

Stratégie de mesure non ciblée de type métabolomique (couplage LC-HRMS) pour identifier différents groupes de composés bioactifs accumulés dans les mollusques bivalves

Florence Mondeguer^{1*}, Jean-Philippe Antignac², Yann Guitton³, Fabrice Monteau², Sabrina Le Borgne², Philipp Hess¹

1 Ifremer - Laboratoire PHYCOTOXINES, - 44311 Nantes Cedex3
 2 LUNAM, Oniris, LABERCA - 44307 Nantes Cedex3
 3 Laboratoire SADV, IFR147 USTL, 59655 Villeneuve d'Ascq

E-mail : florence.mondeguer@ifremer.fr
 E-mail : jean-philippe.antignac@oniris-nantes.fr
 E-mail : yann.guitton@univ-lille1.fr



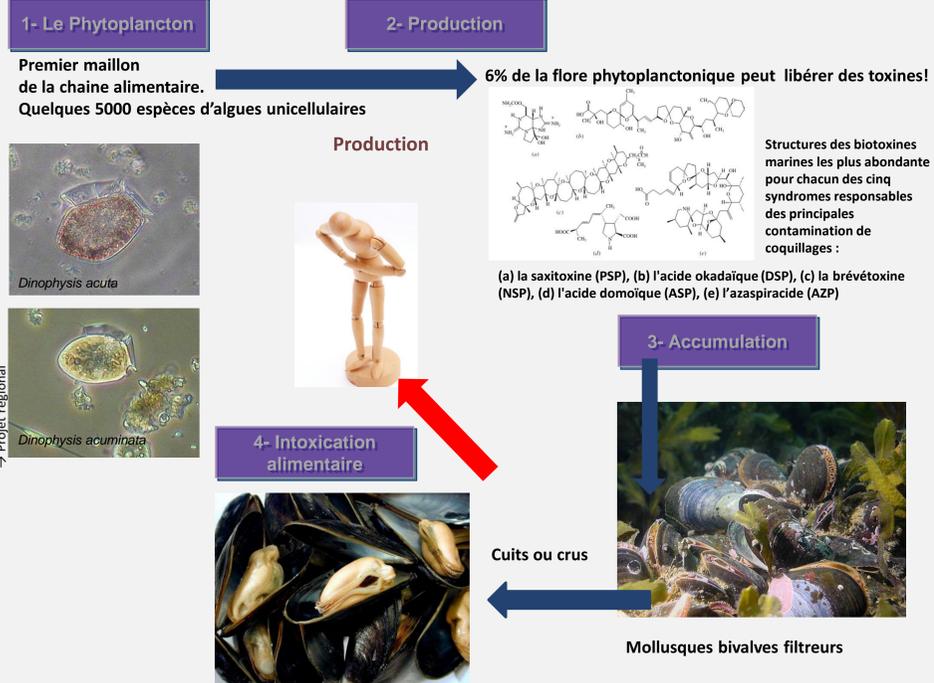
INTRODUCTION

LES TOXINES MARINES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

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 2 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 outils du contrôle sanitaire

1-Test de dépistage
 Test souris : Injection d'un extrait de glande digestive de moule à un lot de 3 souris (Test positif si mortalité d'au moins 2 souris en moins de 24h)
 - Test de Toxicité Global
 - Relativement Rapide
 - Non identification des toxines présentes
 - Non Ethique (standards actuels de bien être animal)

2-Test de confirmation
 Analyse LC-MS/MS : Mesure ciblée d'un nombre fini de toxines de structure connue
 - Détection Sensible et Spécifique
 - Quantification Précise des concentrations en présence
 - Nombre significatif de toxines connues non suivies
 - Pas de possibilité de détection de toxines encore inconnues

3-Nouvelle approche de dépistage proposée :
 -Profilage métabolomique

Protocoles développés

1-Préparation des échantillons
 Echantillon de moules certifié : Acide okadaïque, Dinophysistoxine 1
 Extraction liquide-liquide (DCM) : Difficultés de séparation, Pureté insuffisante
 SPE : phase normale, phase inverse
 Colonne SIOH : Difficultés à récupérer les composés d'intérêt
 Colonne C18 : Optimisation des conditions d'élution : F1 : 5 mL de MeOH/H₂O 10/90, F2 : 10 mL de MeOH/H₂O 80/20, F3 : 5 mL de MeOH 100%

2-Optimisation des paramètres de source
 MS: Hybride trappe linéaire - trappe orbitale (LTQ-Orbitrap, ThermoScientific)
 Acquisitions: (ESI+) et (ESI-) Résolution de 30000 (fwhm, m/z=400)
 Balayage complet (Full Scan) de m/z=65 à m/z=1000

Standard d'acide okadaïque
 Mi = 804.45 Da

Détection ion [M-H]
 Détection ion [M+Na]
 Détection ion [M+Na]
 Détection ion [M+Na]

1-Prise d'empreinte
 Echantillon Toxique vs Echantillon Non Toxique

2-Développement des conditions (LC/MS)
 La séparation chromatographique réalisée avec une pompe HPLC binaire Agilent 1200 (Palo Alto, USA) sur une colonne HypersilGold (ThermoFisher):
 - 1,9 µmC18-10 0mm x 2,1 mm
 - Volume d'injection: 5 µL
 - Débit et température: 0,4 mL.min⁻¹ et 40 °C.
 - La phase mobile: Eau (A) et Acétonitrile (B), contenant chacun 0,1% d'acide acétique.
 - Le gradient d'élution utilisé (A:B, v/v) : 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.

3-Retraitements des données
 Normalisation : « raw data » vers fichiers NetCDF
 Répartition des données selon leur appartenance à 1 groupe (Tox/non Tox)
 Data Processing: R-Xcms
 Choix des pics
 Regroupement des pics
 Alignement des chromatogrammes (Rt)
 Intégration des pics

4-Mise au point du «script»

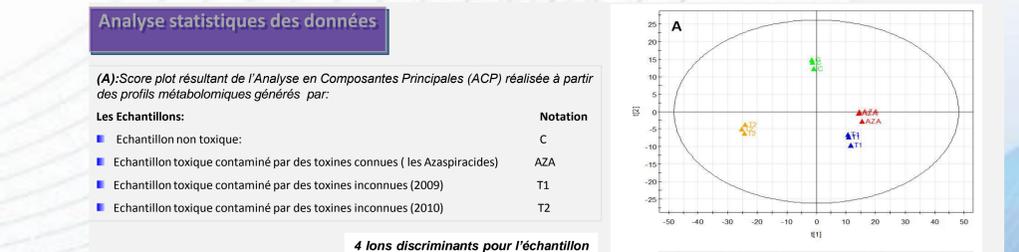
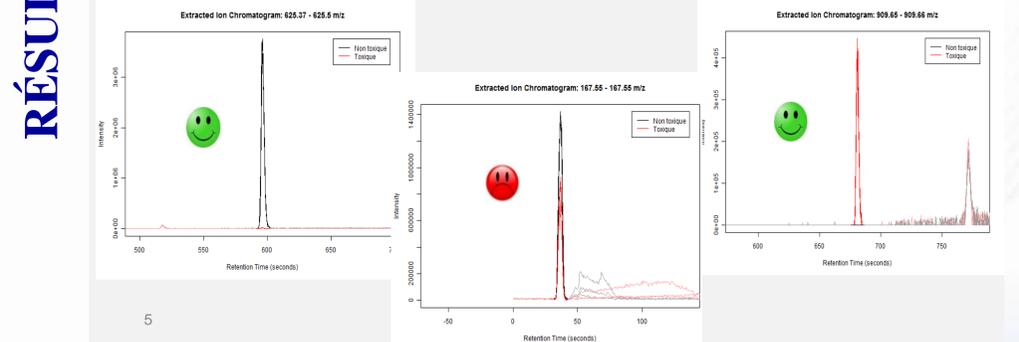
5-Génération de rapports contenant les résultats du retraitement

Description des signaux, indicateurs stat. Abondances dans les différents échantillons analysés

name	fold	tstat	pvalue	mzmed	mzmin	mzmax	rtmed	rtmin	rtmax	190511-80	190511-83	190511-86	190511-81
1	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
2	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
3	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
4	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
5	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
6	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
7	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
8	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
9	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
10	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
11	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
12	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
13	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
14	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
15	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
16	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
17	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
18	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
19	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
20	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
21	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
22	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157
23	1.00	0.00	1.00	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157	12.157

Résultats du retraitement : La sélection des ions

Groupes d'échantillons comparés	Modes d'ionisation: ESI+			Modes d'ionisation: ESI-		
	Non Toxique vs Toxité connue (AZAs)	Non Toxique vs Toxité atypique 2009	Non Toxique vs Toxité atypique 2010	Non Toxique vs Toxité connue (AZAs)	Non Toxique vs Toxité atypique 2009	Non Toxique vs Toxité atypique 2010
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	2	6	6	13	6	9



4 ions discriminants pour l'échantillon non toxique « C »

Les 4 ions repérés dans le cercle sur la Figure B 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.

Evaluation de la robustesse des 4 candidats biomarqueurs

- A partir des 4 échantillons (C, AZA, T1, T2) sur des extraits indépendants nouvellement préparés, six séries d'essais ont été réalisées sur une période de plus de trois mois.
- A partir de 10 échantillons variés (régions, dates, toxicités) de matrices de glandes digestives de moule rassemblées 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.

Un seul ion (m/z=665, T_r=10, 1 min) est donné comme caractéristique de l'échantillon non toxique (abondance, répétabilité)

CONCLUSION
 Les premiers résultats obtenus indiquent la possibilité de mettre en évidence des biomarqueurs exprimés de façon différentielle dans les échantillons contrôles 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. Ces 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 confirmer à plus large échelle.

Références : 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.