F. MONDEGUER¹, Jean-Philippe ANTIGNAC², Yann GUITTON³, Fabrice MONTEAU², Sabrina Le BORGNE², P. HESS¹

Nouvelle stratégie de caractérisation non ciblée de type métabolomique au service de l'identification de composés bioactifs accumulés dans les mollusques bivalves

Couplage chromatographie liquide–spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS)

RÉSUMÉ

La bioactivité des toxines du phytoplancton qui s'accumulent dans les coquillages est presque toujours évaluée sur modèle animal (test souris). Malgré ses avantages, la capacité de ce test à expliquer la nature de cette bioactivité reste limitée. Par ailleurs, le contrôle sanitaire actuellement basé sur une méthode ciblée d'identification et de quantification d'un ensemble de toxines connues ne permet pas de détecter des toxines encore inconnues. Afin de répondre à ce besoin de caractérisation de substances toxiques inconnues, une nouvelle approche de profilage chimique différentiel et non ciblé, de type métabolomique, a été proposée. Les extraits sélectionnés sont ceux ayant montré une toxicité positive chez la souris, sans que les substances potentiellement responsables de cet effet toxique n'aient été révélées par des mesures ciblées. Les premiers résultats obtenus par cette approche donnent un nouvel éclairage aux phénomènes toxiques de type atypique. Ce concept permet de mettre en évidence une signature biologique associée à cette toxicité et démontre l'intérêt de caractériser des biomarqueurs qui sont des candidats potentiels à la mise en place d'une nouvelle stratégie de contrôle. La validité et la robustesse de cette approche restent toutefois à évaluer à plus large échelle.

MOTS-CLÉS

Métabolomique, LC-HRMS, Biotoxines marines, Biomarqueur.

New strategy of non-targeted, metabolomic analysis for the identification of bioactive compounds accumulated in bivalves molluscs

Coupling liquid chromatography - high resolution mass spectrometry (LC-HRMS)

SUMMARY

The bioactivity of phytoplankton toxins that accumulate in shellfish is almost always tested on animal model (mice assay). In spite of these advantages, the ability of this test to explain the nature of the bioactivity remains limited. Besides, the current sanitary control based on targeted methods of identification and quantification (LC-MS/MS) of known toxins, do not permit to detect unknown toxins. In order to cope with this need of identification of unknown toxic substances, a next approach based on global and differential metabolomic profiling was proposed. The first results obtained from extracts that have shown a positive toxicity in mice without the substances potentially responsible for these toxic effects have been measured by targeted methods, clearly open new perspectives regarding this atypical toxicity issue. This concept allows identifying a biological signature associated with this toxicity and shows the interest of characterizing biomarkers, which are potential candidates for the establishment of a new control strategy. Validity and robustness of this approach have now to be confirmed at a larger scale.

KEYWORDS

Metabolomic, HRMS-LC, Marine biotoxins, Biomarker.

* pour correspondance

¹ Laboratoire PHYCOTOXINES, Ifremer Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105 - 44311 Nantes Cedex3 - E-mail : Florence.Mondeguer@ifremer.fr - Tél : 0240374174

² LUNAM, Oniris, Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), BP50707 - 44307 Nantes Cedex3

E-mail : jean-philippe.antignac@oniris-nantes.fr - Tél : 0240687880

³ Laboratoire SADV, IFR147 USTL, 59655 Villeneuve d'Ascq - E-mail : yann.guitton@univ-lille1.fr - Tél : 0320434843

I- Introduction

Une première étude de faisabilité(1) conduite en collaboration entre les unités LABERCA (Oniris) et Phycotoxines (Ifremer) a permis de caractériser une signature biologique associée à une toxicité atypique (crise sanitaire de 2006) observée sur des échantillons d'huîtres du bassin d'Arcachon, par une approche de profilage chimique non ciblé, basée sur le couplage chromatographie liquide - spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS). Cette approche a en effet démontré la possibilité de différencier des échantillons non toxiques des échantillons toxiques sur la base de leur profil métabolique global et de révéler des signaux spectrométriques plus particulièrement impliqués dans cette différenciation. La seconde partie de cette étude a eu pour objectif de différencier les groupes de composés bioactifs qui pourraient s'accumuler dans des mollusques bivalves, en considérant cette fois l'intérêt quantitatif et sanitaire, mais aussi l'aspect des biotransformations ou de la métabolisation relevant de l'accumulation des phycotoxines dans les glandes digestives de ces bivalves filtreurs. L'exploration de la bioactivité des toxines du phytoplancton qui s'accumulent dans les coquillages est presque toujours évaluée sur modèle animal (test souris), bien que la capacité de ce test à expliquer la nature de cette bioactivité reste limitée. Par ailleurs, le contrôle sanitaire est actuellement basé sur une méthode ciblée d'identification et de quantification de toxines connues (2) qui ne permet pas de détecter des toxines encore inconnues (3). Dans ce contexte, des échantillons collectés dans le cadre du plan de surveillance du bassin d'Arcachon en 2009 et 2010 ont été sélectionnés, ceux-ci ayant montré une toxicité positive chez la souris, mais sans que les substances potentiellement responsables de cet effet toxique n'aient été mises en évidence par les méthodes ciblées. Nous avons alors envisagé une nouvelle approche de profilage chimique différentiel et non ciblé, de type métabolomique, pour mettre en évidence une signature biologique associée à cette toxicité, puis caractériser des biomarqueurs exploitables à terme pour la mise en place d'une nouvelle stratégie de contrôle.

1. Phycotoxines Marines

Les phycotoxines marines sont produites par des microalgues (4). Sur plus de 4000 espèces répertoriées au niveau mondial et dont 2000 espèces recensées de dinoflagellés, environ 30 espèces produisent des toxines qui peuvent causer des pathologies humaines via l'ingestion de mollusques(5). Les microalgues constituent la fraction majeure du plancton dont les mollusques se nourrissent. La transmission des molécules toxiques du phytoplancton à l'Homme s'effectue toujours à l'aide d'un vecteur : mollusques bivalves, crustacés ou poissons. Pour tous les mollusques bivalves (moules, coquilles saint jacques, huîtres, palourdes...) qui s'alimentent en filtrant l'eau de mer, l'absorption continue de grandes quantités

de ces microalgues toxiques, aboutit à terme à la concentration dans leurs glandes digestives, de toxines représentant un risque potentiel pour la santé humaine. En France, trois principaux types de toxines sont présents le long des côtes(6) : les toxines diarrhéiques, paralysantes et amnésiantes. La famille des toxines à effet diarrhéique est celle qui pose les problèmes les plus aigus en matière de surveillance de la qualité sanitaire des mollusques bivalves. Notre étude s'est par conséquent plus particulièrement focalisée sur cette famille, dite « lipophile » (7) qui regroupe plusieurs types de toxines ayant chacune leurs propriétés et leurs effets sur l'Homme.

2. Outils de contrôle

En France, depuis le 1^{er} janvier 2010, le test biologique jusque-là classiquement utilisé pour l'évaluation de la toxicité, *i.e.* le bio-essai sur souris, est remplacé pour la détection des toxines lipophiles réglementées au niveau européen par l'analyse physico-chimique par couplage chromatographie liquide - spectrométrie de masse en tandem (LC-SM/SM). Ces méthodes ciblées, qui permettent de détecter, d'identifier et de quantifier des toxines lipophiles connues, sont également mises à profit pour révéler puis identifier d'éventuelles toxines émergentes (8).

3. Limites et perspectives

La surveillance des produits de la mer et des risques associés aux microalgues est conduite dans un cadre réglementaire fixé au plan européen et mondial. Elle permet d'une part de protéger le consommateur et d'autre part d'entreprendre des études coopératives pour tenter de résoudre de nouveaux problèmes souvent complexes avec des composantes à la fois écologiques, physiologiques, toxicologiques et/ou économiques. Cependant, les approches physico-chimiques ciblées, bien qu'assurant un contrôle très efficace des substances connues et pour lesquelles un système d'étalonnage adapté aboutit à une quantification précise (7), ne permettent pas de révéler, et donc encore moins d'anticiper la présence de substances de structure encore inconnue (9). Dans ce contexte, l'apparition de technologies d'investigation globales (non ciblées) (10) et à haut débit, en particulier de type profilage métabolique ou métabolomique, ouvre aujourd'hui de nouvelles perspectives dans de nombreux domaines, dont celui de la toxicologie. Nous avons donc souhaité évaluer l'intérêt de ce type d'approche en réponse au défi que représente la caractérisation de situations de toxicité atypique dans les produits de la mer.

II - Matériel et méthodes

Durant l'étape de recherche et développement méthodologique, les conditions instrumentales ont

été testées et optimisées dans le but de maximiser l'efficacité de la détection des éventuels composés pouvant signer une situation de toxicité, qu'il s'agisse de toxines de structure encore inconnue ou bien de biomarqueurs plus indirects de cette toxicité (11). Pour répondre à cet objectif, différents types de prélèvements et de matériels certifiés ont été utilisés.

1. Echantillons Biologique

- « A » : standard certifié d'acide okadaïque (OACS-1 IBM, CNRC, Canada) correspondant à 7,15 µg/ml dans 0,5 ml de méthanol.
- « B » : échantillon de référence (MUS, CNRC, Canada), constitué d'un homogénat de glandes digestives de moules toxiques à teneur certifiée en acide okadaïque (AO) et en dinophysistoxine1 (DTX1) respectivement à hauteur de 11 et 1 µg de standards de toxines par g de glandes digestives.
- « C » : échantillon témoin négatif ou « Contrôle » constitué d'un mélange de glandes digestives de moules non toxiques lyophilisées d'une même provenance (Parc Leucate).
- « AZA » : échantillon dit « témoin positif », lyophilisé, issu d'une confiscation douanière de sacs de 1kg (sur 200) de moules cuites « Pêche Océan » Atlantique NE 240209, présentant une toxicité observée (test souris positif) reliée à la présence de toxines connues, identifiées et quantifiées (valeur moyenne en µg/kg de chair : acide okadaïque = 83,7 et azaspiracides1-2-3 = 67,5 ; 23,7 ; 47,3).
- « T1 » et « T2 » : échantillons tests collectés dans le cadre du plan de surveillance du bassin d'Arcachon en 2009 et 2010. Lyophilisés, ils sont constitués d'un mélange de glandes digestives de moules, présentant une toxicité observée (test souris positif), mais non reliée à la présence de toxines connues.

2. Préparation des échantillons

Bien que le principe de l'approche métabolomique soit basé sur une préparation non sélective, la fraction active (ayant provoquée la mortalité des souris) de nos échantillons étant la même que celle injectée classiquement pour le dépistage des toxines lipophiles, il nous est apparu pertinent de travailler à partir de cette même fraction extraite, et non à partir de l'échantillon global initial. Pour répondre à l'un des principaux défis de la métabolomique qui est de produire des extraits à la fois non purifiés d'une façon trop sélective (car, par définition, la nature des éventuels biomarqueurs d'intérêt n'est pas toujours connue), mais en même temps compatibles avec une injection sur l'instrument de mesure (12), plusieurs protocoles d'extraction ont été testés. Dans le cas présent, le développement et la mise en place du protocole de traitement des échantillons fait appel à l'échantillon de référence (MUS). Dans cet échantillon, la présence de deux toxines connues à une concentration certifiée a servi de fil conducteur, aux différentes stratégies d'extraction/purification.

3. Protocoles développés

La totalité de l'échantillon de référence (3,9 g) a été solubilisée dans un mélange composé de 15 ml de dichlorométhane et 15 ml d'eau afin de réaliser une première extraction liquide-liquide, la phase organique représentant la fraction d'intérêt pour la suite de notre étude. Un second partage liquide-liquide par un mélange acétonitrile/hexane a ensuite été réalisé, afin de s'affranchir d'une partie des interférents matriciels de nature lipidique (éliminés dans la fraction hexane), tout en récupérant les composés d'intérêt dans la fraction acétonitrile. Les fractions obtenues sont toutefois apparues toujours très complexes et non compatibles avec une bonne répétabilité du signal en raison d'un fort effet de matrice. Une technique d'extraction alternative sur phase solide (SPE) a donc été envisagée, sur un support de type phase inverse (type C18) ou phase normale (type Si OH). L'AO apparaissant très fortement retenu, et par conséquent difficilement, récupérable sur la phase Si OH, le fractionnement sur C18 a été celui finalement choisi.

Trois fractions d'élution successives composées de mélanges eau/méthanol avec un pourcentage de méthanol de 10, 80 et 100 % ont alors été collectées. Au final, une fraction de lavage F1, avec un mélange eau/méthanol 90:10 (v/v) récupère respectivement 10,2 % et 3,8 % de l'AO et de la DTX1, tandis qu'une élution F2 avec un mélange 20:80 (v/v) est efficace pour récupérer respectivement 88,8 % et 95,3 % de l'AO et de la DTX1. La fraction F2 obtenue à partir de l'échantillon de référence (MUS) a été systématiquement incluse dans chaque série d'analyse en vue de caractériser la variabilité du signal due au seul processus analytique. Pour chaque séquence d'analyse où toutes les fractions d'intérêt, F2 ont été injectées en triplicate, la stabilité du système de mesure (LC-HRMS) a donc été vérifiée.

La séparation chromatographique a été réalisée avec une pompe HPLC binaire Agilent 1200 (Palo Alto, USA) sur une colonne HypersilGold (Thermo Scientific), de dimensions 10 cm x 2,1 mm et d'une granulométrie de 1,9 µm. Le volume d'injection, le débit et la température ont été fixés respectivement à 5 µL, 0,4 mL.min⁻¹ et 40 °C. La phase mobile est constituée d'eau (A) et d'acétonitrile (B), contenant chacun 0,1% d'acide acétique. Le gradient d'élution utilisé (A:B, v / v) est le suivant : 95:5 de 0 à 2,4 min; 75:25 à 4,5 min; 70:30 à 11 min; 0:100 de 14 à 16,5 min, et de 95:5 de 20 à 25 min.

Le spectromètre de masse utilisé pour la génération des profils métabolomiques est de type hybride trappe linéaire - trappe orbitale (LTQ-Orbitrap, Thermo Scientific). Les acquisitions ont été réalisées après ionisation dans les modes électrospray positif (ESI+) et négatif (ESI-), avec une résolution de 30 000 (fwhm, m/z=400) et en balayage complet (Full Scan) de m/z=65 à m/z=1000.

Un exemple de chromatogramme d'ion total (TIC) typiquement observé pour un extrait de contrôle

(non toxique) et un échantillon présentant une toxicité atypique, après ionisation dans le mode ESI+, donné à la Figure 1, témoigne de la difficulté à dégager une signature chimique caractéristique de cette toxicité sur la seule base d'un examen visuel de ces profils globaux (*i.e.* avant déconvolution).

III - Résultats

1. Traitement des données

Le volume et la nature des données métabolomiques générées imposent l'utilisation d'outils et procédures de traitement puis d'analyse statistique adaptés. Dans un premier temps, les données brutes (fichiers au format constructeur) doivent être convertis dans un format plus ouvert, de type mzData (13) ou NetCDF (Network Common Data Form (14), via l'utilisation d'un utilitaire de conversion dédié (Xcalibur, Thermo Scientific). Dans un second temps, une étape de déconvolution permet l'analyse fine de ces empreintes métabolomiques selon plusieurs étapes successives incluant notamment la détection des différents signaux (pics chromatographiques), leur alignement en terme de temps de rétention

(pour corriger les déviations éventuelles intervenant au cours des séquences d'analyse), leur intégration, puis enfin l'application de tests statistiques préliminaires permettant de caractériser leur caractère différentiel entre les deux groupes d'échantillons à comparer. La solution retenue pour cette étape de traitement des données a été le logiciel XCMS (package fonctionnant sous l'environnement R) (15) qui est actuellement utilisé de façon consensuelle au sein de la communauté métabolomique tant au plan national qu'international. Pour une utilisation homogène de nos données avec RXCMS un script de traitement (paramètres d'extraction et de déconvolution) a été développé.

Le rapport final issu du traitement se présente alors sous la forme d'un tableau Excel. Dans ce tableau figurent l'identifiant de chaque ion détecté, (composé du rapport m/z et du temps de rétention correspondant), mais aussi l'abondance de l'ion observé dans chacun des échantillons analysés, ainsi qu'une série de paramètres statistiques. Deux paramètres sont plus particulièrement d'intérêt, à savoir le « Fold », qui correspond au ratio d'abondance moyenne observé pour l'ion considéré dans les échantillons toxiques (AZA, T1Arcachon2009, T2Arcachon 2010) versus

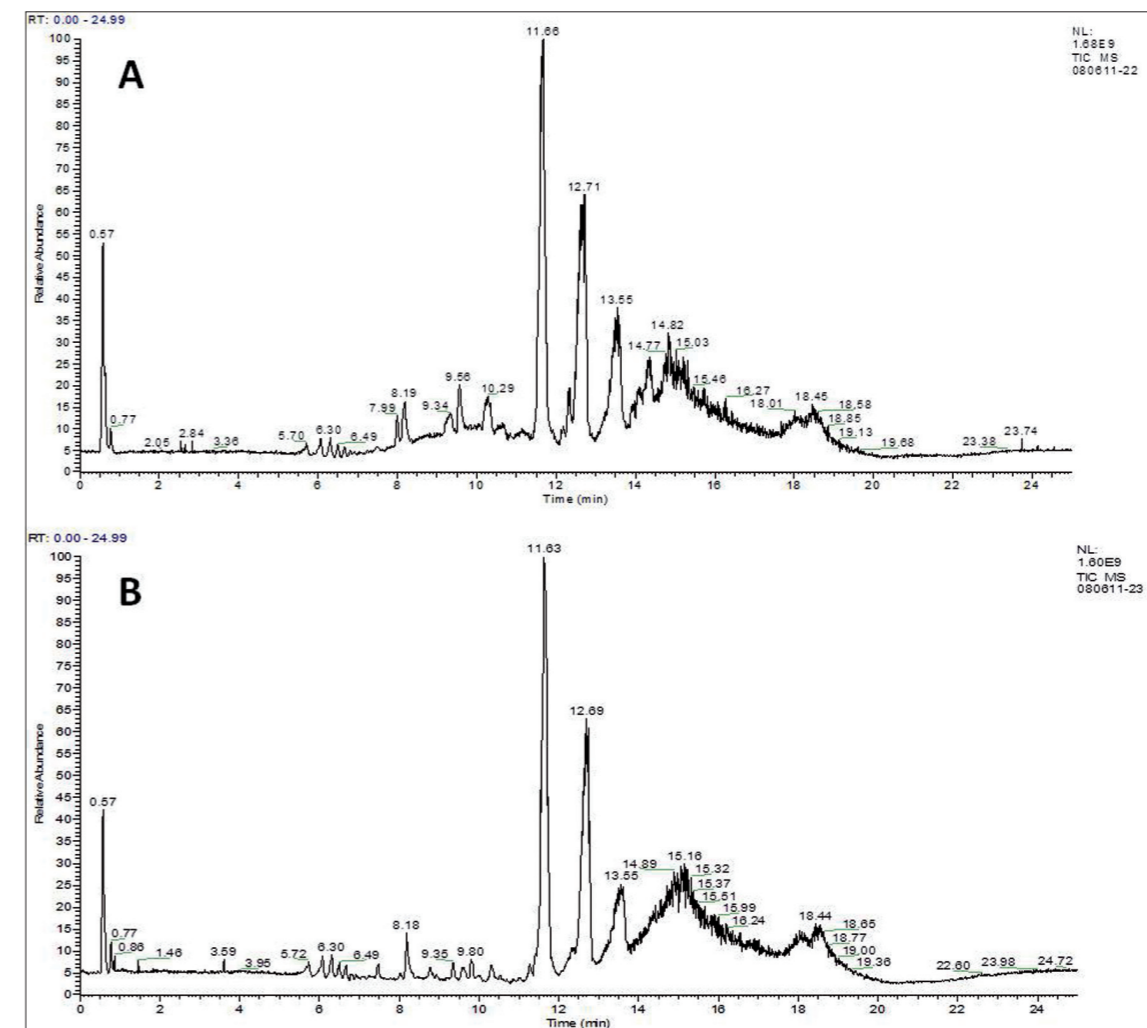


Figure 1
Exemple de chromatogramme d'ion total (TIC) typiquement observé pour un extrait de contrôle (non toxique) (A) et un échantillon présentant une toxicité atypique (B), après ionisation dans le mode ESI+.

Tableau 1

Synthèse des résultats obtenus dans les modes ESI+, ESI-, en terme de richesse globale et de pertinence de l'information générée en vue de la discrimination des échantillons non toxiques (C) versus toxiques (AZAs, 2009, 2010).

Modes d'ionisation	ESI+			ESI-		
	C-AZAs	C-2009	C-2010	C-AZAs	C-2009	C-2010
Groupes d'échantillons comparés						
Nombre total de signaux détectés	2076	2121	1968	764	898	902
Nombre de signaux de p<0.05 et R>1.5	553	696	624	605	650	591
Nombre de signaux de p<0.01 et R>10	100	72	33	318	105	90
Signaux présents uniquement dans les échantillons toxiques	8	7	7	8	16	11
Signaux présents uniquement dans les échantillons non toxiques	9	6	6	13	6	9

non toxiques (Cmoules non toxiques), et la « p-value », qui correspond au degré de signification de cette différence, et qui dépend notamment de la variabilité intra-groupe.

Une première étape, à visée informative et descriptive, a consisté à trier et sélectionner les seuls signaux ayant une p-value (p) inférieure à 0,05 et un ratio toxique/non toxique (R) supérieur à 1,5. Après ce premier tri, le nombre de signaux potentiellement pertinents est apparu encore relativement élevé, de même que la proportion de signaux ne correspondant pas à de réels biomarqueurs susceptibles de passer différentes étapes ultérieures de validation. Un second tri plus strict a donc été réalisé en ne conservant que les ions ayant un ratio toxique/non toxique supérieur à 10 et une p-value inférieure à 0,01. Une synthèse des résultats obtenus lors de cette étape de sélection des signaux d'intérêt potentiel, pour les profils métabolomiques générés dans le mode ESI+ et ESI-, est donnée dans le Tableau 1. Ainsi dans le premier exemple de l'échantillon de moules toxiques contaminées par les azaspiracides comparé à l'échantillon non toxique (C-AZAs), après retraitement les données des tris successifs permettent de passer de 2076 ions détectés à 553 puis 100 ions. A ce niveau du retraitement, le traitement réalisé par le logiciel XCMS donne également accès aux chromatogrammes d'ions spécifiques (*Extracted Ion Chromatograms*, EIC) des différents signaux détectés. Le cas de signaux de type « tout ou rien », présents uniquement dans l'un des sous-groupes d'échantillons analysés est assez rare en métabolomique. Nous avons cependant pu repérer dans notre cas, une dizaine d'ions validant tant sur le plan physico-chimique que statistique, un ratio élevé, une p-value faible et un chromatogramme bien défini et exploitable (EIC). Et ainsi dans l'exemple n°1, huit ions caractéristiques de la toxicité (ions présents seulement dans l'échantillon toxique) et 9 ions caractéristiques d'une absence de toxicité (ions présents seulement dans l'échantillon non-toxique) ont été observés.

On observe également (de manière attendue) que le nombre de signaux détectés en mode ESI- est globalement significativement inférieur au nombre de signaux détectés en mode ESI+.

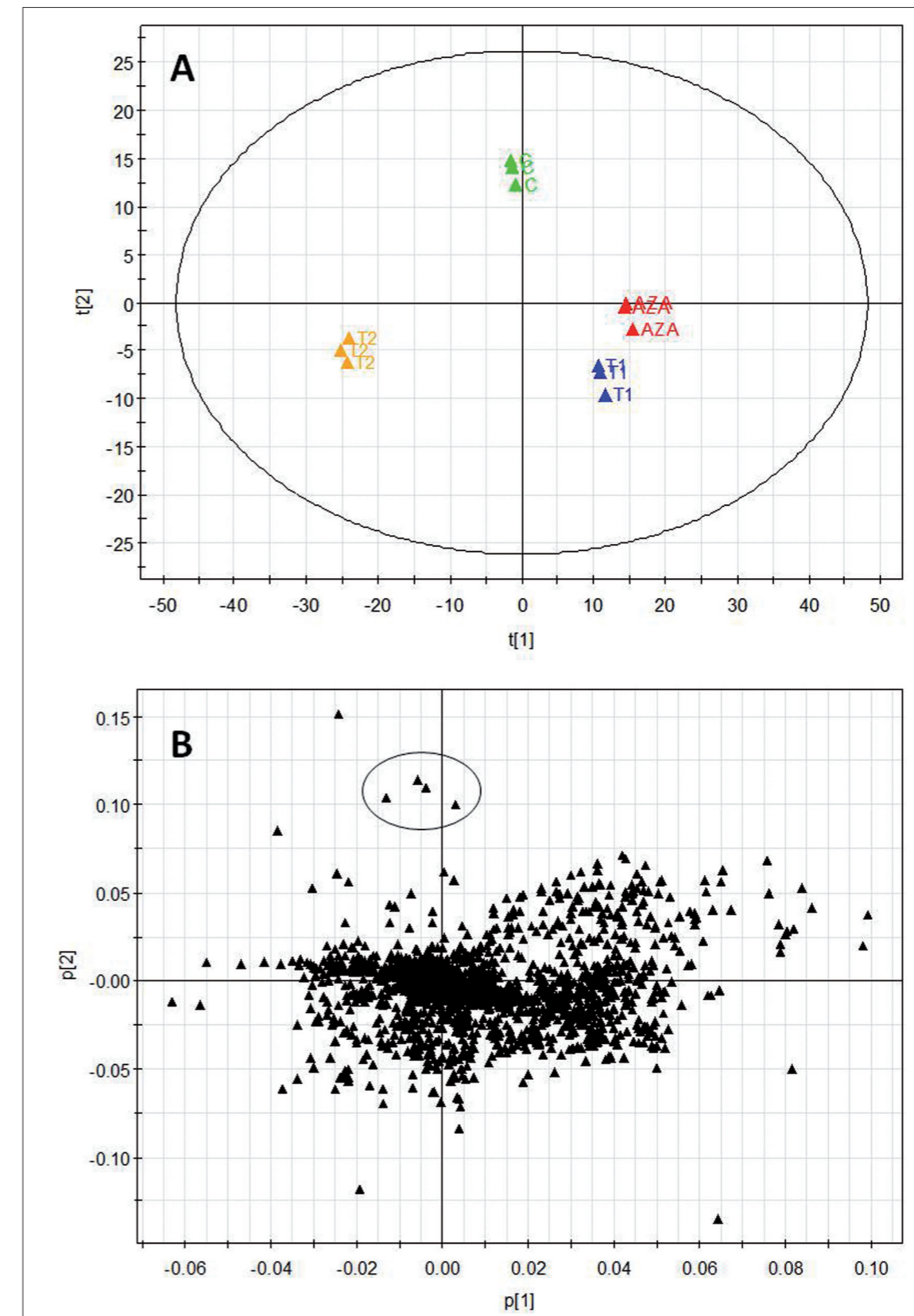
Cependant, même si les données bibliographiques indiquent que la plupart des toxines connues s'ionisent essentiellement en mode positif, les résultats obtenus en mode négatif n'ont pas été écartés du fait de la présence possible de biomarqueurs plus indirects dont la structure favoriserait une ionisation en mode négatif. Parmi les échantillons toxiques, l'échantillon AZA est le seul dont la nature de la toxicité est connue. La comparaison entre l'échantillon non toxique « C » versus l'échantillon de toxicité connue « AZAs » a bien relevé, par l'expérience non ciblée, la présence de l'acide okadaïque et celle de l'AZA3 parmi les 8 ions caractéristiques. Cependant, l'absence des AZA (1 et 2) quantifiés par LC-MS/MS, reste à comprendre parmi des hypothèses telles que l'effet de matrice trop important ou la purification sur SPE.

2. Résultats de l'Analyse Statistique des données

Afin de procéder à un traitement plus complet de ces données, le logiciel SIMCA-P+ a été utilisé pour réaliser un ensemble de techniques d'analyses statistiques multivariées. Les résultats de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) réalisée sur les données acquises en mode ESI+ (données qui, dans le cas présent, sont apparues plus significatives) montrent une discrimination des différents échantillons analysés (le groupe contrôle et les trois groupes toxiques) selon la composante horizontale (Figure 2 : *Score plot* (A) et *Loading plot* (B) résultant de l'ACP réalisée à partir des profils métabolomiques générés (C : échantillon non toxique, AZA : échantillon de toxicité connue de type AZA, T1 : échantillon de toxicité inconnue prélevé en 2009, T2 : échantillon de toxicité inconnue prélevé en 2010). Les signaux cerclés en B sont caractéristiques des échantillons

de contrôle (i.e. abondance plus élevée que pour les échantillons toxiques). Ces graphes (*scores-plot* et *loadings-plot*) permettent de déterminer les raisons probables de formation des groupes d'objets que l'on visualise, c'est-à-dire le poids

(ou l'importance) de certaines variables dans le positionnement des objets sur le plan formé par deux composantes principales. En effet, les objets placés, par exemple, à droite sur le *scores-plot* auront des valeurs importantes pour les


Figure 2

Score plot (A) et Loading plot (B) résultant de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) réalisée à partir des profils métabolomiques générés (C : échantillon non toxique, AZA : échantillon de toxicité connue de type AZA, T1 : échantillon de toxicité inconnue prélevé en 2009, T2 : échantillon de toxicité inconnue prélevé en 2010). Les signaux cerclés en B sont caractéristiques des échantillons de contrôle (i.e. abondance plus élevée que pour les échantillons toxiques).

variables placées à droite sur le *loadings-plot*, tandis que les variables proches de l'origine des axes n'auront qu'une faible contribution dans la discrimination des objets. Dans notre *Loadind-Plot*, les 4 signaux cerclés en (figure 2: *Score plot* (A) et *Loading plot* (B) résultant de l'ACP réalisée à partir des profils métabolomiques générés (C : échantillon non toxique, AZA : échantillon de toxicité connue de type AZA, T1 : échantillon de toxicité inconnue prélevé en 2009, T2 : échantillon de toxicité inconnue prélevé en 2010). Les signaux cerclés en B sont caractéristiques des échantillons de contrôle (*i.e.* abondance plus élevée que pour les échantillons toxiques). apparaissent plus particulièrement caractéristiques des échantillons de contrôle (*i.e.* abondance plus élevée que pour les échantillons toxiques).

Parmi les échantillons toxiques, l'échantillon « AZA » était le seul dont la nature de la toxicité est connue. On peut aussi noter que l'échantillon AZA et l'échantillon T1 (2009) présentant une toxicité atypique se projettent de façon rapprochée sur le modèle. Or, des analyses ciblées de confirmation, réalisées en parallèle, ont montré qu'aucune des toxines lipophiles détectées ne pouvaient être responsables de la mortalité des souris observée en T1. La similarité des profils, constatée entre les échantillons « AZA » et « T1 », est donc plus probablement liée à la présence d'autres composés (éventuels métabolites directs communs à différentes toxines, ou encore biomarqueurs plus indirects). De même, les ions situés à gauche du

Loading Plot qui semblent influencer le modèle vers l'échantillon T2 et discriminent celui-ci par rapport aux échantillons AZA et T1, donnent à penser que les toxicités atypiques de 2009 et de 2010 n'auraient pas la même origine ou que ces ions auraient subi des processus métaboliques différents (nutrition, température, etc....)

Les ions repérés dans le cercle sur la Figure 2B ont une influence très forte sur la composante verticale qui discrimine les toxiques des non toxiques. Ces signaux correspondent donc à des substances plus particulièrement présentes dans l'échantillon non toxique, et dont l'abondance est plus faible, voire nulle, dans les échantillons toxiques. Bien que non-attendu, ce résultat qui permet de différencier l'échantillon non toxique de l'ensemble des trois échantillons toxiques met en évidence une signature intéressante dans l'optique de caractériser une « non toxicité » générique, *i.e.* indépendante du type de toxines présentes dans l'échantillon.

Cette optique consistant à considérer non pas un profil chimique associé aux toxines elles-mêmes, mais plutôt un profil caractérisant l'impact de celles-ci sur la physiologie de l'organisme marin, représente ici une nouvelle perspective en termes de contrôle.

Suite à cette première étude de faisabilité et de preuve de concept, plusieurs étapes de validation sont toutefois nécessaires pour conforter ces résultats et leur applicabilité. Ainsi pour évaluer la robustesse de ces six candidats biomarqueurs et la répétabilité de l'approche, nous avons reproduit les

résultats obtenus précédemment sur des extraits indépendants nouvellement préparés à partir des quatre échantillons de cette étude. Au final, six séries d'essais ont été réalisées sur une période de plus de trois mois. Parmi les différents ions initialement considérés comme potentiellement d'intérêt, certains n'ont finalement pas confirmé leur pertinence au regard de différents critères fixés au plan analytique (abondance trop faible, répétabilité perfectible, trop grande susceptibilité vis-à-vis d'effets de matrice...). Deux d'entre eux sont en revanche apparus particulièrement robustes vis-à-vis de ces différents essais. Le premier ($m/z = 503$, $Tr = 9,7$ min) est donné comme un ion caractéristique de la toxicité atypique de l'échantillon de 2009 tandis que le second ($m/z = 665$, $Tr = 10,1$ min) comme un ion présent dans l'échantillon non toxique et absent dans l'échantillon prélevé en 2009.

En nous intéressant plus particulièrement à l'ion $m/z = 665$, nous avons constaté qu'il était également discriminant lorsqu'on comparait l'échantillon non toxique à l'échantillon de 2010 ou à l'échantillon « AZA » contaminé par les azaspiracides. Un exemple de la discrimination évidente de cet ion, absent de chacun des trois échantillons toxiques et présent dans l'échantillon non toxique est illustré à la Figure 3.

L'hypothèse d'un signal correspondant à une molécule présente de façon endogène dans la glande digestive des moules non toxiques et dont le niveau d'expression chute suite à la présence de la toxine nous permet de retenir cet ion 665 comme marqueur d'une « non toxicité générale » puisque indépendante de la présence de toxines connues comme responsables de celle-ci. Ce résultat renforce notre intérêt à étudier l'impact physiologique de la toxine sur le coquillage, en vue de révéler des marqueurs indirects, si possible assez génériques, plutôt que de vouloir identifier des biomarqueurs directs (toxines elles-mêmes

ou métabolites) par définition plus spécifiques de chaque classe, voire de chaque toxine.

Dans une seconde étape visant à approfondir et à confirmer notre démarche, la recherche de l'ion 665 a été étendue à d'autres échantillons indépendants de cette étude. Le très grand nombre d'échantillons rassemblés de manière hebdomadaire tout au long de l'année sur tout le littoral par la surveillance sanitaire liée au dépistage des toxines lipophiles dans les coquillages nous a permis de sélectionner un échantillonnage varié (régions, dates, toxicités) de matrices de glandes digestives de moules. Dix nouveaux échantillons, dont quatre échantillons contaminés par diverses toxines toujours de type lipophiles et six échantillons non toxiques, préalablement lyophilisés et extraits à l'identique que les quatre échantillons de départ ont ainsi été analysés (tableau 2).

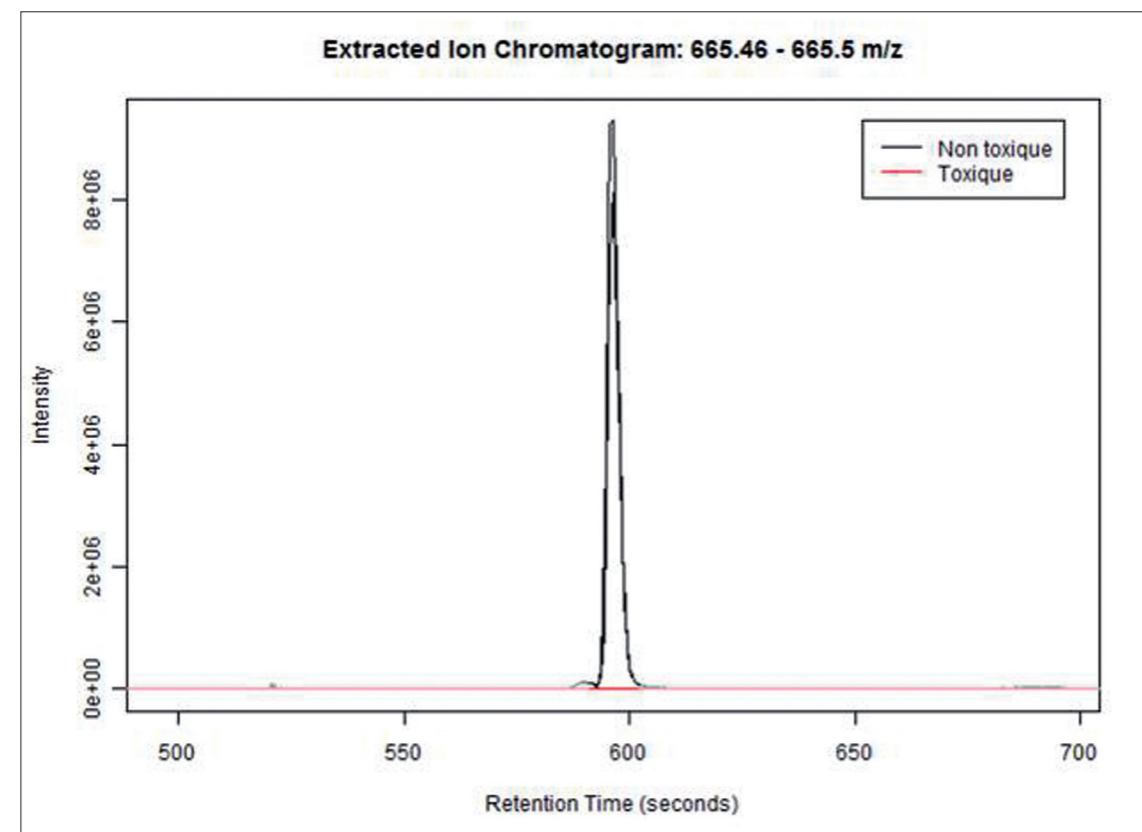
Sur les dix échantillons « tout venant » considérés (quatre toxiques/six non toxiques), neuf ont confirmé l'hypothèse précédemment émise concernant l'ion particulier $m/z = 665$. Nous avons en effet retrouvé l'ion $m/z = 665$ dans cinq échantillons non toxiques et il était bien absent dans quatre des échantillons toxiques.

Cependant, un échantillon prélevé en 2011 (identifiant 11/254) a montré l'absence de cet ion 665 alors que selon notre hypothèse celui-ci aurait dû être présent. Bien que le constat le plus fréquent émis lors des conclusions d'une approche métabolomique fasse état de l'importance de l'homogénéité de la cohorte d'échantillons sélectionnés (16) et de la facilité de compréhension qu'apportent des approches menées dans un cadre d'expérimentation contrôlées (ce qui n'est pas le cas avec les échantillons de la surveillance sanitaire qui sont d'une grande variabilité inter individuelle (environnement, âge, sexe), nous avons tenté de comprendre ce qui avait pu générer cette inversion.

L'échantillon « 11/254 » issu de « La Pointe de Saint Quentin » (département 50), est un site pollué

Figure 3

Chromatogramme d'ion extrait (EIC) de l'ion $m/z=665,49$ montrant une présence dans l'échantillon contrôle non toxique (en noir) et une absence dans l'échantillon toxique prélevé en 2009 (en rouge).



Identifiant	Matrice	Lieu de prélèvement	Date de prélèvement	Statut
10/1003	Moule	Diana Centre (Corse)	07/09/2010	Toxique
10/733	Moule	Le Scoré (Bretagne)	01/07/2010	Toxique
10/1030	Moule	Le Scoré (Bretagne)	09/09/2010	Toxique
10/060	Moule	Diana Centre (Corse)	08/02/2010	Toxique
11/247	Moule	Ingril Sud (Hérault)	11/04/2011	Non Toxique
11/254	Moule	Pointe de St Quentin (Somme)	11/04/2011	Non Toxique
10/001	Moule	Lazaret (Toulon)	04/01/2010	Non Toxique
10/051	Moule	Le Grand Traict (Pays de Loire)	02/02/2010	Non Toxique
10/078	Moule	Kervoyal (Bretagne)	15/02/2010	Non Toxique
10/100	Moule	Le Grand Traict (Pays de Loire)	02/03/2010	Non Toxique

Tableau 2

Récapitulatif de la provenance et de la toxicité des dix échantillons analysés dans la seconde phase de l'étude

Tableau 3

Tableau récapitulatif concernant la présence de toxines réglementées (en µg/kg) dans les dix échantillons de la surveillance sanitaire et considérés dans la seconde phase de l'étude (mesures par couplage LC-MS/MS) <LD : inférieur au seuil de détection.

Nom	Lieu de prélèvement	AO total	YTXs	SPXs	PTXs	COOH YTX	Toxicité Globale
11/254	Pointe(sud) de St Quentin	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
10/051	Le Grand Traict	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD
10/001	Lazaret	<LD	<LD	<LD	3	<LD	<LD
10/100	Le Grand Traict	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
10/078	Kervoyal	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD
11/247	Ingril sud	26	<LD	<LQ	<LQ	<LD	26
10/060	Diana centre	140	<LQ	4	27	<LD	171
10/733	Le Scoré	853	84	9	<LD	<LD	946
10/1003	Diana centre	33	93	2	<LQ	14	142
10/1030	Le Scoré	39	80	3	<LD	12	134

de manière significative par des contaminants de l'environnement du type organochlorés. Ici, l'absence de notre biomarqueur potentiel (l'ion 665), pourrait donc être le fait d'un échantillon ayant subi une pollution autre que celle provoquée par des toxines marines. En effet, si l'ion 665 est un candidat potentiel présent chez la moule qui disparaît en cas de toxicité, il se pourrait qu'un autre type de substance ou qu'un autre facteur environnemental puisse induire un effet similaire. Nous sommes donc revenus en détails sur des facteurs ayant contribué à donner le bio-essai négatif pour cet échantillon particulier. Dans le récapitulatif des toxines ayant été quantifiées dans le cadre de la surveillance réglementaire (tableau 3) au laboratoire Phycotoxines, on remarque qu'en effet, aucune des toxines réglementées n'a été détectées (méthodes de mesure ciblées par couplage LC-MS/MS).

Pour comprendre l'origine de la réponse négative du bio-essai « 11/247 » une enquête a été menée auprès des services sanitaires. En parallèle au réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY), le REMI, Réseau de contrôle microbiologique des zones de production conchylicoles, indique que le jour du prélèvement (11/04/2011) de l'échantillon « 11/247 », deux autres prélèvements réalisés quelques centaines de mètres plus au Nord et plus au Sud de la Pointe de Saint Quentin ont donné des tests souris positifs.

Ce complément d'information, renforce l'hypothèse de la présence d'un ion 665, marqueur potentiel d'une « non-toxicité générale », et signalerait bien plus une modification du métabolisme de la moule. La présence de l'ion 665 pourrait alors être relative à un stade de contamination, plutôt qu'à la présence de toxines dans la glande digestive de la moule.

En conclusion, notre hypothèse de départ est vérifiée, pour une même matrice (moules), sur au moins sur une douzaine d'échantillons incluant une grande variabilité. Si notre étude mérite aujourd'hui d'être étendue à un ensemble plus important de prélèvement, afin de confirmer le caractère pertinent de ce biomarqueur potentiel, nous avons souhaité pousser plus loin la pertinence de ce candidat en engageant un travail d'élucidation structurale pour ce composé.

La recherche de l'ion 665.49 dans les principales bases de données disponibles et accessibles sur Internet a conduit à une structure potentielle, correspondant à l'un des isomères du HODE cholesteryl ester. La recherche des différents isomères possibles de ce composé (notamment 13(S) ou 9(S)) commercialement disponibles en standard, puis des essais de fragmentation en spectrométrie de masse en tandem afin de collecter d'autres informations structurales sont en cours afin de confirmer la structure de ce candidat.

IV - Conclusion

Les premiers résultats obtenus indiquent la possibilité de mettre en évidence des biomarqueurs exprimés de façon différentielle dans les échantillons contrôlés et toxiques, avec la présence d'ions discriminants très marqués, caractéristiques d'un groupe d'échantillons particulier (toxique ou non toxique).

Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'existence d'une signature associée aux échantillons « conformes ». En particulier, l'ion $m/z = 665$ pourrait être particulièrement intéressant en tant que marqueur d'une absence de toxicité. Ce résultat est très prometteur car, au-delà d'une détection de toxines particulières, ce composé ne semble pas dépendant de la nature exacte de la toxine impliquée dans la contamination. Ce biomarqueur potentiel pourrait donc correspondre à une molécule présente de façon endogène dans la glande digestive de la moule et serait donc un marqueur assez générique des moules non toxiques.

Cependant, ces essais ont pour l'instant été réalisés sur un nombre restreint d'échantillons. Par la suite, il sera nécessaire d'effectuer de nouvelles

étapes de validation de ces résultats afin de définir le domaine ainsi que les conditions d'applicabilité de la méthode.

Puisque l'hypothèse de départ concernait la recherche de substances de structures proches de celles de toxines connues, nous nous sommes avant tout focalisés sur une fraction particulière des extraits préparés. Cependant, les deux autres fractions d'élution obtenues à chaque préparation des échantillons restent à étudier pour tenter de mettre en évidence d'autres types de molécules ou de toxines particulières.

De plus, un prétraitement des échantillons pourra également être mis en place, par exemple par une hydrolyse d'éventuelles formes estérifiées de toxines non accessibles à l'analyse dans les conditions actuellement utilisées.

Enfin, d'autres techniques d'analyse complémentaires pourront par la suite être envisagées afin de générer d'autres « images » du métabolome de la moule. Le couplage GC-MS en particulier pourrait être employé pour ce type d'analyse, mais il nécessitera une étude préliminaire concernant la préparation des échantillons et le retraitement des données.

REMERCIEMENTS

Cette étude a bénéficié du soutien financier de la Région des Pays de la Loire au travers d'un contrat de recherche lié aux projets COLNACOQ (2009-2012) et ChiMiMAR.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ANTIGNAC, J.P., F. MONDEGUER, F. MONTEAU, Z. AMZIL, B. LE BIZEC, and Development and application of a metabolomic approach based on liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry as new screening tool for assessing toxicity in oysters. in *7th International Conference on Molluscan Shellfish Safety*. 2009. Nantes, France.
- (2) FUX, E., D. MCMILLAN, R. BIRE, and P. HESS, Development of an ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins. *Journal of Chromatography A*, 2007. 1157(1-2):273-280.10.1016/j.chroma.2007.05.016
- (3) HESS, P., Requirements for screening and confirmatory methods for the detection and quantification of marine biotoxins in end-product and official control. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010. 397(5):1683-1694.10.1007/s00216-009-3444-y
- (4) ROSSINI, G.P. and P. HESS, Phycotoxins: chemistry, mechanisms of action and shellfish poisoning Molecular, Clinical and Environmental Toxicology, A. Luch, Editor. 2010, Birkhäuser Basel. p. 65-122.
- (5) OSEK, J., K. WIECZOREK, and M. TATARCZAK, Seafood as potential source of poisoning by marine biotoxins. *Medycyna Weterynaryjna*, 2006. 62(4):370-373
- (6) AMZIL, Z., M. SIBAT, F. ROYER, and V. SAVAR, First report on azaspiracid and yessotoxin groups detection in French shellfish. *Toxicon*, 2008. 52(1):39-48.10.1016/j.toxicon.2008.05.006
- (7) GERSSSEN, A., P.P.J. MULDER, and J. DE BOER, Screening of lipophilic marine toxins in shellfish and algae: Development of a library using liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2011. 685(2):176-185.10.1016/j.jaca.2010.11.036
- (8) THESE, A., C. KLEMM, I. NAUSCH, and S. UHLIG, Results of a European interlaboratory method validation study for the quantitative determination of lipophilic marine biotoxins in raw and cooked shellfish based on high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Part I: collaborative study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011. 399(3):1245-1256.10.1007/s00216-010-4383-3

- (9) SUZUKI, T. and M.A. QUILLIAM, LC-MS/MS Analysis of Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) Toxins, Okadaic Acid and Dinophysistoxin Analogues, and Other Lipophilic Toxins. *Analytical Sciences*, 2011. 27(6):571-584

- (10) ANTIGNAC, J.P., F. COURANT, G. PINEL, E. BICHON, F. MONTEAU, C. EL-LIOTT, and B. LE BIZEC, Mass spectrometry-based metabolomics applied to the chemical safety of food. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2011. 30(2):292-301.10.1016/j.trac.2010.11.003

- (11) PINEL, G., S. WEIGEL, J.P. ANTIGNAC, M.H. MOONEY, C. ELLIOTT, M.W.F. NIELEN, and B. LE BIZEC, Targeted and untargeted profiling of biological fluids to screen for anabolic practices in cattle. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2010. 29(11):1269-1280.10.1016/j.trac.2010.06.010

- (12) ROUX, A., Analyse du métabolome urinaire humain par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution. 2011, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI: Paris. p. 153.

- (13) REW, R. and G. DAVIS, NETCDF - AN INTERFACE FOR SCIENTIFIC-DATA ACCESS. *IEEE Computer Graphics and Applications*, 1990. 10(4):76-82.10.1109/38.56302

- (14) PEDRIOLI, P.G.A., J.K. ENG, R. HUBLEY, M. VOGELZANG, E.W. DEUTSCH, B. RAUGHT, B. PRATT, E. NILSSON, R.H. ANGELETTI, R. APWEILER, K. CHEUNG, C.E. COSTELLO, H. HERMIAKOB, S. HUANG, R.K. JULIAN, E. KAPP, M.E. MCCOMB, S.G. OLIVER, G. OMENN, N.W. PATON, R. SIMPSON, R. SMITH, C.F. TAYLOR, W.M. ZHU, and R. AEBERSOLD, A common open representation of mass spectrometry data and its application to proteomics research. *Nature Biotechnology*, 2004. 22(11):1459-1466.10.1038/nbt1031

- (15) CORETEAM, R.D., R: A language and environment for statistical computing, in *R Foundation for Statistical Computing, R.F.F.S.*, Editor. 2008, In Computing: Vienna, Austria.

- (16) ROUX, A., D. LISON, C. JUNOT, and J.-F. HEILLIER, Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. *Clinical Biochemistry*, 2011. 44(1):119-135.10.1016/j.clinbiochem.2010.08.016