**2001**). Ciguatera fish poisoning: review of clinical manifestations. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, *20*(2), 141–160.

Park, D. L. (**1994**). Evolution of methods for assessing ciguatera toxins in fish. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1–20.

Park, D. L., Guzman-Perez, S. E., & Lopez-Garcia, R. (**1999**). Aquatic biotoxins: design and implementation of seafood safety monitoring programs. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 157–200.

Park, D. L. (**2012**). Assessing Ciguatera Toxins in Fish. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, *136*, 1.

Parsons, M. L., & Preskitt, L. B. (**2007**). A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawaii. *Harmful Algae*, *6*(5), 658–669.

Parsons, M. L., Aligizaki, K., Bottein, M.-Y. D., Fraga, S., Morton, S. L., Penna, A., & Rhodes, L. (**2012**). *Gambierdiscus* and *Ostreopsis*: reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology, and toxicology. *Harmful Algae*, *14*, 107–129.

Parsons, M. L., Sobol, R., Anderson, D. M., Richlen, M., Erdner, D., Robertson, A., Pierce, J., James, J., Daniel, C., & Smith, T. B. (**2020**). The Greater Caribbean Center for Ciguatera Research: Climate Change and Human Health. *Ocean Sciences Meeting 2020*.

Pasinszki, T., Lako, J., & Dennis, T. E. (**2020**). Advances in detecting ciguatoxins in fish. *Toxins*, *12*(8), 494.

Pauillac, S., Sasaki, M., Naar, J., Inoue, M., Branaa, P., Cruchet, P., Chinain, M., & Legrand, A. M. (**1997**). Immunochemical methods for ciguatoxins detection in Pacific herbivorous and carnivorous fish. *Paris: Société Française d'Ichtyologie*, 759–773.

Pauillac, S., Sasaki, M., Inoue, M., Naar, J., Branaa, P., Chinain, M., Tachibana, K., & Legrand, A.-M. (**2000**). Characterization of mice antisera elicited with a ciguatoxin tetracyclic synthetic ring fragment (JKLM) conjugated to carrier proteins. *Toxicon*, *38*(5), 669–685.

Pawlowiez, R., Darius, H. T., Cruchet, P., Rossi, F., Caillaud, A., Laurent, D., & Chinain, M. (**2013**). Evaluation of seafood toxicity in the Australes archipelago (French Polynesia) using the neuroblastoma cell-based assay. *Food Additives & Contaminants: Part A*, *30*(3), 567–586.

Pawlowiez, R., Morey, J. S., Darius, H. T., Chinain, M., & Van Dolah, F. M. (**2014**). Transcriptome sequencing reveals single domain Type I-like polyketide synthases in the toxic dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis*. *Harmful Algae*, *36*, 29–37.

Paz, B., Riobó, P., & Franco, J. M. (**2011**). Preliminary study for rapid determination of phycotoxins in microalgae whole cells using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Mass Spectrometry*, *25*(23), 3627–3639.

Pearn, J., Harvey, P., De Ambrosis, W., Lewis, R., & McKay, R. (**1982**). Ciguatera and pregnancy. *The Medical Journal of Australia*, *1*(2), 57–58.

Pearn, J. (**1994**). Ciguatera: dilemmas in clinical recognition, presentation and management. *Memoirs of the Queensland Museum*, *34*(3), 605–608.

Pearn, J. (**2001**). Neurology of ciguatera. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *70*(1), 4–8.

Pérez-Arellano, J. L., Luzardo, O. P., Perez Brito, A., Hernandez Cabrera, M., Zumbado, M., Carranza, C., Angel-Moreno, A., Dickey, R. W., & Boada, L. D. (**2005**). Ciguatera fish poisoning, Canary Islands. *Emerging Infectious Diseases Journal*, *11*(12), 1981–1982.

Perrault, J. R., Schmid, J. R., Walsh, C. J., Yordy, J. E., & Tucker, A. D. (**2014**). Brevetoxin exposure, superoxide dismutase activity and plasma protein electrophoretic profiles in wild-caught Kemp's ridley sea turtles (*Lepidochelys kempii*) in southwest Florida. *Harmful Algae*, *37*, 194–202.

Pisapia, F. (**2017**). *Criblage bioguidé et analyse CL-SMHR des toxines et d'autres métabolites d'intérêt chez les dinoflagellés Gambierdiscus et Fukuyoa*. Université de Nantes.

Pisapia, F., Holland, W. C., Hardison, D. R., Litaker, R. W., Fraga, S., Nishimura, T., Adachi, M., Nguyen-Ngoc, L., Séchet, V., Amzil, Z., Herrenknecht, C., & Hess, P. (**2017a**). Toxicity screening of 13 *Gambierdiscus* strains using neuro-2a and erythrocyte lysis bioassays. *Harmful Algae*, *63*, 173–183.

Pisapia, F., Sibat, M., Herrenknecht, C., Lhaute, K., Gaiani, G., Ferron, P.-J., Fessard, V., Fraga, S., Nascimento, S. M., Litaker, R. W., Holland, W. C., Roullier, C., & Hess, P. (**2017b**). Maitotoxin-4, a novel MTX analog produced by *Gambierdiscus excentricus*. *Marine Drugs*, *15*(7), 220.

Pisapia, F., Sibat, M., Watanabe, R., Roullier, C., Suzuki, T., Hess, P., & Herrenknecht, C. (**2020**). Characterization of maitotoxin-4 (MTX4) using electrospray positive mode ionization high-resolution mass spectrometry and UV spectroscopy. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *34*(19), e8859.

Pitz, K. J., Richlen, M. L., Fachon, E., Smith, T. B., Parsons, M. L., & Anderson, D. M. (**2021**). Development of fluorescence in situ hybridization (FISH) probes to detect and enumerate *Gambierdiscus* species. *Harmful Algae*, *101*, 101914.

Poey, F. (**1866**). *Ciguatera: memoria sobre la enfermedad ocasionada por los peces venenosos*. Imprenta de la viuda de Barcina y Comp.

Poli, M. A. (**1985**). *Characterization of the binding of the Ptychodiscus brevis neurotoxin T17 to sodium channels in rat brain synaptosomes*. Miami University.

Poli, M. A., Mende, T. J., & Baden, D. *G.* (**1986**). Brevetoxins, unique activators of voltage-sensitive sodium channels, bind to specific sites in rat brain synaptosomes. *Molecular Pharmacology*, *30*(2), 129–135.

Pompon, A., & Bagnis, R. (**1984**). Ciguatera: Un procédé rapide d'extraction de la ciguatoxine. *Toxicon*, *22*(3), 479–482.

Pottier, I., Vernoux, J.-P., & Lewis, R. J. (**2001**). Cigutera fish poisoning in the Carribean Islands and Western Atlantic. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, *168*, 99–141.

Pottier, I., Vernoux, J.-P., Jones, A., & Lewis, R. J. (**2002**a). Characterisation of multiple Caribbean ciguatoxins and congeners in individual specimens of horse-eye jack (*Caranx latus*) by high-performance liquid chromatography / mass spectrometry. *Toxicon*, *40*(7), 929–939.

Pottier, I., Vernoux, J.-P., Jones, A., & Lewis, R. J. (**2002**b). Analysis of toxin profiles in three different fish species causing ciguatera fish poisoning in Guadeloupe, French West Indies. *Food Additives & Contaminants A*, *19*(11), 1034–1042.

Pottier, I., & Vernoux, J.-P. (**2003**). Evaluation de la ciguatoxicité de poissons des Antilles par les bioessais souris et poussin. *Bulletin de La Société de Pathologie Exotique*, *96*(1), 24–28.

Quod, J. P., Prunaux, O., & Guignard, A. (**1990**). Les empoisonnements par poissons tropicaux à la Réunion: synthèse et perspectives. *Revue de Médecine Vétérinaire*, *141*, 1005–1009.

Quod, J. P., & Turquet, J. (**1996**). Ciguatera in Reunion Island (SW Indian Ocean): epidemiology and clinical patterns. *Toxicon*, *34*(7), 779–785.

Rabenjarison, F., Ramarolahy, A. R. N., Velomora, A., Rahajaniaina, M. P., & Raveloson, N. E. (**2016**). Ciguatera poisoning after consumption of shark in Fenerive-Est: epidemiological and clinical aspects and laboratory results. *Revue d'Anesthésie-Réanimation, Médecine d'Urgence et Toxicologie*, *8*(1), 9–12.

Raimbault, P., Garcia, N., & Cerutti, F. (**2008**). Distribution of inorganic and organic nutrients in the South Pacific Ocean − evidence for long-term accumulation of organic matter in nitrogen-depleted waters. *Biogeosciences*, *5*(2), 281–298.

Rains, L. K., & Parsons, M. L. (**2015**). *Gambierdiscus* species exhibit different epiphytic behaviors toward a variety of macroalgal hosts. *Harmful Algae*, *49*, 29–39.

Ramstad, H., Hovgaard, P., Yasumoto, T., Larsen, S., & Aune, T. (**2001**). Monthly variations in diarrhetic toxins and yessotoxin in shellfish from coast to the inner part of the Sognefjord, Norway. *Toxicon*, *39*(7), 1035–1043.

Randall, J. E. (**1958**). A review of ciguatera, tropical fish poisoning, with a tentative explanation of its cause. *Bulletin of Marine Science*, *8*(3), 236–267.

Reguera, B., Boisson, F., Darius, H. T., & M.-Y., D. B. (**2011**). Toxic microalgal blooms : what can nuclear techniques provide for their management ? *Isotopes in Hydrology, Marine Ecosystems and Clilmate Change Studies*, *1*.

Rein, K. S., & Borrone, J. (**1999**). Polyketides from dinoflagellates: origins, pharmacology and biosynthesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, *124*(2), 117–131.

Rein, K. S., & Snyder, R. V. (**2006**). The biosynthesis of polyketide metabolites by dinoflagellates. *Advances in Applied Microbiology*, *59*, 93–125.

Reverté, L., Toldrà, A., Andree, K. B., Fraga, S., Falco, *G.* De, Campàs, M., & Diogène, J. (**2018**). Assessment of cytotoxicity in ten strains of *Gambierdiscus australes* from Macaronesian Islands by neuro-2a cell-based assays. *Journal of Applied Phycology*, *30*(4), 2447–2461.

Reyes, J., Sánchez-Cárdenas, C., Acevedo-Castillo, W., Leyton, P., López-González, I., Felix, R., Gandini, M. A., Treviño, M. B., & Treviño, C. L. (**2014**). Maitotoxin: An enigmatic toxic molecule with useful applications in the biomedical sciences. In L. M. Botana (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection* (CRC Press, pp. 677–694). Taylor & Francis.

Rhodes, L. L., Gimenez Papiol, G., Smith, K. F., & Harwood, T. (**2014a**). *Gambierdiscus cf. yasumotoi* (*Dinophyceae*) isolated from New Zealand's sub-tropical northern coastal waters. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, *48*(2), 303–310.

Rhodes, L. L., Harwood, T., Smith, K. F., Argyle, P., & Munday, R. (**2014b**). Production of ciguatoxin and maitotoxin by strains of *Gambierdiscus australes*, *G. pacificus* and *G. polynesiensis* (*Dinophyceae*) isolated from Rarotonga, Cook Islands. *Harmful Algae*, *39*, 185–190.

Rhodes, L. L., Smith, K. F., Murray, S. A., Harwood, D. T., Trnski, T., & Munday, R. (**2017a**). The epiphytic genus *Gambierdiscus* (*Dinophyceae*) in the Kermadec Islands and Zealandia regions of the southwestern Pacific and the associated risk of ciguatera fish poisoning. *Marine Drugs*, *15*(7), 219.

Rhodes, L. L., Smith, K. F., Verma, A., Curley, B. G., Harwood, D. T., Murray, S., Kohli, *G.* S., Solomona, D., Rongo, T., Munday, R., & Murray, S. A. (**2017b**). A new species of *Gambierdiscus* (*Dinophyceae*) from the South-West Pacific: *Gambierdiscus honu* sp. nov. *Harmful Algae*, *65*, 61–70.

Rhodes, L. L., Smith, K. F., Verma, A., Murray, S., Harwood, D. T., & Trnski, T. (**2017c**). The dinoflagellate genera *Gambierdiscus* and *Ostreopsis* from subtropical Raoul Island and North Meyer Island, Kermadec Islands. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 51*(4), 490–504.

Richardson, B. W. (**1862**). Half-yearly report on toxicology, forensic medicine, and public hygiene. *The British and Foreign Medico-Chirurgical Review*, *30*(60), 530.

Richlen, M. L., & Lobel, P. S. (**2011**). Effects of depth, habitat, and water motion on the abundance and distribution of ciguatera dinoflagellates at Johnston Atoll, Pacific Ocean. *Marine Ecology - Progress Series*, *421*, 51–66.

Richter, I., & Fidler, A. E. (**2015**). Detection of marine microalgal biotoxins using bioassays based on functional expression of tunicate xenobiotic receptors in yeast. *Toxicon*, *95*, 13–22.

Robertson, A., Garcia, A. C., Flores Quintana, H. A., Smith, T. B., Castillo II, B. F., Reale-Munroe, K., Gulli, J. A., Olsen, D. A., Hooe-Rollman, J. I., Jester, E. L. E., Klimek, B. J., & Plakas, S. M. (**2014**). Invasive lionfish (*Pterois volitans*): a potential human health threat for ciguatera fish poisoning in tropical waters. *Marine Drugs*, *12*(1), 88–97.

Robertson, A., Richlen, M. L., Erdner, D., Smith, T. B., Anderson, D. M., Liefer, J., Xu, Y., McCarron, P., Miles, C., & Parsons, M. L. (**2018**). Toxicity, chemistry, and implications of *Gambierdiscus silvae*: a ciguatoxin superbug in the Greater Caribbean Region. *18th International Conference on Harmful Algae*, 115.

Rodier, M., Longo, S., Henry, K., Ung, A., Lo-Yat, A., Darius, H. T., Viallon, J., Beker, B., Delesalle, B., & Chinain, M. (**2019**). Diversity and toxic potential of algal bloom-forming species from Takaroa lagoon (Tuamotu, French Polynesia): a field and mesocosm study. *Aquatic Microbial Ecology*, *83*(1), 15–34.

Rodriguez-Navarro, A., Lagos, N., Lagos, M., Braghetto, I., Csendes, A., Hamilton, J., Figueroa, C., Truan, D., Garcia, C., & Rojas, A. (**2007**). Neosaxitoxin as a local anesthetic: preliminary observations from a first human trial. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, *106*(2), 339–345.

Rodríguez, F., Fraga, S., Ramilo, I., Rial, P., Figueroa, R. I., Riobó, P., & Bravo, I. (**2017**). Canary Islands (NE Atlantic) as a biodiversity 'hotspot' of *Gambierdiscus*: implications for future trends of ciguatera in the area. *Harmful Algae*, *67*, 131–143.

Rodríguez, I., Genta-Jouve, G., Alfonso, C., Calabro, K., Alonso, E., Sánchez, J. A., Alfonso, A., Thomas, O. P., & Botana, L. M. (**2015**). Gambierone, a ladder-shaped polyether from the dinoflagellate *Gambierdiscus belizeanus*. *Organic Letters*, *17*(10), 2392–2395.

Rodriguez, I., Vieytes, M. R., & Alfonso, A. (**2017**). Analytical challenges for regulated marine toxins. Detection methods. *Current Opinion in Food Science*, *18*, 29–36.

Roeder, K., Erler, K., Kibler, S., Tester, P., Van The, H., Nguyen-Ngoc, L., Gerdts, G., & Luckas, B. (**2010**). Characteristic profiles of ciguatera toxins in different strains of *Gambierdiscus* spp. *Toxicon*, *56*(5), 731–738.

Rongo, T., & Van Woesik, R. (**2011**). Ciguatera poisoning in Rarotonga , southern Cook Islands. *Harmful Algae*, *10*(4), 345–355.

Rongo, T., & van Woesik, R. (**2012**). Socioeconomic consequences of ciguatera poisoning in Rarotonga, southern Cook Islands. *Harmful Algae*, *20*, 92–100.

Rongo, T., & van Woesik, R. (**2013**). The effects of natural disturbances, reef state, and herbivorous fish densities on ciguatera poisoning in Rarotonga, southern Cook Islands. *Toxicon*, *64*, 87–95.

Rossi, F., Jullian, V., Pawlowiez, R., Kumar-Roiné, S., Haddad, M., Darius, H. T., Gaertner-Mazouni, N., Chinain, M., & Laurent, D. (**2012**). Protective effect of *Heliotropium foertherianum* (Boraginaceae) folk remedy and its active compound, rosmarinic acid, against a Pacific ciguatoxin. *Journal of Ethnopharmacology*, *143*(1), 33–40.

Rossignoli, E., Tudó, A., Bravo, I., Díaz, A. P., Diogène, J., & Riobó, P. (**2020**). Toxicity characterisation of *Gambierdiscus* species from the Canary Islands. *Toxins*, *12*(2), 134.

Roué, M., Darius, H. T., Picot, S., Ung, A., Viallon, J., Gaertner-Mazouni, N., Sibat, M., Amzil, Z., & Chinain, M. (**2016**). Evidence of the bioaccumulation of ciguatoxins in giant clams (*Tridacna maxima*) exposed to *Gambierdiscus* spp. cells. *Harmful Algae*, *57*, 78–87.

Roué, M., Darius, H. T., & Chinain, M. (**2018a**). Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) Technology for the Monitoring of Aquatic Toxins: A Review. *Toxins*, *10*(4), 167.

Roué, M., Darius, H. T., Ung, A., Viallon, J., Sibat, M., Hess, P., Amzil, Z., & Chinain, M. (**2018b**). Tissue distribution and elimination of ciguatoxins in *Tridacna maxima* (Tridacnidae, bivalvia) fed *Gambierdiscus polynesiensis*. *Toxins*, *10*(5), 1–13.

Roué, M., Darius, H. T., Viallon, J., Ung, A., Gatti, C. M. i., Harwood, D. T., & Chinain, M. (**2018c**). Application of solid phase adsorption toxin tracking (SPATT) devices for the field detection of *Gambierdiscus* toxins. *Harmful Algae*, *71*, 40–49.

Roué, M., Smith, F. K., Sibat, M., Viallon, J., Henry, K., Ung, A., Biessy, L., Hess, P., Darius, H. T., & Chinain, M. (**2020**). Assessment of ciguatera and other phycotoxin-related risks in Anaho Bay (Nuku Hiva Island, French Polynesia): molecular, toxicological, and chemical analyses of passive samplers. *Toxins*, *12*(5), 321.

Rubiolo, J., Vale, C., Boente-Juncal, A., Hirama, M., Yamashita, S., Camiña, M., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (**2018**). Transcriptomic analysis of ciguatoxin-induced changes in gene expression in primary cultures of mice cortical neurons. *Toxins*, *10*(5), 192.

Saint-Martin, K., Durand-Clement, M., & Bourdeau, P. (**1988**). Contribution à l'étude des rapports entre les macroalgues et *Gambierdiscus toxicus* (*Dinophyceae*), agent causal de la ciguatéra. *Cryptogamie. Algologie*, *9*(3), 195–202.

Sakamoto, B., Nagai, H., & Hokama, Y. (**1996**). Stimulators of *Gambierdiscus toxicus* (*Dinophyceae*) growth: The possible role of gambieric acid-A as an endogenous growth enhancer. *Phycologia*, *35*(4), 350–353.

Saldarriaga, J. F., Taylor, F. J. R., Keeling, P. J., & Cavalier-Smith, T. (**2001**). Dinoflagellate nuclear SSU rRNA phylogeny suggests multiple plastid losses and replacements. *Journal of Molecular Evolution*, *53*(3), 204–213.

Sanchez-Henao, J. A., García-Álvarez, N., Sergent, F. S., Estévez, P., Gago-Martínez, A., Martín, F., Ramos-Sosa, M., Fernández, A., Diogène, J., & Real, F. (**2020**). Presence of CTXs in moray eels and dusky groupers in the marine environment of the Canary Islands. *Aquatic Toxicology*, *221*(9), 105427.

Sanchez-Henao, J. A., García-Álvarez, N., Fernández, A., Saavedra, P., Sergent, F. S., Padilla, D., Acosta-Hernández, B., Suárez, M. M., Diogène, J., & Real, F. (**2019**). Predictive score and probability of CTX-like toxicity in fish samples from the official control of ciguatera in the Canary Islands. *Science of the Total Environment*, *673*, 576–584.

Sassenhagen, I., & Erdner, D. L. (**2017**). Microsatellite markers for the dinoflagellate *Gambierdiscus caribaeus* from high-throughput sequencing data. *Journal of Applied Phycology*, *29*(4), 1927–1932.

Satake, M., Murata, M., & Yasumoto, T. (**1993**a). Gambierol: a new toxic polyether compound isolated from the marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Journal of the American Chemical Society*, *115*(1), 361–362.

Satake, M., Murata, M., & Yasumoto, T. (**1993**b). The structure of CTX3C, a ciguatoxin congener isolated from cultured *Gambierdiscus toxicus*. *Tetrahedron Letters*, *34*(12), 1975–1978.

Satake, M., Morohashi, A., Oguri, H., Oishi, T., Hirama, M., Harada, N., & Yasumoto, T. (**1997**). The absolute configuration of ciguatoxin. *Journal of the American Chemical Society*, *119*(46), 11325–11326.

Satake, M., Fukui, M., Legrand, A. M., Cruchet, P., & Yasumoto, T. (**1998**). Isolation and structures of new ciguatoxin analogs, 2,3-Dihydroxy CTX3C and 51-HydroxyCTX3C, accumulated in tropical reef fish. *Tetrahedron Letters*, *39*, 1197–1198.

Satake, M., & Yasumoto, T. (**2020**). Methods for determining the absolute configurations of marine ladder-shaped polyethers. *Chirality*, *32*(4), 474–483.

Scheuer, P., Takahashi, W., Tsutsumi, J., & Yoshida, T. (**1967**). Ciguatoxin: isolation and chemical nature. *Science*, *155*(3767), 1267–1268.

Schlaich, C., Hagelstein, J., Burchard, G., & Schmiedel, S. (**2012**). Outbreak of ciguatera fish poisoning on a cargo ship in the port of Hamburg. *Journal of Travel Medicine*, *19*(4), 238–242.

Schlumberger, S., Girard, E., Bournaud, R., Sasaki, M., Fuwa, H., Cagide, E., Louzao, M. C., Botana, L. M., Molgó, J., & Benoit, E. (**2007**). *Effects du gambierol sur les canaux potassium et la libération de neurotransmetteurs* (pp. 157–158). Librairie Lavoisier, Paris, France.

Schnorf, H., Taurarii, M., & Cundy, T. (**2002**). Ciguatera fish poisoning: a double-blind randomized trial of mannitol therapy. *Neurology*, *58*(6), 873–880.

Sellner, K. G., Doucette, *G.* J., & Kirkpatrick, *G.* J. (**2003**). Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *30*(7), 383–406.

Sequeira, E., Pierce, M., Gomez, D., & Murray, T. (**2019**). Investigation of the potential therapeutic use of Brevetoxin to promote ischemic stroke recovery. *The FASEB Journal*, *33*, 500–516.

Sérandour, A.-L., Ledreux, A., Krys, S., Fessard, V., Troussellier, M., & Bernard, C. (**2012**). Collaborative study for the detection of toxic compounds in shellfish extracts using cell-based assays. Part I : screening strategy and pre-validation study with lipophilic marine toxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *403*(7), 1983–1993.

Sharkey, R., Jover, E., Couraud, F., Baden, D., & Catterall, W. A. (**1987**). *Allosteric modulation of neurotoxin binding to voltage-sensitive sodium channels by Ptychodiscus brevis toxin 2* (Vol. 31).

Shen, B. (**2003**). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, *7*(2), 285–295.

Shimojo, R., & Iwaoka, W. (**2000**). A rapid hemolysis assay for the detection of sodium channel-specific marine toxins. *Toxicology*, *154*(1–3), 1–7.

Shmukler, Y., & Nikishin, D. A. (**2017**). Ladder-shaped ion channel ligands: Current state of knowledge. *Marine Drugs*, *15*(7).

Sibat, M., Herrenknecht, C., Darius, H. T., Roué, M., Chinain, M., & Hess, P. (**2018**). Detection of pacific ciguatoxins using liquid chromatography coupled to either low or high resolution mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Chromatography A*, *1571*, 16–28.

Silva, M., Rodriguez, I., Barreiro, A., Kaufmann, M., Neto, A. I., Hassouani, M., Sabour, B., Alfonso, A., Botana, L. M., & Vasconcelos, V. (**2015**). First report of ciguatoxins in two starfish species: *Ophidiaster ophidianus* and *Marthasterias glacialis*. *Toxins*, *7*(9), 3740–3757.

Sims, J. K. (**1987**). A theoretical discourse on the pharmacology of toxic marine ingestions. *Annals of Emergency Medicine*, *16*(9), 1006–1015.

Sinkins, W. G., Estacion, M., Prasad, V., Goel, M., Shull, *G.* E., Kunze, D. L., & Schilling, W. P. (**2009**). Maitotoxin converts the plasmalemmal Ca2+ pump into a Ca2+-permeable nonselective cation channel. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *297*(6), C1533–C1543.

Skinner, M. P., Brewer, T. D., Johnstone, R., Fleming, L. E., & Lewis, R. J. (**2011**). Ciguatera fish poisoning in the Pacific Islands (1998 to 2008). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *5*(12), e1416.

Skinner, M. P., Lewis, R. J., & Morton, S. (**2013**). Ecology of the ciguatera causing dinoflagellates from the Northern Great Barrier Reef: Changes in community distribution and coastal eutrophication. *Marine Pollution Bulletin*, *77*, 210–219.

Smith, K. F., Rhodes, L., Verma, A., Curley, B. G., Harwood, D. T., Kohli, *G.* S., Solomona, D., Rongo, T., Munday, R., & Murray, S. A. (**2016**). A new *Gambierdiscus* species (*Dinophyceae*) from Rarotonga, Cook Islands: *Gambierdiscus cheloniae* sp. nov. *Harmful Algae*, *60*, 45–56.

Smith, K. F., Kohli, *G.* S., Murray, S. A., & Rhodes, L. L. (**2017**). Assessment of the metabarcoding approach for community analysis of benthic-epiphytic dinoflagellates using mock communities. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, *51*(4), 555–576.

Soliño, L., Widgy, S., Pautonnier, A., Turquet, J., Loeffler, C. R., Flores Quintana, H. A., & Diogène, J. (**2015**). Prevalence of ciguatoxins in lionfish (*Pterois* spp.) from Guadeloupe, Saint Martin, and Saint Barthélmy Islands (Caribbean). *Toxicon*, *102*, 62–68.

Soliño, L., & Costa, P. R. (**2018**). Differential toxin profiles of ciguatoxins in marine organisms: Chemistry, fate and global distribution. *Toxicon*, *150*, 124–143.

Sousa e Silva, E. (**1956**). Contribution à l'étude du microplancton de Dakar et des régions maritimes voisines. *Bulletin de l'Institut Français d'Afrique Noire. Série A, Sciences Naturelles*, *18*(A), 335–371.

Sparrow, L., & Heimann, K. (**2016**). Key environmental factors in the management of Ciguatera. *Journal of Coastal Research*, *75*(10075), 1007–1011.

Sparrow, L., Momigliano, P., Russ, *G.* R., & Heimann, K. (**2017**). Effects of temperature, salinity and composition of the dinoflagellate assemblage on the growth of *Gambierdiscus carpenteri* isolated from the Great Barrier Reef. *Harmful Algae*, *65*, 52–60.

Spector, I., Braet, F., Shochet, N. R., & Bubb, M. R. (**1999**). New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microscopy Research and Technique*, *47*(1), 18–37.

Sperr, A. E., & Doucette, *G.* J. (**1996**). Variation in growth rate and ciguatera toxin production among geographically distinct isolates of *Gambierdiscus toxicus*. *Harmful and Toxic Algal Blooms*, 309–312.

Staunton, J., & Weissman, K. J. (**2001**). Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Product Reports*, *18*(4), 380–416.

Stocker, T. (**2014**). *Climate change 2013: the physical science basis: Working Group I contribution to the Fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (T. Stocker (Ed.)). Cambridge university press.

Sugg, L. M., & VanDolah, F. M. (**1999**). No evidence for an allelopathic role of okadaic acid among ciguatera-associated dinoflagellates. *Journal of Phycology*, *35*(1), 93–103.

Sumner, J., McLeod, C., & Ross, T. (**2014**). Assuring Safety of Seafood–Risk Assessment. In *Seafood Processing: Technology, Quality and Safety* (pp. 453–478). Wiley Online Library.

Suzuki, T., Ha, D. V., Uesugi, A., & Uchida, H. (**2017**). Analytical challenges to ciguatoxins. *Current Opinion in Food Science*, *18*, 37–42.

Swofford, C., St. Jean, A. T., Panteli, J. T., Brentzel, Z. J., & Forbes, N. S. (**2014**). Identification of *Staphylococcus aureus* α-hemolysin as a protein drug that is secreted by anticancer bacteria and rapidly kills cancer cells. *Biotechnology and Bioengineering*, *111*(6), 1233–1245.

Takabayashi, M., Santos, S. R., & Cook, C. B. (**2004**). Mitochondrial DNA phylogeny of the symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*, Dinophyta). *Journal of Phycology*, *40*(1), 160–164.

Takahashi, H., Kusumi, T., Kan, Y., Satake, M., & Yasumoto, T. (**1996**). Determination of the absolute configuration of yessotoxin, a polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning, by NMR spectroscopic method using a chiral anisotropic reagent, methoxy-(2-naphthyl) acetic acid. *Tetrahedron Letters*, *37*(39), 7087–7090.

Takahashi, M., Ohizumi, Y., & Yasumoto, T. (**1982**). Maitotoxin, a Ca2+ channel activator candidate. *Journal of Biological Chemistry*, *257*(13), 7287–7289.

Tawong, W., Nishimura, T., Sakanari, H., Sato, S., Yamaguchi, H., & Adachi, M. (**2015**). Characterization of *Gambierdiscus* and *Coolia* (*Dinophyceae*) isolates from Thailand based on morphology and phylogeny. *Phycological Research*, *63*(2), 125–133.

Taylor, F. J. R., & Gustavson, M. S. (**1986**). An underwater survey of the organism chiefly responsible for “ciguatera” fish poisoning in the Eastern Caribbean Region : the benthic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *The World’s Knowledge Supplied by the British Library*.

Taylor, F. J. R., Hoppenrath, M., & Saldarriaga, J. F. (**2008**). Dinoflagellate diversity and distribution. *Biodiversity and Conservation*, *17*, 407–418.

Ten-Hage, L., Robillot, C., Turquet, J., Le Gall, F., Le Caer, J. P., Bultel, V., Guyot, M., & Molgo, J. (**2002**). Effects of toxic extracts and purified borbotoxins from *Prorocentrum borbonicum* (*Dinophyceae*) on vertebrate neuromuscular junctions. *Toxicon*, *40*(2), 137–148.

Tester, P. A., Feldman, R. L., Nau, A. W., Kibler, S. R., & Litaker, R. W. (**2010**). Ciguatera fish poisoning and sea surface temperatures in the Caribbean Sea and the West Indies. *Toxicon*, *56*(5), 698–710.

Tester, P. A., Vandersea, M. W., Buckel, C. A., Kibler, S. R., Holland, W. C., Davenport, E. D., Clark, R. D., Edwards, K. F., Taylor, J. C., Vander Pluym, J. L., Hickerson, E. L., & Litaker, W. R. (**2013**). *Gambierdiscus* (*Dinophyceae*) species diversity in the Flower Garden Banks National Marine Sanctuary, Northern Gulf of Mexico, USA. *Harmful Algae*, *29*, 1–9.

Thoman, M. (**1989**). Ciguatera in a breastfed baby. *Veterinary and Human Toxicology*, *31*, 71.

Thomassin, B., Halidi, M. E. A. A. L. I., & Quod, J. P. (**1992**). Ecophysiologie des dinoflagellés Toxiques. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, *85*, 449–452.

Tibiriçá, C. E. J. de A., Sibat, M., Fernandes, L. F., Bilien, G., Chomérat, N., Hess, P., & Mafra Jr, L. L. (**2020**). Diversity and toxicity of the Genus *Coolia* (Meunier) in Brazil, and detection of 44-methylgambierone in *Coolia tropicalis*. *Toxins*, *12*(5), 327.

Tillmann, U., Krock, B., Trefault, N., Gu, H., Clarke, D., Gottschling, M., Nézan, E., Jaen, D., Fernandez, L., Kilkoyne, J., Akselman, R., Smith, K., Sanchez, S., Guinder, V., Gatti, C., Roué, M., Kaufmann, M., Biszel, N., & Carbonell-Moore, C. (**2016**). Amphidomataceae, the dinophycean source of azaspiracid toxins: new records, new species, new toxins. *1rst Annual MERHAB Azaspiracid project meeting*, 16-17 mars 2016, Seattle, WS, USA.

Tobío, A., Alfonso, A., Madera-Salcedo, I., Botana, L. M., & Blank, U. (**2016**). Yessotoxin, a marine toxin, exhibits anti-allergic and anti-tumoural activities inhibiting melanoma tumour growth in a preclinical model. *PLOS One*, *11*(12), e0167572.

Townsend-Small, A., Pataki, D. E., Liu, H., Li, Z., Wu, Q., & Thomas, B. (**2013**). Increasing summer river discharge in southern California, USA, linked to urbanization. *Geophysical Research Letters*, *40*(17), 4643–4647.

Tsumuraya, T., Fujii, I., Inoue, M., Tatami, A., Miyazaki, K., & Hirama, M. (**2006**). Production of monoclonal antibodies for sandwich immunoassay detection of ciguatoxin 51-hydroxyCTX3C. *Toxicon*, *48*(3), 287–294.

Tsumuraya, T., Fujii, I., & Hirama, M. (**2010**). Production of monoclonal antibodies for sandwich immunoassay detection of Pacific ciguatoxins. *Toxicon*, *56*, 797–803.

Tsumuraya, T., Takeuchi, K., Yamashita, S., Fujii, I., & Hirama, M. (**2012**). Development of a monoclonal antibody against the left wing of ciguatoxin CTX1B: Thiol strategy and detection using a sandwich ELISA. *Toxicon*, *60*(3), 348–357.

Tsumuraya, T., Sato, T., Hirama, M., & Fujii, I. (**2018**). Highly sensitive and practical fluorescent sandwich ELISA for ciguatoxins. *Analytical Chemistry*, *90*(12), 7318–7324.

Tsumuraya, T., & Hirama, M. (**2019**). Rationally Designed Synthetic Haptens to Generate Anti-Ciguatoxin Monoclonal Antibodies, and Development of a Practical Sandwich ELISA to Detect Ciguatoxins. *Toxins*, *11*(9).

Tudó, À., Toldrà, A., Andree, K. B., Rey, M., Fernàndez-Tejedor, M., Compàs, M., & Diogène, J. (**2018**). First report of *Gambierdiscus* in the Western Mediterranean Sea (Balearic Islands). *Harmful Algal News*, *59*, 22–23.

Tudó, À., Toldrà, A., Rey, M., Todolí, I., Andree, K. B., Fernández-Tejedor, M., Campàs, M., Sureda, F. X., & Diogène, J. (**2020**). *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* as potential indicators of ciguatera risk in the Balearic Islands. *Harmful Algae*, *99*, 101913.

Twiner, M. J., Dechraoui Bottein, M.-Y., Wang, Z., Mikulski, C. M., Henry, M. S., Pierce, R. H., & Doucette, *G.* J. (**2007**). Extraction and analysis of lipophilic brevetoxins from the red tide dinoflagellate *Karenia brevis*. *Analytical Biochemistry*, *369*(1), 128–135.

Twiner, M. J., Doucette, *G.* J., Rasky, A., Huang, X.-P., Roth, B. L., & Sanguinetti, M. C. (**2012**). Marine algal toxin azaspiracid is an open-state blocker of hERG potassium channels. *Chemical Research in Toxicology*, *25*(9), 1975–1984.

UE. (**2019**). Modalités uniformes pour la réalisation des contrôles officiels en ce qui concerne les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine conformément au règlement (UE) 2017/625 du Parlement européen et du Conseil et modifiant le règlement (CE). *Journal Officiel de l'Union Européenne*, *Annexe VI*, 131–151.

Urdaneta, A. (**1580**). *Relación de los sucesos de la armada del comendador Loaisa a las Islas de la Especiería o Molucas en 1525 y sucesos acaecidos en ellas hasta el 1536* (Real Biblioteca II (ed.)).

Usup, G., Kulis, D. M., & Anderson, D. M. (**1994**). Growth and toxin production of the toxic dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* in laboratory cultures. *Natural Toxins*, *2*(5), 254–262.

Vacarizas, J., Benico, G., Austero, N., & Azanza, R. (**2018**). Taxonomy and toxin production of *Gambierdiscus carpenteri* (*Dinophyceae*) in a tropical marine ecosystem: the first record from the Philippines. *Marine Pollution Bulletin*, *137*, 430–443.

Van Dolah, F. M., Leighfield, T. A., Sandel, H. D., & Hsu, C. K. (**1995**). Cell division in the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* is phased to the diurnal cycle and accompanied by activation of the cell cycle regulatory protein, CDC2 kinase 1. *Journal of Phycology*, *31*(3), 395–400.

Van Dolah, F. M. (**2000**). Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspectives*, *108 Suppl*, 133–141.

Van Dolah, F. M., Fire, S. E., Leighfield, T. A., Mikulski, C. M., & Doucette, *G.* J. (**2012**). Determination of paralytic shellfish toxins in shellfish by receptor binding assay collaborative study. *Journal of AOAC International*, *95*(3), 795–812.

Van Dolah, F. M., Morey, J. S., Milne, S., Ung, A., Anderson, P. E., & Chinain, M. (**2020**). Transcriptomic analysis of polyketide synthases in a highly ciguatoxic dinoflagellate, *Gambierdiscus polynesiensis* and low toxicity *Gambierdiscus pacificus*, from French Polynesia. *PLOS One*, *15*(4), e0231400.

Vandersea, M. W., Kibler, S. R., Holland, W. C., Tester, P. A., Schultz, T. F., Faust, M. A., Holmes, M. J., & Litaker, R. W. (**2012**). Development of semi-quantitative pcr assays for the detection and enumeration of *Gambierdiscus* species (gonyaulacales, *Dinophyceae*). *Journal of Phycology*, *48*(4), 902–915.

Verma, A., Barua, A., Ruvindy, R., Savela, H., Ajani, A. P., & Murray, A. S. (**2019**). The Genetic Basis of Toxin Biosynthesis in Dinoflagellates. *Microorganisms*, *7*(8), 222.

Vernoux, J.-P., Lahlou, N., Abbad el Andaloussi, S., Riyeche, N., & Magras, L. P. (**1985**). A study of the distribution of ciguatoxin in individual Caribbean fish. *Acta Tropica*, *42*(3), 225–233.

Vernoux, J.-P., & Lejeune, J. (**1994**). Ciguatera in the French West Indies. *Memoirs of the Queensland Museum. Brisbane*, *34*(3), 631–638.

Vernoux, J.-P., & Lewis, R. J. (**1997**). Isolation and characterisation of Caribbean ciguatoxins from the horse-eye jack (Caranx latus). *Toxicon*, *35*(6), 889–900.

Vernoux, J.-P., Arnich, N., Chinain, M., Diogène, J., Fremy, J.-M., Hess, P., Soria, M., Trotereau, S., & Turquet, J. (**2014**). *Etat des connaissances relatives à la contamination des requins, notamment tigre et bouledogue,par des ciguatoxines: occurrence, méthodes analytiques, cas humains rapportés et éléments d'éthologie pour ces deux espèces de requins* (ANSES (ed.); Edition sc.).

Viallon, J., Chinain, M., & Darius, T. H. (**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).

Vigneau, J., Kierzek, G., Dumas, F., & Pourriat, J. L. (**2008**). Ciguatera: recrudescence of symptomatology of a previous intoxication. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, *27*(10), 863–864.

Vilariño, N., Louzao, M. C., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (**2010**). Biological methods for marine toxin detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *397*, 1673–1681.

Villareal, T. A., & Morton, S. L. (**2002**). Use of cell-specific PAM-fluorometry to characterize host shading in the epiphytic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Marine Ecology*, *23*(2), 127–140.

Vitousek, P. M., Chadwick, O. A., Hotchkiss, S. C., Ladefoged, T. N., & Stevenson, C. M. (**2014**). Farming the rock: A biogeochemical perspective on intensive agriculture in Polynesia. *Journal of Pacific Archaeology*, *5*(2), 51–61.

Wang, B., Yao, M., Zhou, J., Tan, S., Jin, H., Zhang, F., Mak, Y., Wu, J., Lai Chan, L., & Cai, Z. (**2018**). Growth and toxin production of *Gambierdiscus* spp. can be regulated by Quorum-Sensing bacteria. *Toxins*, *10*(7), 257.

Wang, Y., Weiss, M. T., Yin, J., Frew, R., Tenn, C., Nelson, P. P., Vair, C., & Sawyer, T. W. (**2009**). Role of the sodium hydrogen exchanger in maitotoxin-induced cell death in cultured rat cortical neurons. *Toxicon*, *54*(2), 95–102.

Wang, Z., Maucher Fuquay, J., Ledreux, A, Barbieri, M., & Ramsdell, J. S. (**2020**). Sample preparation and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of selected Pacific ciguatoxins in blood samples. *Journal of Chromatography A*, *1621*, 461050.

Ward, D. M., Nislow, K. H., Chen, C. Y., & Folt, C. L. (**2010**). Rapid, efficient growth reduces mercury concentrations in stream-dwelling Atlantic salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, *139*(1), 1–10.

Watanabe, R., Uchida, H., Suzuki, T., Matsushima, R., Nagae, M., Toyohara, Y., Satake, M., Oshima, Y., & Yasumoto, T. (**2013**). Gambieroxide, a novel epoxy polyether compound from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* GTP2 strain. *Tetrahedron*, *69*(48), 10299–10303.

Wattenberg, E. (**2007**). Palytoxin: exploiting a novel skin tumor promoter to explore signal transduction and carcinogenesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *292*(1), C24–C32.

Weissman, K. J. (**2004**). Polyketide biosynthesis: understanding and exploiting modularity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, *362*(1825), 2671–2690.

Withers, N. (**1981**). Toxin production, nutrition and distribution of *Gambierdiscus toxicus* (Hawaiian strain). *Fourth International Coral Reef Symposium*, *2*.

Wu, J. J., Mak, Y. L., Murphy, M. B., Lam, J. C. W., Chan, W. C., Wang, M., Chan, L. L., & Lam, P. K. S. (**2011**). Validation of an accelerated solvent extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry method for Pacific ciguatoxin-1 in fish flesh and comparison with the mouse neuroblastoma assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *400*(9), 3165–3175.

Wunsch, C., Hu, D., & Grant, B. (**1983**). Mass, heat, salt and nutrient fluxes in the South Pacific Ocean. *Journal of Physical Oceanography*, *13*(5), 725–753.

Xu, Y., Richlen, M. L., Morton, S. L., Mak, Y. L., Chan, L. L., Tekiau, A., & Anderson, D. M. (**2014**). Distribution, abundance and diversity of *Gambierdiscus* spp. from a ciguatera-endemic area in Marakei, Republic of Kiribati. *Harmful Algae*, *34*, 56–68.

Xu, Y., Richlen, M. L., Liefer, J. D., Robertson, A., Kulis, D., Smith, T. B., Parsons, M. L., & Anderson, D. M. (**2016**). Influence of environmental variables on *Gambierdiscus* spp. (*Dinophyceae*) growth and distribution. *PLOS One*, *11*(4), e0153197.

Yamaoka, K., Inoue, M., Miyahara, H., Miyazaki, K., & Hirama, M. (**2004**). A quantitative and comparative study of the effects of a synthetic ciguatoxin CTX3C on the kinetic properties of voltage-dependent sodium channels. *British Journal of Pharmacology*, *142*(5), 879–889.

Yamaoka, K., Inoue, M., & Hirama, M. (**2011**). A study on mechanisms of toxic actions of ciguatoxins: existence of functional relationship between CTX-3C and charged residues of voltage sensors in Nav1.4 sodium channel. *Forensic Toxicology*, *29*, 125–131.

Yang, Z., Luo, Q., Liang, Y., & Mazumder, A. (**2016**). Processes and pathways of ciguatoxin in aquatic food webs and fish poisoning of seafood consumers. *Environmental Reviews*, *24*(2), 144–150.

Yasumoto, T., Nakajima, I., bagnis, R., & Adachi, R. (**1977**). Finding of a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fisheries*, *43*(8), 1021–1026.

Yasumoto, T., Inoue, A., Bagnis, R., & Garcon, M. (**1979**). Ecological survey on a dinoflagellate possibly responsible for the induction of ciguatera. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fisheries*, *45*(3), 349–395.

Yasumoto, T., Inoue, A., Ochi, T., Fujimoto, K., Oshima, Y., Fukuyo, Y., Adachi, R., & Bagnis, R. (**1980**). Environmental studies on a toxic dinoflagellate responsible for ciguatera. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fisheries*, *46*(11), 1397–1404.

Yasumoto, T., Seino, N., Murakami, Y., & Murata, M. (**1987**). Toxins produced by benthic dinoflagellates. *The Biological Bulletin*, *172*(1), 128–131.

Yasumoto, T., & Murata, M. (**1993**). Marine toxins. *Chemical Reviews*, *93*(5), 1897–1909.

Yasumoto, T., Igarashi, T., Legrand, A.-M., Cruchet, P., Chinain, M., Fujita, T., & Naoki, H. (**2000**). Structural elucidation of ciguatoxin congeners by fast-atom bombardment tandem mass spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, *122*(20), 4988–4989.

Yasumoto, T. (**2001**). The chemistry and biological function of natural marine toxins. *Chemical Record*, *1*(3), 228–242.

Yogi, K., Oshiro, N., Inafuku, Y., Hirama, M., & Yasumoto, T. (**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), 8886–8891.

Yogi, K., Sakugawa, S., Oshiro, N., Ikehara, T., Sugiyama, K., & Yasumoto, T. (**2014**). Determination of toxins involved in Ciguatera Fish Poisoning in the Pacific by LC/MS. *Journal of AOAC International*, *97*(2), 398–402.

Yong, H. L., Mustapa, N. I., Lee, L. K., Lim, Z. F., Tan, T. H., Usup, G., Gu, H., Litaker, R. W., Tester, P. A., Lim, P. T., & Leaw, C. P. (**2018**). Habitat complexity affects benthic harmful dinoflagellate assemblages in the fringing reef of Rawa Island, Malaysia. *Harmful Algae*, *78*, 56–68.

Yoshimatsu, T, Yamaguchi, H., Iwamoto, H., Nishimura, T., & Adachi, M. (**2014**). Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of Japanese *Gambierdiscus* spp. (*Dinophyceae*). *Harmful Algae*, *35*, 29–37.

Yoshimatsu, Takamichi, Tie, C., Yamaguchi, H., Funaki, H., Honma, C., Tanaka, K., & Adachi, M. (**2016**). The effects of light intensity on the growth of Japanese *Gambierdiscus* spp. (*Dinophyceae*). *Harmful Algae*, *60*, 107–115.

Zhang, F., Xu, X., Li, T., & Liu, Z. (**2013**). Shellfish Toxins Targeting Voltage-Gated Sodium Channels. *Marine Drugs*, *11*, 4698–4723.

Zheng, L., Gatti, C. M. iti, Garrido Gamarro, E., Suzuki, A., & Teah, H. Y. (**2020**). Modeling the time-lag effect of sea surface temperatures on ciguatera poisoning in the South Pacific: implications for surveillance and response. *Toxicon*, *182*, 21–29.