



Analyse non ciblée des biotoxines marines dans les produits de la pêche

Inès Dom

► To cite this version:

Inès Dom. Analyse non ciblée des biotoxines marines dans les produits de la pêche. Chimie analytique. Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France, 2018. Français. ⟨NNT : 2018IAVF0026⟩. ⟨tel-02941624⟩

HAL Id: tel-02941624

<https://pastel.hal.science/tel-02941624v1>

Submitted on 17 Sep 2020

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

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



HAL Authorization

NNT° : 2018IAVF0026

THESE DE DOCTORAT

Préparée à

L'Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (AgroParisTech)

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut Agronomique Vétérinaire et Forestier de France

Spécialité : Chimie Analytique

École doctorale n° 581

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

par

INES DOM

Analyse non ciblée des biotoxines marines dans les produits de la pêche

Directeur de thèse : **Thierry GUÉRIN**
Co-encadrement de la thèse : **Ronel BIRÉ**

Thèse présentée et soutenue à Maisons-Alfort, le 19 Décembre 2018 :

Composition du jury

Pr. Christine HERRENKNECHT	Université de Nantes	Présidente du jury
Dr. Jorge DIOGENE	IRTA, Espagne	Rapporteur
Pr. Eric MARCHIONI	IPHC, Strasbourg	Rapporteur
Dr. Marie-Yasmine DECHRAOUI BOTTEIN	Laboratoires de l'environnement de l'AIEA	Examineur
Pr. Rodolphe LEMEE	Laboratoire d'Océanographie de Villefranche	Examineur
Dr. Christophe JUNOT	CEA, Saclay	Membre invité
Dr. Ronel BIRE	Anses-LSAL, Maisons-Alfort	Membre invité
Dr. Thierry GUERIN	Anses-LSAL, Maisons-Alfort	Directeur de thèse

**Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments,
Département CHIMIE, Unité PBM**
14 rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

À RAJA...

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont d'abord aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'expertiser cette thèse malgré la charge de travail qui est la leur. Je suis particulièrement reconnaissante pour l'intérêt qu'ils y ont porté.

J'adresse mes remerciements aux membres du comité de pilotage (M. Philippe Hess, M. Christophe Junot, M. Jean Turquet et Mme. Audrey Combès) pour leur disponibilité, leur expertise et leur conseils avisés qui ont permis d'orienter au mieux les travaux de cette thèse.

Je tiens à remercier la direction de l'école doctorale Abies, M ALEXENDRE Pery , Mme Irina Vassileva, Mme Corine Fiers pour leur disponibilité et leur soutien.

J'ai eu la chance et le plaisir durant ces trois années de thèse de travailler au sein de l'unité UPBM du département Chimie du laboratoire de sécurité des Aliments de Maison-Alfort. Je tiens à exprimer ma reconnaissance à M. Laurent Laloux de m'avoir accueillie au sein du LSAL.

Je remercie également Mme Gwenaëlle Lavison-Bompard, chef de l'unité PBM pour son soutien et sa bienveillance.

Un grand merci du fond du cœur à toi Marina Nicolas (chef de l'équipe BM) d'avoir été là du début à la fin. Merci d'avoir toujours répondu présente et encore merci pour l'opportunité que tu m'as offerte de visiter le LEUE à Vigo, ET surtout merci pour ta gentillesse de maman.

Je tiens à adresser mes remerciements à mon directeur de thèse Thierry Guérin d'avoir accepté de superviser ce projet, d'avoir cru en moi, de m'avoir accompagnée avec bienveillance. Merci pour tes conseils avisés et d'avoir su m'écouter et me guider dans les moments de doute pour que je puisse mener à bien ce beau projet.

À toi le seul et unique RONEL, mon SUPER encadrent de thèse. Les mots me manquent pour t'exprimer ma gratitude et ma reconnaissance éternelles. Ce projet n'aurait pas vu le jour sans toi et je ne serais pas arriver au bout si ce n'était pas avec toi. Je ne pouvais espérer un meilleur encadrement. Je te remercie d'abord de m'avoir transmis ton savoir, ton expertise dans le domaine m'a été des plus précieuses. Merci pour ta rigueur scientifique, pour ta passion pour ton métier et ton implication corps et âme tous les jours weekends et vacances compris durant ces 3 années et demi que j'ai passé au labo. Merci d'avoir cru en moi mais surtout d'avoir été à la fois mon chef et mon ami. Merci d'avoir subi mes peurs, mes angoisses, mes folies sans jamais me juger. Merci pour tous les délires et les supers moments qu'on a pu partager. Cette thèse n'est pas que la mienne, elle est à nous deux !

Je tiens à remercier Sophie Mompelat (de l'unité Arc du laboratoire de Fougères) pour sa collaboration, sa disponibilité et sa bienveillance. Merci Sophie pour ta contribution sans ton expertise ces travaux ne seraient pas aussi intéressants.

Un immense merci à toi mon Super Vincent. Merci d'être la personne que tu es, merci d'avoir toujours répondu présent et de m'avoir toujours aidée et transmis tes connaissances scientifiques. Merci de m'avoir emmenée avec toi aux matchs de foot du midi qui m'ont permis de me défouler et rencontrer d'autres belles personnes. Tu es au top !

Mes remerciements vont au meilleur stagiaire de tous les temps, Christophe Roger pour son implication dans ce travail mais surtout d'avoir égayé mes journées durant ses 6 mois de stage. Je suis fier de ce que tu as accompli.

A mon trio de choc, Patricia, Kam-eng et Karelle avec qui j'ai passé le plus de temps dans ce labo et sans lesquelles je me serais vraiment ennuyée. Merci d'avoir été plus que des collègues mais des copines. Merci Pat pour ta sincérité, Kam-eng pour ta bonne humeur quotidienne et toi Karelle pour ton grand cœur.

Je ne peux passer sans remercier, mes collocs qui se sont succédés à mon bureau. :

Christine Delpont, tu es l'une de mes plus belle rencontres. Merci pour tout ce que tu m'as apporté, pour ta sagesse et ton soutien sans faille.

Maille ST-Hilaire, ta présence a allégé ma solitude dans cette aventure qui est la thèse. Merci à toi pour ton sérieux qui m'a toujours impressionnée et motivée à me surpasser.

Thomas Bertin, ton arrivée dans mon bureau a été l'un des meilleurs cadeaux que j'ai pu avoir cette dernière année. Merci d'être tout simplement toi.

Un grand merci à tous mes collègues du département Chimie pour leur gentillesse, leurs encouragements et leurs soutiens ; Hanene, Caroline, Antoine, Jacques, Marion, Marine, Sophie, Julien, Dry, Rachida, Nathalie, Alin, Petru, ...

Merci à tous les collègues de l'anses que j'ai pu croiser et avec qui j'ai pu échanger et en particuliers mes amis footers : François, Loïc, Vincent V, Marina, Tifenn, Stéphane, Yassine et tous les autres.

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagnée tout au long de ces années.

Merci à l'ensemble de mes amis qui m'ont supportée pendant cette période, qui m'ont toujours fait revenir à la réalité et permis de relativiser mais m'ont aussi aidée à garder une vie en dehors de la thèse. Un immense merci, en particulier à Sélima pour ta présence au quotidien, à Manu mon meilleur ami qui a su rester présent malgré la distance, à Fatma pour les coups de fil de débriefs matinaux, à Arwa, Momo, Ahlem, Amina, Myriam ...

Et enfin à toi Marc, comme tu le sais mieux que personne, j'ai traversé des moments si difficiles que plus d'une fois j'ai pensé que je ne verrais jamais le bout du tunnel. A chacun de ces moments, tu étais là pour me réconforter et m'aider à avancer. Je ne te remercierais jamais assez pour tout ce que tu m'as apporté. Du fond du cœur merci d'avoir été ma bouffée d'oxygène.

A vous mes très chers parents modèles, nul ne saurait exprimer à sa juste valeur ma gratitude, ma reconnaissance et le profond respect que je porte envers vous. Rien au monde ne pourrait compenser tout ce que vous avez fait pour moi. Que ce travail soit le témoignage de ma gratitude et de mon grand amour.

Je remercie également tous les membres de ma famille qui ont toujours été présents à mes côtés ; mes tantes, mes chères cousines (Fatma, Myriam, Cyrine et Mélissa), mon petit frère chéri Wassim pour sa douceur.

Last but not least, toute ma gratitude à ma moitié mon Roc, mon plus grand soutien de tous les temps, mon grand frère Houssein pour son amour inconditionnel. Sans toi ma vie ne serait pas la même.

À tous ceux que j'aurais malencontreusement oubliés,

MERCI !

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	1
TABLE DES MATIERES.....	4
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES ABBREVIATIONS	10
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	12
INTRODUCTION GENERALE.....	13
CHAPITRE I : ETAT DE L'ART.....	17
I. Les biotoxines marines	17
I.1. L'acide domoïque.....	19
I.2. Les saxitoxines	21
I.3. Les tétrodotoxines	24
I.4. L'acide okadaïque et les dinophysistoxines	26
I.5. Les azaspiracides.....	28
I.6. Les pecténotoxines	30
I.7. Les yessotoxines	31
I.8. Les brévétotoxines	33
I.9. Les imines cycliques	34
I.10. Les ciguatoxines et maïtotoxines	40
II. Aspects réglementaires et dispositifs de surveillance / veille d'urgence en France.....	42
II.1. Seuils réglementaires des biotoxines marines et méthodes d'analyse associées.....	43
II.2. Dispositif français de surveillance et de veille d'urgence	45
III. L'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.....	47
III.1. La détection par spectrométrie de masse.....	47
III.2. Les sources d'ionisation.....	48
III.3. La chromatographie liquide	54
III.4. Méthodes LC-MS décrites dans la littérature pour l'analyse des biotoxines	56
IV. Application de l'approche non ciblée pour l'analyse des composés émergents ou inconnus	69
IV.1. Principe général.....	69
IV.2. Traitement des données.....	74
IV.3. Analyses statistiques des données	76
CHAPITRE II : DÉVELOPPEMENT DES METHODES D'ANALYSE CIBLEE.....	78
A. Introduction	78
B. Développement de la méthode ciblée pour l'analyse des toxines lipophiles et l'acide domoïque par LC-HRMS	79
I. Matériels et Méthodes	79
I.1. Produits chimiques et réactifs	79

I.2.	Étalons et échantillons analysés	79
I.3.	Préparation des solutions de travail et des gammes d'étalonnage.....	80
I.4.	Préparation des échantillons.....	81
I.5.	Conditions d'analyse par LC-HRMS	81
I.6.	Acquisition et traitement des données ciblées.....	82
I.7.	Évaluation des performances de la méthode	83
I.8.	Application : Participation à l'EILA	86
II.	Résultats et discussion.....	88
II.1.	Développement de la méthode	88
II.2.	Évaluation des performances de la méthode quantitative	96
II.3.	Application de la méthode quantitative à des échantillons naturellement contaminés : Résultats de l'EILA du LRUE.....	101
C.	Mise en place d'une méthode ciblée pour l'analyse des toxines hydrophiles	102
I.	Matériels et Méthodes	102
I.1.	Produits chimiques et réactifs	102
I.2.	Solutions étalons	102
I.3.	Préparation des solutions de travail.....	103
I.4.	Préparation des échantillons.....	105
I.5.	Conditions d'analyse par LC-HRMS	106
II.	Résultats et discussions	108
D.	Conclusions	115
CHAPITRE III : MISE EN PLACE D'UNE APPROCHE NON CIBLEE POUR L'ANALYSE DES BIOTOXINES MARINES : PREUVE DE CONCEPT		117
A.	Introduction	117
B.	Traitement des données HRMS avec les logiciels constructeurs	117
I.	Matériels et Méthodes	117
I.1.	Produits chimiques et réactifs	117
I.2.	Préparation des échantillons et des solutions de travail	118
I.3.	Conditions d'analyse par LC-HRMS	119
I.4.	Acquisition et traitement des données.....	120
I.5.	Analyses statistiques des données	123
I.6.	Identification des composés d'intérêt.....	124
II.	Résultats et discussions	124
II.1.	Qualités des données acquises	124
II.2.	Évaluation des performances de l'approche « suspect screening ».....	125
II.3.	Évaluation de l'approche non ciblée sans a priori.....	127
II.1.	Conclusions	138
C.	Traitement des données HRMS logiciel open source : XCMS	141
I.	Matériels et Méthodes	141
I.1.	Préparation des échantillons et des contrôles qualité (QC).....	141

I.2.	Conditions d'analyse par LC-HRMS	142
I.3.	Traitement des données.....	143
I.4.	Analyses statistiques	144
II.	Résultats et discussions	145
II.1.	Traitement des données brutes.....	145
II.2.	Analyses statistiques des données.....	146
II.3.	Conclusions.....	154
D.	Investigation de cas de TIAC liés à la consommation de violets du genre <i>Microcosmus</i>	155
I.	Introduction	155
II.	Matériels et Méthodes	157
II.1.	Produits chimiques et réactifs	157
II.2.	Echantillons de violets du genre <i>Microcosmus</i>	157
II.3.	Conditions d'analyse par LC-HRMS	157
II.4.	Acquisition et traitement des données.....	158
III.	Résultats et discussion.....	158
IV.	Conclusions	163
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	164
	ANNEXES	169
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	198
	RÉSUMÉ.....	Erreur ! Signet non défini.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structures chimiques de l'AD et ses analogues (FAO, 2004)	20
Figure 2. Biotransformation des toxines paralysantes dans les coquillages	24
Figure 3. Structures des principaux analogues de TTX (Bane et al., 2016)	25
Figure 4. Structures chimiques des toxines du groupe de l'AO (Holmes and Teo, 2002)	27
Figure 5. Structure chimique des principaux azapiracides (Rehmann et al., 2008)	29
Figure 6. Structure chimique des pecténotoxines (Suzuki et al., 2003)	31
Figure 7. Structure chimique de quelques analogues de yessotoxines	32
Figure 8. Structure chimique des brevétotoxines (Baden et al., 2005)	34
Figure 9. Structure de quelques imines cycliques (McCarron et al., 2012; Miles et al., 2000; Selwood et al., 2010; Selwood et al., 2013; Sleno et al., 2004)	35
Figure 10. Structure de la palytoxine et ses analogues (Ciminiello et al., 2011b)	40
Figure 11. Structure chimique des ciguatoxines du Pacifique (P-CTXs) qui se différencient selon 2 types distincts (Type-1 et -2), ainsi que d'une ciguatoxine des Caraïbes (C-CTX-1) (Chinain et al., 2014)	41
Figure 12. Structure chimique de la maitotoxine (MTX) (Nonomura et al., 1996)	42
Figure 13. Principe de l'ionisation par électrospray	49
Figure 14. Représentation schématique d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle	51
Figure 15. Représentation d'un analyseur Q-ToF (Sciex) (Andrews et al., 2011)	53
Figure 16. Schéma d'un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific).	54
Figure 17. Les différentes étapes d'une analyse non-ciblée par spectrométrie de masse à haute résolution (adapté de la thèse de K. Slimani)	70
Figure 18. Stratégies d'analyses des données HRMS (adapté de Krauss et al. (2010))	71
Figure 19. Optimisation du gradient d'élution. a) gradient initial, b) chromatogramme obtenu dans les conditions initiale (ESI+), c), gradient optimisé, d) chromatogramme obtenu avec le gradient optimisé (ESI+)	91
Figure 20. Comparaison des réponses des toxines analysées en ESI+ et ESI- aux deux compositions de phases mobiles testées	93
Figure 21. Chromatogrammes représentatif de la séparation des toxines analysées dans les conditions finales (zoomé) : (a) ESI+ et (b) ESI-	93
Figure 22. Variation des erreurs de masses (ppm) pour les toxines analysées dans les deux modes d'ionisation, déterminées pour cinq injections par jour (3 jours sur 2 semaines) ; (a) : erreurs de mass en ppm et (b) précision intra et inter journalière de la mesure de la masse.	96
Figure 23: Effets matrice observés pour les différentes toxines analysées dans des extrait de moules et d'huîtres	99
Figure 24. Z-scores obtenus pour les échantillons analysés dans le cadre de l'EILA	101
Figure 25. Protocole d'extraction et de purification pour les toxines hydrophiles (selon Boundy et al., 2015)	105
Figure 26. Transfert de méthode avec le logiciel HPLC calculator	109
Figure 27. Séparation des toxines en mode d'ionisation positif	111
Figure 28. Séparation des toxines en mode d'ionisation négatif	112
Figure 29. Chromatogramme d'ions extraits (en ESI+) correspondant à l'extrait (a) brut sans purification et (b) après purification de l'échantillon de moule supplémenté	114
Figure 30. Taux de récupération calculés pour l'échantillon de moule supplémenté après purification utilisant les deux gammes d'étalonnage en solvant et en matrice	115
Figure 31. Paramètres de confiance définis pour le suspect screening	121
Figure 32. Paramètres d'extraction des pics (Masterview TM)	122
Figure 33. Screening comparatif, échantillon contaminé (chromatogramme en haut à gauche) vs échantillon de contrôle (chromatogramme en haut à droite) avec MasterView TM	128
Figure 34. Étapes d'identification d'un composé inconnu (exemple : SPX1) : 1- Recherche de la formule brute dans ChempSpider à partir du spectre TOF-MS, comparaison des profils	

isotopique, 2- Confirmation de la structure par comparaison du spectre de fragmentation acquis avec le spectre de fragmentation théorique (<i>in silico</i>).....	131
Figure 35. Nombre de signaux restant à identifier manuellement après analyse statistique (t-test) préalable pour les différents niveaux de dopage	134
Figure 36. Scores plot obtenu après l'analyse ACP des données générées en ESI+ pour les échantillons de moules, d'huîtres et les solutions multitoxines dans le MeOH.....	136
Figure 37. Scores plot obtenu après l'analyse ACP-DA des données générées en ESI+ pour les échantillons de moules et d'huîtres.	137
Figure 38. Zoom sur le graphique des LAOdings plot (ACP-DA): les ions encerclés en bleu correspondent aux variables représentatives (points verts) du niveau le plus contaminé (L6). Les ions correspondant aux toxines d'intérêt sont marqués par des étoiles jaunes. Les trois chiffres indiqués à côté de chaque point vert (tels que 508.3 / 4.3 (378)) représentent respectivement la masse exacte, le temps de rétention et l'air du pic.	138
Figure 39. Workflow optimisé pour l'analyse des données LC-HRMS selon les trois approches : (i) screening ciblée, (ii) suspect screening et (iii) screening non ciblée sans a priori	139
Figure 40. Exemple d'une séquence d'injection.....	143
Figure 41. Alignement des pics avec le logiciel XCMS (fonction « rector »)	146
Figure 42. Tables de données générées avec le logiciel CAMERA.....	147
Figure 43. Représentation « scores plot » de l'ACP réalisée (a) pour l'ensemble des échantillons (moules, huîtres et CSJ) et (b) pour les échantillons de la matrice moule.....	148
Figure 44. PLS-DA 1 (a) sur l'ensemble des échantillons (moules, huîtres, CSJ) et PLS-DA 2 (b) sur les échantillons de la matrice moule.....	149
Figure 45. Représentation de la validation du modèle PLS-DA par des tests de permutations (k=1000) : (a) PLS-DA 1 (moules, huîtres et CSJ ensemble) et (b) PLS-DA 2 (moules). 150	
Figure 46. Boxplot (de gauche à droite : contaminé, contrôle et QC pool) et EIC des cinq ions déterminés par la PLS-DA comme étant les plus significatifs dans la discrimination des échantillons dopés et contrôles.....	153
Figure 47 : Violets du genre <i>Microcosmus</i> (a) entiers et (b) ouverts longitudinalement	155
Figure 48 : Symptômes associés aux TIA liées à la consommation de violets du genre <i>Microcosmus</i> . Cas recensés entre 2011 et 2014 par le CAPTVM et l'ARS.	156
Figure 49 : Scores plot obtenu après l'analyse ACP-DA des données générées en ESI+ pour les échantillons de violets.	160

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Structures des principales saxitoxines	21
Tableau 2. Seuils réglementaires et méthodes d'analyse (officielles et alternatives) des biotoxines marines dans les coquillages fixés par la législation européenne.....	43
Tableau 3. Pouvoir résolutif des différents analyseurs (Werner et al., 2008)	50
Tableau 4. Méthodes LC-MS des toxines hydrophiles (groupe de l'AD, STX et TTX).....	59
Tableau 5. Méthodes LC-MS pour l'analyse des toxines lipophiles	62
Tableau 6. Méthodes d'analyses LC-MS des palytoxines	66
Tableau 7. Méthodes LC-MS pour l'analyse des CTX.....	68
Tableau 8. Echantillons analysés dans le cadre de l'EILA pour la recherche des toxines lipophiles	86
Tableau 9. Echantillons analysés dans le cadre de l'EILA pour la recherche des toxines du groupe de l'acide domoïque.....	87
Tableau 10. Informations acquises pour les toxines analysées	95
Tableau 11. Limites de quantification (LQ) des différentes toxines dans le MeOH, les extraits de moules et huîtres.....	98
Tableau 12. Taux de récupération et précision de la méthode pour la matrice moules (n=6).....	100
Tableau 13. Solutions étalons.....	103
Tableau 14. Préparation des solutions de travail	103
Tableau 15. Gradient initial pour l'équilibrage de la colonne	106
Tableau 16. Gradient d'analyse pour la séparation des toxines	107
Tableau 17. Gradient final pour le rinçage de la colonne.....	107
Tableau 18. Paramètres de masse optimisés pour l'analyse des toxines hydrophiles	107
Tableau 19. Conditions chromatographiques optimisées	110
Tableau 20. Informations acquises pour les toxines hydrophiles analysées	113
Tableau 21. Concentrations des différents niveaux des gammes d'étalonnage en mmol/L.....	113
Tableau 22. Préparation des solutions d'ajout (SA).....	118
Tableau 23. Préparation des extraits de moules et d'huîtres supplémentés (N)	119
Tableau 24. Conditions chromatographiques	119
Tableau 25. Paramètres de masse.....	120
Tableau 26. Tableaux récapitulatifs des résultats de l'extraction des données avec le logiciel MasterView pour les échantillons d'huître :	132
Tableau 27. Identification des toxines pour les différents niveaux de contamination par le logiciel MasterView™	132
Tableau 28. Résumé des résultats de la stratégie de réduction des données pour l'identification manuelle des signaux, après des étapes de préfiltrage et de comparaison par paires en utilisant le t-test avec comme facteurs discriminants la p-value et le log du fold-change.....	133
Tableau 29. Résultats du t-test pour l'identification des toxines en fonction du niveau de concentration étudié, par comparaison avec l'extrait non dopé (niveau N0).....	135
Tableau 30. Echantillons utilisés dans le cadre de l'étude	142
Tableau 31. Récapitulatif des niveaux de dopage et des contrôles utilisés	142
Tableau 32. Toxines et étalon interne (EI) utilisés pour doper les échantillons	142
Tableau 33. Extraction de la matrice des données issues de l'analyse PLS-DA.....	152
Tableau 34 : Cas de TIA en région Provence-Alpes-Côte d'Azur et en Occitanie entre janvier 2011 et mars 2014, associés à la consommation de violets.....	156
Tableau 35. Résumé des résultats de la stratégie de réduction des données pour l'identification manuelle des signaux, après des étapes de préfiltrage et de comparaison par paires en utilisant le t-test avec comme facteurs discriminants la p-value et le fold-change.....	161
Tableau 36. Liste des signaux retenus et formules brutes proposées par l'application Masterview™. Les ions issus des violets de France sont en bleu et ceux des violets de Croatie sont en noir. Les ions en gras ne sont présents que dans les violets contaminés	162

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACN : Acétonitrile
ACP : Analyse en Composantes Principales
AD : Acide domoïque
AO : Acide okadaïque
AOAC : Association of Official Agricultural Chemists
APCI : Atmospheric Pressure Chemical Ionisation; Ionisation chimique à pression atmosphérique
ASP : Amnesic shellfish poisoning
AZA : Azaspiracide
AZP : Azaspiracid Shellfish Poisoning
BTX : Brévétotoxine
CTX : Ciguatoxine
DART : Analyse directe en temps réel ; Direct Analysis in Real Time
DSP : Diarrhetic shellfish poisoning
DTX : Dinophysistoxine
EFSA : European Food Safety Authority; Autorité européenne de sécurité des aliments
EILA : Essai Inter-Laboratoires d'Aptitude
ESI : Ionisation par électrospray
FAB : Fast Atom Bombardment; Ionisation par bombardement d'atomes neutres
FAT : Fast Acting Toxins - Toxines à action rapide
FLD : Fluorimètre
FWHM : Full Width Half-height Maximum ; largeur à mi-hauteur
GTX : Gaunoyotoxines
GYM : Gymnodimine
H₂O : Eau
HAB : Harmful Algal Bloom
HILIC : Chromatographie à interaction hydrophile ; Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance ; High Performance liquid Chromatography
HRMS : Spectrométrie de masse haute résolution ; High Resolution Mass Spectrometry
IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
LC : Chromatographie en phase liquide ; Liquid Chromatography
LC-FLD : Chromatographie en phase liquide couplée à la fluorimétrie
LC-MS/MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LC-MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
LC-UV : Chromatographie en phase liquide couplée à la détection UV
LD : Limite de détection
LQ : Limite de quantification
LRUE : Laboratoire de Référence de l'Union Européenne
LWMS : Spectrométrie de masse basse résolution ; LRMS en anglais
m/z : Rapport masse sur charge
MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption ; Désorption-ionisation laser assistée par Matrice
MeOH : Méthanol

MRM : Multiple Reaction Monitoring
MS : Mass Spectrometry ; spectrométrie de masse
MTX : Maïtotoxine
OvTX : Ovatoxine
PLS-DA : Régression aux moindres carrés partiels-Analyse Discriminate ; Partial Least Squares-Discriminat Analysis
PITX : Palytoxine
PnTX : Pinnatoxine
ppm : Partie par million
PSP : Paralytic shellfish poisoning
PST : Paralytic shellfish toxin
PtTX : Ptériatoxine
PTX : Pecténotoxine
QC : Contrôle qualité ; Quality Control
QqQ : Triple-quadripôle
QTOF : Quadrupole-time of flight; Quadripôle- temps de vol
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire ; Nuclear Magnetic Resonance (NMR)
SPE : Solid Phase Extraction; extraction sur phase solide
SPX : Spirolide
STX : Saxitoxine
TIC : Courant ionique total ; Total Ion Current
TR : Temps de rétention
TSQ : Triple stage quadrupole; Triple-quadripôle
TTX : Tetrodotoxine
UHPLC : Chromatographie Liquide Ultra-Haute Performance; UHPLC en anglais
UV : Ultra-Violet
VIP : Importance de la variable pour la projection ; Variable Importance on the Projection
XIC : Extract Ion Chromatogram
YTX : Yessotoxine

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications

Dom I., Biré R., Hort V., Lavison-Bompard G., Nicolas M., Guérin T. Extended targeted and non-targeted strategies for the analysis of marine toxins in mussels and oysters by (LC-HRMS). *Toxins* 2018, 10, 375.

Communications orales

Dom I., Biré R., Hort V. Mompelat S. Nicolas M. and Guérin T. “Target and Non-target analysis of marine biotoxins in shellfish by LC-HRMS”. The 18th International Conference on Harmful Algae (ICHA), 21-26 octobre 2018, Nantes, France.

Dom I., Biré R. and Guérin T. “La spectrométrie de masse : alternative au bio-essai sur souris pour la veille d’emergences liées aux biotoxines marines”. Journées scientifiques et doctorales de l’Anses, 26 octobre 2017, Maisons-Alfort, France.

Dom I., Biré R. and Guérin T. “Non-targeted analysis of marine biotoxins in fishery products from mainland France and French Overseas territories”. ABIES Doctoral Days, 26-27 avril 2017, Paris, France.

Communications affichées

Dom I. Biré R., Nicolas M. and Guérin T. “Non-targeted analysis of marine biotoxins in fishery products from mainland France and French overseas territories”. International Conference on Molluscan Shellfish Safety (ICMSS), 14-18 mai 2017, Galway, Ireland.

Dom I., Biré R., Saint-Hilaire M. and Guérin T. “Développement d'une méthode non ciblée pour l'analyse des biotoxines marines par LC-HRMS”. 12ème congrès francophone des sciences séparatives et des couplages (SEP 2017), 28-30 mars 2017, Paris, France.

Dom I., Biré R., Nicolas M. and Guérin T. “Analyse ciblée et non ciblée des biotoxines marines par LC-HRMS”. Journée des doctorants, Anses, 06 octobre 2016, Maisons-Alfort (**Prix du meilleur poster**).

INTRODUCTION GENERALE

Bien que les analyses chimiques constituent l'un des piliers de la sécurité sanitaire des aliments, les méthodes classiquement employées se concentrent généralement uniquement sur les substances réglementées ou que l'on s'attend à retrouver. Le risque est élevé que de nouvelles contaminations ou des contaminations inattendues dues à des fraudes, des erreurs, des accidents, ou encore aux changements des conditions climatiques et environnementales quand il s'agit de composés naturels, aient lieu. En effet, l'analyse de routine n'a pas évité le scandale du lait contaminé en Chine en 2008 (Xin and Stone, 2008), car la mélamine ne figurait pas sur la liste des substances à contrôler à l'époque. En conséquence de l'adultération à la mélamine, près de 300 000 bébés sont tombés malades et 6 sont morts, comme l'a signalé le Ministère chinois de la Santé fin 2008 (Gossner et al., 2009). D'autres exemples plus récents de contamination alimentaire inattendue, préoccupante pour le consommateur ont été signalés ; c'est le cas des polyfluoroalkyles et perfluoroalkyles et de leurs produits de transformation dans l'eau potable aux États-Unis et dans plusieurs pays d'Europe (Ahrens and Bundschuh, 2014), notamment en Suède en 2012 (Banzhaf et al., 2017), ou encore le fipronil dans les œufs néerlandais disséminés en Europe en 2017 (Guardian, 2017). Ces incidents détectés que tardivement peuvent être expliqués par les limitations des méthodes dites ciblées employées classiquement dans le domaine de la sécurité alimentaire (Kunzelmann et al., 2018).

Les évolutions technologiques et les efforts analytiques ont conduit au développement de nouvelles stratégies d'analyse plus globales et sans a priori permettant de mieux appréhender les risques de contaminations émergentes et inattendues. Parmi ces nouvelles stratégies, qui viennent compenser les manques des analyses conventionnelles, on retrouve les approches non ciblées de type métabolomique basées sur la détection par spectrométrie de masse haute résolution. Ces approches mettent en jeu l'analyse d'un grand nombre de molécules organiques de petites tailles (< 1500 Da), à partir d'empreintes chimiques globales et d'outils

bio-informatiques de fouille de données (Junot, 2010) . Ce type d'approche globale, en fort développement dans les domaines d'analyse vétérinaire, pharmaceutique , environnementale, clinique etc. (Fiehn et al., 2015). est un outil encore peu exploité pour l'analyse des biotoxines marines (Mondeguer, 2015) qui sont pourtant responsables de 50 000 à 500 000 cas d'intoxication par an, avec un taux global de mortalité de 1,5% (Martinez I, 2005).

Les biotoxines marines sont produites par des microalgues, principalement des dinoflagellés, dont les populations peuvent proliférer, dans certaines conditions environnementales. Au cours de ces efflorescences, les biotoxines marines constituent un risque important pour la sécurité alimentaire lorsqu'elles s'accumulent dans des coquillages consommés par l'homme et qu'elles provoquent des syndromes divers (gastro-intestinaux, neurologiques etc...), pouvant aller jusqu'au décès dans les cas les plus graves. Pour protéger le consommateur, ces toxines sont soumises à des programmes de surveillance basés sur différentes méthodes d'analyses.

L'analyse des biotoxines marines a une histoire unique en ce sens qu'elle reposait jusqu'à tout récemment sur des tests biologiques. Les tests biologiques sur animaux (sur souris ou sur rats) ont été les premières méthodes officielles de recherche des biotoxines dans les produits de la pêche (Iverson et al., 1989; Krogh, 1979; Stabell et al., 1992). Bien qu'il soit considéré comme un détecteur universel par certains, ce type de test présente plusieurs inconvénients. Le manque de spécificité, le nombre élevé de résultats faussement positifs et faussement négatifs (Hess et al., 2006), ainsi que l'éthique douteuse d'un tel test (Combes, 2003), ont incité à adopter des méthodes d'analyse alternatives tels que les tests biologiques sur cellules, les tests enzymatiques, des méthodes immunologiques, et les tests physicochimiques basés sur la chromatographie liquide couplée à différents détecteurs : ultraviolet (UV), fluorescence (FLD) ou spectromètres de masse (MS). La tendance actuelle est de démocratiser les analyses ciblées par spectrométrie de masse qui ont gagné du terrain depuis quelques années et se sont montrées efficaces pour l'analyse et la quantification des toxines réglementées et attendues. Toutefois, ce type de méthodes, comme mentionné précédemment, est restrictif à un groupe prédéfini de molécules et ne permet pas d'appréhender le phénomène d'émergence des

toxines qui peut prendre différentes formes : (i) expansion géographique des toxines connues, (ii) apparition de nouveaux analogues de toxines connues ou encore (iii) l'apparition de toxines nouvelles.

C'est donc dans un contexte de besoin urgent de disposer de nouvelles approches suffisamment versatiles pour l'analyse aussi bien des toxines connues que la recherche de nouveaux analogues ou de composés inconnus que se positionne ce travail de thèse. En effet, il apparaît essentiel, au vu des quelques limitations affichées par les méthodes suscitées, d'améliorer et/ou de trouver des méthodes alternatives et/ou complémentaires pour assurer la sécurité des consommateurs.

Cette thèse vise répondre à cette attente en matière d'investigation de phénomènes de contamination connus ou émergents en mettant en œuvre une approche non-ciblée, innovante dans le domaine des biotoxines marines. Nous présentons dans ce manuscrit les résultats de ces travaux au travers de trois chapitres.

En premier lieu, ce manuscrit fait le point sur les données de la littérature et expose l'état des connaissances actuelles sur la structure, les effets biologiques, les législations en vigueur, les méthodes de détection des biotoxines marines, plus particulièrement par spectrométrie de masse, mais également sur le principe des approches non-ciblées.

Le deuxième chapitre est consacré au développement de méthodes ciblées utilisant des colonnes de phases inverse et HILIC pour l'analyse d'un grand nombre de toxines lipophiles et hydrophiles. Cette étape apparaît comme un prérequis pour la mise en place de la stratégie d'analyse non-ciblée visée, afin de s'assurer que ces méthodes ciblées sont efficaces, avec des critères de performances satisfaisants. Le dernier chapitre détaille la démarche entreprise pour la mise en place d'une stratégie analytique non-ciblée au travers d'une étude de preuve de concept. Les résultats de l'optimisation des deux approches de suspect screening et d'analyse sans a priori sont discutés en mettant l'accent sur les étapes de traitement employées pour l'exploitation de la quantité importante des données générée par LC-HRMS. Enfin, la méthodologie développée est appliquée pour l'investigation d'échantillons de violets impliqués dans des TIAC.

CHAPITRE I : ETAT DE L'ART

I. Les biotoxines marines

Les biotoxines marines sont produites naturellement lors de la prolifération d'algues nuisibles (HAB). Lorsque des conditions environnementales et climatiques favorables coïncident, les espèces de phytoplancton, principalement des dinoflagellés ou des diatomées, se reproduisent de manière exponentielle et libèrent des toxines potentiellement dangereuses. Les causes des HAB ne sont toujours pas claires. Cependant, les activités anthropiques et les changements climatiques ont contribué à l'augmentation récente de l'incidence de HAB dans les écosystèmes marins et d'eau douce, y compris dans des endroits inattendus (Hallegraeff, 2010). Parmi les milliers d'espèces de microalgues connues dans la nature, environ 100 produisent des toxines naturelles qui peuvent provoquer des intoxications ou même la mort chez l'homme et les animaux (Visciano et al., 2016). Ces toxines peuvent être de poids moléculaire petits ou élevés et présentent des caractéristiques chimiques et biologiques uniques. Dans tous les cas, les composés toxiques sont produits *de novo* par certaines microalgues photo ou mixo-trophiques, jamais par les coquillages. Ces micro-algues et toxines associées sont filtrées et concentrées par les mollusques, constituant une menace potentielle pour les consommateurs selon les concentrations en toxines accumulées (Nielsen et al., 2016).

Les épisodes d'intoxication chez l'homme dus aux biotoxines marines peuvent avoir une large gamme de symptômes liés au composé toxique spécifique. Les espèces appartenant au genre *Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Dinophysis* et *Pseudo-Nitzschia* sont les principaux producteurs de biotoxines marines (Farabegoli et al., 2018). Sur la base de symptômes provoqués, elles peuvent être classifiées comme toxines paralysantes (PSP, Paralytic Shellfish Poisoning), amnésiantes (ASP, Amnesic Shellfish Poisoning), diarrhéiques (DSP, Diarrhetic Shellfish Poisoning), neurotoxiques (NSP, Neurotoxic Shellfish Poisoning) et aussi toxines ciguateriques (CFP, Ciguatera Fish Poisoning). Toutefois, d'autres syndromes

supplémentaires existent, chaque type d'intoxication étant associé à un groupe spécifique de biotoxines (Nicolas et al., 2017).

Elles peuvent également être regroupées en fonction de leur mécanisme d'action en :

- neurotoxines agissant sur le canal sodique voltage-dépendant, telles que les brevéttoxines (BTX), responsables de NSP, les saxitoxines (STX), responsables de PSP et les tétrodotoxines (TTX) ;
- neurotransmetteurs excitateurs, tels que l'acide domoïque (AD) et ses analogues, qui se lient à des récepteurs spécifiques dans les neurones. Ces toxines sont responsables du syndrome ASP, qui comprend des symptômes gastro-intestinaux et/ou neurologiques (EFSA, 2009a) ;
- les IC à action rapide, telles que la gymnodimine (GYM), les spirolides (SPX) et les pinnatoxines (PnTX), bloquent les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine, ce qui conduit à nouveau à une paralysie musculaire (Otero et al., 2011) ;
- les toxines d'acides gras polyéthers telles que l'acide okadaïque (AO) et les dinophysistoxines (DTX), qui se sont avérées inhibitrices de protéines phosphatases *in vitro* (EFSA, 2008) ;
- les palytoxines (PITX), gros polyalcools hydrophiles, qui se lient à la membrane plasmique $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATPase}$, convertissant la pompe ionique en un canal ionique non spécifique, permettant ainsi un transport non contrôlé d'ions à travers la membrane plasmique (Ramos and Vasconcelos, 2010) ;
- les azaspiracides (AZA), pecténotoxines (PTX) et yessotoxines (YTX), dont le mécanisme de toxicité est inconnu.

En conclusion, selon leur structure chimique propre, on peut distinguer dix groupes de biotoxines marines à savoir les azaspiracides (AZA), les brevéttoxines (BTX), les imines cycliques (IC), l'acide domoïque (AD), les groupes acide okadaïque (AO), les pecténotoxines (PTX), les saxitoxines (STX), les yessotoxines (YTX), les palytoxines (PITX) et les tétrodotoxines (TTX).

Des directives et des législations ont été établies dans le monde entier pour le contrôle des biotoxines marines que l'on nomme également phycotoxines. Au 21^{ème} siècle, parmi les intoxications associées aux biotoxines marines, les plus répandues ont été les DSP et les CFP, sur la base des épisodes survenus dans le monde entier qui ont été signalés entre 2001 et 2015. Plus de 1200 intoxications identifiées ont été rapportées, la plupart en Europe, en Amérique du Nord et Amérique du Sud - le Chili affichant la plus forte incidence de DSP en Amérique latine - et également en Chine (Nicolas et al., 2017).

L'objectif de ce premier chapitre est de présenter une revue bibliographique la plus exhaustive possible sur les biotoxines marines que l'on trouve habituellement chez les invertébrés marins et leurs propriétés pertinentes, rassemblant des recherches à jour sur l'origine, les espèces où ils ont été trouvés, ainsi que leurs mécanismes d'action et principaux effets sur l'homme.

I.1. L'acide domoïque

L'acide domoïque (AD) est un acide aminé secondaire qui doit son caractère polaire à ses trois fonctions carboxyliques. C'est la molécule principale d'une famille de nombreux isomères et analogues (**Figure 1**) décrits dans la littérature (Clayden et al., 2005; Zaman et al., 1997).

L'acide domoïque est une neurotoxine isolée pour la première fois de la macroalgue rouge *chondria armata* (Takemoto and Daigo, 1958) qui était initialement connu pour ses propriétés insecticides et vermifuges (Maeda et al., 1984). Ce n'est qu'en 1987 que l'acide domoïque a été reconnu comme toxine responsable de cas d'intoxication amnésiante par les fruits de mer survenue sur l'île du Prince Edward au Canada suite à la consommation de moules (*Mytilus edulis*) contaminées (Perl et al., 1990; Wright et al., 1989). L'intoxication par l'AD provoque chez l'homme divers symptômes caractérisés par des vomissements, des crampes abdominales, des nausées et des diarrhées en plus des maux de tête, la confusion et la perte de mémoire.

L'AD est structuellement similaire au glutamate, un neurotransmetteur excitateur. Il se lie au récepteur glutamate d'acide kaïnique et le stimule au niveau du système nerveux central, ce qui permet un flux de Na^+ et une petite quantité de potassium provoquant une dépolarisation neuronale. Il agit principalement au niveau de l'hippocampe, qui est impliqué dans le traitement de la mémoire et des fonctions viscérales.

La microalgue associée à l'épisode de contamination sur l'île du Prince Edward est *Pseudo-nitzschia pungens*, un genre de diatomée pennée. Il existe plus de 10 autres espèces de diatomées productrices d'AD.

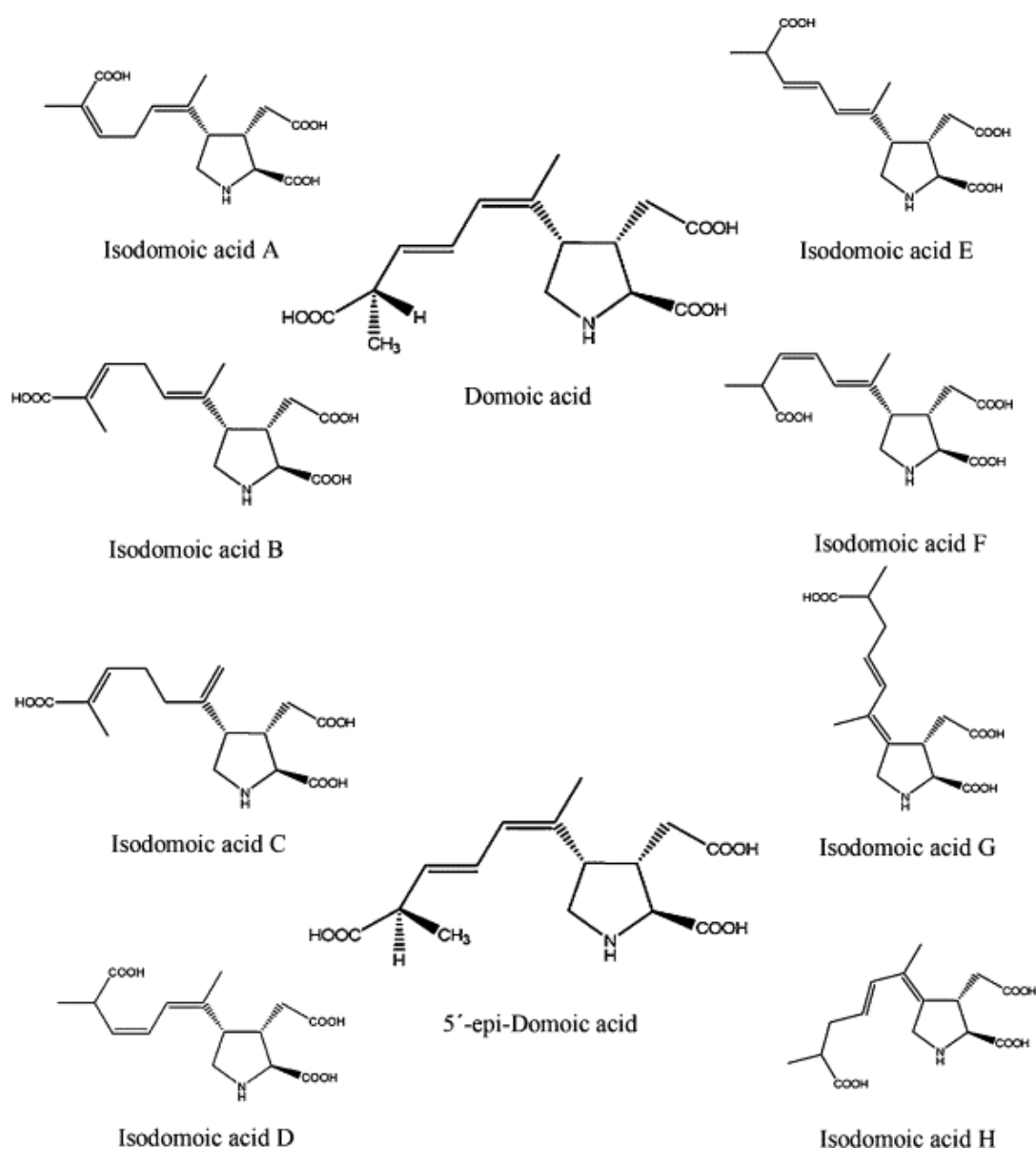
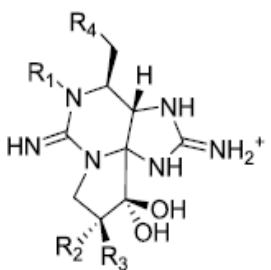


Figure 1. Structures chimiques de l'AD et ses analogues (FAO, 2004)

I.2. Les saxitoxines

La saxitoxine (STX) et sa cinquantaine d'analogues constituent un vaste groupe d'alkaloïdes neurotoxiques naturels, que l'on nomme de nos jours toxines du groupe de la STX, mais qui étaient plus communément appelées toxines paralysantes (PST) par le passé. Les PST ont une structure commune composée d'un noyau central tétrahydropurique (5,3,4,6-trialkyltétrahydropurine) sur lequel peuvent être greffés différents groupements fonctionnels conférant aux analogues des polarités et des toxicités variables. Les PST les plus courantes sont hydrophiles ; elles peuvent être non sulfatées, comme la STX et la néosaxitoxine (neoSTX), mono-sulfatées, comme les gonyautoxines (GTX 1-6), ou di-sulfatées (toxines C1-4). D'autres variantes décarbamoylées de ces analogues existent telles que les décarbamoyl-saxitoxines (dcSTX, dcneoSTX), les décarbamoyl-gonyautoxines (dcGTX 1-4), et les dérivés 13-désoxy-décarbamoyl (doSTX, doGTX 2,3). Trois familles structurales principales de STX sont distinguées sur la base de la chaîne latérale R4 en tant que N-sulfocarbamoyl, décarbamoyl ou carbamoyl. (**Tableau 1**). Les PST d'origine naturelle peuvent subir des biotransformations modifiant leur structure sous l'influence de divers facteurs biologiques donnant lieu à de nouveaux analogues (Wiese et al., 2010). (**Figure 2**).

Tableau 1. Structures des principales saxitoxines

	R1	R2	R3	Carbamate	décarbamate	N-sulfocarbamate
	H	H	H	STX	dcSTX	GTX5
	OH	H	H	NEO	dcNEO	GTX6
	H	OSO ₃ ⁻	H	GTX2	dcGTX2	C1
	H	H	OSO ₃ ⁻	GTX3	dcGTX3	C2
	OH	OSO ₃ ⁻	H	GTX1	dcGTX1	C3
	OH	H	OSO ₃ ⁻	GTX4	dcGTX4	C4
	R4			H ₂ N-OCO-	HO-	⁻ O ₃ S-NH-OCO-

Elles sont reconnues comme l'agent responsable d'une intoxication humaine bien connue sous le nom d'intoxication paralysante par les fruits de mer « Paralytic Shellfish Poisoning »

(PSP) (Sommer and Meyer, 1937). Les symptômes initiaux suite à la consommation de produits marins contaminés par des toxines du groupe de la saxitoxine sont de nature gastro intestinale et apparaissent dans les 30 à 60 minutes après l'ingestion. Ces symptômes peuvent être suivis par des troubles neurologiques plus graves sous forme de fatigabilité musculaire importante, convulsions, détresse respiratoire pouvant aller jusqu'à une paralysie complète entraînant la mort en l'absence d'assistance.

Les premières déclarations d'intoxication avec des symptômes similaires aux intoxications de type PSP remontent à 1927 sur la côte pacifique des États-Unis avec 102 personnes intoxiquées dont au moins 6 décédées (Schantz, 1969).

L'intoxication par les PST chez l'homme est expliquée par l'inhibition de la transmission nerveuse ; les saxitoxines agissent principalement en bloquant irréversiblement le site I des canaux sodium voltage dépendants. Elles empêchent ainsi la propagation du potentiel d'action le long du système nerveux entraînant une paralysie et dans certains cas la mort (Narahashi et al., 1967). Il a également été démontré que la saxitoxine bloque les canaux calcium (Su et al., 2004) et prolonge l'ouverture des canaux potassium des cellules du muscle cardiaque. La saxitoxine est reconnue comme l'une des toxines des plus puissantes à l'état naturel, avec une DL50 intrapéritonéale de 10 µg/kg de poids corporel chez la souris et une dose fatale de 1 mg chez l'Homme pour un poids standard de 70 kg (Wiese et al., 2010). En raison de leur caractère létal et de leur accessibilité, les saxitoxines sont répertoriées depuis 1993 dans la première liste de la convention d'interdiction des armes chimiques.

Ces toxines ont été détectées pour la première fois sur la côte pacifique des États-Unis en 1937 et décrites par (Schantz, 1969). Depuis, elles ont été trouvées dans de nombreux autres sites en Europe, au Chili, en Afrique du Sud, en Australie ainsi que dans d'autres pays (Krock et al., 2007; Pitcher et al., 2007; Robertson et al., 2004). Cela s'explique en partie par la mise en œuvre progressive de programmes de surveillance, qui se sont développés parallèlement au développement de la conchyliculture, mais aussi par l'expansion géographique des organismes producteurs de ces toxines (Van Dolah, 2000). En effet, les PST sont associés aux dinoflagellés marins (eucaryotes) et aux cyanobactéries d'eau douce (procaryotes), qui

peuvent former de vastes efflorescences dans le monde entier. Les dinoflagellés producteurs de PST appartiennent principalement aux genres *Alexandrium*, *Gymnodinium* et *Pyrodinium*. Plusieurs genres de cyanobactéries ont également été identifiés comme producteurs de ces toxines tels qu'*Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix* et *Lyngbya* (Dell'Aversano et al., 2005; Wiese et al., 2010).

Les saxitoxines sont accumulées et transférées via la chaîne alimentaire par l'intermédiaire de différents organismes vecteurs. Il s'agit notamment d'invertébrés filtreurs tels que les coquillages, crustacés et mollusques (Gainey, 1998) ainsi que d'autres vecteurs moins communs comme les gastéropodes et les poissons (Deeds et al., 2008). Ces organismes marins se nourrissant de phytoplanctons toxiques sont particulièrement résistants aux toxines et peuvent donc accumuler des niveaux dangereusement élevés en PST pour l'homme (Shumway and Cucci, 1987).

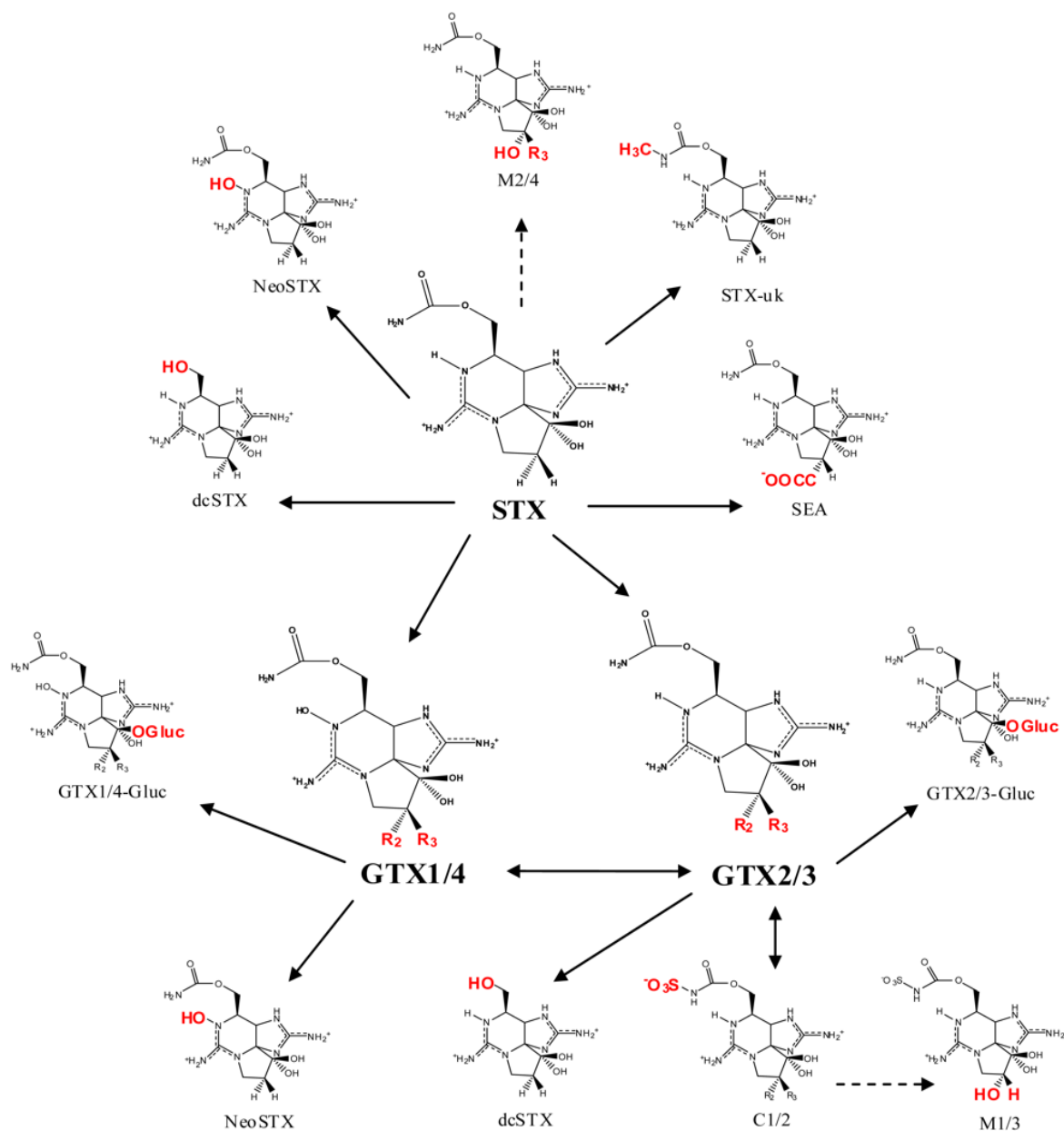


Figure 2. Biotransformation des toxines paralysantes dans les coquillages

Se référer au Tableau 1 pour les groupes R assignés. Les motifs surlignés en rouge indiquent une différenciation par rapport à la structure du STX. La ligne ininterrompue fait référence aux données expérimentales sur la conversion des toxines. La ligne brisée se réfère à la biotransformation putative basée sur l'analyse structurale (Wiese et al., 2010).

I.3. Les tétródotoxines

La tétródotoxine (TTX) est une neurotoxine extrêmement dangereuse avec une structure chimique et un mode d'action similaire à celui des saxitoxines (**Figure 3**). La TTX et ses analogues (**Figure 3**) sont responsables de l'intoxication avec le taux de mortalité le plus

élevé des intoxications marines courantes. Cette intoxication originellement associée aux poissons de la famille des tétrodons a été décrite depuis des siècles (Fuhrman, 1986; Kao, 1966). Suite à des empoisonnements récurrents au « fugu » espèce de poisson très prisée au Japon, le Dr Yoshizumi Tahara a mené des études pharmacologiques et a réussi en 1909 à identifier la TTX comme seul agent responsable de cette intoxication (Suehiro, 1994). Les intoxications par la TTX étaient principalement rapportées au Japon et quelques pays du sud-est de l'Asie (Bane et al., 2014). Mais durant la dernière décennie des occurrences en Europe ont été enregistrées (Cassiday, 2008; Rodriguez et al., 2008). La TTX a été retrouvée dans des espèces de poissons autre que le fugu mais aussi dans des crustacés, gastéropodes ainsi que chez certains vertébrés terrestres (Turner et al., 2015b). Contrairement aux autres familles de biotoxines marines, l'origine des TTX semble être incertaine même s'il a été démontré qu'elles sont produites par des bactéries endosymbiotiques dans le poisson globe (Lago et al., 2015).

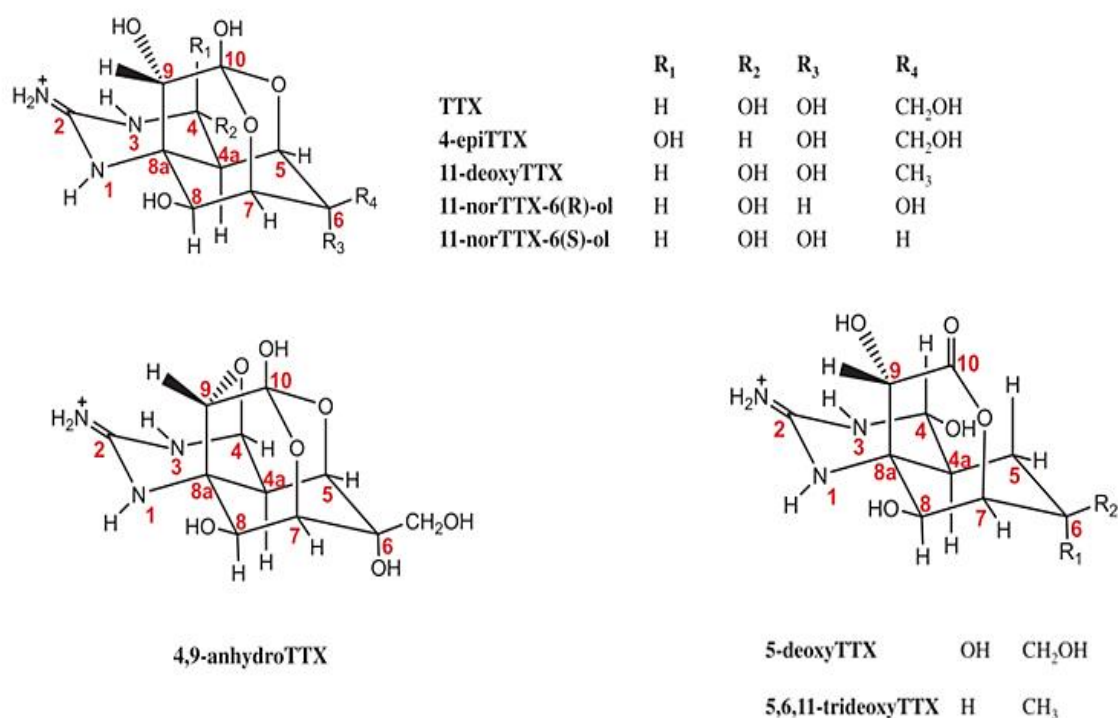


Figure 3. Structures des principaux analogues de TTX (Bane et al., 2016)

I.4. L'acide okadaïque et les dinophysistoxines

L'acide okadaïque (AO) et les dinophysistoxines (DTX) sont des polyéthers lipophiles qui se caractérisent par une fonction acide carboxylique et trois assemblages de cycles spiro-cétone. La DTX1 est le dérivé méthylé de l'AO, tandis que la DTX2 est l'isomère de l'AO. D'autres dérivés acyclés de type esters peuvent être formés par voie de métabolisation (Suarez-Gomez et al., 2001; Yasumoto, 1985) (**Figure 4**).

L'AO et les DTX sont les principales toxines responsables des intoxications diarrhéiques par les fruits de mer (DSP) qui se traduisent par des troubles gastro-intestinaux, diarrhées, crampes abdominales, nausées et vomissements. Ces symptômes apparaissent dans un délai de 30 minutes à quelques heures après la consommation de fruits de mer contaminés à des niveaux élevés (Amzil et al., 1992). Les premières intoxications de type DSP ont été répertoriées en 1961 aux Pays Bas (Bates S, 2006) puis décrites en détail en 1978 à la suite de la consommation de moules et de pétoncles contaminées au Japon (Stewart and McLeod, 2014; Yasumoto et al., 1987). On a assisté lors de ces vingt dernières années à une augmentation globale de la fréquence, de l'intensité et de la distribution géographique de ce type d'intoxication (Gerssen and Klijnsma, 2017). Aujourd'hui, des niveaux élevés d'AO et DTX sont fréquemment rapportés dans différentes autres régions du globe outre le Japon et les côtes Européennes, au Canada, en Amérique du Sud (Chili, Mexique), aux Philippines, en Australie et au Maroc (Elgarch et al., 2008b; García et al., 2005).

Chez l'homme, les toxines du groupe de l'AO agissent en inhibant les sérine et thréonine phosphatases PP1 et PP2A. Cette inhibition entraîne un dysfonctionnement de divers processus intracellulaires à l'origine des symptômes observés. Il a également été démontré par expérimentation animale que l'AO et la DTX1 sont des promoteurs tumoraux (Creppy et al., 2002). Cependant ce risque d'intoxication chronique n'est pas encore avéré chez les consommateurs de coquillages contaminés.

Initialement l'AO a été isolé de l'éponge *Halichondria Okadai* (Tachibana et al., 1981), la dinophysistoxine-1 (DTX1) isolée à partir de moules au Japon (Murata et al., 1982) et la dinophysistoxine-2 (DTX2) initialement isolée à partir de moules irlandaises (Hu et al.,

1992). Les dinoflagellés pélagiques du genre *Dinophysis* (ex : *D. acuta* et *D. acuminata*) (Reguera et al., 2014) et les espèces benthiques du genre *Prorocentrum* (ex : *P. lima* et *P. belizeanum*). (Granade et al., 1992) sont les principaux organismes identifiés comme producteurs d'AO et DTX. Ces toxines peuvent ensuite s'accumuler dans les moules, les huîtres, les palourdes, les coques et certains crustacés (EFSA, 2008)

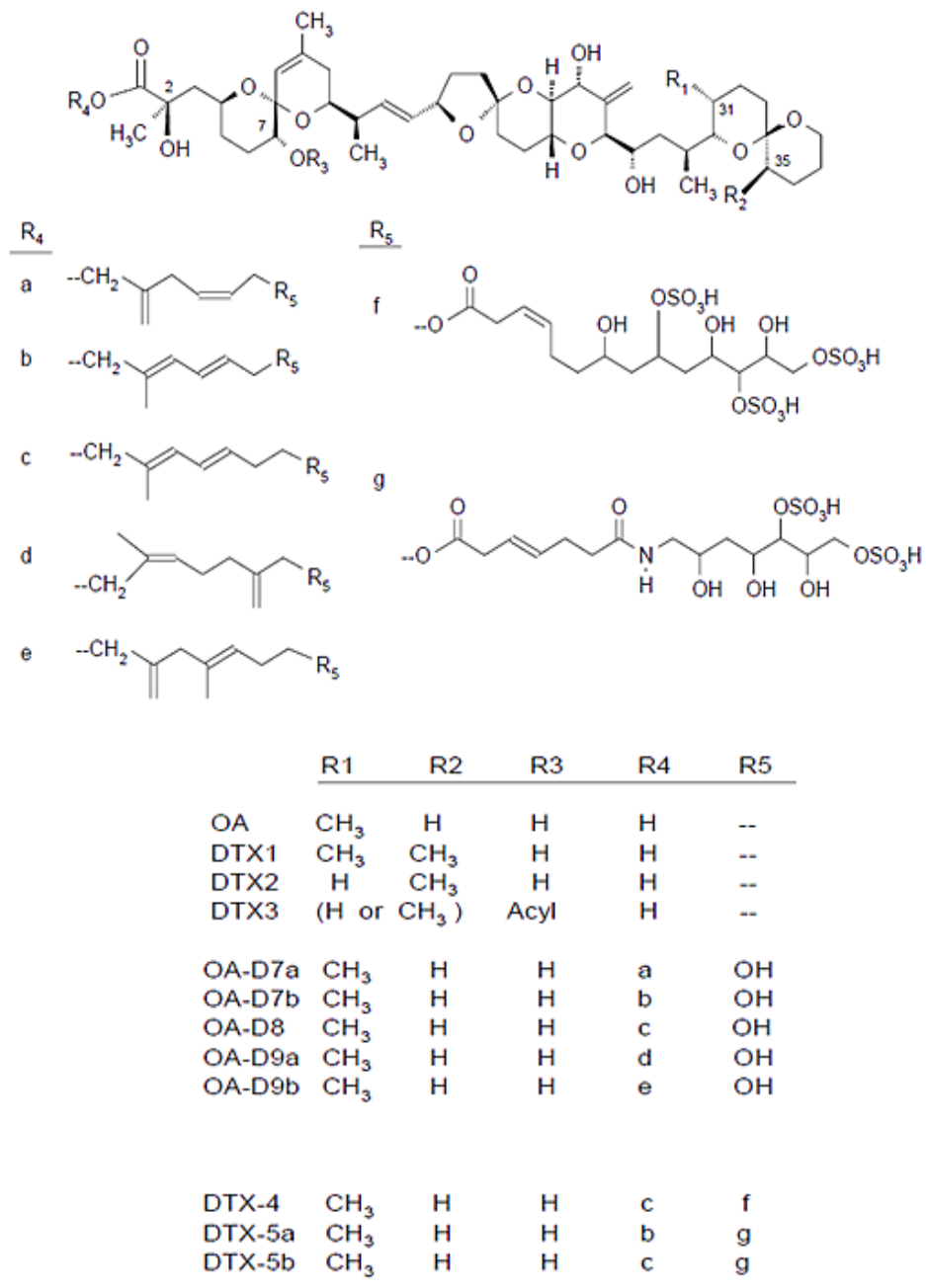


Figure 4. Structures chimiques des toxines du groupe de l'AO (Holmes and Teo, 2002)

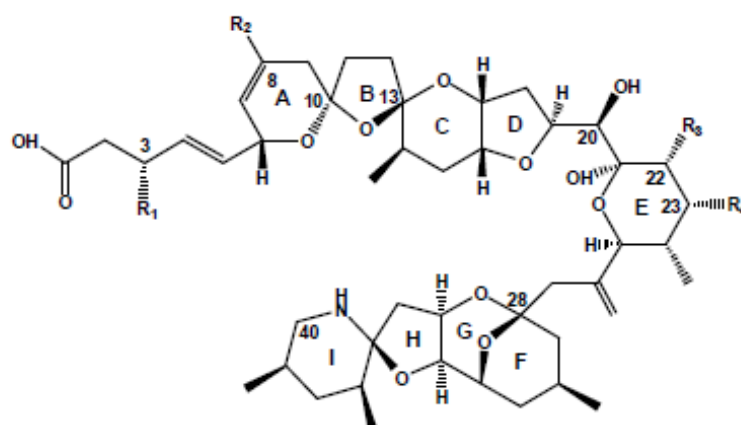
1.5. Les azaspiracides

Les azaspiracides (AZA) sont des toxines marines de type polyéther. Elles sont ainsi appelées à cause de leur structure chimique composée d'une amine cyclique (groupe AZA), un groupement tri-spiro et un groupe acide carboxylique (Twiner et al., 2008). Peu après la détermination de la première azaspiracide (AZA1), quatre autres analogues ont été découverts, AZA2 et AZA3 ne différant que par la position du groupe méthyle tandis que AZA4 et AZA5 sont des analogues hydroxyles de l'AZA3 (Hess et al., 2005). Ces dernières années, de nombreux autres analogues de l'AZA ont été identifiés, portant le nombre total d'analogues à une quarantaine de composés (**Figure 5**). Certains de ces analogues ne sont pas directement produits par des microalgues mais sont obtenus par biotransformation dans les coquillages. D'autres n'ont pas été identifiés comme contaminants dans les coquillages et sont donc considérés comme des artéfacts de stockage formés en solution méthanolique (Jauffrais et al., 2012).

Les AZA ont été associées pour la première fois à des intoxications humaines en 1995 lorsqu'aux Pays-Bas, au moins huit personnes sont tombées malades après avoir consommé des moules irlandaises importées de Killary Harbour (James et al., 2003). Les azaspiracides ont d'abord été assimilées au groupe des toxines diarrhéiques en raison des symptômes observés qui étaient similaires à ceux d'une DSP, à savoir des nausées, des vomissements, des diarrhées sévères, des douleurs stomacales (Krys and Frémy, 2002). Les essais biologiques chez le rat, normalement utilisés pour détecter les toxines de type AO, ont révélé la présence d'une activité toxique diarrhéique mais aucune toxine connue n'a été détectée laissant penser à un nouveau composé. Ce n'est qu'en 1998 que la structure de l'AZA1 fut élucidée à partir d'extraits purifiés des moules irlandaises contaminées. Le syndrome lié aux intoxications par les azaspiracides fut alors appelé azaspiracide shellfish poisoning (AZP). Le mécanisme d'action n'est pas encore entièrement compris, mais des expériences *in vitro* sur des lignées cellulaires de mammifères ont montré des altérations de la structure cytosquelettique et un effet sur le système E-cadhérine, qui est responsable des interactions

cellule-cellule (Ronzitti et al., 2007). Ces interactions pourraient expliquer les effets toxiques associés aux azapiracides.

Depuis leur découverte initiale, les AZA ont été successivement détectées en Irlande, au Royaume-Uni, en Norvège, en France, au Portugal, au Maroc, au Chili et aux États-Unis (Elgarch et al., 2008a; James et al., 2004; Torgersen et al., 2008). Ils sont principalement produites par de minuscules dinoflagellés toxiques des genres, *Azadinium spinosum*, et *Amphidoma* (Jauffrais et al., 2012).



Abbréviation	Nom	MM	R1 (C3)	R2 (C8)	R3 (C22)	R4 (C23)	R5 (?)
AZA1	Azapiracide	841,5	H	H	CH ₃	H	
AZA2	8-méthyle-azapiracide	855,5	H	CH ₃	CH ₃	H	
AZA3	22-desméthyle-azapiracide	827,5	H	H	H	H	
AZA4	22-desméthyle-3-hydroxy-azapiracide	843,5	OH	H	H	H	
AZA5	22-desméthyle-23-hydroxy-azapiracide	843,5	H	H	H	OH	
AZA6	22-desméthyle-8-méthyle-azapiracide	841,5	H	CH ₃	H	H	
AZA7	3-hydroxy-azapiracide	857,5	OH	H	CH ₃	H	
AZA8	23-hydroxy-azapiracide	857,5	H	H	CH ₃	OH	
AZA9	22-desméthyle-3-hydroxy-8méthyle-azapiracide	857,5	OH	CH ₃	H	H	
AZA10	22-desméthyle-23-hydroxy-8méthyle-azapiracide	857,5	H	CH ₃	H	OH	
AZA11	3-hydroxy-8-méthyle-azapiracide	871,5	OH	CH ₃	CH ₃	H	
AZA12	23-hydroxy-8-méthyle-azapiracide	871,5	H	CH ₃	CH ₃	OH	
AZA13	22-desméthyle-3,23-dihydroxy-azapiracide	859,5	OH	H	H	OH	
AZA14	3,23-dihydroxy-azapiracide	873,5	OH	CH ₃	H	OH	
AZA15	22-desméthyle-3,23-dihydroxy-8-méthyle-azapiracide	873,5	OH	H	CH ₃	OH	
AZA16	3,23-dihydroxy-8-méthyle-azapiracide	887,5	OH	CH ₃	CH ₃	OH	
AZA17	carboxy-22-desméthyle-azapiracide	871,5	H	H	H	H	COOH
AZA18	carboxy-azapiracide	885,5	H	CH ₃	H	H	COOH
AZA19	carboxy-22-desméthyle-8méthyle-azapiracide	885,5	H	H	CH ₃	H	COOH
AZA20	carboxy-8-méthyle-azapiracide	899,5	H	CH ₃	CH ₃	H	COOH
AZA21	carboxy-22-desméthyle-3hydroxy-azapiracide	887,5	OH	H	H	H	COOH
AZA22	carboxy-3-hydroxy-azapiracide	901,5	OH	CH ₃	H	H	COOH
AZA23	carboxy-22-desméthyle-3-hydroxy-8-méthyle-azapiracide	901,5	OH	H	CH ₃	H	COOH
AZA24	carboxy-3-hydroxy-8-méthyle-azapiracide	915,5	OH	CH ₃	CH ₃	H	COOH

Figure 5. Structure chimique des principaux azapiracides (Rehmann et al., 2008)

I.6. Les pecténotoxines

Les pecténotoxines (PTX) sont un groupe de toxines lipophiles qui comprend une quinzaine d'analogues composés de polyéthers lactones chimiquement neutres, également appelés macrolides. Les différents analogues résultent principalement des transformations métaboliques dans les mollusques : par exemple le groupement méthyle en position 43 de la PTX2 est progressivement oxydé en alcool (PTX1), en aldéhyde (PTX3) et en acide carboxylique (PTX6) alors que la forme seco-acide de la PTX2 (PTX2sa) résulte de l'hydrolyse de la fraction lactone avec une ouverture du macrocycle (Miles et al., 2004) (**Figure 6**).

Les PTX ont souvent été associées au groupe des toxines diarrhéiques (Yasumoto and Murata, 1993) de par leur origine commune. Elles sont en effet produites par les mêmes algues du genre *Dinophysis* principaux producteurs des toxines du groupe AO. Les PTX 1 et 2 ont été découvertes simultanément chez des pétoncles contaminées *Pactinopecten yessoensis* au Japon (Yasumoto, 1985). Depuis elles ont été mise en évidence dans différents types de coquillages dont les moules, les huîtres et les palourdes (EFSA, 2009b). Cependant leur toxicité chez l'homme n'a pas été confirmée.

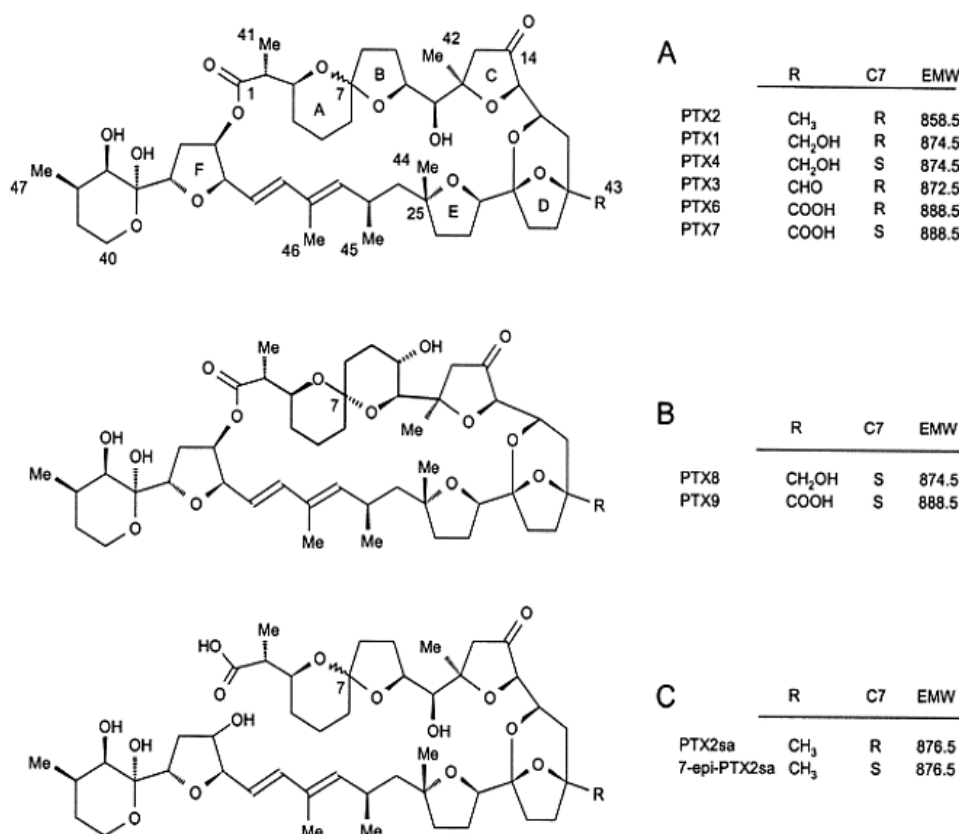


Figure 6. Structure chimique des pecténotoxines (Suzuki et al., 2003)

I.7. Les yessotoxines

Les yessotoxines (YTX) sont constituées d'un squelette unique en forme d'échelle de polyéthers polycycliques composés de 11 cycles accolés, d'une chaîne insaturée et de deux fonctions sulfate (**Figure 7**). La structure rigide de la chaîne cyclique présente un caractère apolaire qui est contrebalancé par les groupements sulfates polaires (Hess and Aasen, 2007). Une centaine d'analogues de la YTX a été identifiée dans un seul isolat de *P.reticulatum* (Miles *et al.*, 2005). Les analogues les plus fréquemment rapportés sont la YTX, la 45-hydroxy-YTX, et la carboxy-YTX.

À l'instar des pecténotoxines, les YTX ont souvent été retrouvées coexistant avec certaines DTX. Elles ont donc été d'abord regroupées avec les toxines diarrhéiques avant de prouver qu'elle ne sont impliquées dans aucune intoxication humaine (Tubaro et al., 2004).

Les YTX ont été découvertes pour la première fois en 1987 au Japon (Murata et al., 1987) dans des pétoncles contaminés. Plusieurs espèces de dinoflagellés productrices de yessotoxines ont été identifiées : *Prorocentrum reticulatum* a été le premier à être identifié (Satake et al., 1999) suivi de *Lingulodinium polyedrum* et *Gonyaulax spinifera* (Paz et al., 2004; Rhodes et al., 2006). Les YTX peuvent s'accumuler dans diverses espèces de mollusques bivalves filtreurs telles que les huîtres, les moules, les coquilles Saint-Jacques et les palourdes (EFSA, 2008). Leur présence a été mise en évidence dans de nombreux pays tel que le Japon, le Chili, la Nouvelle-Zélande, la Norvège et l'Italie (Aasen et al., 2005b; Draisci et al., 1999; Vale et al., 2008).

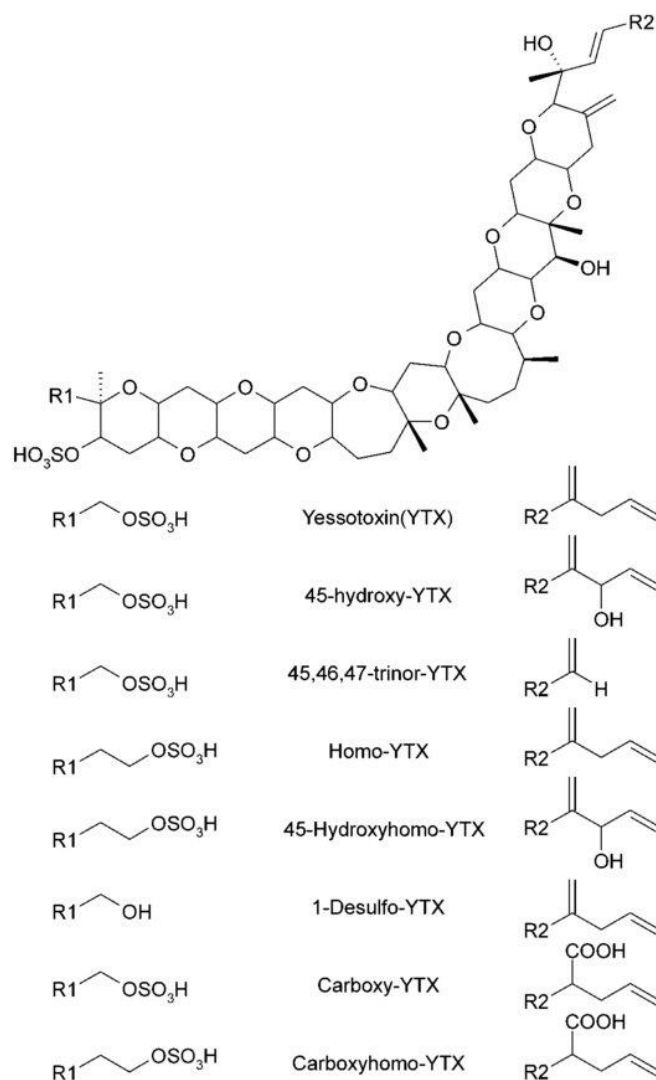


Figure 7. Structure chimique de quelques analogues de yessotoxines

[Toxic episodes in shellfish produced by lipophilic phycotoxins An overview](#)

I.8. Les brevéttoxines

Les brevéttoxines (BTX ou PbTX) sont des composés polyéthers cycliques lipophiles. Deux structures dorsales A et B (A possédant 10 cycles polyéthers accolés et 11 cycles pour B) sont à la base de tous les analogues connus de la brevéttoxines. Les brevéttoxines 1, 7 et 10 ont le squelette de type A tandis que les brevéttoxines 2, 3, 4, 5, 6, 8 et 9 ont le squelette de type B. La **Figure 8** montre un exemple de brevéttoxines de type A et de type B.

Elles sont responsables d'intoxication neurologiques connue sous le nom de NSP de l'anglais « Neurologic Shellfish Poisoning » et consécutive à l'ingestion de fruits de mer contaminés. Parmi les symptômes décrits chez l'homme figurent nausées, diarrhée, vomissements, douleurs abdominales, paresthésie, myalgie, ataxie, bradycardie, vertige et mydriase (Watkins et al., 2008). L'intoxication par les BTX peut également survenir par inhalation d'aérosols résultants du déferlement des vagues sur le rivage (Pierce and Henry, 2008) et entraîner des problèmes respiratoires et une irritation des yeux et des membranes nasales.

Les BTX agissent en se fixant au site 5 des canaux sodiques voltage-dépendant, ce qui entraîne une activation persistante des cellules neuronales, musculaires et cardiaques (Plakas and Dickey, 2010).

Les principaux organismes producteurs des brevéttoxines sont des dinoflagellés du genre *Karenia brevis*, *Karenia brevisulcatum*, *K. mikimotoi*, *K. selliformis*, and *K. papilionacea* (Daneshian et al., 2013).

Les BTX ont été mises en évidence de nombreuses espèces de mollusques dont les moules, les huîtres et les palourdes qui sont les principaux vecteurs de contamination chez l'Homme. Elles ont également été trouvées dans des pétoncles, des tuniciers et certaines espèces de poissons mais à des concentrations beaucoup plus faibles (FAO, 2004; Naar et al., 2007).

Les plus importants épisodes d'intoxication par les BTX ont été enregistrés en Nouvelle-Zélande entre 1992 et 1993. Des intoxications ont également été rapportées aux Etats-Unis (Golfe du Mexique) mais aucune présence de BTX n'a été signalée en Europe jusqu'à présent (Farabegoli et al., 2018).

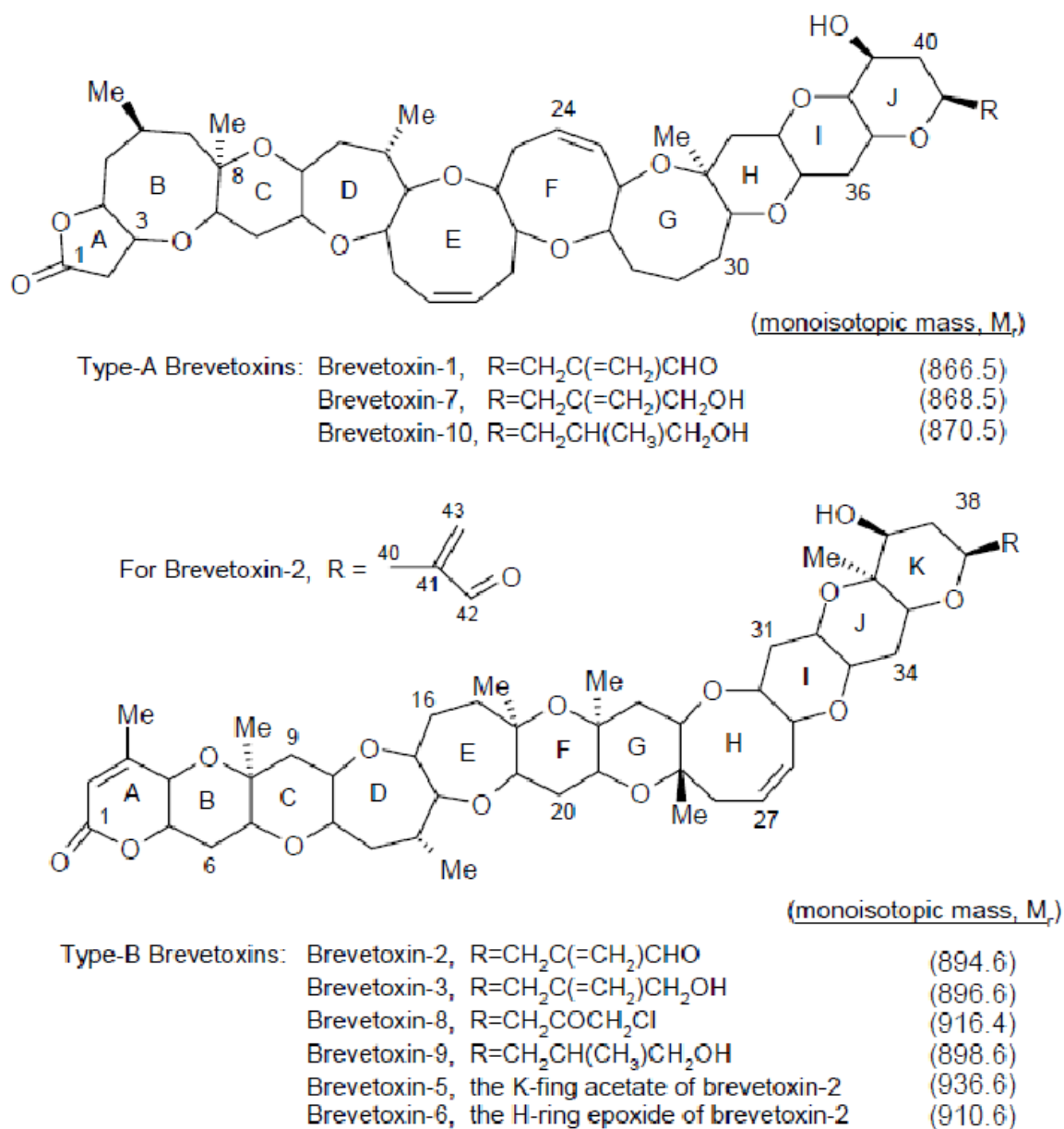


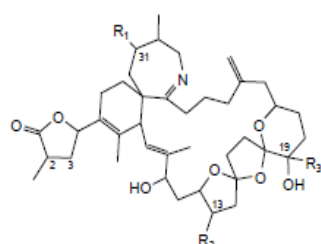
Figure 8. Structure chimique des brevéttoxines (Baden et al., 2005)

I.9. Les imines cycliques

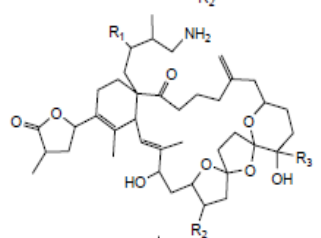
Les imines cycliques (IC) forment un groupe de biotoxines marines émergentes structurellement apparentées. Ce groupe comprend les spirolides, les gymnodimines, les pinnatoxines, les ptériatoxines, les prorocentrolides et la portimine (Selwood et al., 2013; Silva et al., 2015a) (**Figure 9**). La principale caractéristique commune de ces composés est la présence d'un macrocycle et d'une partie imine cyclique responsable de leurs activités biologiques. Le mécanisme d'action des imines cycliques n'est pas encore tout à fait élucidé.

Cependant leur toxicité aiguë évaluée par les bio-essais sur souris (BES), les classe dans la catégorie des toxines "à action rapide" ou en anglais « Fast Acting Toxins » (FAT) (Tindall, 1984). En effet, elles provoquent chez la souris l'apparition rapide de symptômes neurologiques suivis d'un décès en quelques minutes. Les congénères des spirolides sont les plus toxiques après l'injection intrapéritonéale, alors que les pinnatoxines sont considérées comme le groupe le plus toxique après l'administration orale.

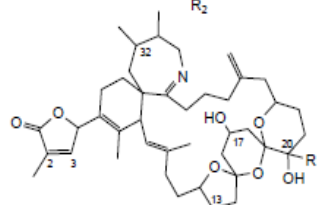
Spirolides



R ₁	R ₂	R ₃	$\Delta^{2,3}$	[M+H] ⁺	
H	CH ₃	CH ₃	✓	692.5	A
H	CH ₃	CH ₃	—	694.5	B
CH ₃	CH ₃	CH ₃	✓	708.5	C
CH ₃	CH ₃	CH ₃	—	708.5	D
CH ₃	H	CH ₃	✓	692.5	13-desMe-C
CH ₃	H	H	✓	678.5	13,19-didesMe-C

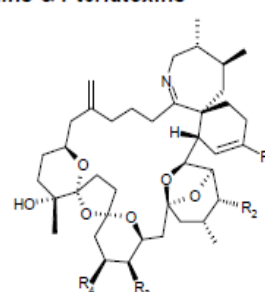


H	CH ₃	CH ₃	✓	710.5	E
H	CH ₃	CH ₃	—	712.5	F



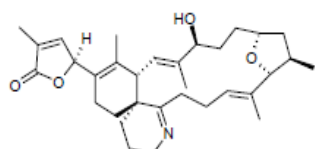
R	MW	
H	692.5	G
CH ₃	708.5	20-Me-G

Pinnatoxins & Pteriatoxins

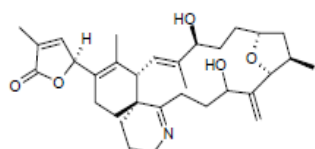


	R1	R2	R3	R4	[M+H] ⁺
Pinnatoxin A	COOH	OH	H	H	712.4
B	CH(NH ₂)COOH (S)	OH	H	H	741.5
C	CH(NH ₂)COOH (R)	OH	H	H	741.5
D	COCH ₂ CH ₂ COOH	H	OH	CH ₃	782.5
Pteriatoxin A	CH(OH)CH ₂ CH ₂ CH(NH ₂)COOH	OH	H	H	831.5
B,C	CH(CH ₂ OH)CH ₂ CH(NH ₂)COOH	OH	H	H	831.5

Gymnodimines

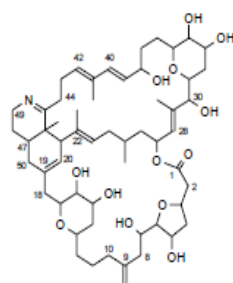


Gymnodimine
[M+H]⁺ = 508.3

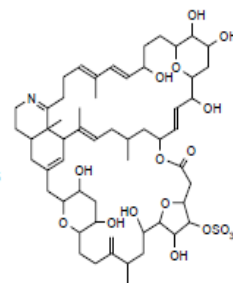


Gymnodimine B
[M+H]⁺ = 524.3

Prorocentrolides



Prorocentrolide
C₅₈H₉₈NO₁₃
[M+H]⁺ 980.5
[M+NH₄]⁺ 997.5



Prorocentrolide B
C₅₈H₉₈NO₁₇S
[M-H]⁻ 1074.5
[M+H]⁺ 1076.5
[M+NH₄]⁺ 1093.5

Figure 9. Structure de quelques imines cycliques (McCarron et al., 2012; Miles et al., 2000; Selwood et al., 2010; Selwood et al., 2013; Sleno et al., 2004)

I.9.1. Les gymnodimines

Le groupe des gymnodimines (GYM) est composé de 3 analogues pentacycliques comportant un motif buténolide et une imine cyclique. En 1995, l'extraction de 3 kg d'huîtres (*Tiostrea chilensis*) contaminées a conduit à l'isolement et la caractérisation de la gymnodimine A (GYM-A) (Seki et al., 1995). Les analogues GYM-B et GYM-C sont deux épimères qui se distinguent de la GYM-A par la présence d'un groupement hydroxyle porté par le carbone C-18 ; ce même groupement permet de différencier les deux épimères entre eux en fonction de sa position dans l'espace (Miles et al., 2003) (**Figure 9**). La gymnodimine (GYM) a été découverte suite à des analyses réalisées par BES sur des huîtres plates pêchées en 1993 dans l'île du Nord de la Nouvelle Zélande entraînant une mortalité très rapide des souris. Les analyses ont été menées dans le cadre d'un plan de surveillance pour les biotoxines neurologiques mais les symptômes observés chez la souris étaient différents de ceux attendus avec une forte toxicité (Seki et al., 1995). Malgré leur toxicité chez l'animal, les GYM n'ont pas été associées à des intoxications humaines. Ces toxines sont produites par le dinoflagellé *Karenia selliformis* et ont été trouvées dans différentes espèces de moules, huîtres et de palourdes en Nouvelle-Zélande (MacKenzie et al., 2002), en Australie (Paredes et al., 2011) et en Tunisie (Biré et al., 2002).

I.9.2. Les spirolides

Les spirolides (SPX) partagent un squelette constitué de six à sept cycles (en fonction de la présence ou non de l'imine cyclique) parmi lesquels un buténolide (ou lactone), un cyclohexène et trois noyaux éther (**Figure 9**). Les SPX B et D ont été découvertes pour la première fois dans des mollusques contaminés au Canada en 1995 (Hu et al., 1995) et en 2001, la même équipe a découvert de nouveaux analogues dans les mollusques contaminés, y compris les spirolides A, C et SPX-1 (également appelée 13-desméthyl SPX C). De nouveaux analogues sont régulièrement découverts incluant des isomères et d'autres composés avec une structure légèrement modifiée telles que la spirolide 13,19-didesméthyl-C, la spirolide G et la spirolide 20,méthyl-G (Botana and Alfonso, 2015). La spirolide la plus courante dans les mollusques et crustacés reste la 13-desméthyl SPX C.

De la même manière que pour les gymnodimines, les SPX ont été identifiées suite à l'apparition de symptômes atypiques chez des souris suite à l'administration d'extraits de coquillages contaminés. Bien que globalement toxiques chez les souris, peu de cas confirmés d'intoxication humaine par les spirolides sont décrits dans la littérature (Hu et al., 2001; Richard et al., 2001). Cependant, de vagues symptômes, tels qu'une détresse gastrique et une tachycardie, ont été observés chez des patients ayant consommé des bivalves contaminés en Nouvelle-Ecosse et au Canada (Gribble et al., 2005). Ces symptômes pourraient être liés à la présence de spirolides (Marrouchi, 2008).

Les SPX sont principalement produites par les espèces *Alexandrium ostenfeldii* et *A. peruvianum* (Cembella et al., 2000) et s'accumulent le plus souvent dans les moules, les huîtres et les palourdes (EFSA, 2008). Les SPX ont d'abord été découvertes dans les eaux froides de l'Atlantique Nord (Canada, Danemark, Norvège) (Aasen et al., 2005a; Ciminiello et al., 2006; MacKinnon et al., 2006), et elles ont depuis été détectées dans divers fruits de mer sur les côtes d'Italie, d'Espagne (González et al., 2006) et de France (Amzil et al., 2007).

I.9.3. Les pinnatoxines et ptériatoxines

Les pinnatoxines (PnTX) et ptériatoxines (PtTX) partagent la même structure macrocyclique polyéthers (**Figure 9**). Plusieurs analogues de PnTX obtenus par transformations métaboliques chez les mollusques et crustacés ont été caractérisés chimiquement. Il est suggéré que les analogues PnTX F et G soient les précurseurs de toutes les PnTX et PtTX connues (Selwood et al., 2010).

Comme dans le cas des autres toxines « FAT », les pinnatoxines causent une mort rapide chez l'animal par BES, mais il n'existe aucune preuve reliant directement ces composés à des intoxications humaines.

Les PnTX ont été identifiées pour la première fois en Chine dans des coquillages du genre *Pinna* alors que les PtTX ont été mises en évidence dans des viscères de coquillages appartenant à l'espèce *Pteria penguin* régurgités par une murène (Takada et al., 2001). Elles

ont été retrouvées dans diverses régions du monde comme la Nouvelle-Zélande, le Japon, l'Australie, et récemment à l'est du Canada. En Europe, des PnTX ont été retrouvées pour la première fois en Norvège en 2011, dans des moules et de l'eau de mer (Rundberget et al., 2011). C'est grâce aux isolats de microalgues en Mer Méditerranée qu'a pu être décrite une nouvelle espèce et un nouveau genre de dinoflagellé benthique : *Vulcanodinium rugosum* (Nézan and Chomérat, 2011), producteur de pinnatoxines (Hess et al., 2013).

I.9.4. Les palytoxines

La Palytoxine (PlTX) est une macromolécule non peptidique complexe aux propriétés amphiphiles connue comme l'une des toxines marines les plus puissantes. La structure chimique de la palytoxine a été élucidée en 1981 (Moore and Bartolini, 1981; Uemura et al., 1981). Il s'agit de l'une des plus grandes et plus complexes molécules produite naturellement connues à ce jour (**Figure 10**). La palytoxine est un composé polyhydroxylé partiellement insaturé (8 doubles liaisons) à longue chaîne carbonée (115 carbones). La présence des groupes hydroxyles, amines et amides (hydrophiles) d'une part et la longue chaîne carbonée (lipophiles) d'autre part confère à la palytoxine un caractère amphiphile. Elle possède également 64 centres chiraux. En raison de la chiralité et de la possibilité d'isoméries cis-trans à double liaison, elle possède plus de 1021 stéréo-isomères possibles (Ciminiello et al., 2011a).

Les symptômes d'une intoxication à la palytoxine et leur rapidité d'apparition dépendent de la quantité et de la voie d'exposition (par ingestion, inhalation ou par contact cutané). Les manifestations les plus courantes sont l'apparition d'un goût amer/métallique, des crampes abdominales, des nausées, des vomissements, de la diarrhée, une léthargie légère à aiguë, des picotements, un rythme cardiaque lent, une insuffisance rénale, une altération de la sensation, des spasmes musculaires, des tremblements, une myalgie, une cyanose et une détresse respiratoire. Dans les cas extrêmes, la palytoxine cause généralement la mort par arrêt cardiaque (Patocka et al., 2015). Plusieurs cas d'intoxication humaine incriminant la palytoxine et/ou ses analogues ont été rapportés principalement dans les caraïbes et la zone

indopacifique mettant en cause des crabes et quelques espèces de poissons, des décès ont notamment été enregistrés à Madagascar (Vilariño et al., 2018). Plus récemment, des contaminations d'oursins et de mollusques bivalves ont été rapportées en Grèce, en Italie, en Espagne et en France (Aligizaki et al., 2008; Amzil et al., 2012; Biré et al., 2013; Biré et al., 2015; Ciminiello et al., 2010) Par ailleurs, des zones de baignades ont été fermées suite à la présence d'*Ostreopsis spp.*, dinoflagellés producteurs de la palytoxine et des composés analogues (ex : les ovatoxines-a, -b, -c, -d, -e dans *O. ovata*) (Brissard et al., 2014b).

La palytoxine agit principalement sur l'enzyme Na⁺,K⁺-ATPase, convertissant la pompe en un canal ionique et résultant en un flux de K(+), un flux de Na(+) et une dépolarisation de la membrane. En conséquence, la palytoxine provoque un large spectre d'actions pharmacologiques secondaires telles que la dépolarisation des membranes excitables et l'activation secondaire des canaux Ca²⁺ (Ibrahim and Shier, 1987; Wu, 2009).

Elle a été découverte à Hawaï en 1961 et a d'abord été isolée à partir de cnidaires du genre *Palythoa* : *P. toxica* et *P. tuberculosa* (Moore et Scheuer, 1971). La palytoxine et ses analogues ont ensuite été signalées chez des dinoflagellés benthiques du genre *Ostreopsis*, *O. ovata*, *O. mascarenensis* et *O. siamensis* (Biré et al., 2013; Lenoir et al., 2004; Onuma et al., 1999) reconnus comme principaux producteurs. Kerbrat *et al.*(2011) ont isolé deux analogues de PITX à partir de la cyanobactérie *Trichodesmium spp.* (PITX and 2-OH-PITX) Les expositions humaines font suite soit à l'ingestion de crustacés ou de poissons contaminés par de la palytoxine ou palytoxine-like (certaines espèces de crabes comme *Lophozozymus pictor*, maquereaux tropicaux, poissons perroquets) (Louzao et al., 2008), soit par contact d'aérosols produits par les algues toxiques présentes dans l'eau. De manière plus anecdotique, des cas d'intoxications ont été rapportés chez des patients aquariophiles ayant manipulé à mains nues les coraux mous et inhalé des aérosols lors du nettoyage de leur aquarium (Farooq et al., 2017; Pelin et al., 2016; Schmitt et al., 2018; Tartaglione et al., 2016a; Tartaglione et al., 2016b).

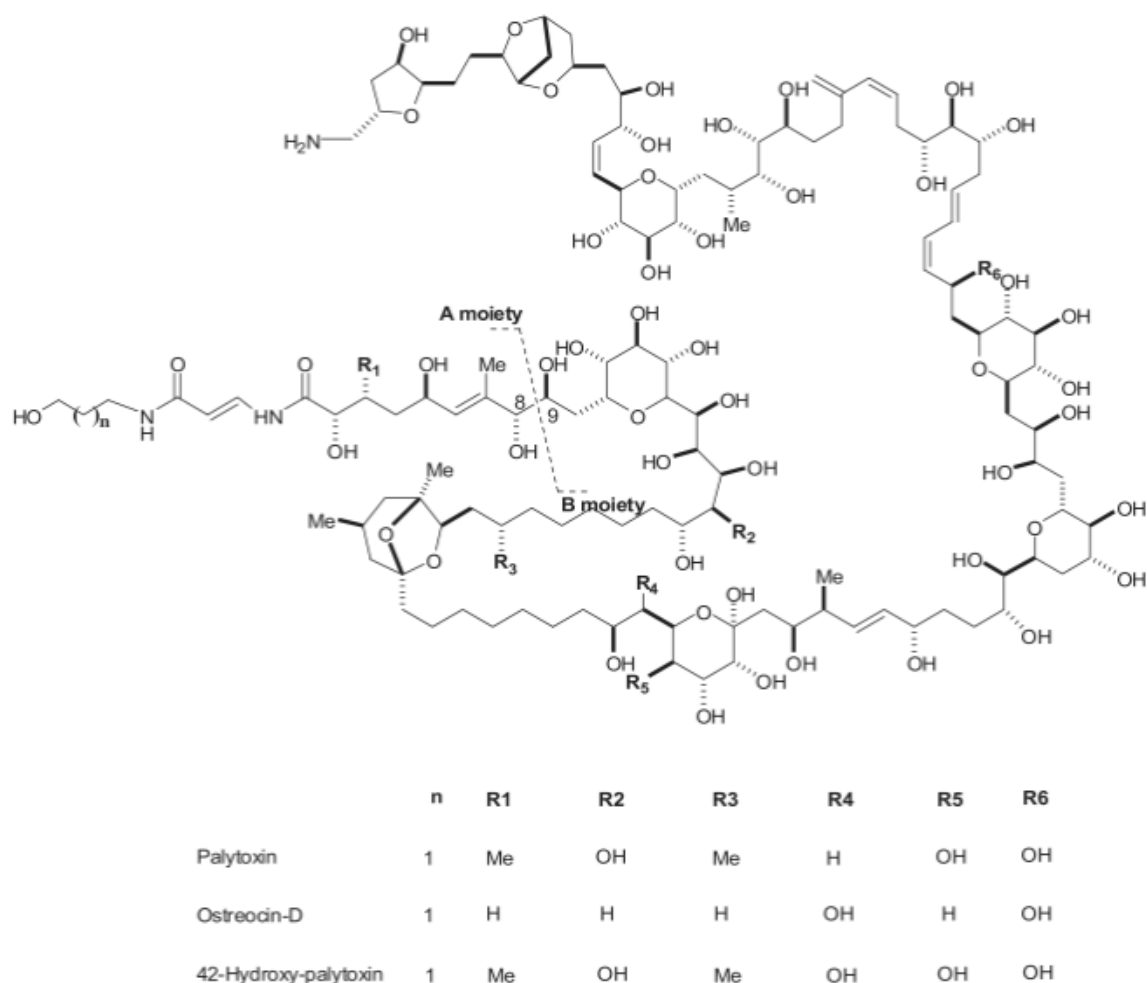


Figure 10. Structure de la palytoxine et ses analogues (Ciminiello et al., 2011b)

I.10. Les ciguatoxines et maïtotoxines

Les CTX sont les toxines responsables de l'intoxication par les poissons de la ciguatéra (CFP). La ciguatéra caractérise l'intoxication provoquée par la consommation de poissons contaminés des zones tropicales et subtropicales. On estime que 10000 personnes souffrent annuellement de la PCP, qui est l'intoxication alimentaire d'origine non bactérienne la plus importante (Chinain et al., 2014). Les CTX sont produits par certaines souches du dinoflagellé *G. toxicus* et d'autres *Gambierdiscus* spp., et sont vraisemblablement accumulés dans divers types de poissons de récif dans la chaîne alimentaire. L'ingestion des poissons affectés entraîne des troubles neurologiques (par exemple, picotements, démangeaisons), gastro-intestinaux (par exemple, vomissements, diarrhée, nausées) et cardiovasculaires (par exemple, hypotension, bradycardie) pouvant durer jusqu'à un mois ou plus.

Les analogues de CTX se trouvent principalement dans les régions du Pacifique, des Caraïbes et de l'océan Indien et sont classés comme étant des toxines du groupe CTX du Pacifique (P), des Caraïbes (C) (**Figure 11**) et de l'océan Indien (I). Aucune structure des CTX de l'océan Indien n'a encore été élucidée.

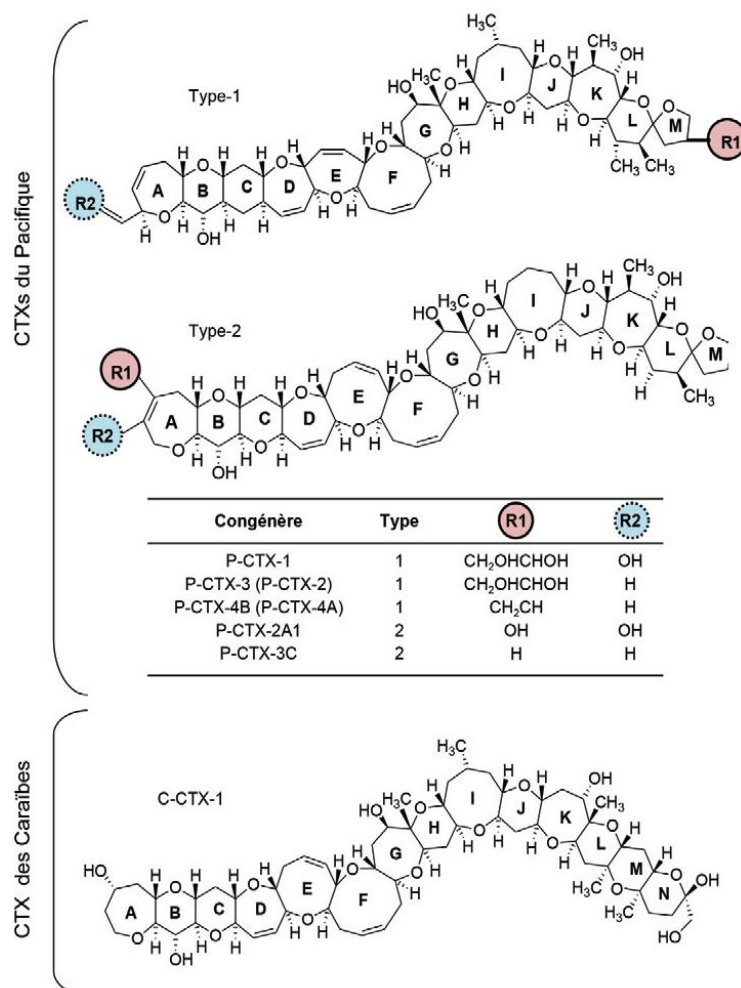


Figure 11. Structure chimique des ciguatoxines du Pacifique (P-CTXs) qui se différencient selon 2 types distincts (Type-1 et -2), ainsi que d'une ciguatoxine des Caraïbes (C-CTX-1) (Chinain et al., 2014)

La maïtotoxine (MTX) est un polyéther polyhydroxylé (**Figure 12**) possédant deux groupements sulfate. De par son caractère amphiphile elle est soluble dans l'eau, le méthanol et le diméthylsulfoxyde. La MTX est ainsi parmi les polyéthers les plus hydrophiles, ce qui limite sa bioaccumulation dans la chaîne alimentaire. Au contraire, les gambierols et les

ciguatoxines qui sont des polyéthers beaucoup plus lipophiles, seront plus facilement bioaccumulables.

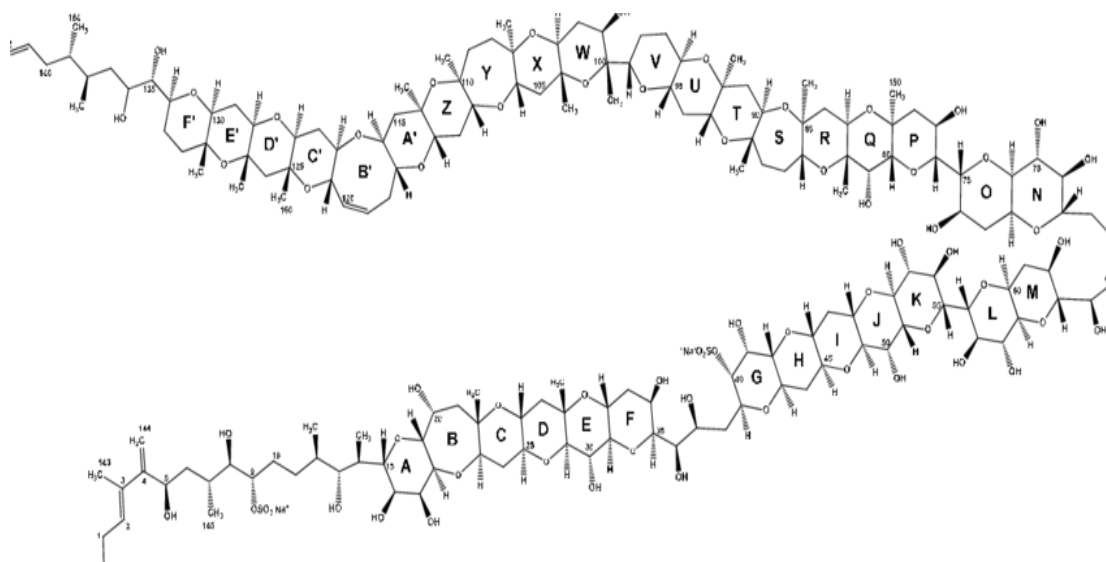


Figure 12. Structure chimique de la maitotoxine (MTX) (Nonomura et al., 1996)

II. Aspects réglementaires et dispositifs de surveillance / veille d'urgence en France

En raison des risques pour la santé humaine liés à la présence des biotoxines marines dans les produits de la pêche, les autorités compétentes ont établi des plans de surveillance et mis en place des mesures de gestion afin de garantir la santé publique. Ces mesures s'appuient sur des données issues de l'évaluation des risques tenant compte de (i) l'identité des toxines et leurs conditions de stabilité (ii) leur potentiel toxique et leur voies d'exposition (iii) le risque aigu qu'elles présentent (iv) l'identité du microorganisme producteur et sa répartition géographique (v) les vecteurs de contamination (vi) le processus de transformation des toxines dans les vecteurs de contamination et (vii) des habitudes alimentaires des populations. La surveillance de la qualité sanitaire des produits de la pêche, assurée par le biais des plans de surveillance, nécessite au préalable que des seuils réglementaires soient déterminés et que des méthodes officielles d'analyse soient définies.

II.1. Seuils réglementaires des biotoxines marines et méthodes d'analyse associées

Les premières réglementations européennes relatives aux BM ont été introduites au début des années 90 par la Directive du Conseil (Anonyme, 1991) qui fixe les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de ces organismes marins. Cette directive a été reprise par le Règlement (CE) n ° 853/2004 (Anonyme, 2004a). Ce document présente des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale et indique les seuils réglementaires pour les biotoxines marines dans les mollusques bivalves vivants ; il s'agit des concentrations limites au-delà desquelles les mollusques bivalves sont considérés comme insalubres et ne peuvent être consommés (**Tableau 2**). Le seuil réglementaire pour les YTX a été amendé par le règlement (UE) 786/2013 de la Commission (Anonyme, 2013). La réglementation européenne fixe également les méthodes d'analyse, qu'il s'agisse de méthodes de référence ou alternatives (Anonyme, 2007, 2011, 2017).

Tableau 2. Seuils réglementaires et méthodes d'analyse (officielles et alternatives) des biotoxines marines dans les coquillages fixés par la législation européenne

Nom des groupes de toxines	Seuils réglementaires		Méthodes officielles	Méthodes alternatives
STX	800 µg/kg de chair		LC-FLD (AOAC 2005-06 Lawrence)	BES (AOAC 959.08) ou n'importe quelle autre méthode reconnue au niveau international
AD	20 mg/kg de chair		LC-UV (AOAC 991.26)	ELISA (AOAC 2006-02)
Toxines lipophiles	AO, DTX et PTX	160 µg équiv. AO/kg de chair (pour AO, DTX et PTX)	LC-MS/MS	Plusieurs techniques possibles sous conditions définies dans le règlement 15/2011
	AZA	160 µg équiv. AZA/kg de chair	LC-MS/MS	
	YTX	3,75 mg équiv. YTX/kg de chair	LC-MS/MS	

Actuellement, il n'y a pas de seuil réglementaire pour les CTX dans l'UE. Toutefois, selon la législation actuelle de l'UE, les produits de la pêche contenant des biotoxines telles que la ciguatoxine ne doivent pas être mis sur le marché (Anonyme, 2004a, 2004b). Certaines interdictions ont été mises en place en tant que mesures de santé publique, comme l'interdiction de vendre des espèces de poissons à haut risque provenant de sites ciguatériques connus tels que les Samoa américaines, le Queensland, la Polynésie française, Fidji, Hawaï et Miami (de Fouw et al., 2001). Des arrêtés d'interdiction de pêche de certaines espèces de poissons potentiellement toxiques ont été pris par dans les Antilles françaises et à La Réunion.

Pour les brévétoxines il n'y a pas de limite réglementaire dans l'UE. La présence de toxines du groupe BTX n'a pas été signalée dans des crustacés ou des poissons d'Europe (EFSA, 2010). Cependant, il y a quelques pays dans le monde où l'on a trouvé des BTX, comme les États-Unis (côte Est, Golf du Mexique) et la Nouvelle-Zélande. Dans ces pays, des réglementations spécifiques ont été établies. Ils ont convenu qu'un niveau acceptable d'exposition aux BTX est de 20 unités souris/100 g, soit 0,8 mg équivalent BTX-2/kg (EFSA, 2010).

La TTX et ses analogues ne sont pas réglementés par la législation européenne. Toutefois, selon la législation actuelle de l'UE, les poissons appartenant à la famille des poissons toxiques Tetraodontidae ou les produits dérivés ne doivent pas être mis sur les marchés européens (Anonyme, 2004a, 2004b). Néanmoins, il existe des réglementations concernant le TTX dans les pays comme le Japon ou la Corée. Comme la toxine n'est accumulée que dans certaines parties du poisson, dans ces pays, le contrôle de cette toxine n'est pas exercé en réglementant la quantité de TTX dans le poisson qui peut être mis sur le marché, mais en exigeant des licences spéciales lorsqu'un restaurant veut servir des espèces contenant de la TTX. Seuls les cuisiniers titulaires de cette licence sont autorisés à servir des poissons contenant de la TTX, car ils ont la formation nécessaire pour sélectionner et prélever les organes et tissus toxiques (Paredes et al., 2011).

II.2. Dispositif français de surveillance et de veille d'urgence

En France, la salubrité des produits de la pêche mis sur le marché est vérifiée par un système de surveillance à double maillage et complétée par un dispositif de veille d'urgence dont la finalité est de détecter d'éventuelles urgences.

II.2.1. Surveillance

L'objectif du système de surveillance est de prévenir la mise sur le marché de produits de la mer contaminés au-delà des seuils réglementaires évoqués dans le paragraphe précédent. La surveillance est dite à double maillage car elle comprend deux niveaux : (i) dans les zones de production avec une surveillance des espèces phytoplanctoniques toxiques dans l'eau et des niveaux en toxines dans les mollusques bivalves et (ii) sur les marchés avec une surveillance des mollusques bivalves destinés à y être vendus.

Le dispositif est sous la responsabilité du Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation (MAA) et le réseau des laboratoires concernés et chargés de réaliser l'ensemble des analyses est piloté par le Laboratoire de sécurité des aliments (LSAI) de l'Anses, en tant que Laboratoire national de référence (LNR) pour les biotoxines marines. Concernant le maillage « zones de production », l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer) est maître d'œuvre en matière d'organisation pratique de la surveillance du milieu, et conserve l'expertise de l'analyse du phytoplancton dans le milieu marin (flores totale et toxique). En revanche, les mollusques bivalves sont analysés par des laboratoires départementaux d'analyse (LDA) agréés par la Direction générale de l'alimentation (DGAl) rattachée au MAA. En cas de dépassement des seuils réglementaires des toxines surveillées, les zones de production sont fermées sur décision du préfet de département ; elles ne rouvriront que si deux résultats consécutifs sont conformes. La fréquence de ces analyses varie en fonction des périodes de l'année, selon qu'elles sont à risque ou non ; ainsi la fréquence peut être hebdomadaire ou mensuelle. Concernant le second maillage, les produits destinés à être mis sur le marché et prélevés par les services vétérinaires sont analysés par les

LDA agréés. En cas de dépassement des seuils réglementaires, les mesures de gestion idoines sont prises par l'autorité compétente : retrait du marché et destruction des produits concernés.

II.2.2. Veille d'urgence

II.2.2.i. Description

Le système de surveillance, qui a vocation à s'intéresser aux toxines définies dans la réglementation est complété par un dispositif de veille d'urgence dont l'objectif est de détecter d'éventuels composés émergents. La notion d'urgence peut prendre différents sens ; il peut s'agir de toxines connues mais jusque-là jamais retrouvées en France ou bien de toxines totalement inconnues dont il s'agirait de la première mise en évidence.

Le dispositif de veille d'urgence comprend 11 points répartis le long du littoral faisant l'objet d'une analyse mensuelle afin de rechercher la présence d'éventuelles toxines émergentes dans la glande digestive (moules ou huîtres). Jusqu'en 2017, les échantillons étaient analysés en parallèle par bio-essai sur souris et chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) afin d'identifier d'éventuelles discordances entre les résultats de ces deux approches. Seules les toxines lipophiles étaient alors concernées. Depuis 2018 le dispositif a évolué ; le BES n'est plus utilisé et seules des analyses par LC-MS/MS sont réalisées. Autre modification apportée au dispositif, les analyses pratiquées uniquement par LC-MS/MS concernent un nombre plus important de toxines puisqu'elles incluent également la recherche de certaines biotoxines marines non réglementées (SPX, GYM, PnTX, BTX, PLTX et OVTX) et cyanotoxines (microcystines, nodularine-R).

II.2.2.ii. Limites du dispositif de veille d'urgence actuel

En l'état, le dispositif de veille d'urgence ne concerne pas les toxines hydrophiles, qu'il s'agisse de biotoxines marines ou de cyanotoxines. Il est prévu qu'à partir de janvier 2019, les toxines hydrophiles (STX, AD, TTX, anatoxines, cylindrospermopsines) soient également incluses dans le dispositif de veille d'urgence et analysées par LC-MS/MS.

Du fait de l'abandon du BES qui était un test de toxicité globale, le dispositif a perdu sa valence prospective en matière de toxines émergentes inconnues, l'utilisation de la LC-MS/MS restreignant de fait l'analyse à des composés ciblés, préalablement définis.

III.L'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) a gagné en popularité depuis quelques années dans le domaine des biotoxines marines. Grâce aux avancées réalisées notamment en termes de validation de méthodes LC-MS, cette technique est récemment devenue méthode de référence pour l'analyse de certaines toxines lipophiles tels que l'acide okadaïque et de ses dérivés, les azaspiracides, les yessotoxines et les pecténotoxines dans plusieurs pays européens (Anonyme, 2011). Plusieurs autres méthodes LC-MS ont également été développées pour les autres familles de toxines et sont en constante amélioration pour envisager potentiellement leur utilisation comme méthodes officielles de contrôle.

III.1. La détection par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS, de l'anglais « *Mass Spectrometry* ») s'est imposée au fil du temps comme la technique de choix pour l'analyse d'un grand nombre de molécules organiques permettant une spécificité et une sensibilité accrue.

Le spectromètre de masse, initialement conçu par le Britannique Joseph John Thomson, comporte une source d'ionisation suivie d'un ou plusieurs analyseurs fonctionnant sous vide qui séparent les ions produits selon leur rapport masse sur charge (m/z), d'un détecteur qui transforme les ions générés en signal électrique, et enfin d'un système de traitement de signal permettant la visualisation et l'enregistrement des spectres de masse représentant les rapports m/z , où m est la masse de l'ion et z sa valence.

III.2. Les sources d'ionisation

Les sources utilisées en spectrométrie de masse sont basées sur l'ionisation en phase gazeuse ou sur la désorption-ionisation d'analytes. L'ionisation en phase gazeuse peut être réalisée sous vide à l'aide de sources à impact électronique (EI) ou à pression atmosphérique : sources APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation), APPI (Atmospheric Pressure Photo-Ionisation) et DART (Direct Analysis in Real Time). La désorption-ionisation d'analytes peut, quant à elle, s'opérer sous vide (sources DIOS) ou encore sur des supports solides à l'aide de matrices, ce qui est le cas des sources MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption), ou à pression atmosphérique sur des nébulisats telles que les sources electrospray ESI (ElectroSpray Ionisation) et, DESI (Desorption Electrospray Ionisation).

Le choix de la source d'ionisation doit se faire en fonction de la nature des molécules à analyser. Parmi les techniques d'ionisation déjà employées pour les toxines on retrouve les ionisations ESI, APCI, APPI (Pardo et al., 2007), MALDI et l'ionisation par bombardement d'atomes neutres (Fast Atom Bombardment: FAB) (Vilariño et al., 2013). La source ESI reste l'interface la plus adaptée pour l'analyse des biotoxines marines car elle permet un couplage avec la chromatographie liquide, qui est la méthode de séparation de choix pour ces molécules.

L'electrospray est une source à pression atmosphérique dans laquelle l'échantillon est introduit en solution. Le principe d'ionisation consiste à appliquer une différence de potentiel entre un capillaire de nébulisation contenant les espèces à analyser et une contre électrode située à l'entrée du spectromètre de masse puis, les gouttelettes chargées en sortie de capillaire vont être desolvatées par un flux d'azote chaud, ce qui va initier une cascade d'explosions coulombiennes. Les ions ainsi produits en phase gazeuse sont attirés vers le spectromètre de masse par la contre électrode (**Figure 13**). Les sources ESI assurent une ionisation douce recommandée pour les molécules peu volatiles et de polarité moyenne à forte sans fragmentation induite.

Deux modes d'ionisation existent : le mode positif (ESI+) et le mode négatif (ESI-). En mode positif, le capillaire devient le siège d'oxydations où sont retenus les anions tandis que les

cations sont repoussés dans l'extrémité du cône de Taylor et inversement en mode négatif. Ces modes permettent de produire respectivement des ions chargés positivement ou des ions chargés négativement. La charge positive est souvent un adduit de proton (H^+) mais l'ajout de sels et d'acide dans les phases mobiles peut favoriser la formation d'adduits sodium (Na^+), de potassium (K^+) ou d'ammonium (NH_4^+). En mode d'ionisation négative, on observe majoritairement les ions déprotonés.

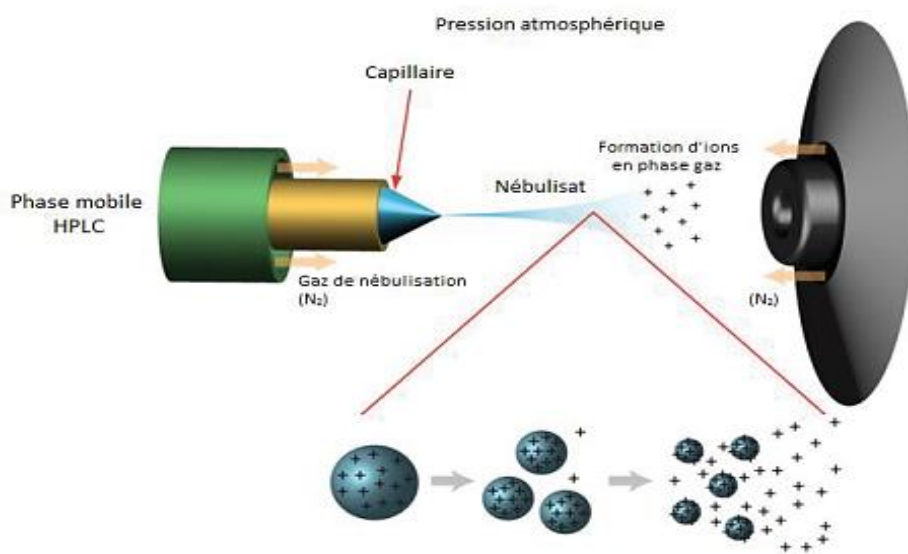


Figure 13. Principe de l'ionisation par électrospray
<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/esi-ionisation.xhtml>

III.2.1. Les analyseurs

Tout comme il existe une grande variété de sources, il existe de nombreux analyseurs qui peuvent être classés en deux catégories :

- les analyseurs à faisceaux d'ions (« in space » instruments) : comme les quadripôles et les analyseurs à temps de vol (time of flight, TOF).
- les analyseurs à piège ou trappe d'ions (« in time » instruments) : comprenant les pièges ioniques à basse résolution comme les trappes ioniques linéaires (2D) et les analyseurs à ultra haute résolution tels que l'Orbitrap®.

Leurs performances sont évaluées grâce à plusieurs paramètres dont les plus déterminants sont reportés ci-après :

- **La vitesse de balayage** qui est le temps que va mettre l'analyseur à établir un spectre pour une gamme de m/z donnée.
- **La résolution**, qui représente la capacité de l'analyseur à séparer deux composés de m/z proches, et qui est donnée par $R = m/\Delta m$, où m correspond au rapport m/z mesuré et Δm à la largeur du pic à mi-hauteur et on parle de résolution FWHM de l'anglais Full Width at Half-Maximum peak height (largeur à mi-hauteur).

La résolution est un paramètre déterminant divisant les analyseurs en deux groupes (**Tableau 3**)

- spectromètre de masse basse résolution (LRMS : « Low Resolution Mass Spectrometer »)
- spectromètre de masse haute résolution (HRMS : « High Resolution Mass Spectrometer »)

- **La précision** qui renseigne sur la faculté de l'analyseur à mesurer une masse juste de la molécule analysée (la plus proche possible de la masse théorique). Cette précision est le plus souvent exprimée sous forme d'erreur de mesure de masse en partie par million (ppm) :

$$\text{Erreur de mesure de masse (ppm)} = \frac{M_{\text{exp}} - M_{\text{th}}}{M_{\text{th}}} \times 10^6$$

où M_{exp} représente la masse mesurée expérimentalement et M_{th} la masse monoisotopique théorique calculée de la molécule analysée.

Tableau 3. Pouvoir résolutif des différents analyseurs (Werner et al., 2008)

	Analyseur	Résolution FWHM (m/z 400)
LRMS	Quadripôle	3000
	Trappe d'ion	5000
HRMS	Temps de vol	8000-60000

	Orbitrap	Jusqu'à 100000
--	----------	----------------

Les quadripôles

Les espèces ionisées générées dans la source arrivent dans le quadripôle sous un champ électrique oscillant assurant des trajectoires stables aux ions pour les séparer selon leur rapport m/z . Les quadripôles sont constitués de quatre barres ayant idéalement une section hyperbolique ou cylindrique auxquelles on applique des potentiels déphasés dont l'un est continu (U) et l'autre alternatif (V). L'application de ces potentiels crée un champ quadripolaire entre les électrodes. Aussi, par un jeu de lentilles électrostatiques, les ions sont extraits de la source, accélérés et focalisés selon l'axe z jusqu'à leur entrée dans l'analyseur quadripolaire. Les quadripôles peuvent être montés en série pour former un triple-quadripôle (TQ). Ce système résulte de l'association de deux analyseurs quadripolaires (Q1 et Q3) en série, séparés par une cellule de collision (Q2) correspondant à un quadripôle plus court (**Figure 14**). Les ions sélectionnés sont filtrés en fonction de leur rapport m/z dans le Q1 et Q3. Le Q2 sert de cellule de collision, dans laquelle la fragmentation s'effectue par l'introduction d'un gaz de collision inerte. Les TQ permettent différents modes d'acquisition en spectrométrie de masse simple (MS) et en mode spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) permettant les balayages d'ions fragments, d'ions précurseurs et de perte de neutre constante. Cet analyseur est particulièrement adapté au dosage spécifique de molécules ou de familles chimiques (approches ciblées).

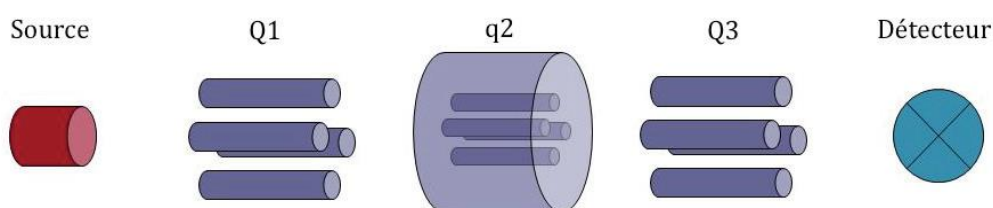


Figure 14. Représentation schématique d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle

Les trappes d'ions linéaires

Les trappes linéaires (pièges 2D) sont des analyseurs constitués de quatre barres comme pour un quadripôle qui serait fermé par des électrodes d'entrée et de sortie permettant de repousser

les ions vers l'intérieur du quadripôle, en appliquant des tensions continues positives et négatives, pour piéger respectivement les ions positifs et négatifs. Suite à l'application d'une tension sur les barres du quadripôle, les ions réalisent donc des va-et-vient suivant l'axe z entre les électrodes terminales et, simultanément, oscillent dans le plan xy. L'éjection des ions se fait, par la suite, soit de manière axiale, selon l'axe z, soit de manière radiale, au travers des fentes creusées dans deux barres opposées du quadripôle, sur lesquelles est appliquée une tension alternative adaptée. Le mode d'éjection radiale permet des expériences de fragmentation successive à n étapes comme la MSⁿ très intéressante pour l'analyse structurale.

L'éjection des ions selon l'axe z quant à elle permet le couplage de la trappe d'ion linéaire avec d'autres types d'analyseurs pour former des analyseurs hybrides de types quadripôle-trappe d'ion. Cette association est très utilisée pour l'analyse ciblée des biotoxines marines.

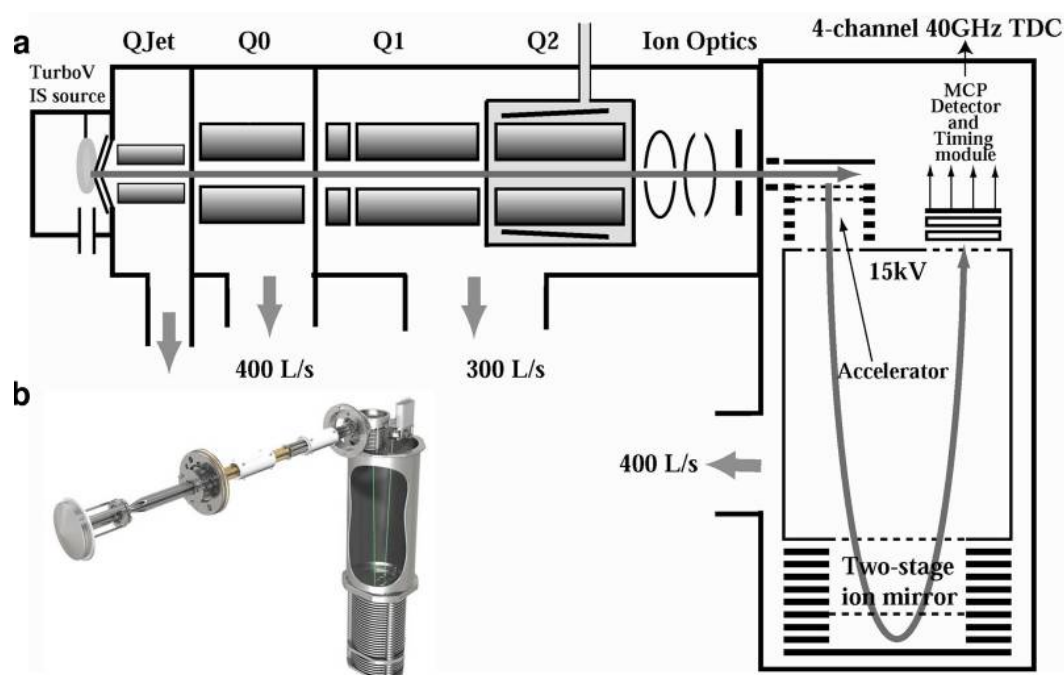
Le quadripôle-temps de vol (Q-ToF)

Les analyseurs hybrides Q-TOF sont apparus en 1995, ils combinent les spécificités du triple quadripôle à celui du temps de vol. L'analyseur à temps de vol permet de séparer les ions en fonction de leur vitesse de déplacement à l'intérieur d'un tube de vol. Les ions sont accélérés par une différence de potentiel appliquée entre une électrode et la grille d'extraction. Les particules accélérées ayant toutes la même énergie cinétique passent ensuite dans le tube de vol, libre de champ, où elles sont séparées en fonction de leur vitesse acquise. Les vitesses sont inversement proportionnelles à la racine carrée de leurs rapports m/z. Ainsi, pour des ions de même énergie cinétique, les ions plus légers possèdent une grande vitesse et arrivent au détecteur plus rapidement que les ions plus lourds possédant une vitesse plus faible.

Grâce à son pouvoir résolutif permettant de travailler en HRMS, le Q-ToF (**Figure 15**) est un outil puissant pour la caractérisation, l'élucidation et l'identification des biotoxines marines, notamment grâce à :

- la mesure de la masse exacte du m/z des ions moléculaires et ions fragments,

- la détermination des abondances isotopiques relatives des ions moléculaires et ions fragments,
- la comparaison des données expérimentales avec celles des bases de données (formules brutes, masses monoisotopiques, etc.), celles des bibliothèques spectrales donnant accès aux données de séparation chromatographique (temps de rétention) et aux données de détection par spectrométrie de masse (spectres de masse, spectres de fragmentation).



La trappe orbitale (Orbitrap™)

Le principe a été décrit par Alexander Makarov (Makarov, 2000). Il est constituée de deux électrodes, la première est centrale et possède la forme d'un fuseau, la deuxième est extérieure et possède la forme d'un tonneau coupé en deux parties égales séparées par un espace étroit. Un champ électrique quadri-logarithmique est maintenu entre les électrodes. Les ions sont injectés tangentiellement par l'interstice séparant les deux moitiés de l'électrode externe. Les ions sont injectés à une énergie cinétique de quelques keV et se mettent à osciller en orbite de l'électrode centrale dans les directions axiales et radiales sous l'action concomitante des tensions qui génèrent le champ électrique, des forces centrifuges et de la

géométrie du piège. Le vide y est poussé (10⁻¹⁰ torr). A chaque passage devant les électrodes externes, les ions génèrent des courants induits sur lesquels est appliquée une transformée de Fourier afin de déconvoluer les différentes fréquences d'oscillation axiale (sur l'axe z) des ions qui sont ensuite convertie en rapports m/z précis.

L'Orbitrap® a été couplée par la société Thermo Electron avec un piège ionique linéaire (LTQ) pour former un spectromètre de masse hybride, le LTQ Orbitrap® (**Figure 16**). Le LTQ est capable d'acquérir ces propres spectres et permet de faire de la MSⁿ. Les ions produits peuvent à leur tour être envoyés dans l'Orbitrap et analysés avec la même résolution que l'ion précurseur.

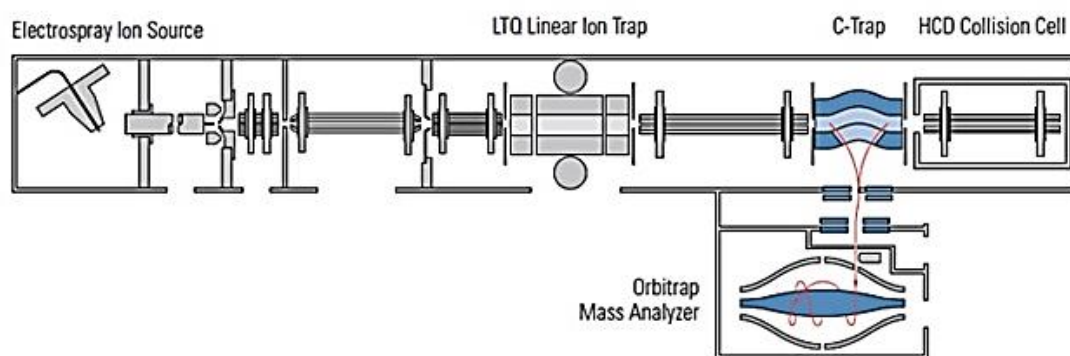


Figure 16. Schéma d'un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific).

III.3. La chromatographie liquide

La chromatographie en phase liquide complète le pouvoir résolutif amené par la spectrométrie de masse. Elle présente l'avantage d'être applicable à l'analyse de composés non volatiles et/ou thermosensibles sans qu'il soit nécessaire de mettre en œuvre des procédures fastidieuses de traitement de l'échantillon. Son principal intérêt est de limiter les problèmes d'ionisation observés avec les sources ESI et dû à la complexité des matrices analysées. En outre, elle peut permettre de séparer des molécules isobares et éventuellement des isomères parfois difficiles à distinguer par la MS seule.

Il existe deux systèmes chromatographiques ; à haute pression (conventionnels) et à ultra-haute pression (UHPLC, de l'anglais « Ultra-High Pressure Liquid Chromatography »).

D'apparition plus récente (depuis 2005), les systèmes de type UHPLC reposent sur l'utilisation de particules de phases stationnaire de diamètre réduit ($< 2 \mu\text{m}$) supportant de plus hautes pressions donc des débits plus élevés et des séparations plus rapides. Les pics chromatographiques élués sont alors plus fins et plus élevés, ce qui augmente le rapport signal/bruit, la capacité de pics et l'efficacité de la colonne (Wilson et al., 2005).

Différents types de mécanismes de rétention chromatographiques peuvent être utilisés pour la séparation des biotoxines marines en couplage LC-MS :

La chromatographie à polarité de phase inversée (RP de l'anglais « Reversed Phase »), met en jeu des mécanismes d'adsorption/désorption entre le soluté, la phase stationnaire et les solvants constituant la phase mobile. Les phases stationnaires sont composées de silice greffée leur conférant un caractère hydrophobe et compatible avec des solvants aqueux et organiques adaptées à la détection en ESI-MS. Les méthodes RP sont hautement reproductibles et leurs mécanismes de séparation sont bien maîtrisés (Kirkland, 2004). Toutefois, afin d'obtenir une bonne séparation, il est nécessaire que les analytes présentent des propriétés hydrophobes de sorte qu'ils puissent interagir avec la phase stationnaire. La chromatographie en phase inverse est adaptée pour l'analyse de la majorité des biotoxines marines et est employée particulièrement pour les toxines lipophiles.

Les toxines très polaires telles que les STX et les TTX sont mal voire pas retenues du tout sur ces colonnes (élucées dans le volume mort). Des mécanismes de rétention alternatifs tels que la chromatographie de paires d'ions, ou la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) ont été développés pour répondre à cette question clé.

La chromatographie par paire d'ions permet d'améliorer la séparation des composés ioniques ou polaires sur des colonnes apolaires de type C8 ou C18 généralement utilisées en chromatographie de phase inverse. Elle nécessite l'ajout à la phase mobile d'un contre-ion, composé porteur à la fois d'une chaîne carbonée et d'un groupement de charge opposée à

celle du composé à séparer. Les paires d'ions résultantes présentent une charge nulle, elles sont donc hydrophobes et retenues sur des colonnes RP. L'utilisation de tensioactifs anioniques et cationiques, et également d'agents d'appariement d'ions pour la détection et la quantification de biotoxines marines a été documentée (Quilliam, 2001). Cependant, les deux principaux inconvénients de cette approche sont la faible volatilité de la paire d'ions et/ou la trop forte affinité entre le réactif d'appariement d'ions et la substance à analyser qui est susceptible d'empêcher la dissociation de la paire d'ions dans la source électrospray induisant un phénomène de suppression d'ionisation (Apffel et al., 1995; Lu et al., 2008).

La chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) a été introduite afin de permettre la rétention et la séparation des composés hydrophiles polaires, qui sont souvent difficiles à retenir sur des colonnes de type C18 (chromatographie en phase inverse). La HILIC utilise une phase stationnaire polaire associée à une phase mobile aqueuse organique, contenant généralement un pourcentage élevé du composant organique (généralement > 60 %). L'eau est un puissant solvant, et contrairement à la chromatographie en phase inverse, l'augmentation du pourcentage d'eau dans la phase mobile diminue la rétention de l'analyte (Buszewski and Noga, 2012; Hemström and Irgum, 2006).

Les mécanismes d'intégration sont complexes, impliquant la combinaison de plusieurs modes d'interaction entre l'analyte, la phase stationnaire et l'éluant. En HILIC, une couche enrichie en eau est présente à la surface de la phase stationnaire. La phase mobile doit contenir un pourcentage d'eau suffisant pour que cette couche se forme. La rétention de l'analyte est souvent due à la combinaison d'une séparation dans la couche enrichie en eau, les liaisons hydrogènes et d'interactions électrostatiques.

III.4. Méthodes LC-MS décrites dans la littérature pour l'analyse des biotoxines

III.4.1. Acide domoïque

L'analyse LC-MS de l'AD est souvent réalisée utilisant des colonnes chromatographiques de phase inverse de type C8 et plus souvent C18 (Suzuki et al., 2017). Les phases mobiles utilisées sont composées d'eau/acétonitrile supplémentées d'additifs tels que l'acide

formique et le formate d'ammonium. Regueiro et al. (2011a) ont décrit une méthode utilisant une phase mobile eau/méthanol. L'AD est souvent analysé en simultané avec les toxines lipophiles utilisant des méthodes LC-MS multi-toxines (Braña-Magdalena et al., 2014; McCarron et al., 2014; McNabb et al., 2005; Zendong et al., 2015). De par son caractère hydrophile, il a également été analysé sur différentes colonnes HILIC seul (Barbaro et al., 2013; Ciminiello et al., 2005; James et al., 2005; Wang et al., 2012; Zhang et al., 2015) ou associé au groupe des STX (Blay et al., 2011). (Tableau 4).

L'AD peut être détecté en ESI+ mais aussi en ESI- comme rapporté par Ciminiello et al. (2005). Les ions précurseurs analysés sont $[M+H]^+$ (m/z 312), l'adduit sodium $[M+Na]^+$ (m/z 334) en positif et l'ion $[M-H]^-$ (m/z 310) en négatif. Les expériences de fragmentation MS/MS ont permis d'obtenir principalement des fragments correspondant à des pertes de H_2O et CO en ionisation positive et négative.

III.4.2. Les saxitoxines

Le couplage de la spectrométrie de masse avec la chromatographie liquide pour l'analyse des STX a été introduit dans les années 90 et a permis l'analyse directe de ces toxines sans passer par les étapes complexes de dérivation pré et post-colonne (Quilliam, 2003).

La séparation chromatographique préalable à la détection MS a d'abord été réalisée sur des colonnes de type phase inverse (Biré et al., 2003; Lagos et al., 1999) utilisant des éluants enrichis en sels et en agents d'appariement d'ions (tels que le tétrabutylammonium et l'heptanesulfonate) indispensables pour séparer des composés polaires sur une colonne apolaire. Cependant, les hautes teneurs de ces additifs dans les phases mobiles entraînent une forte diminution du signal des ions d'intérêt et dégradent ainsi les performances de la source empêchant une application efficace de la LC-MS (Gustavsson et al., 2001). Afin d'améliorer le couplage LC-MS avec les sources ESI, plusieurs méthodes basées sur le couplage avec la HILIC ont été développées pour l'analyse des saxitoxines. En effet, cette technique chromatographique spécifique aux composés polaires, utilise les mêmes solvants qu'en phases inverses et permet ainsi une meilleure compatibilité avec la source ESI. Différentes

compositions de phases stationnaires HILIC ont été décrites dans la littérature ; TSK gel amide 80, amide (BEH amide) ou zwitterionique (ZIC®-HILIC). Les phases mobiles sur colonnes HILIC sont généralement composées d'eau (A) et d'acétonitrile (B) avec du formate d'ammonium et de l'acide formique dans les deux phases. La séparation peut se faire soit dans des conditions isocratiques (Dell'Aversano et al., 2005; Harju et al., 2015; Zhuo et al., 2013) ou avec un gradient de phases mobiles (Boundy et al., 2015; Mattarozzi et al., 2016a; Poyer et al., 2015; Turner et al., 2015c) (**Tableau 4**). Ces méthodes permettent à la fois une bonne séparation des toxines, notamment les épimères (GTX) tout en assurant une sensibilité suffisante pour contrôler les produits de la mer à la limite réglementaire pour la teneur en toxines PST. Les colonnes HILIC nécessitent beaucoup de précautions pour éviter les problèmes de robustesse dus aux décalages potentiels au niveau des temps rétention en fonction de la matrice. Poyer et al. (2015) ont présenté une méthode alternative combinant la mobilité ionique (IM) à la HILIC couplé à un détecteur MS qui permet la séparation des analogues non sulfatés et des isomères GTX avec une bonne robustesse.

Différents spectromètres de masse ont été utilisés pour la détection des STX: (i) triple quadripôle (Dell'Aversano et al., 2005; Zhuo et al., 2013), (ii), trappe d'ions (Harju et al., 2015; Mattarozzi et al., 2016a), (iii) Orbitrap (Mattarozzi et al., 2016a), et (iiii) et TOF-MS (Chen et al., 2016).

Les deux modes d'ionisation sont utilisés selon la nature de la toxine : Les analogues non-sulfatés (STX), ne possédant aucun groupement sulfocarbamate ou sulfate, sont détectés uniquement en mode d'ionisation positif. Les autres analogues sulfatés ou sulfocarbamatés (GTX et dcGTX) peuvent être détectés dans les deux modes d'ionisation (ESI + et ESI-) en raison de leur caractère zwitterionique¹. Pour certains analogues de ce groupe une meilleure sensibilité est assurée en ESI- (Boundy et al., 2015; Poyer et al., 2015; Turner et al., 2015a).

Les ions précurseurs rapportés dans la littérature sont :

- $[M+H]^+$ pour les STX.
- $[M+H]^+$ et l'adduit $[M+NH_4]^+$ pour C1, C2, C3 et C4
- $[M+H]^+$ et $[M+H-SO_3]^+$ pour les GTX en ESI+ et $[M-H]^-$ en ESI-.

III.4.3. Les Tétródotoxines

Depuis l'introduction de l'ESI-MS pour l'analyse des biotoxines marines, cette technique s'est également révélée être une alternative intéressante pour l'analyse des TTX.

Récemment, plusieurs méthodes HILIC-MS ont été rapportées dans la littérature comme méthode de choix pour l'analyse des TTX (seules ou associées au groupe des STX) dans différentes matrices. Diverses colonnes HILIC ont été utilisées ; TSK-gel Amide 80, Cosmosil HILIC colonne, Acquity BEH Amide (Tableau 4) Les phases mobiles sont souvent composées d'eau /acétonitrile mais certaines méthodes utilisent le méthanol comme solvant organique (Jen et al., 2013; Wu et al., 2014b). Les phases mobiles contiennent également des additifs tels que l'acide formique/formate d'ammonium ou acide acétique/acétate d'ammonium.

La TTX et ses analogues sont détectés en mode ionisation positif et l'ion précurseur détecté est le $[M+H]^+$. Il a été rapporté que l'ion caractéristique commun aux différents analogues formé par fragmentation MS/MS est le m/z 162 (Mebs et al., 2010). Malgré les progrès réalisés en termes d'élucidation structurale basée sur les spectres de fragmentation MS/MS, il n'existe encore aucune d'étude faisant état d'une élucidation complète d'un nouvel analogue de TTX utilisant exclusivement la spectrométrie de masse. Cette difficulté est due aux mécanismes de fragmentation très complexes des TTX (Suzuki et al., 2017).

Tableau 4. Méthodes LC-MS des toxines hydrophiles (groupe de l'AD, STX et TTX)

Toxines	Technique	Colonne	Phase Mobile	Référence
AD	HPLC- HRMS/MS (Orbitrap)	i) BEH C18 (2,1 ×100mm, 1.7 μm)	(A) 0.1% formic acid in water + 4 mM ammonium formate	(Zhang et al., 2015)
		ii) HSS T3, C18 (100×2,1 mm, 3 μm)	(B) 0.1% formic acid in acetonitrile	
		iii) BEH HILIC (2,1 ×100 mm, 1.7 μm)	(Gradient)	
AD	LC-MS/MS (QQQ)	Luna C18(2) (150 mm × 2 mm, 5 μm)	(A) H ₂ O (B) ACN Both containing 0.1% formic acid	(Wang et al., 2012) (James et al., 2005)

Toxines	Technique	Colonne	Phase Mobile	Référence
			(Gradient)	
AD	HILIC-MS/MS (QqQ)	ZIC-HILIC 100 Å (4,6×150 mm, 3,5 µm)	(A) H ₂ O (B) ACN Both containing 0.1% formic acid (Gradient)	(Barbaro et al., 2013)
AD	HILIC-MS/MS (QqQ)	TSK-GEL Amide-80 (250×2 mm, 5 µm)	(A) H ₂ O + 2mM ammonium formate + 3.6 mM formic acid (B) CAN (Isocratic: 75% B)	(Ciminiello et al., 2005)
STX	HILIC-MS/MS (Qtrap)	TSK-GEL Amide-80 (150 × 2 mm, 3 µm)	A : ACN 95 % B : H ₂ O 95% +5 % aqueous solution containing 20mM ammonium formate and 26 mM formic acid in both phases (pH =3.2) (Gradient)	(Mattarozzi et al., 2016b)
STX	HILIC-MS/MS (QqQ)	TSK-gel Amide-80 (150 x 2,0 mm, 3 µm)	(A) 0.1% formic acid in water + 2 mM ammonium formate (B) 0.1% formic acid in acetonitrile (Isocratic: 60% B)	(Zhuo et al., 2013)
STX	HILIC-MS/MS (Qtrap)	TSK-GEL Amide-80 (150 × 4,6 mm, 3 µm)	(A)H ₂ O (B): ACN Both containing 4 mM formic acid (pH=3,5) (Isocratic 60 %)	(Harju et al., 2015)
STX	HILIC-MS/MS (QqQ)	TSK-gel Amide-80® (250 × 2 mm, 5 µm)	(A) H ₂ O ; (B) ACN Each containing 2 mM ammonium formate and 3,6 mM formic acid (Isocratic 65% B)	(Dell'Aversano et al., 2005)
STX	HILIC-MS/MS (Qtrap)	(i) TSK-gel Amide-80® (250 mm × 2.0 mm, 5µm) (ii) HILIC Silica (150 × 2,1 mm, 3 µm)	(A) H ₂ O + 4 mM ammonium formate (B) ACN + 5% of eluent A, both containing the same amount of formic acid to achieve the pH 3.5 (Isocratic 60 % B)	(Halme et al., 2012)
STX	LC-IM-MS (Synapt G2)	TSK gel Amide 80® (,1 × 250mm, 5 µm)	(A) 2 mM ammonium acetate buffer (pH 3.5), (B) acetonitrile containing 0.01% of acetic acid	(Poyer et al., 2015)

Toxines	Technique	Colonne	Phase Mobile	Référence
			(Gradient)	
STX	HILIC-MS/MS (QqQ)	Acquity BEH Amide UPLC (2,1 × 150 mm, 1,7 µm)	(A) water + 0.015% formic acid + 0.06% of 25% ammonia (B) 70% MeCN + 0.01% formic acid (Gradient)	(Turner et al., 2015c)
STX	HILIC-MS/MS (QqQ)	Acquity UPLC BEH Amide 130°A (150 × 2,1 mm, 1,7 µm)	A1: water/formic acid/NH ₄ OH (500:0.075:0.3 V/V/V) B1: ACN/water/formic acid (700:300:0.1 v/v/v) (Gradient)	(Boundy et al., 2015)
TTX, STX	HILIC-MS/MS (Qtrap)	Cosmosil Hilic (4,6 × 150 mm ²)	(A) water + 0.1% formic acid (B) Methanol (Gradient)	(Jen et al., 2013) (Wu et al., 2014b) (Lin et al., 2014)
TTX	HILIC-MS/MS (QqQ)	TSK-GEL amide 80, (5 µL, 2,0 × 250 mm)	(A) 10% acetonitrile –90% 50 mM formic acid, 2 mM ammonium formate in water (B) 90% acetonitrile –10% 50 mM formic acid, 2 mM ammonium formate in water	(McNabb et al., 2010)

III.4.4. Les toxines lipophiles

Les premières méthodes développées pour les toxines lipophiles permettaient une analyse spécifique par famille de toxines (ie. DSP, AZA). Au cours de la dernière décennie, des méthodes multi-toxines ont été développées permettant une analyse simultanée de différents groupes de toxines lipophiles (**Tableau 5**).

Plusieurs couplage LC-MS ont été décrits en basse résolution pour détecter une toxine cible dans l'échantillon à l'aide d'un spectromètre triple quadrupôle (Rodríguez et al., 2015; Zhuo et al., 2014), ou d'une trappe d'ion (García-Mendoza et al., 2014).

L'autre couplage se fait avec un spectromètre haute résolution (HRMS), dont les performances permettent de réaliser des analyses ciblées et non ciblées (Chen et al., 2016). Deux types différents de détecteurs HRMS ont été rapportés pour le screening des toxines lipophiles : Orbitrap MS (Domènech et al., 2014 ; Gerssen et al., 2011 ; Orellana et al., 2014 ; Rúbies et al., 2015) et QTOF MS (Chen et al., 2016 ; Zendong et al., 2015).

La séparation chromatographique est souvent effectuée sur des colonnes de phase inverse (C18) de différentes tailles (Chen et al., 2016 ; Domènech et al., 2014 ; García-Mendoza et al., 2014 ; Gerssen et al., 2010 ; Li et al, 2014 ; McCarron et al, 2014 ; Orellana et al, 2015 ; Rodríguez et al, 2015 ; Rúbies et al, 2015 ; Wu et al, 2015 ; Zendong et al, 2015 ; Zendong et al, 2015 ; Zhuo et al, 2014).

Les phases mobiles sont généralement composées d'un mélange eau/acétonitrile contenant de l'acide formique et/ou du formiate d'ammonium pour les conditions acides (Chen et al. 2016 ; Li et al. 2014 ; McCarron et al. 2014 ; Wu et al. 2014 ; Wu et al, 2015 ; Zendong et al. 2015 ; Zhuo et al. 2014) ou hydroxyde d'ammonium pour les conditions alcalines (Domènech et al. 2014 ; García-Mendoza et al. 2014 ; Gerssen et al. 2010 ; Rodríguez et al. 2015 ; Rúbies et al. 2015). Quelles que soient les phases mobiles utilisées, les analytes sont séparés en mode gradient.

La détection est réalisée en mode d'ionisation positif avec la forme protonée $[M+H]^+$ pour AZA, GYM, SPX PnTX et $[M+NH_4]^+$ pour PTX. L'AO peut être détecté à la fois en mode positif $[M+Na]^+$ (Chen et al., 2016 ; Zhuo et al., 2014) et en mode négatif $[M-H]^-$. Ce dernier est le plus souvent employé car assurant une bien meilleure sensibilité. Les DTX et YTX sont surveillés en mode négatif. Pour les YTX, deux ions précurseurs peuvent être détectés $[M-H]^-$ et $[M-2H]^{2-}$ en condition basiques (Gerssen et al., 2009).

Tableau 5. Méthodes LC-MS pour l'analyse des toxines lipophiles

Toxines	Technique	Colonne	Phase Mobile	Référence
AO, DTX, AZA	HPLC-MS/MS (QqQ)	ZORBAX SB-C18 (150 × 2.1 mm, 3.5 µm)	(A) 0.1% formic acid in water (B) 0.1% formic acid in acetonitrile	(Zhuo et al., 2014)
AO, DTX, AZAs, GYM, PTX, SPX, YTX, BTX	HPLC-MS/MS (QTRAP)	Kinetex XB-C18 (100 mm × 2.1 mm, 2.6 µm)	(A) Acetonitrile (B) 0.15 % formic acid in water	(Wu et al., 2014a)

Toxines	Technique	Colonne	Phase Mobile	Référence
DA, AO, DTX, AZA, PTX, YTX, GYs, SPX, PnTXs	HPLC-MS/MS (QTRAP)	Luna C18 (50 × 2.1 mm id, 2.5 µm)	(A) H ₂ O (B) AC/H ₂ O (95 + 5, v/v), Each containing 50 mM formic acid and 2 mM ammonium formate.	(McCarron et al., 2014)
AO, PTX, DTX	HPLC-MS/MS (QqQ)	Luna C18 (50×2.1 mm, 3 µm)	(A) H ₂ O (B) AC/H ₂ O (95 + 5, v/v), Each containing 50 mM formic acid and 2 mM ammonium formate.	(Li et al., 2014)
AO, DTX, AZA, PTX, YTX, GYM, SPX	HPLC-MS/MS (Qtrap)	X-Bridge™ C8 (2.1 mm × 50 mm, 3.5 µm)	Acidic conditions (pH 2) (A) H ₂ O (B) AC/H ₂ O (95 + 5, v/v), Each containing 50 mM formic acid and 2 mM ammonium formate Slightly alkaline conditions (pH 7.9) (A) H ₂ O (B) AC/H ₂ O (95 + 5, v/v), Each containing 5 mM Ammonium bicarbonate Alkaline conditions (pH 11) (A) 6.7 mM of ammonia in water (B) 6.7 mM of ammonia in 90/10 (v/v) ACN/ water	(García-Mendoza et al., 2014)
AO, YTX, AZA, PTX, SPX, GYM	HPLC-MS/MS (QqQ)	X-Bridge C18 (150 mm × 3 mm; 5µm)	(A) H ₂ O (NH ₃ 6.7 mM) (B) ACN:H ₂ O (NH ₃ 6.7 mM) (90:10)	(Gerssen et al., 2009) (Gerssen et al., 2010) (van den Top et al., 2011)
AO, DTX, AZA, PTX, YTX, SPX	UHPLC-HRMS/MS (Orbitrap)	BEH C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 µm)	(A) 6.7 mM ammonia aqueous solution (B) acetonitrile	(Rúbies et al., 2015)
AO, DTX, AZA, PTX, YTX	UHPLC-MS/MS (QqQ)	Acquity UPLC BEH C18 (2.1 × 100 mm, 1.7 µm)	(A) Ammonia 6.7 mM in water (B) Ammonia 6.7 mM in acetonitrile	(Rodríguez et al., 2015)
AO, DTX, PTX, AZA, YTX	HPLC-HRMS (Q-tof)	Hypersil BDS C8 (50 mm × 2 mm; 3 µm)	(A) H ₂ O (B) AC/H ₂ O (95 + 5, v/v), Each containing 50 mM formic acid and 2 mM ammonium formate.	(Kilcoyne and Fux, 2010)
	HPLC-MS/MS (QqQ)	X-Bridge C18 (50 mm × 2 mm; 2.5 µm)		EU-Harmonised-SOP-LIPO LCMSMS_Version5.pdf

Toxines	Technique	Colonne	Phase Mobile	Référence
AO, DTX, AZA, PTX, YTX, SPX	HPLC-MS/MS (QqQ)	Gemini NX C18 (100 mm × 2 mm; 3 µm)	(A) H ₂ O (NH ₃ 6.7 mM) (B) ACN:H ₂ O (NH ₃ 6.7 mM), (90:10)	(Regueiro et al., 2011b)
DA, AO, DTX, AZA, PTX, YTX, GYM, SPX, PnTX	UHPLC-MS/MS (QqQ)	Zorbax SB-C8 (50 mm × 2.1 mm; 2.5µm)	(A) H ₂ O (B) AC/H ₂ O (95 + 5, v/v), Each containing 50 mM formic acid and 2 mM ammonium formate.H ₂ O (50 mM formic acid	(Braña-Magdalena et al., 2014)
AO, PTX2, AZA1, YTX	HPLC–MS/MS (Qtrap)	Gemini NX C18 (150 mm × 2 mm; 3 µm)	(A) H ₂ O (NH ₄ HCO ₃ 5 mM) (B) ACN:H ₂ O (NH ₄ HCO ₃ 5 mM), (85:15)	(These et al., 2011)
AO, DTX, AZA, PTX, YTX, GYM, SPX	LC–HRMS (Orbitrap)	Hypersil Gold C18 (100 mm × 2.1 mm; 1.9 µm)	(A) 0.1% formic acid in water (B) 0.1% formic acid in acetonitrile	(Blay et al., 2011)
AO, YTX, AZA, GYM, SPX, PTX	UHPLC–HRMS (Orbitrap)	Hypersil Gold C18 (50 mm × 2.1 mm; 1.9 µm)	(A) H ₂ O (NH ₃ 6.7 mM) (B) ACN:H ₂ O (NH ₃ 6.7 mM) (90:10)	(Domènech et al., 2014)
AO, YTX, AZAs, SPX, PTX	UHPLC–HRMS (Orbitrap)	Nucleodur C18 Gravity(50 mm × 2 mm, 1.8 µm)	(A) H ₂ O (NH ₃ 0.01%) (B) ACN (NH ₃ 0.01%)	(Orellana et al., 2014)

*En mode gradient

III.4.5. Les Brévétotoxines

Différentes méthodes LC-MS ont été développées pour l'analyse ciblée des brévétotoxines (BTX) (Hua and Cole, 2000; Ishida et al., 2004; McNabb et al., 2012) mais elles ont quelques fois été analysées avec des méthodes LC-MS multitoxines initialement développées pour les toxines lipophiles (Wu et al., 2014a; Zendong et al., 2015).

Les BTX sont séparées sur des colonnes en phase inverse (C18, C8) de différentes caractéristiques avec des phases mobiles eau/acétonitrile, d'acide formique et parfois de formate d'ammonium et fonctionnent en mode gradient. McNabb et al (2012) ont montré qu'une phase mobile composée d'eau et de méthanol avec de l'acide formique et du formiate d'ammonium permettait une meilleure sensibilité. Cette observation a également été confirmée par (Zendong et al., 2015).

La plupart des BTX sont détectés en mode d'ionisation positif. L'ion précurseur est soit la forme $[M+H]^+$, soit l'adduit sodium $[M+Na]^+$, ce dernier étant moins souvent rapporté.

D'autres études ont rapporté les ions $[M-H]^-$ et $[M-Na]^-$ pour BTX-B1 et BTX-B5 en mode négatif (Ishida et al., 2004; Nozawa et al., 2003). Les ions fragments couramment surveillés correspondent à des pertes successives de molécules d'eau.

III.4.6. Les Palytoxines

Plusieurs études concernant la quantification et l'élucidation structurale des analogues de PLTX utilisant la LC-MS ont été rapportées (**Tableau 6**). La détermination des analogues PLTX et OVTX est habituellement effectuée utilisant une chromatographie en phase inverse sur une colonne de silice C8 ou C18 et une élution en gradient. Les phases mobiles sont composées d'eau /acétonitrile avec des modificateurs volatils tels que l'acide acétique, l'acide formique et le formate d'ammonium ou acétate d'ammonium (**Tableau 6**). Rossi et al. (2010) ont décrit une méthode basée sur la séparation sur colonne HILIC. La détection simultanée d'analogues PLTX et OVTX a été réalisée en basse et haute résolution. La détection des analogues de PLTX se fait en mode d'ionisation positif. Ces composés peuvent être multichargés, de sorte que l'ion précurseur surveillé peut être de différentes formes : $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$ ou $[M+3H]^{3+}$. Ciminiello et al. (2015) ont rapporté que dans les conditions analytiques de leur étude, l'adduit de calcium $[M+H+Ca]^{3+}$ était l'ion précurseur le plus intense.

Tableau 6. Méthodes d'analyses LC-MS des palytoxines

Toxines	Technique	Colonne	Phase Mobile	Référence
PLTX OVTX-a OST-D	LC-MS/MS (QqQ)	Gemini C18 (150 × 2 mm; 3 µm)	(A) 100% H ₂ O + 30 mM acetic acid (B) 95% aqueous MeCN with 30 mM acetic acid (Gradient)	(Biré et al., 2013) (Brissard et al., 2014a) (Biré et al., 2015)
PLTX, OVTX	LC-HRMS (Orbitrap)	Gemini C18 (2×150 mm, 3 µm) Kinetex C18 (2,10×100 mm, 2,6 µm) Poreshell 120 EC-C1 (,1×100 mm, 2,7 µm)	(A) H ₂ O + 30 mM acetic acid, (B) 95 % MeCN–H ₂ O + 30 mM acetic acid (Gradient)	(Ciminiello et al., 2015)
PLTX, OVTX	LC-HRMS (QTOF)	Luna HILIC (150 x 2,00 mm, 3 µm)	(A) water (B) 95% acetonitrile/water both containing 0.1% formic acid (gradient)	(Rossi et al., 2010)
PLTX, OVTX	UHPLC-MS/MS (Qtrap)	Acquity C18 HSS (50 × 1 mm, 1,7 µm)	(A) water +0.1% formic acid (B) ACN + 0.1% formic acid	(Selwood et al., 2012)

III.4.7. Les Ciguatoxines

L'analyse LC-MS présente un excellent outil pour (i) l'élucidation de la structure des nouveaux congénères de CTX, à partir de poissons ou de dinoflagellés, et ii) l'établissement du profil toxique d'une espèce de poisson ou d'une souche de dinoflagellé, avec l'identification et la quantification d'analogues connus.

Plusieurs méthodes LC-MS/MS ont été décrites dans la littérature pour l'analyse des ciguatoxines du Pacifique, des Caraïbes et de l'océan Indien dans diverses matrices (**Tableau 7**). Malgré un nombre important de méthodes développées, aucune d'entre elles n'a été formellement validée.

La séparation chromatographique est souvent réalisée sur des colonnes de phase inverse de type C18 (Caillaud et al., 2010; Mak et al., 2013; Wong et al., 2014) C8 (Abraham et al., 2012; Bottein et al., 2011; Dickey, 2008) et C6 (Stewart et al., 2010).

Les études citées ci-dessous rapportent l'utilisation d'un gradient de phase mobile eau/acétonitrile acidifiées avec de l'acide formique et contenant parfois du formate d'ammonium. Yogi et al. (2014) ont présenté une méthode différente permettant l'identification de 13 CTX du pacifique utilisant un gradient linéaire de phase mobile eau/méthanol acidifié sur une colonne Zobrax C18.

Dans la majorité des études décrites dans la littérature, la détection MS est assurée par des spectromètres de masse basse résolution (LRMS) avec des sources électrospray (ESI). D'autres sources d'ionisation de type FAB ont été utilisées dans de précédentes études et ont permis l'élucidation d'un grand nombre d'analogues de P-CTX (Lewis, 1991; Yasumoto et al., 2000). Seules quelques études plus récentes ont rapporté la détection en haute résolution (HRMS) pour l'analyse de ciguatoxines (Diogène et al., 2017; Hamilton et al., 2002; Sibat et al., 2018; Silva et al., 2015b)

Les CTX sont détectées en mode d'ionisation positif donnant lieu à un ion précurseur monochargé soit sous forme d'ion moléculaire protoné, soit un adduit ammonium et/ou potassium ou des adduits sodium. Les fragments couramment suivis correspondent à des pertes successives de molécules d'eau (jusqu'à 5 molécules). Plusieurs méthodes LC-MS/MS basées sur ces transitions MRM ont permis d'identifier de nombreux congénères de CTX dans la chair de poisson et/ou les viscères (Abraham et al., 2012; Boada et al., 2010; Hamilton et al., 2010; Hossen et al., 2015; Robertson et al., 2013) et dans les souches de dinoflagellés (Caillaud et al., 2011; Chinain et al., 2014; Roeder et al., 2010). Néanmoins, il convient de préciser que ces pertes successives de H₂O ne représentent pas un modèle de fragmentation caractéristique des CTX car n'importe quel composé polyhydroxylé se comporterait de la même manière. Ce manque de spécificité peut être problématique pour l'identification des CTX. La méthode développée par Yogi et al. (2011) suggère de suivre l'ion sodium [M+Na]⁺ en tant qu'ion parent et fils à la fois. L'adduit sodium étant très stable et difficile à fragmenter, l'application d'un DP (Declustering Potential) plus important a permis de s'affranchir des interférences matricielles et d'identifier plus facilement les CTX.

Tableau 7. Méthodes LC-MS pour l'analyse des CTX

Toxines	Matrice	Technique	Colonne	Phase Mobile	Référence
P-CTX-1, P-CTX-3C	Liver brain and tissue of (monk seals)	LC-MS/MS (3200 QTRAP)	Luna C8 (150 × 2 mm; 3 µm)	(A) H ₂ O (B) 95% aqueous MeCN 0.1 % formic acid (Gradient)	(Dechraoui Bottein et al., 2011)
P-CTX-1	Flesh (Coral reef fishes)	LC-MS/MS (3220; 5500 QTRAP)	Luna C18 (250×2,0 mm., 5 µm,)	(A) 100% H ₂ O (B) 95% aqueous MeCN With 0.1 % formic acid in both (Gradient)	(Wu et al., 2011)
P-CTX-1, P-CTX- 2, P-CTX-3	Blood Coral reef fish	LC-MS/MS (5500 QTRAP)	Luna C18 (250×2,0 mm , 5 µm,)	(A) H ₂ O (B) 95% MeCN/water both containing 0.1% formic acid and 2 mM ammonium formate (Gradient)	(Mak et al., 2013)
I-CTX-1 & 2 I-CTX-3 & 4 I-CTX-5 I-CTX-6 P-CTX-1/2 & 3	Flesh, stomach and fins, Stomach extract (Shark)	LC-HRMS (Orbitrap- Exactive HCD)	Hypersil Gold C18 (50 × 2,1 mm, 1.9 µm)	(A) H ₂ O (B) 95% MeCN both containing 2 mM ammonium formate and 0.1% formic acid.	(Diogène et al., 2017)
P-CTX1B P-CTX3C & P- CTX3B P-CTX4A & P- CTX4B 2,3-diOH-P- CTX3C 51-OH-P-CTX3C M-seco-P-CTX3C P-CTX2 & P-CTX3 2-OH-P-CTX3C 3-OH-P-CTX3C	sea urchin trochus shell Fish culture of <i>Gambierdiscus</i> <i>polynesiensis</i>	LC-MS/MS (API4000 QTRAP) LC-HRMS (6550 ifunnel Q- TOF)	C18 Kinetex (50x2,1 mm, 2,6 m, 100 Å) Zorbax Eclipse Plus C18 (50*2,1 mm, 1,8 m, 95 Å)	(A) H ₂ O (B) 95% MeCN both containing 2 mM ammonium formate and 50 formic acid (A) H ₂ O (B) MeOH both containing 2 mM ammonium formate and 50 formic acid	(Sibat et al., 2018)
P-CTX-1B P-CTX-2/CTX-3 P-CTX-3B/CTX- 3C P-CTX-4 A/CTX- 4B MTX, MTX-3	Flesh and liver (fish) MicrAOLgae (<i>Gambierdiscus</i> <i>spp.</i>)	LC-MS/MS Xevo TQ-S	Acquity UPLC BEH phenyl (1,7 µm, 100 × 2.1 mm)	(A) H ₂ O (B) MeCN each containing 0.2% (v/v) of a 25% ammonium hydroxide solution (giving a final concentration of 26.7 mM ammonia)	(Murray et al., 2018)

III.4.8. Synthèse

La revue de littérature réalisée sur les méthodes d'analyse LC-MS des biotoxines marines montre que cette technique est en pleine expansion. D'abord utilisée comme méthode officielle pour l'analyse des toxines lipophiles, cette technique de détection est aujourd'hui étendue aux différents autres groupes de toxines.

La majorité des méthodes LC-MS développées reposent sur une détection en basse résolution mais plusieurs méthodes utilisant une détection en haute résolution ont récemment été développées.

Bien que nombreuses, les méthodes LC-MS développées ciblent un groupe de toxines en particulier. Seules quelques méthodes multi-toxines ont été développées, sur des composés de même polarité mais elles ne permettent pas de mettre en évidence d'éventuelles émergences.

L'exploitation du potentiel de la détection par HRMS en dehors des analyses ciblées pour une approche plus globale permettrait de pallier à ce problème. En effet, une approche globale basée sur des méthodes d'extraction non-discriminantes a pour finalité de rechercher et mettre en évidence des toxines émergentes après avoir écarté l'hypothèse de la présence de toxines connues en criblant une base de données aussi exhaustive que possible.

IV. Application de l'approche non ciblée pour l'analyse des composés émergents ou inconnus

IV.1. Principe général

L'approche non-ciblée est principalement employée en métabolomique et a été adaptée pour l'analyse de petites molécules dans divers domaines (pharmaceutique, sécurité alimentaire, analyse environnementale, médicale, etc.). Il s'agit d'une approche multidisciplinaire mettant en jeu des outils d'analyse chimique et chimiométriques ; plus précisément, la préparation des échantillons, la séparation chromatographique et le traitement des données (**Figure 17**).

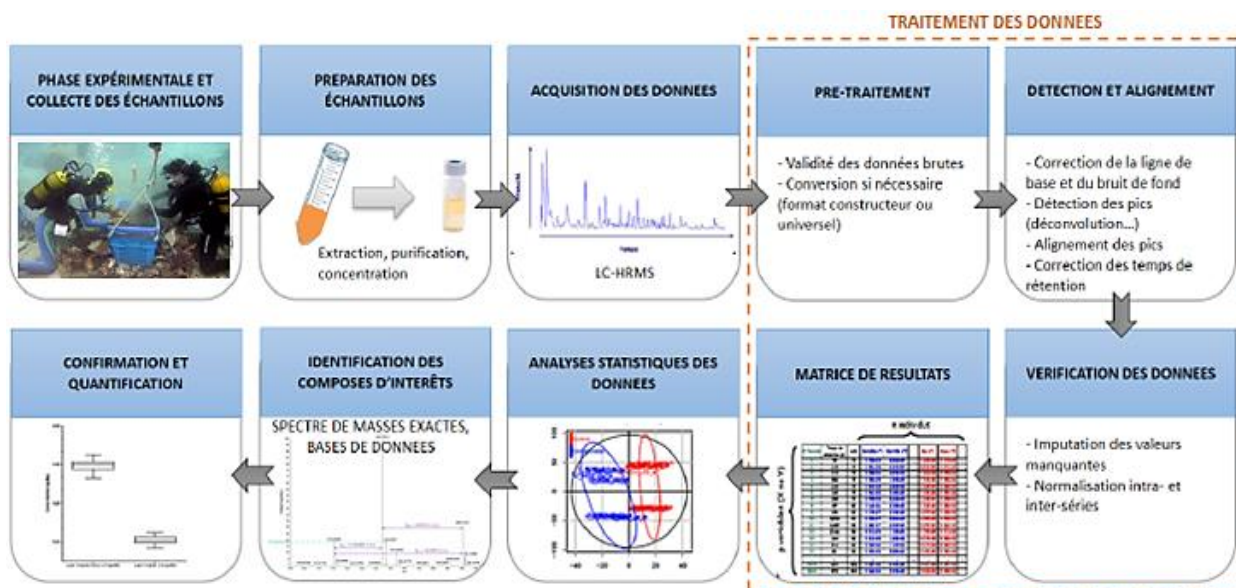


Figure 17. Les différentes étapes d'une analyse non-ciblée par spectrométrie de masse à haute résolution (adapté de la thèse de K. Slimani)

Elles reposent principalement sur l'utilisation des analyseurs à temps de vol (TOF) ou des analyseurs Orbitrap qui ont gagné en popularité en raison de leur grande capacité à fournir des données de qualité exceptionnelles et des informations plus complètes concernant la masse moléculaire exacte, la composition élémentaire et la structure moléculaire détaillée d'un composé donné.

Les données sont acquises en mode full scan ce qui permet la recherche de plusieurs centaines de molécules à la fois, connues et inconnues, dans différentes matrices complexes (animales, végétales, biologiques). L'acquisition d'une empreinte chimique globale de l'échantillon offre la possibilité de réaliser des fouilles de données successives et illimitées en nombre et dans le temps (analyse rétrospective) permettant ainsi l'identification de nouveaux contaminants préoccupant. L'association des analyseurs HRMS avec les quadripôles permet d'enregistrer des spectres de fragmentation (MS^2) indispensables pour l'élucidation structurale des composés détectés. Il convient de noter que les méthodes d'analyse LC-HRMS génèrent une quantité importante de données qui doivent être minutieusement traitées afin d'extraire l'information pertinente. L'identification précise de molécules inconnues est longue et complexe, elle requière de multiples étapes de filtration et de traitement de données

impliquant l'utilisation de différents outils chimiométriques (tests statistiques univariés et multivariés).

Les stratégies pour les analyses LC-HRMS sont très différentes selon les groupes de recherche. Pour identifier des composés inconnus, chaque laboratoire dispose de ses propres « workflow », plusieurs études ont été présentées dans la littérature notamment dans le domaine de l'analyse environnementale (Agüera et al., 2013; Ferrer and Thurman, 2003; Krauss et al., 2010; Schymanski et al., 2015) mais aussi en sécurité alimentaire (Castro-Puyana et al., 2017; Le Boucher et al., 2015; Tengstrand et al., 2013). Malgré la spécificité des protocoles décrits, un schéma global a pu être tiré de ces diverses études englobant le screening ciblé, le screening suspect et le screening non ciblé. Cette stratégie générique décrite par Krauss et al. (2010) (**Figure 18**) peut-être optimisée et adaptée en fonction des instruments utilisés et la finalité de l'étude.

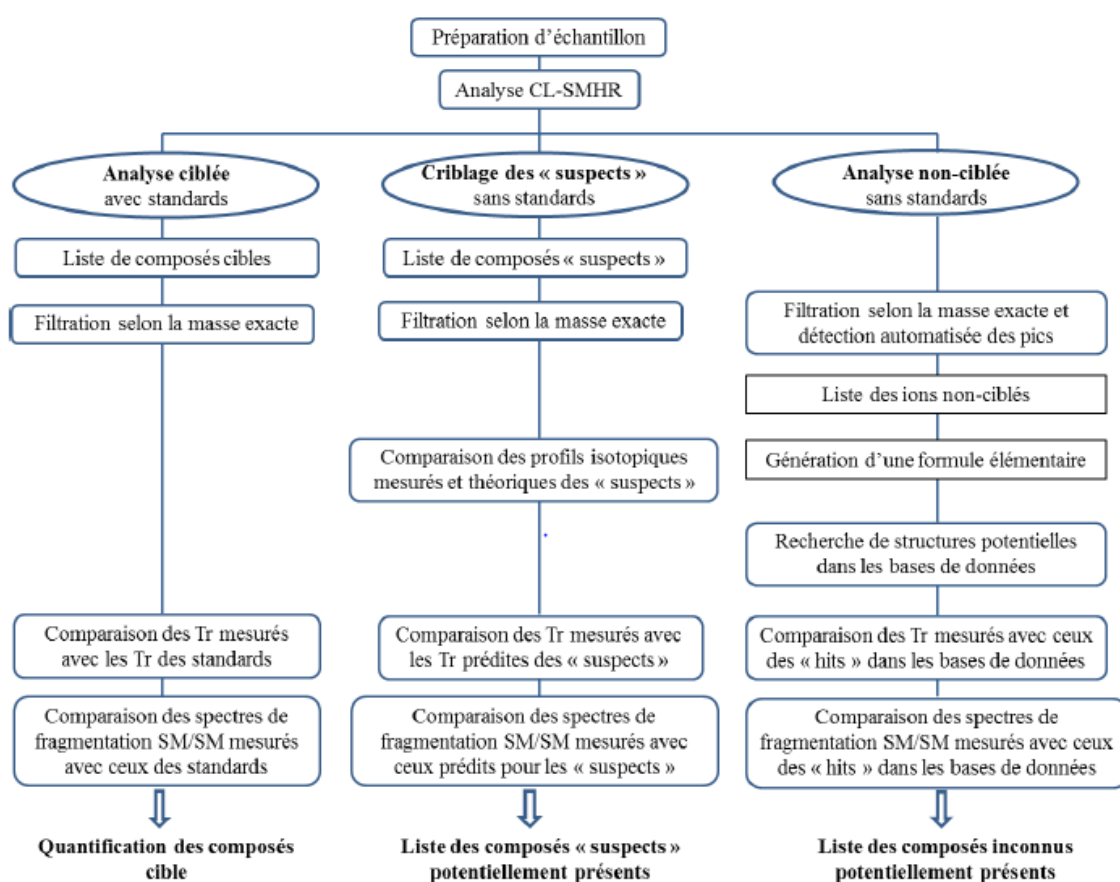


Figure 18. Stratégies d'analyses des données HRMS (adapté de Krauss et al. (2010))

Le screening ciblé fait référence au screening basé sur l'utilisation d'étalons de référence mesurés en interne, ce qui permet de confirmer par comparaison du temps de rétention, la concordance de masse exacte, la correspondance du modèle isotopique et enfin la concordance spectrale MS/MS. Les analyses ciblées ont pour objectif final la quantification des composés d'intérêt. Cette approche est la plus communément utilisée dans le cadre d'analyses de routine.

Le screening suspect ne désigne pas nécessairement des composés nouveaux mais peut être utilisé pour des composés qui n'étaient pas initialement recherchés lors de l'analyse. Il peut s'agir de composés connus comme pouvant potentiellement être présents dans les échantillons (analogues, produits de dégradation et/ou de métabolisation par exemple). Contrairement à l'analyse ciblée quantitative, le criblage de composés « suspects » n'est pas tributaire de l'utilisation de standards pour l'identification et la confirmation. Dans le domaine des biotoxines marines, une minorité de standards est disponible à l'heure actuelle. Cependant, des informations spécifiques à chaque molécule existent, telles que la formule moléculaire et la formule développée. Ces informations peuvent être utilisées lors des processus de confirmation de l'identité des « suspects ». La formule moléculaire permet dans un premier temps de calculer le rapport m/z exact de l'ion moléculaire recherché. Ce dernier est par la suite extrait du spectre haute résolution sous forme de chromatogramme. En ionisation electrospray, les ions majoritairement formés (à quelques exceptions près pour certaines molécules formant des adduits) sont le $[M+H]^+$ ou le $[M-H]^-$, ce qui facilite les tentatives d'identification (Krauss et al., 2010). Les fragments ou ions isotopiques caractéristiques sont par la suite évalués en comparant les spectres expérimentaux MS ou MS/MS, ou le fragment majoritaire avec ceux reportés dans la littérature (Chemspider, PubChem, MassBank, Metlin *etc...*) (Diaz et al., 2012) ou en se rapportant à la théorie. Idéalement, la disponibilité du standard permettra *apostériori* une identification formelle (grâce aux profils isotopiques, temps de rétention et spectres de fragmentation). Cette approche de criblage des suspects peut aussi se faire grâce aux bases de données « maison » (constituées par chaque laboratoire sur leur(s) matériel(s) et logiciel(s) disponibles) contenant

une liste de composés spécifiques de chaque domaine d'étude (pesticides, composés pharmaceutiques, toxines marines, perturbateurs endocriniens *etc...*).

Le screening non ciblé concerne tous les signaux non attribués par le criblage ciblé ou suspect. Cette approche est utilisée pour identifier des composés d'intérêt sur lesquels on ne dispose d'aucune information préalable. Plusieurs milliers de signaux peuvent être concernés. Chaque signal est caractérisé au minimum par un temps de rétention, une masse exacte (et son massif isotopique) et une intensité.

L'analyse non-ciblée commence généralement par la filtration des signaux en fonction des masses exactes, suivie d'étapes de traitement des données pour éliminer le bruit, les blancs ou les artefacts. Ensuite, une déconvolution automatisée permet d'extraire les pics de tous les composés possibles. Les pics de masse des différents ions d'un composé sont souvent fusionnés en un seul élément (par exemple, $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$). L'ensemble de données qui en résulte est ensuite analysé à l'aide de méthodes statistiques afin d'évaluer les caractéristiques les plus pertinentes et sélectionner les ions d'intérêt en comparant différents échantillons et blancs. Pour les ions sélectionnés, la composition élémentaire est calculée et les formules moléculaires les plus probables sont évaluées en faisant correspondre le modèle isotopique. Pour l'identification, les formules moléculaires sont recherchées dans les bases de données ou les bibliothèques MS/MS. Le temps de rétention est souvent utilisé comme critère supplémentaire pour réduire le nombre de « hits ». L'identification est obtenue lorsque la fragmentation MS^2 et le temps de rétention du composé inconnu s'adaptent au spectre de la bibliothèque et au temps de rétention d'un composé de référence.

Si aucune correspondance dans une base de données MS/MS ou une bibliothèque n'est disponible, des recherches dans les grandes bases de données chimiques telles que PubChem et ChemSpider sont effectuées. Cette recherche se traduit généralement par plusieurs centaines à plusieurs milliers d'occurrences pour une structure possible. La fragmentation peut être utilisée comme critère pour sélectionner les résultats les plus probables. Étant donné que les bases de données chimiques ne contiennent généralement pas de données MS^2 , la fragmentation *in silico* (prédictive) peut être utilisée et les fragments doivent ensuite être

comparés aux fragments MS mesurés. Il en résulte un certain nombre de structures composées proposées. Toutefois, l'identification sans équivoque nécessite encore des informations complémentaires provenant d'autres méthodes d'analyse, comme l'analyse RMN.

IV.2. Traitement des données

Pour une véritable analyse sans a priori, il faudrait, en principe, une identification de tous les éléments détectés dans un échantillon. Compte tenu de la richesse des informations générées l'inspection visuelle de l'ensemble du chromatogramme et le traitement manuel des données spectrales ne sont pas suffisants pour détecter et identifier tous les composés. Le recours au traitement de ces données afin d'extraire l'ensemble de l'information utile est donc nécessaire. Le traitement des données s'effectue principalement par l'utilisation de logiciels commerciaux (MarkerLynx, Waters ; MarkerView, Sciex ; MassHunter, Agilent, etc) ou open source (XCMS (Smith et al., 2006)), MetAlign (Tikunov et al., 2005)) ou MZmine (Katajamaa and Orešič, 2005)). D'autres logiciels « maison » sont développés par certains laboratoires. Ils ont pour but d'éliminer le bruit de fond, de détecter les pics par la mise en œuvre d'algorithmes, et d'aligner les pics entre les différents échantillons analysés. Les données sont converties sous des formats numériques exploitables souvent sous forme matricielle compatible avec les logiciels d'analyse statistiques.

Il est à noter que chaque logiciel dispose d'un algorithme différent assurant les différentes étapes de détection automatisées des signaux. L'avantage des logiciels open source c'est que les détails de leur algorithme sont accessibles à l'utilisateur, ce qui lui offre une grande marge de manœuvre pour optimiser chacun des paramètres à chaque étape du traitement. Quant aux logiciels commerciaux (ou constructeurs) souvent simples d'utilisation, peuvent être qualifiés de « boîte noire » car les algorithmes sont confidentiels et l'utilisateur n'a pas forcément accès à tous les paramètres de retraitement.

Les étapes de retraitement des données sont logiciel dépendant, nous présenterons ici le principe de quelques étapes clés en prenant comme exemple le logiciel XCMS, l'un des plus utilisés en métabolomique et pour l'analyse HRMS de petites molécules :

Le prétraitement des informations chromatographiques (temps de rétention) et spectrales (rapport m/z et intensité) repose sur la vérification visuelle de la validité qualitative des données d'acquisition brutes LC-HRMS, suivie de leur conversion du format de fichier constructeur vers un format universel exploitables par le logiciel.

La détection automatique des pics qui consiste en la sélection des signaux analytiques pertinents présents dans les données brutes acquises correspondant à l'ensemble des composés détectés dans la totalité des échantillons. Au cours de cette étape, des filtres de bruit tels que le ratio signal sur bruit (S/N) ou la comparaison au niveau de la ligne de base du chromatogramme permettent la suppression d'artefacts électroniques.

L'alignement des empreintes inter-échantillons consiste à associer les signaux identiques provenant d'un même ion détecté dans les différents échantillons, par création de groupes d'ions selon le Tr et le rapport m/z , malgré de légers décalages possibles.

La correction des temps de rétention est une étape complémentaire à la précédente, elle permet de recalibrer les temps de rétentions et corriger les dérives éventuelles pouvant survenir au cours de la séquence d'acquisition.

La complétion des données manquantes permet de rattraper des pics non détectés en raison du bruit de fond trop important ou de la forme du pic chromatographique atypique mais aussi de remplacer la donnée manquante par l'intégration du bruit de fond local. Cette étape est très importante pour l'utilisation de statistiques notamment les tests de significativité.

La normalisation permet de maîtriser et corriger les fluctuations de rendement d'ionisation dues notamment aux effets de suppression afin qu'elles n'entravent pas l'interprétation des données. Pour être en mesure de corriger cette dérive analytique,

la solution la plus commune est l'utilisation d'échantillons de contrôle qualité (*Quality control*, QC). Ces QCs sont généralement composés d'un mélange de l'ensemble des échantillons analysés et sont injectés régulièrement tout au long de la séquence d'analyse. Le biais analytique pourra ainsi être modélisé et corrigé par régression.

Tout au long du processus de traitement des données, différents paramètres peuvent être optimisés par l'utilisateur afin d'aboutir à une matrice de données à la sortie du logiciel. Ces données contiennent les informations sur les variables détectées. Chaque variable est caractérisée par un couple rapport m/z et temps de rétention et présente l'information sur l'aire du pic chromatographique dans chaque échantillon. Cette matrice de données à deux dimensions est à son tour traitée par des algorithmes ou des programmes d'exploration de données. Ces aspects seront abordés plus en détail dans le chapitre III dédié à l'analyse non ciblée.

IV.3. Analyses statistiques des données

L'analyse statistique des données permet de synthétiser et de structurer l'information contenue dans les données mesurées en spectrométrie de masse. L'analyse d'empreintes chimiques globales peut être réalisée selon deux approches statistiques univariées et multivariées (Gorrochategui et al., 2016).

IV.3.1. Analyses univariées

Les analyses statistiques univariées sont des techniques classiquement utilisées en biologie. Elles permettent d'analyser une à une les variables explicatives en fonction d'une métadonnée (concentration, ordre de passe, origine géographique...) sans tenir compte des interactions existant entre les variables. Le type de test utilisé dépend de la nature de la variable et de la nature de la métadonnée à étudier : des calculs de corrélation sont réalisés si les deux sont quantitatives alors que des analyses de variance sont utilisées si l'une des deux

est qualitative. La distribution de probabilité de la variable conditionne aussi le choix du test. Une distribution selon la loi normale autorise l'utilisation de tests paramétriques (test de Student ou corrélation de Spearman), alors que les variables dont la distribution au sein de la population étudiée ne suit pas une loi statistique sont étudiées à l'aide de tests non-paramétriques tels que le test de Wilcoxon ou la corrélation de Pearson.

IV.3.2. Analyses multivariées

Les analyses statistiques multivariées sont utilisées afin d'étudier ou de décrire un ensemble de données. Elles permettent de synthétiser et de visualiser rapidement une grande quantité d'informations, ceci en projetant les données initiales dans un espace de dimensions réduites ce qui permet une visualisation aisée des données. Les analyses statistiques multivariées peuvent être divisées en deux groupes :

Les analyses descriptives ou non supervisées qui ne nécessitent pas d'information « a priori » sur la nature des échantillons. Leur but est de décrire des données et de visualiser la répartition des échantillons. L'analyse en composante principale (ACP) est la plus représentative de ce groupe (Hotelling, 1933; Wold et al., 1987).

Les analyses statistiques explicatives ou supervisées qui visent à expliquer une réponse (variable qualitative Y). Parmi ces méthodes, les régressions PLS (Partial Least Square ;(Joreskog, 1982)) l'avantage d'être insensibles aux multicollinéarités c'est-à-dire à la présence de variables très corrélées. Ceci est particulièrement intéressant pour les études menées en spectrométrie de masse où les rapports m/z des fragments issus d'un même ion sont très corrélés.

CHAPITRE II : DÉVELOPPEMENT DES METHODES D'ANALYSE CIBLEE

A. Introduction

Au travers de la littérature, nous avons pu constater la difficulté de disposer d'une méthode « universelle » pour l'analyse d'une large gamme de molécules aux propriétés physico-chimiques très variées. Chacune des étapes analytiques présente des risques d'être discriminante et donc d'obtenir une information finale qui ne reflète pas totalement la contamination réelle d'un échantillon, ce qui est l'objectif ultime de toute méthode se voulant globale. La complexité de cette tâche est, à l'heure actuelle, si importante que l'on a conscience que l'utilisation d'une méthode unique permettrait seulement de s'approcher de cette information mais ne pourra être exhaustive et comportera inévitablement des limites. Le but du travail réalisé est de réduire au maximum ces limites.

La spectrométrie de masse haute résolution, permettant de détecter un très grand nombre de biotoxines marines malgré la grande diversité de leurs propriétés physico-chimiques, présente un atout majeur. Cependant compte tenu de la complexité des matrices étudiées et du nombre important de molécules à analyser, le traitement des données générées après analyse peut s'avérer très complexe en l'absence de séparation chromatographique préalable à la détection en masse. Ainsi, afin de mettre en place une approche non-ciblée la plus efficiente possible, il est indispensable de mettre au point une ou plusieurs méthodes de séparation chromatographique.

Les biotoxines marines présentent une gamme de polarité très étendue allant des plus hydrophiles (STX, TTX), relativement polaire (AD), amphiphiles (PITX) au plus lipophiles (AO, AZA, YTX, PTX, CTX, BTX, etc). Il est difficile d'avoir une méthode unique permettant de séparer l'ensemble des molécules. De ce fait, deux conditions chromatographiques différentes basées sur deux types de colonnes C18 et HILIC ont été mises en place et seront décrites dans ce chapitre. Le développement des deux méthodes

d'analyse a été essentiellement basé sur le choix des conditions analytiques et l'évaluation des performances instrumentales. Les aspects relatifs à l'extraction des toxines n'ont pas été abordés lors de ces travaux, nous avons utilisés des protocoles existants. Par contre, nous avons fait le choix de focaliser nos efforts sur la mise en place et l'optimisation d'un workflow pour l'analyse non-ciblée qui sera traitée dans le chapitre III.

B. Développement de la méthode ciblée pour l'analyse des toxines lipophiles et l'acide domoïque par LC-HRMS

I. Matériels et Méthodes

I.1. Produits chimiques et réactifs

Toutes les solutions ont été préparées avec des produits chimiques de qualité analytique et de l'eau ultra pure (18,2 MΩ.cm) produite par avec un système de purification d'eau Milli-Q Academic (Millipore S.A., Saint-Quentin en Yvelines, France). L'acide chlorhydrique (HCl ; 37%) et l'hydroxyde de sodium (NaOH ; 99%) ont été achetés auprès de Merck (Fontenay-sous-Bois, France). Le formiate d'ammonium (> 97%) a été acheté auprès de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France.) L'acide formique (98-100%), l'acétonitrile (ACN ; qualité HPLC) et le méthanol (MeOH ; qualité HPLC) ont été achetés auprès de Fisher Scientific SAS (Illkirch, France). La solution d'hydroxyde d'ammonium (25%) provient de chez VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Les solutions de calibrations d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) pour l'analyse par LC-HRMS ont été achetées auprès de Sciex (Nieuwerkerk aan den IJssel, Pays-Bas).

I.2. Étalons et échantillons analysés

Les solutions étalons certifiées proviennent du Conseil national de recherches du Canada (CNRC, Halifax, Nouvelle-Écosse, Canada). Ceux-ci comprenaient des solutions étalons

certifiées des toxines suivantes : AD, AZA1-3, PTX2, AO, DTX1 et -2, YTX, hYTX, SPX1, PnTX-G et GYM. Les étalons de PnTX-A, 13,19-didesMeC et 20-meG ont été achetées auprès de Cifga (Lugo, Espagne). PbTx-2 et 3 ont été achetés chez Abcam (Cambridge, UK). Les échantillons analysés dans le cadre de cette étude sont des moules et des huîtres non-contaminées (matrices blanches exemptes de toxines) qui ont été supplémentés afin d'obtenir les compositions en toxines désirées.

I.3. Préparation des solutions de travail et des gammes d'étalonnage

Une solution mère multitoxines a été préparée dans le MeOH à partir des solutions étalons certifiées de PTX2, AZA1 à 3, AO, DTX1 et 2, PnTX-A, PnTX-G, YTX, h-YTX, SPX1, 13,19-DidesMeC. 20-meG, GYM-A et AD à des concentrations allant de 120 à 240 ng/mL selon les toxines. Cette solution mère a ensuite été diluée en série dans le MeOH pour préparer six solutions de travail (L1-L6), chacune contenant les toxines étudiées à différentes concentrations. Les solutions de travail des PbTx-2 et 3 ont été préparées séparément en utilisant une solution mère à 250 ng/mL. Ces solutions de travail ont ensuite été utilisées pour préparer les gammes en matrice avec des extraits de moules et d'huîtres blanches (non-contaminées) préalablement préparés pour atteindre les niveaux de concentration appropriés : des aliquotes de 450 µL d'extraits de coquillages sont distribués dans des vials HPLC supplémentés de 50 µL de la solution multitoxines pour chaque niveau. Ce mode opératoire permet d'avoir une charge matricielle constante de 0,09 g/mL pour toutes les solutions analysées. Les gammes en solvant ont été préparées de la même manière, en utilisant du MeOH à la place des extraits d'échantillons. Les courbes d'étalonnage pour l'évaluation des effets matrice vont de 1 à 12 ng/mL pour les AZA et les imines cycliques ; 2–24 ng/mL pour les YTX, AO, DTX et PTX2 ; 6-72 ng/mL pour l'AD.

Les droites d'étalonnage, les pentes moyennes, les ordonnées à l'origine et les coefficients de détermination (R^2) ont été déterminés sur la base de trois injections de chacun des sept niveaux de concentration (y compris le blanc, L0).

I.4. Préparation des échantillons

Les échantillons de moules et d'huîtres ont été préparés selon le mode opératoire standard de l'EURLMB (**Annexe 1**) en extrayant 2 g de tissu homogénéisé avec 2 x 9 mL de MeOH. Après centrifugation, les surnageants sont combinés dans une fiole jaugée et le volume ajusté à 20 ml avec le MeOH.

Pour détecter et quantifier la quantité totale de toxines du groupe AO, y compris les formes estérifiées, une hydrolyse alcaline est nécessaire avant l'analyse des échantillons naturellement contaminés. L'hydrolyse consiste à ajouter du NaOH (2,5 M) à une partie aliquote de l'extrait méthanolique, à homogénéiser l'ensemble au vortex puis à chauffer le mélange à $76^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 40 min. Une fois refroidi à température ambiante, l'extrait hydrolysé est neutralisé avec une solution de HCl (2,5 M) et homogénéisé à l'agitateur. L'extrait est ensuite filtré sur un filtre PTFE de 0,45 μm .

I.5. Conditions d'analyse par LC-HRMS

Les analyses LC-HRMS ont été réalisées avec un système HPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, San José, Californie, États-Unis) couplé à un QTOF (5600 Triple TOF, Sciex). Le spectromètre de masse était équipé d'une source d'ionisation DuoSpray et d'une sonde TurboIonSprayTM. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Waters (Saint-Quentin-en-Yvelines, France) X SELECT[®] HSS T3 (100 \times 2,1 mm, 2,5 μm) avec deux phases mobiles composées (A) d'eau et (B) d'un mélange ACN–eau. (95/5, v / v), contenant chacune 50 mM d'acide formique et 2 mM de formiate d'ammonium. Le gradient de la méthode LC, d'une durée de 20 min, était composé des étapes suivantes : après une étape isocratique pendant 1 min, un gradient linéaire a été appliqué allant de 2% à 100% de B en 9 min et maintenu à 100% de B pendant 5 min, avant un retour aux conditions initiales (2% B) en x min. Ces conditions initiales ont été maintenues pendant 5 min pour rééquilibrer la colonne. Le débit était de 0,45 mL/min et la température de la colonne était de 30°C. Le volume d'injection a été fixé à 5 μL . En ce qui concerne la détection par MS,

l'ionisation par électrospray (ESI) a été réalisée dans les modes positif et négatif en deux analyses séparées. Les paramètres pour l'ionisation positive et négative étaient les suivants (les valeurs différentes pour le mode négatif sont indiquées entre parenthèses): gaz (GS) 1 et 2, 35 et 45 psi; gaz rideau (CUR), 30 psi; température de la source (TEM), 500 ° C; tension du capillaire (ISVF), 5,5 (-4,5) kV; potentiel de déclusterisation (DP), 60 V (-100 V); délai de libération des ions (IRD), 67 ms; largeur de libération des ions (IRW), 25 ms. L'analyse MS a été réalisée en mode full scan TOF MS et MS/MS simultanément avec une acquisition dépendante des informations (IDA). L'acquisition full scan (100-1250 Da) a été réalisée avec un temps d'accumulation de 0,2 s en utilisant le mode haute sensibilité. Huit expériences de fragmentation MS² supplémentaires (temps d'accumulation : 0,05 s) ont été programmées. Les spectres de fragmentation sont acquis en mode IDA en appliquant une énergie de collision (CE) de 40 électrons volts (eV) avec un pas (CES) de ± 20 eV.

Le spectromètre de masse a été calibré automatiquement toutes les cinq injections à l'aide d'un système automatique d'apport de solutions de calibrations (CDS) via la sonde APCI de la source d'ionisation DuoSpray.

I.6. Acquisition et traitement des données ciblées

L'acquisition des données a été réalisée par le logiciel Analyst[®] TF 1.7.1 (Sciex, Toronto, Canada). L'application MasterView[™] du logiciel PeakView[®] 2.2 (Sciex, Toronto, Canada) a été utilisée pour créer des listes de composés cibles et afficher des critères d'identification avec des « codes couleurs » associés (vert, orange, rouge), reflétant le niveau de confiance pour les critères suivis : masse (erreur de masse), profil isotopique et spectre MS² (purity score), ainsi que d'autres informations liées aux pics chromatographiques, telles que le temps de rétention, le rapport signal/bruit (S/N) ou la largeur des pics à mi-hauteur (FWHM). Les voyants passent au vert lorsque les valeurs de confiance préalablement définies pour les paramètres mentionnés ci-dessus sont atteintes ; cela indique un bon niveau de confiance dans l'identification des composés présents dans la liste. La quantification des toxines cibles a été réalisée par le logiciel MultiQuant[™] 2.1.1 (Sciex, Toronto, Canada) utilisant des

courbes de calibration en solvant. Les différents signaux acquis et traités automatiquement par MasterviewTM ont été contrôlés visuellement via MultiQuantTM, afin de vérifier qu'il s'agissait bien d'un pic chromatographique. Les critères de décision pour qu'un pic soit reconnu en tant que tel étaient la forme du pic (gaussienne ; une moyenne de 12 points par pic), un rapport S/N supérieur à 6 et une largeur de pic à la base inférieure à 0,6 min.

I.7. Évaluation des performances de la méthode

I.7.1. Spécificité

La spécificité de la méthode est définie comme la capacité à identifier sans ambiguïté et à quantifier un composé d'intérêt dans un mélange complexe sans interférence provenant des autres composés présents dans la matrice, des impuretés ou encore des produits de dégradation. La spécificité a été évaluée en comparant les extraits des matrices blanches de moules et d'huîtres avec les extraits dopés. La méthode est dite spécifique si aucun composé n'est présent dans les extraits blancs aux temps de rétention des molécules d'intérêt avec un $S/N > 3$.

I.7.2. Précision

La précision caractérise le degré de concordance entre les valeurs mesurées obtenues par des mesures répétées sur les objets identiques ou similaires dans des conditions spécifiées (Anses, 2015). Deux critères ont été pris en compte pour l'évaluation de la précision de notre méthode : la répétabilité et la fidélité intermédiaire.

La différence entre ces critères correspond au nombre de facteurs variant entre chaque analyse. Pour notre étude, des échantillons de moules supplémentés par des toxines marines ont été extraits et injectés deux fois par jour, à trois jours différents répartis sur deux semaines. Le coefficient de variation (CV) a été déterminé dans des conditions de répétabilité (CV_r) et de fidélité intermédiaire (CV_R).

I.7.3. Justesse

La justesse est associée à l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée comme valeur réelle conventionnelle ou comme valeur de référence acceptée, et la valeur mesurée

expérimentalement qui correspond à la valeur moyenne obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois (Anses, 2015). La justesse peut être exprimée comme un recouvrement ou comme la différence entre la valeur de concentration déterminée *via* l'équation de la droite de régression et la valeur de concentration vraie (théorique) en pourcentage. La justesse caractérise alors l'erreur systématique d'une mesure expérimentale par rapport à la valeur vraie.

La justesse de la méthode a été évaluée pour PTX2, AZA1 à 3, AO, DTX1 et 2, PnTX-A, PnTX-G, SPX1, 13,19-DidesMeC. 20-meG, GYM-A et AD à 6 6 niveaux de concentration avec 3 mesures pour chaque niveau. La valeur de concentration vraie retenue pour évaluer la justesse est le niveau de dopage théorique des extraits/solutions.

I.7.4. Rendements d'extraction

Le rendement d'extraction est généralement associé au rapport entre la concentration quantifiée à l'aide d'une calibration et la concentration théorique de dopage dans une matrice blanche.

Ici, le rendement d'extraction est calculé en comparant les niveaux de concentrations en toxines d'échantillons de matrice dopés avant la procédure d'extraction à ceux d'échantillons dits blancs, c'est-à-dire non initialement dopés en composés d'intérêt, extraits selon la même procédure d'extraction, puis dopés à la concentration visée après extraction. Le rendement d'extraction, exprimé en pourcentage, est déterminé au moyen de l'équation ci-dessous ; les rendements d'extractions (%) sont considérés comme satisfaisants s'ils sont compris entre 70 et 120 %.

Équation 1 : Calcul du rendement d'extraction.

$$\text{Rendement extraction (\%)} = \frac{\text{Aire échantillons dopés avant extraction}}{\text{Aire échantillons dopés après extraction}}$$

I.7.5. Effets matrices

Les effets matrices correspondent aux interférences du milieu analysé, sur le composé ciblé. Ils représentent la perturbation de l'ionisation des composés d'intérêt en spectrométrie de masse d'où l'intérêt de les évaluer.

Lorsque la matrice est blanche, l'effet matrice (EM) peut se calculer selon l'Équation 1, en comparant les réponses des échantillons dopés après extraction à celles obtenues dans le solvant à la même concentration.

Équation 2 : Évaluation des effets matrices (EM).

$$EM (\%) = \left(\frac{\text{Aire de l'échantillon dopé après extraction}}{\text{Aire de l'étalon dans le solvant}} - 1 \right) \times 100$$

Dans le cadre de notre étude les effets matrices des différentes toxines ont été évalués pour 6 niveaux de concentration en comparant les droites d'étalonnage en matrice et en solvant.

I.7.6. Limites de détection et de quantification

La limite de détection (LD) est définie comme étant la plus faible concentration du composé d'intérêt pouvant être détectée mais non quantifiée comme une valeur exacte. La limite de quantification (LQ) est associée à la plus petite concentration en molécules cibles pouvant être détectée et quantifiée (Anses, 2015).

Plusieurs approches existent afin de déterminer ces valeurs, on citera les deux approches utilisées pour cette étude :

- **Le rapport signal sur bruit (S/N) :** les LD et LQ sont déterminées comme la concentration en analyte produisant un pic chromatographique avec un rapport signal sur bruit de trois et dix fois le bruit de fond respectivement. Il s'agit de la méthode la plus couramment utilisée. Dans notre étude, la méthode du rapport signal sur bruit a été employée pour une première estimation de la sensibilité de la méthode afin de choisir le bon intervalle des courbes de calibration avant de procéder à la caractérisation de la méthode.

- **La régression linéaire** : elle est basée sur la dispersion des paramètres de régression linéaire obtenus lors de la calibration. Ainsi, si la relation de réponse est de type linéaire ($y = ax + b$), alors la LD et la LQ sont obtenues selon :

$$\text{LOD} = 3 \sigma_b/a \quad \text{LOQ} = 10 \sigma_b/a$$

Où « σ_b » est l'écart type de l'ordonnée à l'origine et « a » la pente de la droite de calibration.

Cette approche a été utilisée pour déterminer les LD et LQ des toxines choisies pour la caractérisation de la méthode.

I.8. Application : Participation à l'EILA

Dans le cadre de ses activités de référence en tant que Laboratoire National de Référence (LNR), le laboratoire a participé à un Essai Inter-Laboratoire d'Aptitude (EILA) organisé par le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (LRUE) sur les méthodes officielles d'analyse des toxines du groupe des lipophiles, des saxitoxines et de l'AD. Le LNR dispose d'une méthode accréditée qui a été développée et validée sur un spectromètre de masse de type triple quadripôle (API 4000) qui cible un certain nombre de toxines lipophiles dont les règlementées. Généralement les résultats rendus lors d'un tel exercice se basent sur la méthode officielle du laboratoire. Il a été décidé en 2017 de participer en parallèle avec la méthode non-ciblée HRMS afin d'évaluer les performances de la méthode développée pour l'analyse d'échantillons contaminés.

Cet essai avait pour but de déterminer les teneurs en toxines présentes dans les échantillons fournis par le LRUE (**Tableau 8** et **Tableau 9**).

Tableau 8. Echantillons analysés dans le cadre de l'EILA pour la recherche des toxines lipophiles

Echantillon	Référence	Origine
Homogénat de moules	EURLMB/17/L/01	Irlande, Espagne (Nord-Ouest)
	EURLMB/17/L/02	Irlande, Espagne (Nord-Ouest)
	EURLMB/17/L/03	Espagne (Nord-Ouest)

Tableau 9. Echantillons analysés dans le cadre de l'EILA pour la recherche des toxines du groupe de l'acide domoïque

Echantillon	Référence	Origine
Homogénat de moules et de coquilles St-Jacques	EURLMB/17/A/01	Irlande, Espagne (Nord-Ouest)
	EURLMB/17/A/02	Irlande, Espagne (Nord-Ouest)

Pour cette étude, seuls les résultats HRMS concernant les toxines lipophiles et l'AD ont été déterminés car la méthode d'analyse des toxines hydrophiles par LC-HRMS n'était pas encore entièrement mise au point.

Les échantillons dédiés à la recherche des toxines lipophiles ont été extraits selon le mode opératoire standard du LRUE. Ce dernier prévoit une étape d'hydrolyse des extraits (cf. paragraphe I.4) pour tenir compte des formes estérifiées de certaines toxines (AO, DTX1, DTX2). En effet, l'analyse de l'extrait avant hydrolyse renseigne sur la forme libre des toxines (non estérifiées) et l'analyse après hydrolyse donne le résultat total (formes estérifiées et non estérifiées). Les deux échantillons contenant l'AD ont été extraits selon la même méthode que les toxines lipophiles.

Ces échantillons ont été analysés en LC-HRMS dans les conditions décrites dans le paragraphe (I.5). Les résultats obtenus ont été comparés aux résultats du LRUE en calculant les Z-score qui sont les critères permettant d'évaluer la qualité des résultats rendus.

Équation 3. Détermination des Z-scores

$$Z\ score = \frac{x - X}{\sigma}$$

Avec x = valeur mesurée

X = valeur assignée par le LRUE

σ = écart type

$|z| < 2$: résultats satisfaisants

$2 < |z| < 3$: résultats douteux

$|z| > 3$: résultats insatisfaisants

II. Résultats et discussion

II.1.Développement de la méthode

II.1.1. Choix de la colonne

Compte tenu de la grande diversité des biotoxines marines, l'enjeu de l'étape de chromatographie est de séparer les analytes avec le meilleur compromis entre la résolution et la sensibilité. Les phénomènes liés aux effets matrice (suppression ou augmentation de signal) sont alors limités et les molécules qui possèdent le même rapport m/z sont analysées et quantifiées sans ambiguïté. L'objectif de cette première étape était de choisir la colonne analytique la mieux adaptée à la séparation et à la détection du plus grand nombre de toxines. Plusieurs études récentes ont montré que la richesse de l'information détectés en HRMS, notamment en vue d'une analyse non-ciblée était dépendante de la méthode séparative utilisée lors de l'acquisition. En effet, Boudah et al. (2014) et Zhang et al. (2012) ont montré que l'utilisation de trois colonnes différentes pour l'analyse d'un même échantillon donnait des informations très différentes. Pour le choix de nos conditions d'analyse nous nous sommes donc basés d'une part sur l'étude bibliographique réalisée sur les méthodes d'analyse LC-MS des biotoxines marines et d'autre part sur les méthodes décrites dans la littérature dans le cadre des analyses métabolomiques et non-ciblées pour l'analyse des contaminants dans les matrices environnementales. Après une étude exhaustive de la bibliographie au préalable (cf. chap. 1), nous avons choisi de développer notre méthode sur une colonne HSS T3. Composée de silice greffée de chaînes C_{18} , la colonne HSS T3 est adaptée pour la rétention des composés apolaires mais se caractérise par un « Endcapping » polaire et une capacité à supporter 100% de phase aqueuse lui offrant une meilleure rétention des composés relativement polaires qu'une C_{18} classique. Elle a été utilisée dans de nombreuses études métabolomiques ainsi que pour l'analyse multi-résidus de composés avec une gamme étendue de polarité (Cotton et al., 2016; Huang et al., 2010; Li et al., 2012; Pereira et al., 2010; Xiao et al., 2014; Zhao et al., 2013) ; mais aussi dans le domaine des biotoxines marine pour l'analyse LC-HRMS de l'acide domoïque. Elle a l'avantage d'avoir une capacité

de rétention allant jusqu'à 1500 pics chromatographiques dans des mélanges complexes (Gao et al., 2012).

Pour les choix des dimensions de la colonne, plusieurs critères ont été pris en compte. D'abord la compatibilité avec le système HPLC couplé à notre spectromètre de masse qui ne permet pas de dépasser les 500 bars en contre pression et par conséquent pas compatible avec les colonnes UPLC. Notre choix s'est donc porté sur les colonnes HPLC. Afin de limiter les volumes d'injection et obtenir des pics les plus fins possibles, nous avons opté pour une colonne avec un diamètre interne de 2.1 mm avec une taille de particules de 2.5 μm . L'objectif de notre méthode étant d'analyser le plus grand nombre possible de composés, avec des polarités étendues, nous avons sélectionné la colonne la plus longue parmi celles disponibles avec une longueur de 100 mm.

II.1.2. Optimisation des conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques de départ ont été inspirées d'une note d'application produite par Waters détaillant une méthode d'analyse UPLC-MS d'une dizaine de molécules couvrant une gamme de masse (m/z 152 à 609 Da) proche de nos molécules d'intérêt et des polarités variées ($-1.05 < \log K_{ow} < 5.89$).

Pour commencer, nous avons gardé la composition de la phase mobile proposée mais avons adapté le gradient et le débit de la méthode aux dimensions de notre colonne en utilisant le logiciel de transfert de méthode ; HPLC-Convertor.

Une solution multitoxines contenant différentes toxines lipophiles et l'acide domoïque (I.3) à une concentration de 50 ng/mL a été analysée en triplicats. Les réponses des toxines aux différentes conditions d'analyse testées ont été étudiées en mode d'ionisation positif d'abord car plus nombreuses tout en vérifiant l'adaptabilité des conditions choisies aux molécules analysées en mode négatif. La présente le chromatogramme obtenu dans les conditions initiales. L'ensemble des toxines analysées a bien détecté dans ces conditions à l'exception des brevétotoxines beaucoup moins sensibles et par conséquent pas visibles sur le chromatogramme à cette échelle. Les pics ne sont pas bien résolus, larges avec une trainée.

Ces conditions constituent un bon point de départ mais nécessitent quelques étapes d'optimisation qui seront présentées dans la suite de ce paragraphe afin d'avoir une meilleure sensibilité et résolution pour l'ensemble des toxines analysées.

Le choix de la durée de l'analyse et plus précisément de la montée en gradient chromatographique représente un compromis entre un temps d'analyse raisonnable et une détection optimale du plus grand nombre de métabolites possibles. Plus l'analyse est longue, plus le nombre de pics détectés est potentiellement augmenté. Cependant si l'augmentation du temps d'analyse favorise l'obtention d'une empreinte la plus complète possible, il doit rester compatible avec l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Différentes modifications ont alors été apportées au gradient d'élution initial pour aboutir aux conditions optimales pour notre analyse.

Le gradient initial (**Figure 19.a**) ne présentant pas de plateau, nous avons estimé que cela pourrait être problématique dans le cadre de nos analyses non ciblées s'il y'a présence de molécules très apolaires qui seraient retenues plus longtemps sur la colonne et ne seraient par conséquent pas éluées avant la fin de l'analyse si le gradient revient brutalement aux conditions initiales. La première étape consistait donc à insérer un palier à 100 % de solvant organique tout en essayant de garder les mêmes pentes. L'étape d'après était de tester différents débits d'élution en adaptant le gradient avec le logiciel de transfert de méthode. Pour le choix des valeurs testées nous nous sommes référés aux recommandations du constructeur qui préconise de travailler à un débit compris entre 0.35 et 0.45 mL/min.

Les chromatogrammes obtenus avec les différents débits testés sont similaires du point de vue séparation (résultats non présentés). Toutefois un débit de 0.45 mL/min permet d'avoir une durée d'analyse plus courte avec une meilleure résolution de pic et une contre-pression acceptable. Nous avons donc décidé de travailler avec ce débit pour la suite de cette étude.

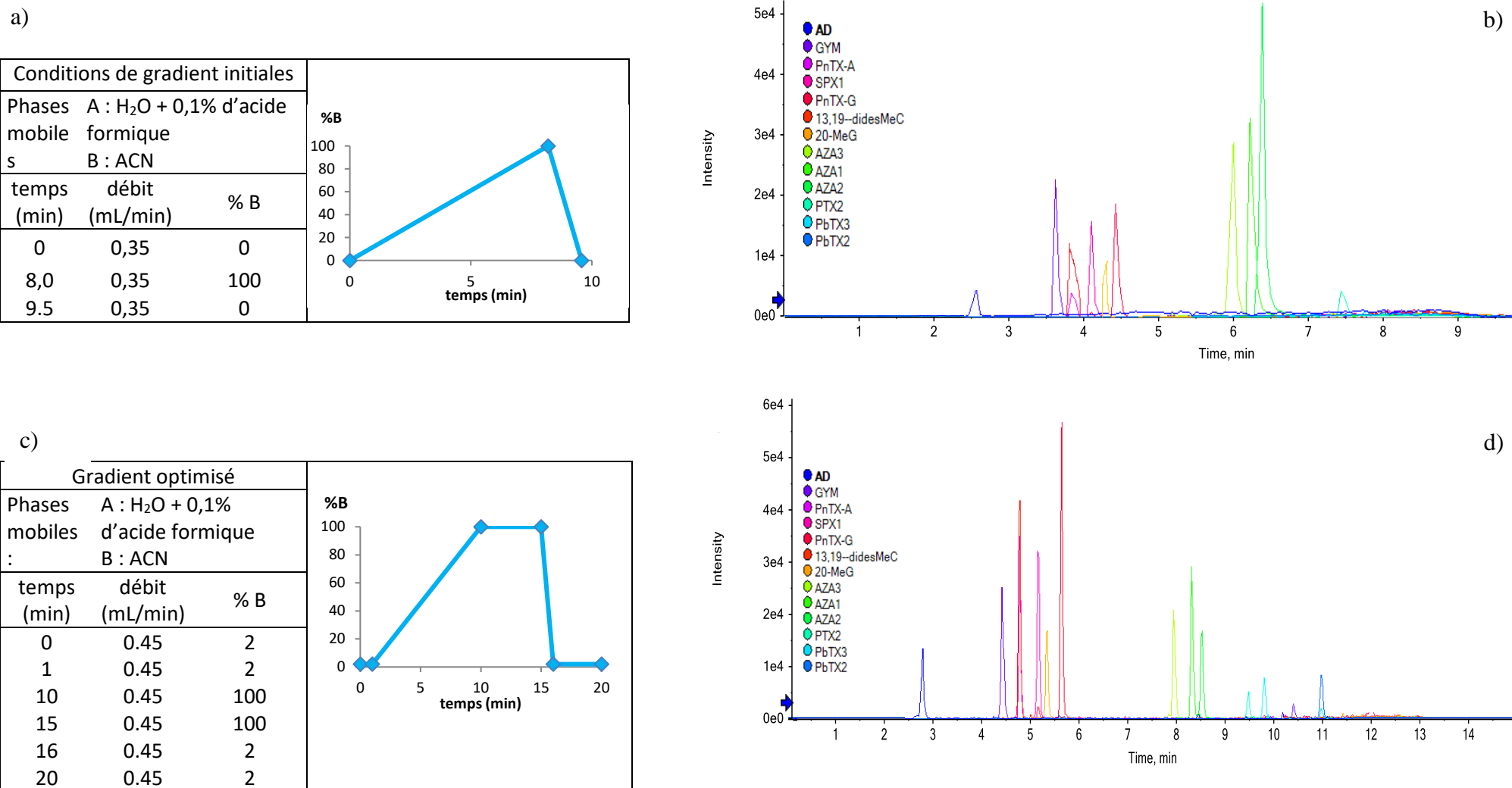


Figure 19. Optimisation du gradient d'élution. a) gradient initial, b) chromatogramme obtenu dans les conditions initiale (ESI+), c), gradient optimisé, d) chromatogramme obtenu avec le gradient optimisé (ESI+)

Les différentes toxines sont bien séparées à cette étape à l'exception d'un chevauchement de pic entre AZA1 et AZA3. Afin de remédier à ce problème nous avons choisi d'augmenter la première pente afin d'assurer une montée plus progressive du pourcentage de phase organique. Nous avons donc obtenu un nouveau gradient avec une durée de 15 min, plus longue mais permettant une bien meilleure séparation de l'ensemble des molécules. Finalement pour le gradient final, nous avons rajouté une étape rééquilibrage de la colonne de 4 min à la fin du gradient et de 1 min au début. Nous avons également fait démarrer notre gradient avec 2% de la phase B. Les optimisations apportées au gradient ont permis d'améliorer la résolution et la forme des pics qui sont plus fins et plus gaussiens augmentant ainsi la sensibilité des toxines analysées y compris pour les brevétotoxines (**Figure 19d**).

Après l'optimisation du gradient, nous nous sommes intéressés à la composition de la phase mobile qui a une influence importante sur l'ionisation des molécules et leur ordre d'élution. Dans les conditions présentées initialement, les phases mobiles A et B étaient composées respectivement d'eau acidifiée avec 0,1% d'acide formique et d'acétonitrile. D'après la littérature, les phases mobiles utilisées pour l'analyse des toxines lipophiles en conditions acide sont composées d'eau (A) et d'acétonitrile (B) avec du formate d'ammonium et de l'acide formique dans les deux phases. Nous nous sommes basés sur ces données bibliographiques pour tester cette nouvelle composition de phase mobile. Pour la concentration des additifs nous nous sommes inspirés de la méthode développée et validée dans le laboratoire pour l'analyse des toxines lipophiles réglementées.

Nous avons alors comparé la réponse des différentes toxines analysées (en ESI + et -) pour les deux compositions de phases mobiles :

-Composition 1 : A : H₂O + 0,1 % d'acide formique

B : ACN

-Composition 2 : A : H₂O + 2 mM formate d'ammonium

B : 95% ACN } +50 mM d'acide formique

Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 20** et montrent que l'on obtient une meilleure sensibilité pour l'ensemble des toxines avec la composition 2.

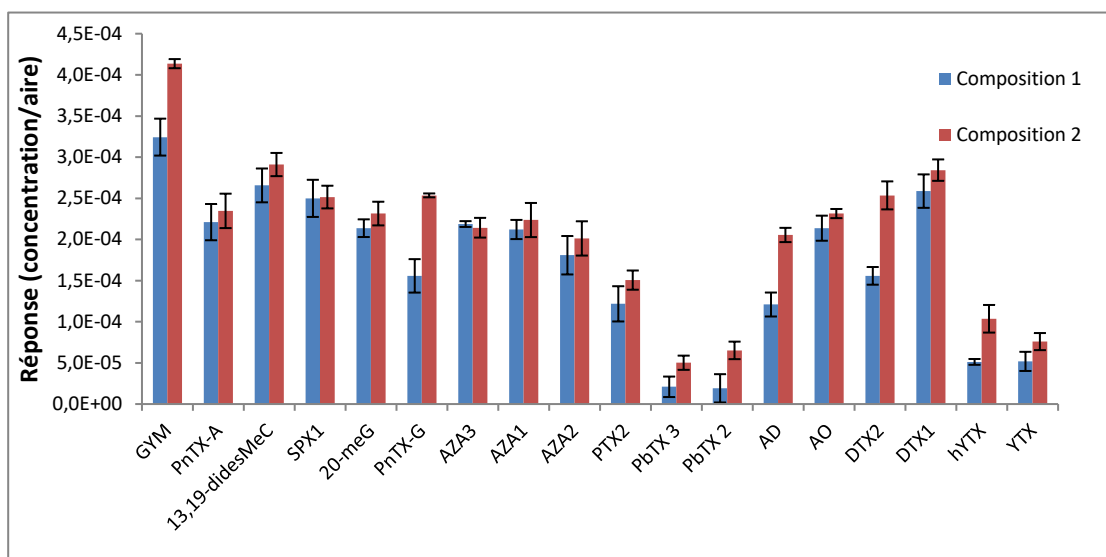


Figure 20. Comparaison des réponses des toxines analysées en ESI+ et ESI- aux deux compositions de phases mobiles testées

L'ordre d'élution de certaines toxines (AZA3, PTX2, AZA2 et AZA1) en ESI + a été modifié sans affecter la résolution chromatographique des pics. (**Figure 21**).

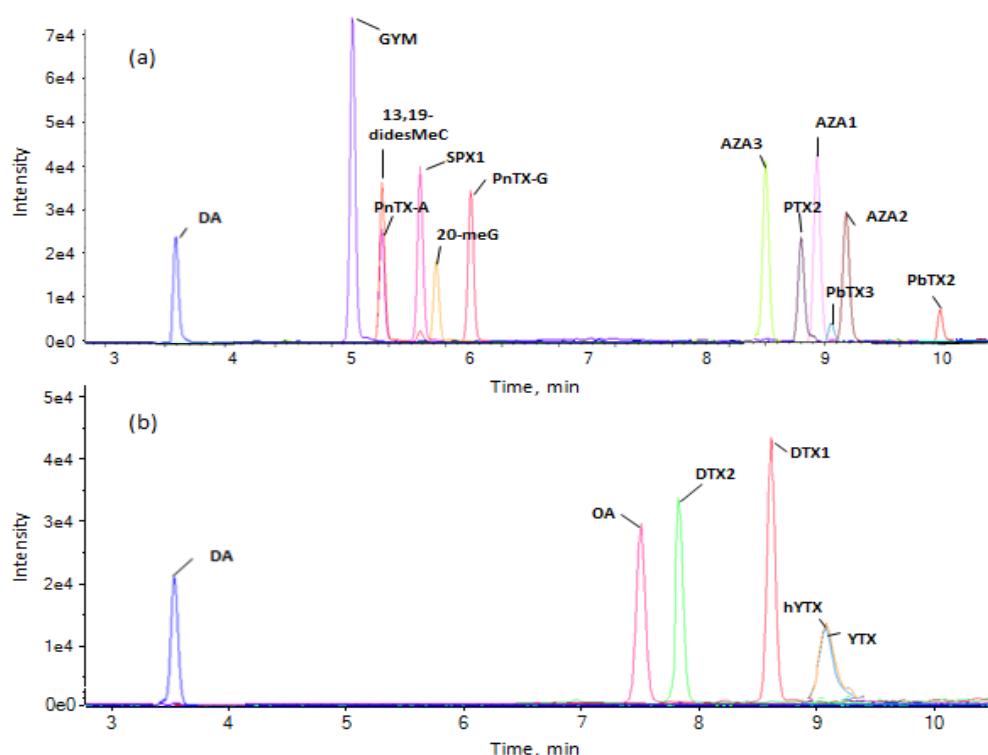


Figure 21. Chromatogrammes représentatif de la séparation des toxines analysées dans les conditions finales (zoomé) : (a) ESI+ et (b) ESI-

Les deux derniers paramètres étudiés étaient la température du four (25, 30 et 40°C) et le volume d'injection (5 et 10 µL). La variation des réponses obtenues pour les différentes valeurs testées était négligeable, nous avons donc choisi de garder une température de four de 30°C et un volume d'injection de 5 µL.

II.1.3. Synthèse

La méthode a été développée pour analyser une large gamme de toxines lipophiles et relativement polaires. Un total de 18 toxines pour lesquelles des solutions étalons certifiées étaient disponibles ont été analysées en mode d'ionisation positive ou négative.

Pour toutes les toxines analysées en ESI⁺ (GYM, SPX1, 13,19-didesMeC, 20-meG, PnTX-A et G, AZA1 à -3, PTX2, PbTx-2 et -3), les molécules $[M+H]^+$ étaient détectées sauf pour PTX2, pour lequel le produit d'addition $[M+NH_4]^+$ a été choisi comme ion caractéristique. En ionisation négative, la forme déprotonée $[M-H]^-$ a été détectée pour AO, DTX1 et 2, YTX et hYTX. Pour l'AD, l'ionisation positive est principalement rapportée dans la littérature [39–43], mais dans les conditions de notre étude, une meilleure sensibilité a été obtenue en ESI⁻, comme l'ont également signalé (Ciminiello et al., 2005). La forme déprotonée $[M-H]^-$ (m/z 310.12961) a été utilisée à des fins d'identification et de quantification.

Comme l'identification des toxines se faisait en haute résolution, elle était principalement basée sur la masse exacte de chaque molécule. Ainsi, l'exactitude de la masse (exprimée en ppm) a été déterminée. Les écarts-types (SD) correspondants des masses pour la précision intra-journalière et inter-journalière variaient de 0,4 à 1,7 ppm (**Figure 22**). Les valeurs observées sont en accord avec des résultats rapportés dans d'autres études HRMS (Blay et al., 2011; Domènech et al., 2014; Zendong et al., 2016) et montrent une bonne stabilité et précision des mesures de masse.

Les conditions de LC optimisées utilisant la colonne C18 HSS T3 ont permis une bonne séparation de la plupart des toxines analysées dans les deux modes d'ionisation (**Figure 21**). Certaines coélutions ont été observées (PnTX A / 13,19-didesMeC ; YTX / hYTX) mais n'étaient pas problématiques. La résolution chromatographique était surtout importante dans le cas des toxines isobares (AO / DTX2), pour lesquelles une séparation satisfaisante a été obtenue. La variation des temps de rétention n'a pas dépassé 0,2% au cours de l'étude et a donc été négligeable pour toutes les toxines cibles.

Une liste de composés cibles a été créée, comprenant des informations telles que la masse exacte, les adduits et le temps de rétention de toutes les toxines analysées à utiliser pour la quantification (**Tableau 10**). À des fins de confirmation supplémentaires, les spectres MS et MS/MS ont été bancarisés à différentes énergies de collision et enregistré dans une bibliothèque LibraryView.

Tableau 10. Informations acquises pour les toxines analysées

Toxine	Formule brute	Ion parent	Masse mesurée m/z	Tr (min)
GYM	C32H45NO4	[M + H] ⁺	508,3419	5,2
PnTX-A	C41H61NO9	[M + H] ⁺	712,4415	5,4
PnTX-G	C42H63NO7	[M + H] ⁺	694,4676	6,2
AZA1	C47H71NO12	[M + H] ⁺	842,5042	8,9
AZA2	C48H73NO12	[M + H] ⁺	856,5208	8,5
AZA3	C46H69NO12	[M + H] ⁺	828,4884	9,2
SPX1	C42H61NO7	[M + H] ⁺	692,4514	5,7
13,19-didesMeC	C41H59NO7	[M + H] ⁺	678,4367	5,3
20-meG	C43H63NO7	[M + H] ⁺	706,4679	5,8
PTX2	C47H70O14	[M + NH ₄] ⁺	876,5109	8,8
PbTx-2	C50H70O14	[M + H] ⁺	895,4838	10,0
PbTx-3	C50H72O14	[M – H] ⁺	897,4399	9,1
AD	C15H21NO6	[M – H] ⁻	310,1296	3,5
AO	C44H68O13	[M – H] ⁻	803,4616	7,5
DTX1	C45H70O13	[M – H] ⁻	817,4762	8,6
DTX2	C44H68O13	[M – H] ⁻	803,4616	7,9
YTX	C55H82O21S2	[M – H] ⁻	1141,4729	9,2
hYTX	C56H84O21S2	[M – H] ⁻	1155,4886	9,2

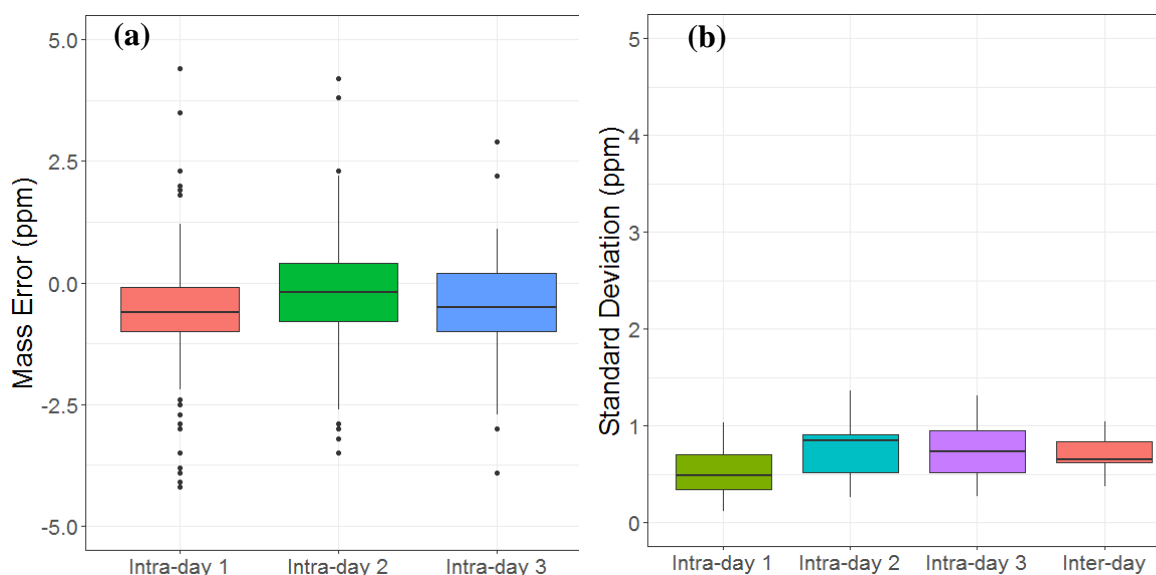


Figure 22. Variation des erreurs de masses (ppm) pour les toxines analysées dans les deux modes d'ionisation, déterminées pour cinq injections par jour (3 jours sur 2 semaines) ; (a) : erreurs de mass en ppm et (b) précision intra et inter journalière de la mesure de la masse.

II.2. Évaluation des performances de la méthode quantitative

Plusieurs critères de performance ont été étudiés pour évaluer la pertinence de la méthode quantitative en se référant aux recommandations de la Commission Decision 2002/657/EC. Des échantillons de moules et huîtres supplémentés par les toxines étudiées ont été analysés et quantifiés en étalonnage externe utilisant des gammes étalons préparées dans le MeOH. La linéarité des courbes d'étalonnage a été vérifiée. Tous les coefficients de détermination (R^2) étaient supérieurs à 0,991 pour les courbes d'étalonnage en solvant et en matrice (**Annexe 2**). La spécificité a été évaluée en analysant et en comparant des échantillons de moules et d'huîtres blanches avec des extraits dopés, et les résultats ont montré que toutes les toxines n'étaient détectées que dans les échantillons dopés à des temps de rétention spécifiques. La haute résolution de l'analyse a également contribué à la spécificité de la méthode et a confirmé que les toxines présentes dans les échantillons réels de mollusques peuvent être identifiées sans aucune ambiguïté.

La sensibilité de la méthode a été évaluée par la détermination des limites de détection et des limites de quantification dans le MeOH et dans les extraits de moules et d'huîtres. Une bonne

sensibilité a été obtenue pour les 14 toxines incluses dans l'étude de caractérisation (**Tableau 11**). Dans l'extrait de moule, les LQ étaient comprises entre 2,0 µg/kg (GYM) et 8,9 µg/kg (AO). La LQ de l'AD était plus élevée (30 µg/kg). Les limites de quantification déterminées dans l'extrait d'huître étaient légèrement inférieures pour toutes les toxines par rapport à la sensibilité de l'extrait de moule, sauf pour la PnTX-G, la DTX1 et l'AD. Les LQ les plus faibles ont été obtenues dans le MeOH, en l'absence de matrice, avec des valeurs allant de 1,1 à 26 µg/kg pour la GYM et l'AD respectivement.

Les YTX présentent une sensibilité plus faible que les autres toxines. Cependant les LQ obtenues sont bien inférieures au seuil réglementaire 3,75 mg/kg (Anonyme, 2013), nous considérons donc ce résultat comme acceptable. Les brévétotoxines étaient les moins sensibles parmi les toxines étudiées dans les conditions présentées. Le remplacement de l'ACN dans la phase mobile B par du MeOH (en conservant le reste de la composition comme indiqué dans le paragraphe I.5) a permis d'obtenir une sensibilité beaucoup plus élevée pour le PbTx-2 et 3 (par un facteur 6-10). Ces observations sont en accord avec les résultats rapportés par McNabb et al. (2012) et Zendong et al. (2015). Bien que plus élevées que nos objectifs de sensibilité, les LQ obtenues restent bien inférieures au seuil de 800 µg PbTx-2 eq/kg défini dans les législations américaine et australienne (Ishida et al., 2004; McNabb et al., 2012). Comme la plupart des toxines analysées répondaient bien dans la phase mobile à base d'ACN, nous avons décidé de conserver cette composition et d'évaluer la méthode pour les 14 toxines ayant les LQ les plus faibles, en excluant les YTX et PbTx.

Tableau 11. Limites de quantification (LQ) des différentes toxines dans le MeOH, les extraits de moules et huîtres

	LQ ($\mu\text{g/kg}$)		
	MeOH	Moules	Huîtres
AZA1	4,3	4,6	4,5
AZA2	2,7	4,4	3,2
AZA3	5,6	7,6	6,5
PTX2	6,7	8,7	8,4
GYM-A	1,1	2,0	1,6
SPX1	1,7	3,1	2,2
PnTX-A	4,4	5,1	4,6
PnTX-G	5,0	4,4	4,6
13,19-didesMeC	3,3	4,7	4,1
20-meG	3,5	5,0	4,0
AO	6,0	8,9	5,6
DTX1	3,6	4,4	5,6
DTX2	4,2	5,4	5,0
DA	26	30	31
YTX *	87	119	132
hYTX *	84	121	128
PbTx-2 *	280	312	324
PbTx-3 *	300	321	337

* Les toxines marquées par un astérisque n'ont pas été incluses dans l'étude de caractérisation. Les LQ correspondantes ont été déterminées lors d'une étude préliminaire selon l'approche S/N pour 3 réplicats.

Les effets matrices pour les extraits de moules et d'huîtres ont été déterminés en comparant la pente moyenne des courbes d'étalonnage de MeOH (n=3) à celles des courbes d'étalonnage en matrice (n=3). Les effets observés peuvent être décrits soit comme une augmentation du signal (réponses > 100%), soit comme une suppression du signal (réponse < 100%). Dans l'extrait de moules, 11 des toxines testées présentaient un effet de suppression d'ionisation allant de -8% pour AZA1 à -27% pour 20-meG (**Figure 23**). L'effet matrice pour PTX2 est négligeable, tandis que pour DTX2 et AD une augmentation de signal de + 20% a été observée dans la matrice moule. En ce qui concerne la matrice huître, une augmentation du signal a été observée pour huit toxines avec des valeurs allant de + 6% (AZA1) à + 33% (DA). Les six toxines restantes ont montré une suppression de signal allant de -3% (PTX2) à

-13% (DTX1). Les effets matrices sont considérés comme satisfaisants et aucun facteur de correction n'a été appliqué pour la quantification.

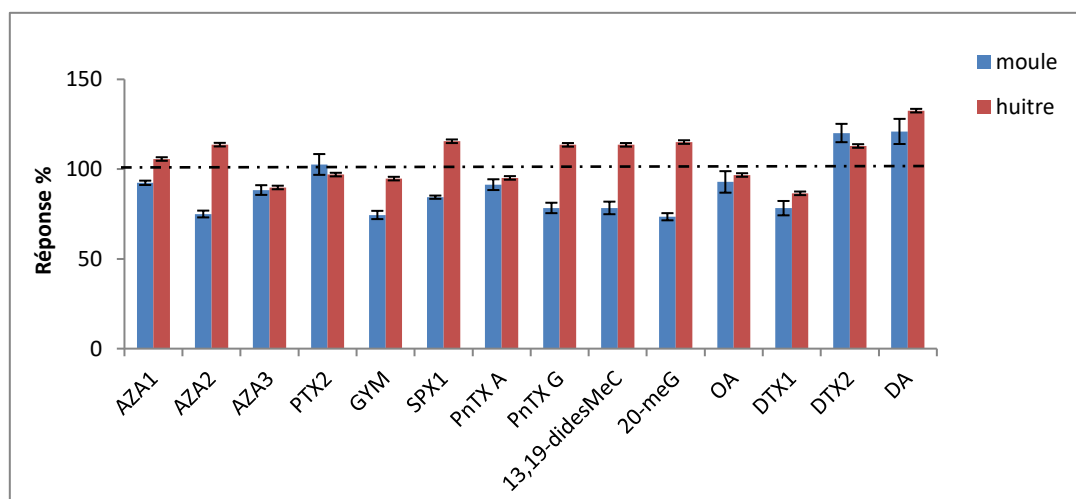


Figure 23: Effets matrice observés pour les différentes toxines analysées dans des extrait de moules et d’huîtres

La justesse de la méthode a été vérifiée pour la matrice moules. Selon les critères fixés par la décision 2002/657/CE de la Commission européenne, la méthode proposée s’est révélée juste, avec des taux de récupération satisfaisants allant de 86 à 110% pour le niveau bas et de 95 à 106% pour le niveau haut (**Tableau 12**). Les taux de récupération satisfaisants prouvent que la méthode d'extraction est bien adaptée à toutes les toxines analysées et qu’il est possible de s’affranchir des étapes de purification discriminantes qui peuvent constituer une limitation pour une analyse non ciblée.

La précision de la méthode quantitative exprimée par la répétabilité et la fidélité intermédiaire, a été étudiée au moyen du coefficient de variation (CV). Les CV obtenus pour les variations intra-journalières (CV_I) et inter-jours (CV_R) allaient respectivement de 1,3% à 14,7% et de 1,7% à 19,8% selon les toxines (**Tableau 12**). Ces résultats sont conformes aux critères d'acceptation (<20%) démontrant que la méthode proposée est considérée comme précise et peut être adoptée pour une analyse quantitative.

Tableau 12. Taux de récupération et précision de la méthode pour la matrice moules (n=6)

Toxines	Niveau (µg/kg)	Taux de récupération(%)	CV _r (%)	CV _R (%)
AZA1	10	96	13,7	17,1
	120	105	3,4	5,8
AZA2	10	86	8,2	11,3
	120	100	1,3	4,2
AZA3	10	103	12,9	19,8
	120	104	2,9	6,9
PTX2	20	110	9,4	11,0
	240	101	4,2	4,2
GYM	10	97	6,1	6,1
	120	100	7,3	7,3
SPX1	10	94	3,9	9,1
	120	103	1,6	1,7
PnTX-A	10	90	8,0	8,9
	120	97	4,8	6,2
PnTX-G	10	103	11,4	14,7
	120	95	11,4	14,7
13,19- didesMeC	10	91	8,7	12,1
	120	105	4,1	4,1
20-meG	10	88	9,1	14,1
	20	102	1,7	1,9
AO	20	106	5,9	8,7
	240	103	8,0	9,2
DTX 1	20	108	11,9	11,9
	240	106	3,0	3,2
DTX 2	20	106	6,9	7,1
	240	104	7,6	8,3
DA	60	99	12,2	12,2
	720	99	1,4	2,7

II.3. Application de la méthode quantitative à des échantillons naturellement contaminés : Résultats de l'EILA du LRUE

Les homogénats d'échantillons naturellement contaminés proposés par le LRUE dans le cadre des programmes d'essais d'aptitude ont été analysés par la méthode LC-HRMS développée. Les résultats obtenus sont en accord avec les valeurs assignées du LRUE (**Figure 24**).

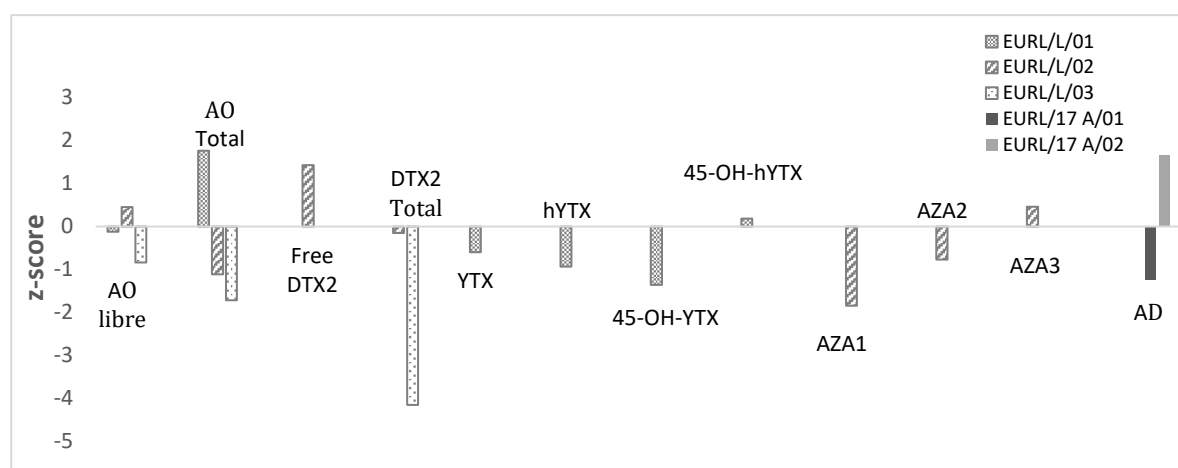


Figure 24. Z-scores obtenus pour les échantillons analysés dans le cadre de l'EILA

Toutes les toxines lipophiles (AO, YTX, hYTX, 45-OH-YTX, AZA1 à 3) présentes dans les échantillons analysés ont été correctement identifiées et quantifiées (valeurs de Z-scores comprises entre +2 et -2) à l'exception de la DTX2 totale dans l'échantillon EURL/L/03 (valeur de Z-score de -4,2), en raison de sa concentration proche de la LQ. Les échantillons contenant de l'AD ont été correctement quantifiés et les résultats se situent dans les limites acceptables. Ces résultats prouvent que la méthode mise au point convient à la quantification des toxines lipophiles et de l'AD dans les échantillons de mollusques naturellement contaminés. Les résultats obtenus confirment les bonnes performances de la méthode et son adaptabilité pour l'analyse et la quantification d'échantillons naturellement contaminés.

C. Mise en place d'une méthode ciblée pour l'analyse des toxines hydrophiles

I. Matériels et Méthodes

I.1. Produits chimiques et réactifs

Toutes les solutions ont été préparées avec des produits chimiques de qualité analytique et de l'eau ultra pure (18,2 MΩ.cm) produite par avec un système de purification d'eau Milli-Q Academic (Millipore S.A., Saint-Quentin en Yvelines, France). L'acide chlorhydrique (HCl ; 37%) et l'hydroxyde de sodium (NaOH ; 99%) ont été achetés auprès de Merck (Fontenay-sous-Bois, France). Le formiate d'ammonium (> 97%) a été acheté auprès de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). L'acide formique (98-100%), l'acétonitrile (ACN ; qualité LC-MS) et le méthanol (MeOH ; qualité LC-MS), l'acide acétique glacial (qualité HPLC) ont été achetés auprès de Fisher Scientific SAS (Illkirch, France). La solution d'hydroxyde d'ammonium (25%) provient de chez VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Les solutions de calibrations d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) pour l'analyse par LC-HRMS ont été achetées auprès de Sciex (Nieuwerkerk aan den IJssel, Pays-Bas). Les cartouches SPE Supelclean ENVI-Carb 250 mg/3 mL ont été commandées chez (Sigma-Aldrich, France).

I.2. Solutions étalons

Les solutions étalons certifiées de saxitoxines proviennent du Conseil national de recherches du Canada (CNRC, Halifax, Nouvelle-Écosse, Canada). La solution étalon de la tétródotoxine a été commandée chez CIFGA (Espagne) (**Tableau 13**).

Tableau 13. Solutions étalons

Toxine	Nom	Concentration (μmol/L)	Concentration (μg/mL)*
N-sulfocarbamoyl gonyautoxine-2	C1	113,4	53,9
N-sulfocarbamoyl gonyautoxine-3	C2	33,9	16,1
Décarbamoyl Gonyautoxine-2	dcGTX2	100,1	35,9
Décarbamoyl Gonyautoxine-3	dcGTX3	29,4	8,4
Gonyautoxine-2	GTX2	114,2	45,2
Gonyautoxine-3	GTX3	43,4	17,2
Gonyautoxine-1	GTX1	60,4	24,9
Gonyautoxine-4	GTX4	19,7	8,1
Gonyautoxine-5	GTX5	55,7	21,1
Décarbamoyl Saxitoxine	dcSTX	65,0	16,6
Décarbamoyl Néosaxitoxine	dcNEO	29,4	8,0
Saxitoxine	STX	66,3	19,8
Néosaxitoxine	NEO	65,5	20,7
Tétradotoxine	TTX	80,7	25,8

*Calculée à partir de la masse moléculaire de chaque toxine

I.3. Préparation des solutions de travail

○ Solutions étalons

Une solution multitoxines a d'abord été préparée à partir des solutions étalons disponibles dans le laboratoire. Un volume de 100 μL a été prélevé de chacune des solutions étalons et mélangé dans un vial de 1,5 mL. À partir de cette solution qu'on appellera « solution stock » des solutions à différents niveaux de concentration ont été préparées par dilution (**Tableau 14**). Ces solutions filles ont été injectées pour tracer les gammes d'étalonnage en solvant et en matrice.

Tableau 14.Préparation des solutions de travail

Niveau	Solution Standard utilisée	Volume de solution standard	Volume d'extrait de la matrice blanche
N1	N4 (solution stock diluée par 200)	50 μL	450 μL
N2	N4 (solution stock diluée par 200)	100 μL	400 μL
N3	N6 (solution stock diluée par 50)	50 μL	450 μL
N4	N6 (solution stock diluée par 50)	100 μL	300 μL
N5	solution stock	15 μL	1485 μL
N6	solution stock	30 μL	1470 μL
N7	solution stock	40 μL	760 μL

○ **Phases mobiles**

Les phases mobiles doivent être préparées avec précaution en respectant parfaitement les volumes d'additifs ajoutés à chaque phase. Les solutions doivent être bien mélangées avant utilisation et conservées à température ambiante.

Phase A1 : 500 mL d'eau MilliQ + 75 µL d'aide formique + 300 µL d'hydroxyde d'ammonium. Conservée 24h.

Phase B1 : 700 mL d'acétonitrile (LC-MS) + 300 mL d'eau MilliQ (LC-MS) + 100 µL d'acide formique. Conservée 3 mois.

Phase A2 : 200 mL d'eau MilliQ + 1 mL d'acide formique. Conservée 1 semaine.

Phase B2 : 100% méthanol (LC-MS). Conservée 3 mois.

○ **Solutions utilisées pour la préparation d'échantillons**

S1 : solvant d'extraction (1% HAc) : 1000 mL d'eau MilliQ + 10 mL d'acide acétique (HAc).

S2 : « extract modifier » : solution d'hydroxyde d'ammonium à 25%.

S3 : solution acide de conditionnement et élution SPE (20% d'acétonitrile avec 1% HAc) : 200 mL d'acétonitrile (HPLC) + 800 mL d'eau Milli-Q + 10 mL HAc.

S4 : solution basique de conditionnement SPE (0,025% NH_3) : 500 mL d'eau Milli-Q + 500 µL de la solution à 25% d'hydroxyde d'ammonium.

S5 : solvant d'élution (80% ACN avec 0,25% HAc) : 80 mL d'acétonitrile + 20 mL d'eau Milli-Q + 250 µL d'acide acétique.

I.4. Préparation des échantillons

Les échantillons analysés dans le cadre de cette étude sont des MRI (matériaux de référence internes) préparés à partir des homogénats de chaire totale de moules blanches (résultats négatifs pour les analyses PSP par BES). Pour déterminer les rendements d'extraction les échantillons blancs ont été supplémentés avant extraction en ajoutant 50 µL de la solution stock. La préparation des échantillons a été réalisée en deux étapes (**Figure 25**) : une extraction suivie d'une purification sur cartouche SPE en suivant le protocole décrit par (Boundy et al., 2015).

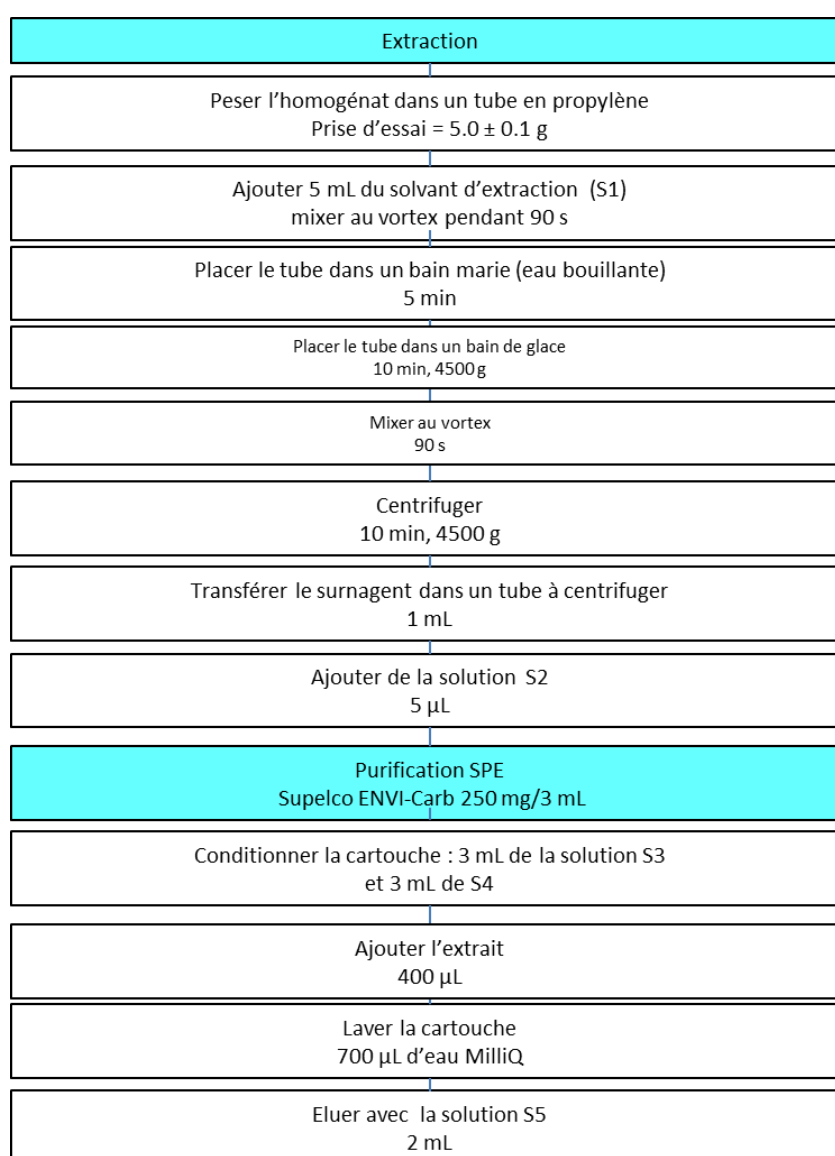


Figure 25. Protocole d'extraction et de purification pour les toxines hydrophiles (selon Boundy et al., 2015)

Les toxines sont extraites à partir de 5 g d'homogénat de mollusques en une seule fois avec 5 mL d'acide acétique à 1%. Les extraits sont centrifugés pour permettre le transfert du surnageant, puis 1 mL est transféré dans un tube en polypropylène. 5 µL de la solution d'hydroxyde d'ammonium sont ajoutés et la solution est bien agitée. L'extrait est ensuite purifié sur une cartouche (SPE) en carbone graphite puis dilué avec de l'acétonitrile.

I.5. Conditions d'analyse par LC-HRMS

Les analyses LC-HRMS ont été réalisées avec un système HPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, San José, Californie, États-Unis) couplé à un QTOF (5600 Triple TOF, Sciex). Le spectromètre de masse était équipé d'une source d'ionisation DuoSpray et d'une sonde TurboIonSpray™. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Waters (Saint-Quentin-en-Yvelines, France), X Bridge BEH Amide (130 °A 2,5 µm 100 ×2,1 mm). Le volume d'injection et la température de la colonne étaient respectivement de 5 µL et 60°C. Afin d'assurer la stabilité de cette colonne de type HILIC, 3 gradients successifs ont été utilisés pour (i) le conditionnement de la colonne en début d'analyse (Start-up), (ii) la séparation des toxines (analyse) et (iii) le nettoyage et rééquilibrage de la colonne à la fin de la séquence d'analyse (Shut-down) (**Tableau 15** à **Tableau 18**).

Tableau 15. Gradient initial pour l'équilibrage de la colonne

Start-up			
Temps (min)	Débit (mL/min)	A1 (%)	B1 (%)
0,0	0,135	50	50
30,0	0,135	50	50
35,0	0,270	50	50
38,0	0,270	2	98
40,0	0,270	2	98

Tableau 16. Gradient d'analyse pour la séparation des toxines

Analyse			
Temps (min)	Débit (mL/min)	A1 (%)	B1 (%)
0,0	0,270	2	98
3,90	0,270	2	98
7,5	0,270	20	50
9,0	0,350	50	50
9,3	0,350	2	98
9,8	0,500	2	98
10,6	0,500	2	98
11,0	0,270	2	98

Tableau 17. Gradient final pour le rinçage de la colonne

Shut-down			
Temps (min)	Débit (mL/min)	A2 (%)	B2 (%)
0,0	0,135	100	0
5,0	0,135	100	0
10,0	0,135	0,0	100
12,0	0,135	0,0	100
15,0	0,270	0,0	100
30,0	0,270	0,0	100

Les conditions de détection et les modes d'acquisition étaient les mêmes que ceux présentés précédemment dans le paragraphe I.5 à l'exception des paramètres décrits dans le **Tableau 18**.

Tableau 18. Paramètres de masse optimisés pour l'analyse des toxines hydrophiles

Source	ESI+/ESI-
Gaz 1 (GS1)	40 psi
Gaz 2 (GS2)	60 psi
Température (TEM)	600 °C
Energie de collision énergie (CE)	30 eV / -30 eV
Amplitude de l'énergie de collision (CES)	15 V

II. Résultats et discussions

Quelques méthodes HILIC-MS/MS développées à des fins de recherches ont été décrites dans la littérature pour l'analyse des saxitoxines (Dell'Aversano et al., 2005; Halme et al., 2012; Mattarozzi et al., 2016b; Poyer et al., 2015; Turrell et al., 2008; Zhuo et al., 2013) et les tétródotoxines (Bane et al., 2016; Jen et al., 2013; McNabb et al., 2010; Turner et al., 2017).

Pour cette étude, notre choix s'est porté sur la méthode développée pour l'analyse simultanée des STX et de la TTX par Mickael Boundy (Boundy et al., 2015) du CAWTHRON Institute et validée par Andrew Turner du Cefas (Turner et al., 2015c). Ce choix a été fait suite à une invitation reçue par le LNR pour la participation à une étude inter-laboratoires de validation (EILV) organisée par les auteurs de la méthode. En effet, le LNR Biotoxines Marines avait pour objectif de mettre en place une méthode de détermination des toxines paralysantes et de la tétródotoxine par HILIC-MS/MS dans le cadre de ces activités de référence afin de renforcer le dispositif de vigilances pour les toxines hydrophiles.

La méthode a été mise en place en couplage avec deux spectromètres de masse basse et haute résolution ; un triple quadripôles TSQ Vantage (Thermo) et un 5600 QTOF (Sciex). Seuls les résultats des travaux menés dans le cadre de la thèse en couplage avec un QTOF seront détaillés ici.

Dans les deux publications citées précédemment, les auteurs insistent sur l'importance de bien respecter les conditions chromatographiques décrites et d'appliquer rigoureusement les étapes de préparation des solutions de travail afin de garantir un bon équilibrage de la colonne HILIC au début et à la fin de chaque séquence d'analyse, car la colonne est très sensible aux variations de pH, gradient, température, etc.

La colonne recommandée est une colonne HILIC Acquity UPLC BEH Amide 130 °A 1,7 µm 150 × 2,1 mm (Waters) nécessitant de travailler avec une chaîne UPLC. Dans le cadre des travaux de thèse l'appareillage mis à disposition pour l'analyse HRMS est composé d'une chaîne HPLC Dionex 3000 ne permettant pas de travailler en mode UPLC car la pression maximale supportée par le système est de 600 bars.

Nous avons opté pour une colonne de type X Bridge BEH Amide 130 °A 2,5 µm 100 × 2,1 mm (waters) ayant la même phase stationnaire mais des dimensions de particules plus adaptées à notre système HPLC.

Les paramètres de masses avaient été choisis lors des essais préliminaires d'infusion de solutions étalons disponibles pour les différentes toxines hydrophiles. La méthode d'analyse en

mode TOF-MS ne permet pas de définir des paramètres composés-dépendant mais plutôt des conditions génériques qui représentent le meilleur compromis possible pour l'ensemble des molécules analysées.

Afin d'adapter les conditions de gradient et de débit aux dimensions de notre colonne, nous avons utilisé le logiciel de transfert de méthode « HPLC calculator ». Les conditions obtenues initialement sont présentées **Figure 26**. Les conditions proposées par le logiciel ont été ajustées pour mieux les adapter au système utilisé (**Tableau 19**).

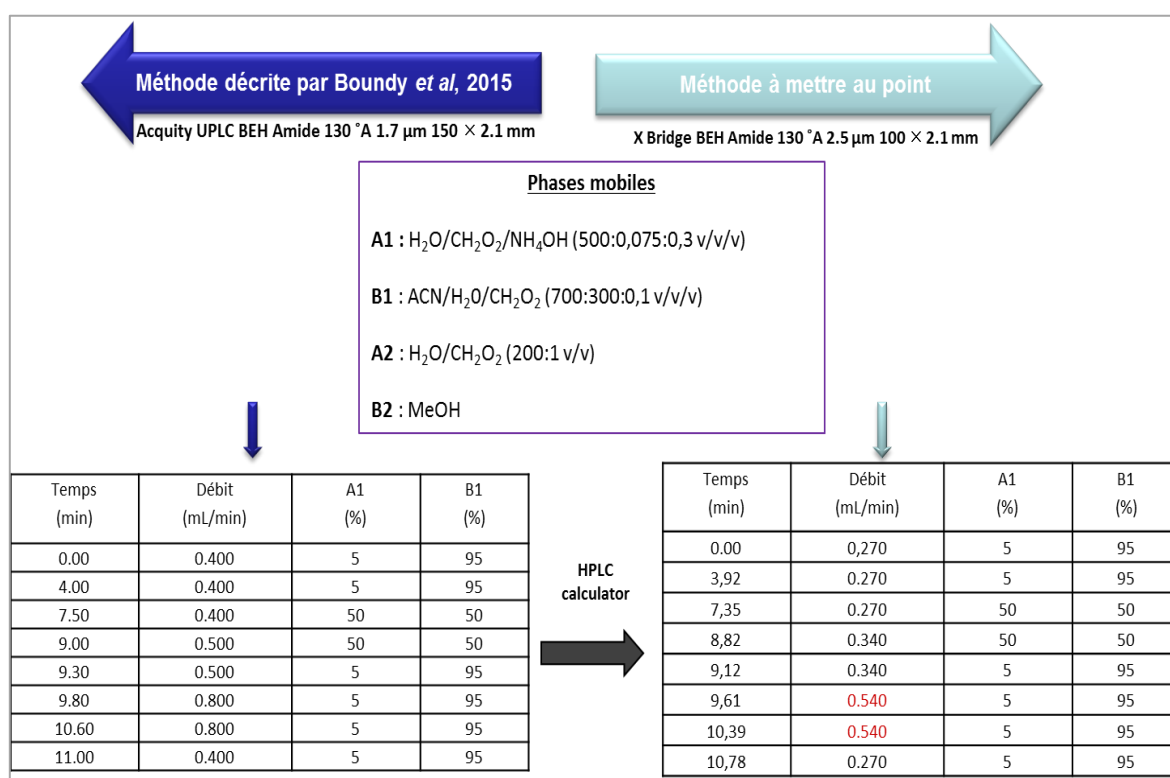
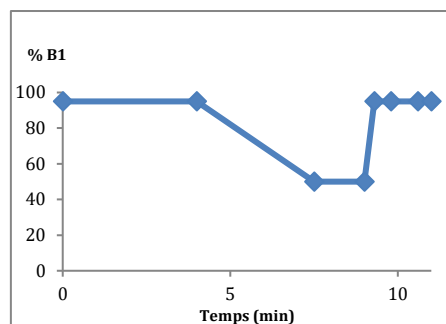


Figure 26. Transfert de méthode avec le logiciel HPLC calculator

Tableau 19. Conditions chromatographiques optimisées

Colonne	X Bridge BEH Amide (130 °A, 2,5 µm 100 ×2,1 mm)		
Volume injecté	5 µL		
Température	60 °C		
Time (min)	Débit (mL/min)	A1 (%)	B1 (%)
0,00	0,270	5	95
3,90	0,270	5	95
7,35	0,340	50	50
8,80	0,340	50	50
9,10	0,500	5	95
9,60	0,500	5	95
10,4	0,500	5	95
70,8	0,270	5	95



Les analogues non-sulfatés qui sont la STX, dcSTX, NEO et dcNEO, ne possédant aucun groupement sulfocarbamate ou sulfate, ont été détectés en mode d'ionisation positif. La TTX a également été détectée dans ce mode.

Les analogues sulfatés ou sulfocarbamatés qui sont GTX5 ainsi que les couples de diastéréoisomères GTX1/4, GTX2/3 et dcGTX2/3 ont été détectés dans les deux modes d'ionisation en raison de leur caractère zwitterionique (fonctions guanidines facilement protonables et fonction sulfate négative en solution). Cependant, le mode d'ionisation positif engendre une importante perte du groupement SO₃ pour les analogues GTX1,-2 et dcGTX2. Le choix s'est donc porté sur le mode négatif pour l'analyse et la quantification de ces toxines. La colonne BEH Amide dans les conditions chromatographiques optimisées a permis de séparer avec succès les toxines analysées, y compris les épimères (**Figure 27 et Figure 28**).

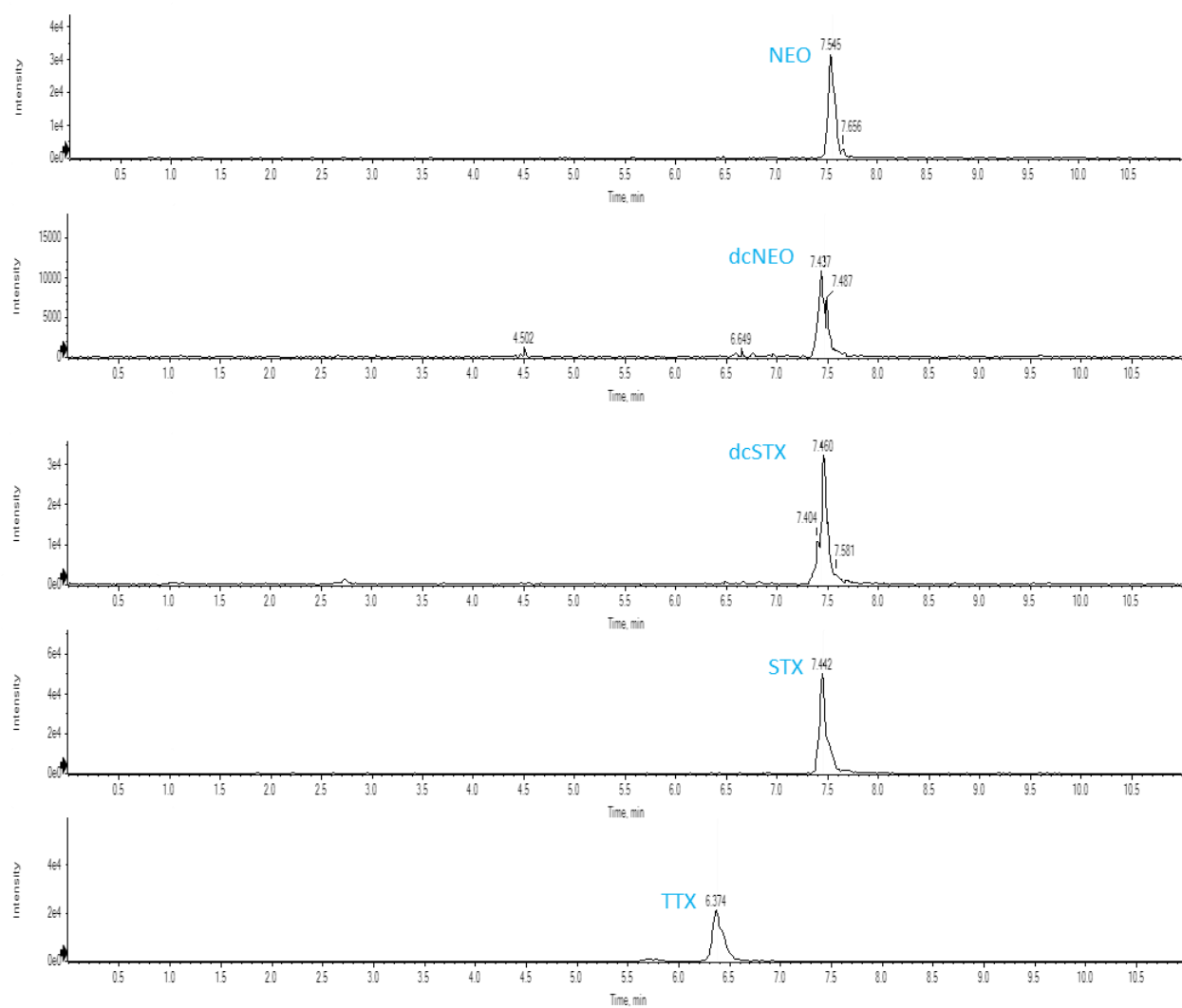


Figure 27. Séparation des toxines en mode d'ionisation positif

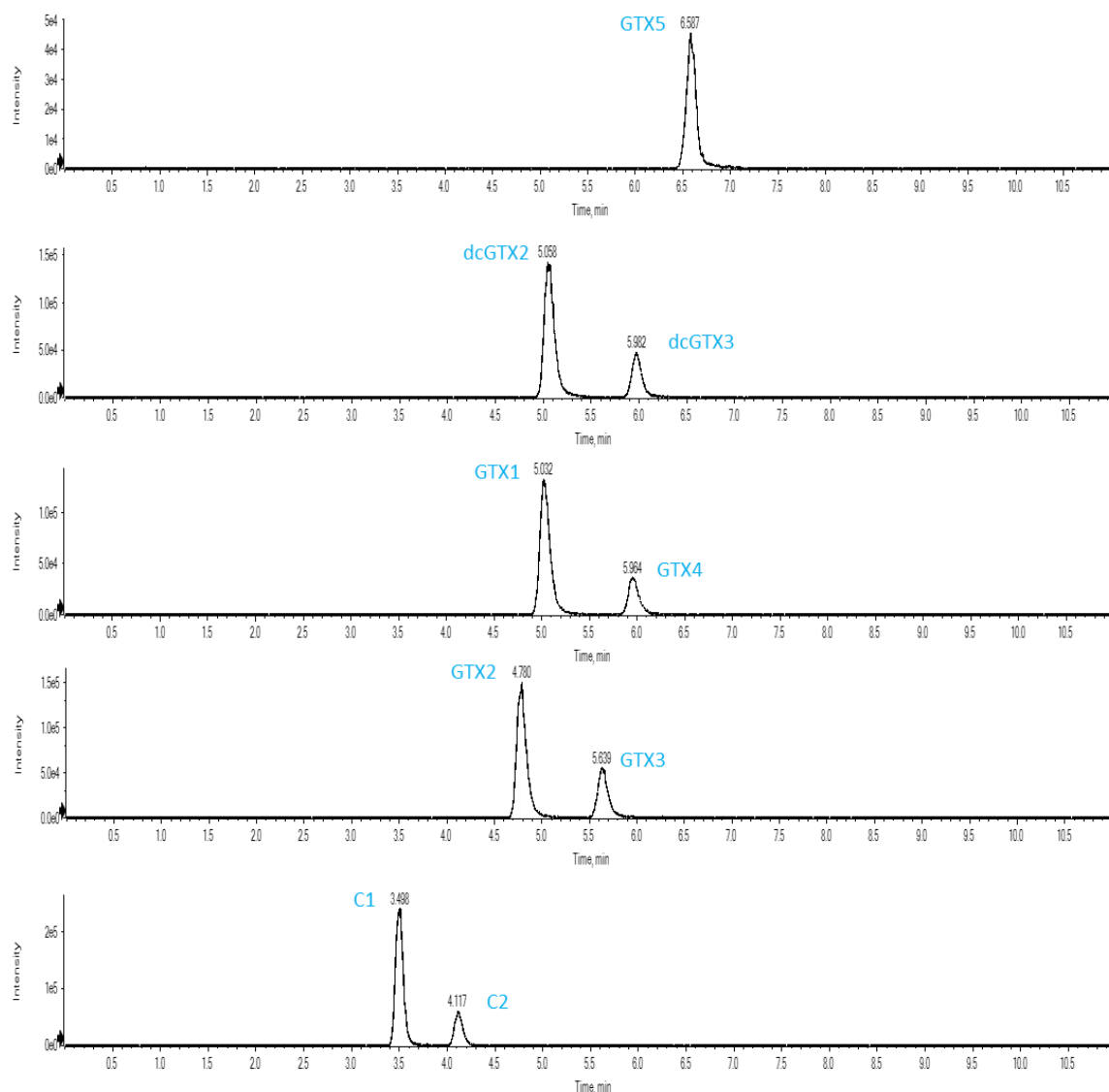


Figure 28. Séparation des toxines en mode d'ionisation négatif

La séparation de GTX2/3 et dcGTX2/3 est nécessaire en raison de la fragmentation à la source du GTX1-4 en dérivés décarbamoyle respectifs qui peut rendre l'identification de ces toxines complexes. Une liste des toxines cibles a été créée avec les informations relatives à chaque composé (**Tableau 20**).

NB : Des tests réalisés dans ces conditions pour essayer d'inclure l'AD avec les toxines hydrophiles n'ont pas été probants. En effet dans ces conditions de gradient et de phases mobiles, l'AD n'a pas été retenu sur la colonne BEH Amide.

Tableau 20. Information acquises pour les toxines hydrophiles analysées

Toxine	Formule brute	Ion parent	Masse mesurée m/z	Tr (min)
C1	C10H17N7O11S2	[M - H] ⁻	474,0354	3,5
C2	C10H17N7O11S2	[M - H] ⁻	474,0354	4,1
dcGTX2	C9H16N6O7S	[M - H] ⁻	351,0728	5,1
dcGTX3	C9H16N6O7S	[M - H] ⁻	351,0728	6,0
GTX2	C10H17N7O8S	[M - H] ⁻	396,0932	4,8
GTX3	C10H17N7O8S	[M - H] ⁻	396,0932	5,6
GTX1	C10H17N7O9S	[M - H] ⁻	410,0735	5,0
GTX4	C10H17N7O9S	[M - H] ⁻	410,0735	5,9
GTX5	C10H17N7O7S	[M - H] ⁻	378,0837	6,6
dcSTX	C9H16N6O3	[M + H] ⁺	257,1356	7,4
dcNEO	C9H16N6O4	[M + H] ⁺	273,13058	7,5
STX	C10H17N7O4	[M + H] ⁺	300,1414	7,5
NEO	C10H17N7O5	[M + H] ⁺	316,1363	7,5
TTX	C11H17N3O8	[M + H] ⁺	320,1088	6,4

Les solutions multitoxines préparées à différents niveaux de concentration (N1-N7) en solvant et en matrice (moule) ont été analysées pour déterminer la sensibilité de la méthode et choisir l'intervalle des gammes d'étalonnage pour la quantification (**Tableau 21**).

Tableau 21. Concentrations des différents niveaux des gammes d'étalonnage en mmol/L

	N1 (mmol/L)	N2 (mmol/L)	N3 (mmol/L)	N4 (mmol/L)	N5 (mmol/L)	N6 (mmol/L)	N7 (mmol/L)
C1	5,2	10,3	20,6	51,5	103,1	206,2	515,5
C2	1,5	3,1	6,2	15,4	30,8	61,6	154,1
dcGTX2	4,6	9,2	18,3	45,8	91,5	183,1	457,7
dcGTX3	1,4	2,7	5,4	13,6	27,1	54,2	135,5
GTX2	5,2	10,4	20,8	52,0	104,0	208,1	520,2
GTX3	2,0	4,0	7,9	19,8	39,5	79,0	197,6
GTX1	2,6	5,2	10,4	26,0	52,0	104,0	260,0
GTX4	0,8	1,6	3,3	8,2	16,4	32,7	81,8
GTX5	2,7	5,3	10,6	26,6	53,2	106,3	265,9
dcSTX	3,0	6,0	12,1	30,2	60,4	120,8	302,0
dcNEO	1,3	2,7	5,3	13,4	26,7	53,5	133,6
STX	3,0	6,0	12,1	30,2	60,5	121,0	302,5
NEO	3,0	6,0	12,0	30,0	60,0	120,0	300,0
TTX	3,7	7,3	14,7	36,7	73,4	146,7	366,8

L'ensemble des toxines a été détecté sans problème qu'à partir du niveau 3 qui a été sélectionné comme le point le plus bas pour tracer les gammes d'étalonnage avec 5 points. Les courbes de calibration étaient linéaires avec un coefficient R supérieur à 0,98 pour toutes les toxines. Afin d'évaluer l'efficacité du protocole de préparation d'échantillon (extraction et purification), un homogénat de moule a été supplémenté avant extraction avec la solution stock multitoxines. Les extraits bruts (avant purification) et les extraits purifiés ont tous les deux été analysés. L'analyse de l'extrait brut a montré que les pics chromatographiques des différentes toxines étaient très mal résolus (**Figure 29**). Les GTX n'étaient pas aussi bien séparées que précédemment et la NEO et dcSTX n'ont pas pu être identifiées. Des décalages aux niveaux des temps de rétention ont également été observés.

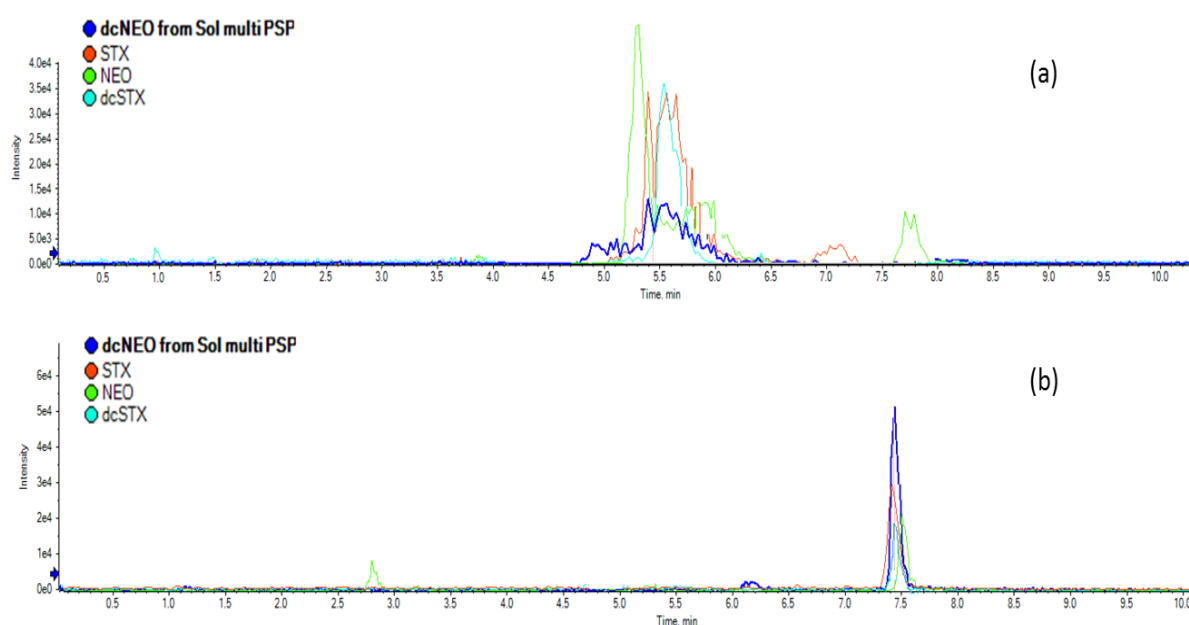


Figure 29. Chromatogramme d'ions extraits (en ESI+) correspondant à l'extrait (a) brut sans purification et (b) après purification de l'échantillon de moule supplémenté

Les taux de recouvrement obtenus sur les extraits bruts étaient trop faibles pour les toxines détectées, ceci est certainement dû aux interférences matricielles trop importantes à ce stade. L'étape de purification est donc nécessaire et a permis de réduire considérablement les effets matrice observés. Après purification, les taux de recouvrement obtenus pour l'ensemble des toxines ont été déterminés en utilisant deux gammes d'étalonnage en solvant et en matrice (**Figure 30**).

La comparaison des résultats obtenus par les deux méthodes a montré que l'utilisation d'une gamme en matrice serait plus adaptée pour la quantification de ces toxines, avec des taux de

récupération compris entre 45 et 123% (contre 23 et 176% en gamme solvant). A noter que même dans ces conditions, les taux de récupération restent faibles pour la TTX (< 50%) et dcSTX (61%).

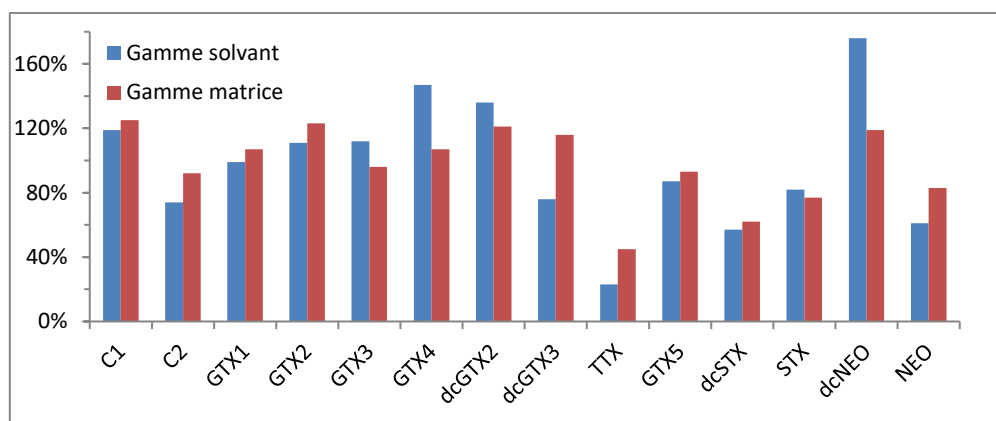


Figure 30. Taux de récupération calculés pour l'échantillon de moule supplémenté après purification utilisant les deux gammes d'étalonnage en solvant et en matrice

D. Conclusions

Deux méthodes LC-HRMS ont été mises en place pour l'analyse ciblée d'une large gamme de biotoxines marines. La première méthode développée utilisant une colonne de phase inverse (HSS T3) a permis de séparer et d'analyser 18 toxines marines de propriétés lipophiles et relativement hydrophiles (AD), les saxitoxines plus hydrophiles n'étant pas retenue sur cette colonne.

Selon les critères de la décision 2002/657 / CE de la Commission et les seuils correspondants la méthode développée a montré des performances satisfaisantes pour les 14 toxines marines qui ont été sélectionnées pour l'étude de caractérisation. La méthode a été appliquée pour l'analyse d'échantillon naturellement contaminées dans le cadre d'un EILA et les résultats très satisfaisant obtenus ont conforté la pertinence de la méthode développée. .

Le protocole d'extraction reposant sur une double extraction MeOH sans étape de purification s'est avéré être un excellent compromis permettant d'avoir des taux de récupération acceptables pour les toxines connues et un caractère exhaustif essentiel pour les analyses non ciblées qui sont l'objectif final de ces travaux.

La deuxième méthode a été mise en place utilisant une colonne HILIC (BEH Amide) qui a permis d'analyser 14 toxines à caractères hydrophiles (groupe des STX et la TTX).

Les épimères de GTX ont été bien séparés par la colonne permettant une identification sans ambiguïté en analyse ciblée. Contrairement à la première méthode, l'étape de purification ici est indispensable. Dans l'ensemble, ces premiers résultats sont encourageants pour une analyse qualitative en haute résolution en mode ciblé des toxines hydrophiles. Cependant, dans l'état, il n'est pas encore envisageable d'utiliser cette méthode dans le cadre des analyses non ciblées. En effet, mis à part la limitation en termes de sensibilité sur le QTOF, la confirmation de l'identité des toxines en analyse non ciblée (en l'absence d'information sur les temps de rétention) s'avère complexe notamment pour les composés isomères générant des spectres de fragmentation MS2 identiques.

A noter que le laboratoire a également mis en place, en parallèle, cette méthode avec la colonne UPLC BEH Amide couplée avec un spectromètre triple quadripôles dans le cadre du programme de veille d'urgence. Les optimisations réalisées en termes de détection et préparation d'échantillons ont permis d'avoir des résultats très satisfaisants pour la quantification d'échantillons naturellement contaminés.

Pour la suite de ces travaux de thèse, nous avons décidé de développer notre approche non-ciblée en utilisant la première méthode développée pour l'analyse des toxines lipophiles et l'acide domoïque.

CHAPITRE III : MISE EN PLACE D'UNE APPROCHE NON CIBLEE POUR L'ANALYSE DES BIOTOXINES MARINES : PREUVE DE CONCEPT

A. Introduction

L'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution pour le criblage non ciblé employant les approches dites « métabolomiques » a connu un essor considérable ces dernières années dans de nombreux domaines notamment en analyse environnementale. Plusieurs travaux sont désormais focalisés sur l'amélioration des connaissances pour la mise en œuvre de cette technique afin d'identifier de nouvelles molécules d'intérêts.

Cependant l'apport de ce type d'approche n'a pas encore été suffisamment étudié dans le domaine des biotoxines marines.

Nous présenterons ici notre démarche et les résultats que nous avons obtenus dans le cadre d'expériences de preuve de concept visant à démontrer le potentiel et les limites des analyses globales selon une approche non ciblée par spectrométrie de masse à haute résolution pour une caractérisation plus fine et plus complète d'échantillons contaminés et l'identification potentielle de composés émergents.

Nous détaillerons dans ce chapitre la démarche entreprise pour l'approche de suspect screening et l'analyse sans a priori. Pour cette dernière, nous mettons l'accent sur les étapes de traitement de données réalisées avec deux logiciels constructeurs (MasterviewTM et MarkerView) et le logiciel open source XCMS disponible sous la plateforme «Workflowformetabolomics».

B. Traitement des données HRMS avec les logiciels constructeurs

I. Matériels et Méthodes

I.1. Produits chimiques et réactifs

Les produits et réactifs chimiques utilisés pour les expériences décrites dans ce chapitre sont les mêmes que ceux présentés dans le chapitre II.B (I.1). La solution étalon de boscalid (à 10 ng/ μ L dans l'ACN) utilisée comme étalon interne a été achetée auprès du fournisseur Dr Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Allemagne).

I.2. Préparation des échantillons et des solutions de travail

Dans le cadre de notre preuve de concept, nous avons choisi de réaliser notre étude sur des échantillons de moules et d'huîtres contrôle que nous avons supplémentés avec des toxines connues dont les étalons sont commercialisés. Les expériences de supplémentation étant très coûteuses, nous avons fait le compromis de sélectionner quelques toxines de familles différentes ; 5 toxines analysables en ESI+ (GYM, SPX1, AZA1, PnTXA, PTX2) et 4 toxines analysables en ESI-. (AO, DTX1, DTX2, AD).

Les échantillons contrôles de moules et d'huîtres ont été extraits selon le mode opératoire standard de l'EURLMB décrit dans le chapitre II.B (I.4). Un contrôle réactif a été également préparé selon le même protocole. Les extraits de moules et d'huîtres ont ensuite été supplémentés par les toxines choisies.

Les solutions d'ajouts ont été préparées à différents niveaux de concentrations à partir d'une solution mère multitoxines (240 ng/mL) tel que décrit dans les

Tableau 22 et Tableau 23

Ne disposant pas de standard interne spécifique aux biotoxines marines, une solution étalon de boscalid (10 ng/mL) a été ajoutée aux solutions de supplémentation comme composé de référence dans le cadre des analyses sans a priori.

Tableau 22. Préparation des solutions d'ajout (SA)

	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5	SA6
Concentration en toxines (ng/mL)	20	40	80	120	160	240
ESI + GYM, SPX1, AZA1, PnTXA, PTX2						
ESI- AO, DTX1, DTX2, AD						
Volume prélevé de la solution mère (µL)	42	83	167	250	333	470
Volume de la solution étalon de boscalid (µL)				30		
Volume de MeOH (µL)	428	387	303	220	137	0
Volume total (µL)				500		

Tableau 23. Préparation des extraits de moules et d’huîtres supplémentés (N)

	N1	N2	N3	N4	N5	N6
Concentration en toxines (ng/mL)	2	4	8	12	16	24
ESI + GYM, SPX1, AZA1, PnTXA, PTX2 ESI- AO, DTX1, DTX2, AD						
Volume solution d’ajout SA (µL)	50	50	50	50	50	50
Volume d’extrait de moules ou d’huîtres (µL)	450	450	450	450	450	450
Volume total (µL)	500					

I.3. Conditions d’analyse par LC-HRMS

Les analyses ont été menées par LC-HRMS. Les détails de la méthode d’analyse sont décrits dans le chapitre II (I.5).

Les conditions chromatographiques et les paramètres de masse utilisés sont résumés dans les **Tableau 24** et **Tableau 25** respectivement.

Tableau 24. Conditions chromatographiques

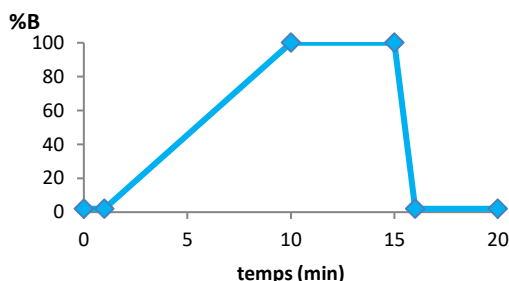
Système HPLC	Dionex U3000
Colonne	HSS T3 C18 – 100 x 2,1 mm, 2,6 µm (Waters)
Débit	0,45 mL/min
Température	30°C
Volume d’injection	5 µL
Phases mobile	A : H ₂ O + 2 mM formiate d’ammonium+50 mM acide formique B : 95% ACN + 2 mM formiate d’ammonium+50 mM acide formique
Gradient	 <p>Le graphique illustre le gradient de phase mobile B utilisé lors de l'analyse. L'axe vertical représente le pourcentage de phase B (%B) et l'axe horizontal représente le temps en minutes (min). La courbe indique une élution isocratique à 0% de phase B pendant les premières minutes, suivie d'une rampe linéaire jusqu'à 100% de phase B à 10 minutes. Cette composition est maintenue constante jusqu'à 15 minutes, puis il y a une transition abrupte de retour à 0% de phase B, qui persiste jusqu'à la fin de la course à 20 minutes.</p>

Tableau 25. Paramètres de masse

Spectromètre	5600 QTOF (Sciex)
Source	ESI+/ESI-
Gaz 1 (GS1)	35 psi
Gaz 2 (GS2)	45 psi
Température (TEM)	500°C
IonSpray Voltage (ISV)	5,5 kV / -4,5 kV
Gaz rideau (CUR)	30 psi
Potentiel de déclusterisation (DP)	60 V / -100
Ion release delay (IRD)	67 ms
Ion release width (IRW)	25 ms
Energie de collision (CE)	40 eV / -40 eV
Amplitude de l'énergie de collision (CES)	20 V / -20 V
Mode d'acquisition (temps d'accumulation)	MS : TOF MS (0,2 ms) MS/MS : IDA (0,05 ms)
Gamme de masse	TOF MS : 100-1250 Da MS/MS : 50-1250 Da

I.4. Acquisition et traitement des données

L'acquisition des données a été réalisée par le logiciel Analyst® TF 1.7.1 (Sciex, Toronto, ON, Canada).

Pour l'approche suspect screening, les logiciels PeakView® (Sciex, Toronto, ON, Canada) et son algorithme MasterView™ (Sciex, Toronto, ON, Canada) ont été utilisés pour visualiser et traiter les données. Une liste de composés suspects a été créée avec MasterView™ avec 821 molécules incluant biotoxines marines et cyanotoxines. Les seules informations disponibles dans cette liste de suspects sont les noms des molécules, leurs formules brutes et leurs masses exactes. La liste a été utilisée pour les deux modes d'ionisation pour chercher les ions $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$ en ESI+ et ESI- respectivement.

Après le traitement, le logiciel permet d'afficher les résultats dans le volet chromatogramme et dans un tableau. Ce tableau affiche des informations pour l'identification des composés en fonction des résultats de recherche de la bibliothèque créée, y compris le temps de rétention, l'erreur de masse (ppm ou Da), la composition élémentaire et le score de pureté. Des paramètres

de confiance pour l'identification des composés sont définis avant de procéder au traitement des données permettant de filtrer les ions détectés selon un code tricolore (vert, orange et rouge) en fonction du niveau de confiance (**Figure 31**).

	Mass Error Mass Error (ppm)	Retention Time % Error	Isotope Isotope Ratio % Difference	Library Hit Library Score	Formula Finder Formula Finder Score
Green (✓)	< 10.0	< 2	< 10.0	> 65.0	> 65.0
Orange (▲)	< 20.0	< 5.0	< 20.0	> 35.0	> 35.0
Red (●)	>= 20.0	>= 5.0	>= 20.0	<= 35.0	<= 35.0

Combined Score
Individual scores are combined into a single score using these weighting factors

20 % 20 % 20 % 20 % 20 %

☒ Use RT Error % for RT Score
☐ Use RT Error Delta for RT Score

Figure 31. Paramètres de confiance définis pour le suspect screening

Pour l'approche « suspect screening » nous nous sommes intéressés uniquement à l'erreur de masse, le ratio isotopique et le Formula Finder Score. Les composés répondant aux critères fixés sont affichés en vert en haut du tableau et sont considérés comme des potentiels positifs. Cette identification automatique est un premier filtre qui permet de réduire la liste et de prioriser les ions à étudier. Ensuite pour chaque composé de la liste, nous vérifions l'allure du pic correspondant, le rapport S/N, la cohérence du temps de rétention, le profil isotopique et pour confirmation le spectre de fragmentation MS/MS.

Les deux logiciels d'extraction de pics MasterViewTM et MarkerViewTM ont été testés pour l'approche non-ciblée sans a priori :

- Le logiciel MasterViewTM possède un algorithme d'extraction de pics non ciblé « untargeted peak finding » qui permet l'extraction des pics d'intérêt à partir des données brutes. L'extraction des pics a été réalisée en fixant certains paramètres au préalable (**Figure 32**).

Calculations | Library Searching | Columns | Confidence Settings | User Settings

XIC

Do not calculate details for XIC with Intensity < counts or S:N <

Default XIC Width (Da)

Default Retention Time Width (min)

Default Threshold (cps)

Default Threshold (ratio of control)

☒ Non-Targeted Peak Finding

Find new LCMS peaks and add them to the existing XIC list.

Minimum Retention Time (min)

☒ Maximum Retention Time (min)

Find peaks from:

☒ All samples

☐ Selected sample only

Peak Detection Sensitivity

Fast | | | | | Exhaustive

☒ Formula Finder

Max Element

Mass Tolerance (ppm)

Figure 32. Paramètres d'extraction des pics (Masterview™)

Le logiciel MarkerView™ (version 1.2.1.) a été utilisé pour traiter les données brutes LC-HRMS. Il s'agit d'un progiciel de traitement qui permet la détection des pics, l'alignement et le filtrage des données, générant une matrice de variables dans laquelle sont définis les m/z mesurés, le temps de rétention et l'intensité ionique du signal détecté. L'exploration des données a été effectuée par un algorithme automatisé avec les paramètres d'extraction suivants :

- subtraction offset: 15 scans (cette option réduit les chances de trouver des ions de fond constants sous forme de pics) ;
- subtraction multiplication factor: 1.3 (avant la soustraction, le spectre de fond mentionné ci-dessus est d'abord multiplié par cette valeur, ce qui est utile pour compenser les variations mineures de l'intensité des ions présents dans le bruit de fond) ;
- minimum retention time peak width: 5 scans (les « pics » plus petits que cette valeur sont considérés comme du bruit) ;
- minimum spectral peak width : 10 ppm.

Le logiciel effectue ensuite une correction des temps de rétention et un alignement des pics par rapport à notre composé de référence (le boscalid) avec les paramètres suivants: retention time tolerance 0,2 min; mass tolerance 10 ppm; intensity threshold 50 cps; maximum number of peaks 5000 ; les largeurs minimale et maximale des pics chromatographiques sont fixées respectivement à 0,05 min et 1 min ; les temps de rétention minimal et maximal sont respectivement de 1,2 et 10 min. Pour limiter le nombre de signaux, les pics présents dans moins de 3 échantillons de la séquence d'analyse sont éliminés car considérés comme de potentiels artefacts. De même les pics dont l'intensité dans les échantillons contaminés est moins de 10 fois plus importante que dans le blanc sont éliminés.

Enfin, le logiciel revient aux données brutes pour intégration en utilisant les intervalles de masse m/z et de temps de rétention des pics alignés. En revenant aux données brutes, les pics alignés dans les échantillons analysés sont traités de la même façon, indépendamment de la précision de l'intégration originale. Toutes ces données sont converties en matrice de variables pour procéder ensuite aux analyses statistiques qui vont nous permettre de déterminer les ions d'intérêt avant de procéder à leur identification.

I.5. Analyses statistiques des données

Les données ont été traitées avec différents outils statistiques :

Un t-test qui est un outil d'analyse statistique univariée supervisée pertinent lorsque deux ou plusieurs groupes d'échantillons prédéterminés sont présents. L'outil statistique de MarkerViewTM permet une comparaison par paire de tous les groupes ou de comparer un groupe à tous les autres. Nous avons opté pour la comparaison par paire des échantillons contaminés et blancs. Les résultats du t-test indiquent dans quelle mesure chaque signal (ion m/z) distingue les deux groupes. Ceci est rapporté en tant que « p-value » ; plus cette valeur est petite plus le signal est significativement déterminant dans la différence observée entre deux groupes. Les ions ayant une p-value <0.05 ont été retenus comme potentiellement intéressants. Le « fold » est également un paramètre important traduisant la différence d'intensité entre les groupes pour les ions considérés.

Analyse multivariée : une ACP non supervisée a d'abord été réalisée. Avant l'analyse statistique, les réponses aux pics étaient mises à l'échelle avec le modèle pareto selon lequel les données sont centrées autour de la moyenne et divisées par la racine carrée de l'écart type. Cela a pour effet de réduire l'influence des pics très intenses, tout en mettant l'accent sur les pics plus

faibles qui peuvent avoir plus de pertinence. Les données ont également été traitées par analyse supervisée (PCA-DA) qui a un pouvoir plus discriminant que l'ACP pour la détermination des ions responsables des différences significatives entre les échantillons contaminés et blancs.

I.6. Identification des composés d'intérêt

L'identification des composés d'intérêt a été réalisée avec le logiciel Peakview[®] qui peut être programmé pour effectuer automatiquement des calculs empiriques de la formule moléculaire potentielle avec l'application Formula Finder. L'algorithme de Formula Finder utilise les données MS et MS/MS pour trouver les meilleures formules possibles qui correspondent à la masse extraite. Une fois qu'une formule potentielle a été déterminée, elle peut être recherchée dans la base de données ChemSpider. Les structures extraites de la base de données sont liées au spectre MS/MS acquis pour cet ion via les fichiers mol correspondants. Les spectres de fragmentation des biotoxines marines ne sont souvent pas référencés dans les bases de données utilisées (ChemSpider et PubChem). L'identification se fait alors sur la base du spectre MS uniquement dans un premier temps. Pour la confirmation de la structure potentielle, une méthode alternative de fragmentation *in silico* est alors appliquée afin d'élucider les structures. En effet les algorithmes du logiciel sont capables de prédire la fragmentation théorique d'un composé donné utilisant les énergies de liaison et de dissociation (Ruttkies et al., 2016). Les fragments générés *in silico* et ceux acquis sont alors comparés. Le logiciel permet ainsi de calculer un score de probabilité entre les fragments détectés et la structure suspectée. Ce score prend en compte le rapport m/z, l'intensité de chaque fragment coïncidant et l'énergie de liaison.

II. Résultats et discussions

II.1. Qualités des données acquises

Le développement et la caractérisation de notre méthode en mode ciblée nous a permis de valider les performances chromatographiques (répétabilité des temps de rétention des étalons), et de détection en spectrométrie de masse (précision et répétabilité des mesures de masses précises et répétabilité des intensités des références). Les critères de validation analytique ont été les suivants : mesure de la masse précise des références avec une erreur inférieure à 5 ppm et coefficient de variation des Tr et des intensités, respectivement inférieurs à 5 et 25%.

II.2. Évaluation des performances de l'approche « suspect screening »

Pour évaluer le workflow du suspect screening, nous avons procédé à l'analyse des échantillons de moules et d'huîtres dopés tout en considérant les toxines présentes comme des composés inconnus. La seule information a priori était la masse exacte des ions présents dans la liste des suspects, calculée à partir de la formule brute de chacun des composés candidats.

Les critères d'identification des suspects devaient être choisis avec soin afin de minimiser à la fois le nombre de faux positifs (ions identifiés à tort comme composés d'intérêt) et de faux négatifs (composés réellement présents et pas identifiés).

Les premières étapes du criblage des suspects sont automatisées grâce au logiciel MasterViewTM qui permet de filtrer les données et identifier les ions potentiellement présents en se basant sur des critères de confiance que nous fixons à l'avance. Différents paramètres ont alors été étudiés et optimisés pour arriver au workflow optimal. Pour les paramètres relatifs aux pics chromatographiques, une intensité minimale de 1000 cps a été appliquée. Le rapport signal/bruit (S/N) minimum a été fixé à 6 (compris entre la LD (S/N 3) et la LQ (S/N 10)). Les autres critères d'identification ont été déterminés à partir de trois injections d'extraits de moules et d'huîtres supplémentés à la LQ des différentes toxines étudiées. Nous avons vérifié les scores obtenus pour chacune des toxines (erreur de masse, ratio isotopique, Formula Finder score) et les plus mauvais scores obtenus dans ces conditions expérimentales ont été choisis comme paramètres de confiance. Ainsi, nous avons conclu qu'un Formula Finder score de 65 permettrait d'atteindre le nombre minimum de faux négatifs et de réduire le nombre de faux positifs potentiels. Une erreur de masse de 10 ppm et une différence de rapport isotopique de 10% ont été choisies comme meilleurs compromis.

Une fois nos critères choisis, nous avons procédé à l'analyse de nos échantillons à l'aveugle pour évaluer la pertinence du workflow.

Comme des résultats comparables ont été obtenus pour les différentes matrices, seuls les résultats relatifs aux échantillons d'huîtres sont présentés ici. Après la première étape de filtrage automatique en ESI+, 15 composés suspects (allumés en vert) sur une liste de 821 ont d'abord été identifiés comme des toxines potentiellement présentes dans les échantillons analysés. La deuxième étape consistait à vérifier manuellement pour chacun des ions de la liste : la présence d'un ou plusieurs pics chromatographiques, la correspondance des massifs isotopiques, la

présence des pics dans les 3 réplicats et enfin nous avons vérifié que ces pics n'étaient pas également présents dans le blanc réactif.

Cette deuxième étape a conduit à l'élimination de cinq candidats qui n'étaient soit pas présents dans les trois injections (et donc considérés comme des faux positifs) soit n'affichant pas de « vrai » pic chromatographique. Cette étape a abouti à une liste de 10 candidats, parmi lesquels figuraient les 5 toxines présentes dans l'échantillon : PnTX-A, PTX2, GYM, SPX1, AZA1 mais également des analogues isobares de SPX1 (SPX-A, SPX-G) et AZA1 (AZA6, AZA29, AZA40). Pour confirmer l'identité de ces composés, nous avons comparé les spectres MS/MS expérimentaux aux spectres de fragments théoriques extraits des fichiers « mol » obtenus à partir des bases de données ChemSpider ou PubChem. Tous les spectres expérimentaux ont montré une bonne corrélation avec les fragments théoriques (score > 70%). Une exception a été observée pour la GYM, avec seulement 20% de fragments correspondants. Le logiciel a automatiquement attribué le pic le plus intense présent dans le chromatogramme extrait (XIC) à la masse exacte du composé sélectionné dans la liste des suspects. Le XIC de la GYM a ensuite été vérifié visuellement et un deuxième pic moins intense était présent à un temps de rétention différent (5,1 min) dans les réplicats. Ce pic a ensuite été sélectionné manuellement et la corrélation entre les spectres de fragmentation empirique et théorique a été vérifiée à nouveau. Cette fois, nous avons obtenu une correspondance de 100%. Toutes les toxines étudiées ont été identifiées sans équivoque sur la base de leurs spectres de fragmentation à l'exception de la SPX1 et AZA1, qu'il n'a pas été possible de distinguer de leurs analogues isobares.

Ces résultats montrent qu'il est important de garder un esprit critique lors du traitement des résultats générés automatiquement et de toujours procéder à une vérification pour une identification fiable.

Pour cet exercice de preuve de concept, nous avons essayé de simuler les conditions d'analyse d'un échantillon naturellement contaminé pour lequel le laboratoire ne disposerait pas d'un échantillon de contrôle (même échantillon mais non contaminé). Ce cas de figure se présente souvent pour les échantillons impliqués dans les cas de TIAC où seul un échantillon contaminé est envoyé au laboratoire pour investigation.

Dans le cas où un échantillon de contrôle est disponible, une étape supplémentaire de comparaison, contaminé versus blanc, permettrait d'éliminer soit tous les pics communs aux deux échantillons (« blank extraction ») ou d'éliminer les pics avec une intensité moins de 10 fois plus élevée dans le contaminé que dans le blanc, on parlerait ici de « blank reduction ».

Travaillant dans des conditions de preuve de concept, nous avons pu mettre en application cette approche qui nous fait de gagner du temps en réduisant le nombre initial de candidats potentiels et aucun problème n'a été rencontré pour l'identification de la GYM, puisque le pic le plus intense identifié à tort comme la GYM était en fait présent dans le contrôle alors que le second, élué à 5,1 min et correspondant effectivement à la GYM n'était présent que dans le contaminé. Les mêmes étapes ont été suivies pour les données acquises en ionisation négative. Nous avons réussi à identifier sans ambiguïté l'ensemble des toxines supplémentées (AD, AO, DTX1 et DTX2). L'AO et la DTX2 sont deux composés isobares ayant la même formule brute (m/z 803,4587 ; $C_{44}H_{68}O_{13}$), néanmoins les conditions chromatographiques permettent de les séparer. Il y a ainsi deux pics chromatographiques parfaitement résolus attribués à chacune de ces deux toxines (AO première toxine éluée). Sans aucune information sur le temps de rétention de l'AO et de la DTX2, il est difficile de se prononcer sur l'identité du pic lorsque seule une de ces deux toxines est présente, car elles ne peuvent pas être différenciées sur la base de leur spectre de fragmentation puisqu'il est identique.

II.3. Évaluation de l'approche non ciblée sans a priori

II.3.1. MasterView™

Le même jeu de données a été traité selon une approche sans a priori cette fois-ci en employant la fonction « untarget peak finding » de MasterView™. Après la définition de certains paramètres (cf.I.4) le logiciel procède à l'extraction (peak peaking) des signaux présents dans les échantillons traités. Le logiciel va extraire tous les signaux répondant aux critères définis préalablement, il peut générer une liste avec une centaine voire des milliers de signaux comprenant les composantes matricielles, les interférents qui peuvent survenir lors des étapes de préparation d'échantillons et potentiellement nos composés d'intérêts. Il est impossible à ce stade d'investiguer toute la liste de signaux et de réussir à distinguer les contaminants recherchés parmi tous les ions générés. La meilleure approche pour éliminer les composés sans intérêt (composantes matricielles, artéfacts) est d'effectuer un screening comparatif. Le screening comparatif consiste en la comparaison de notre échantillon inconnu (échantillons supplémentés) avec un témoin connu (échantillons blancs non supplémentés). Nous avons appliqué ici un « control ratio » de 10 qui permet d'éliminer tous les signaux dont l'intensité dans les échantillons inconnus ne serait pas 10 fois plus importante que dans le blanc (**Figure 33**).

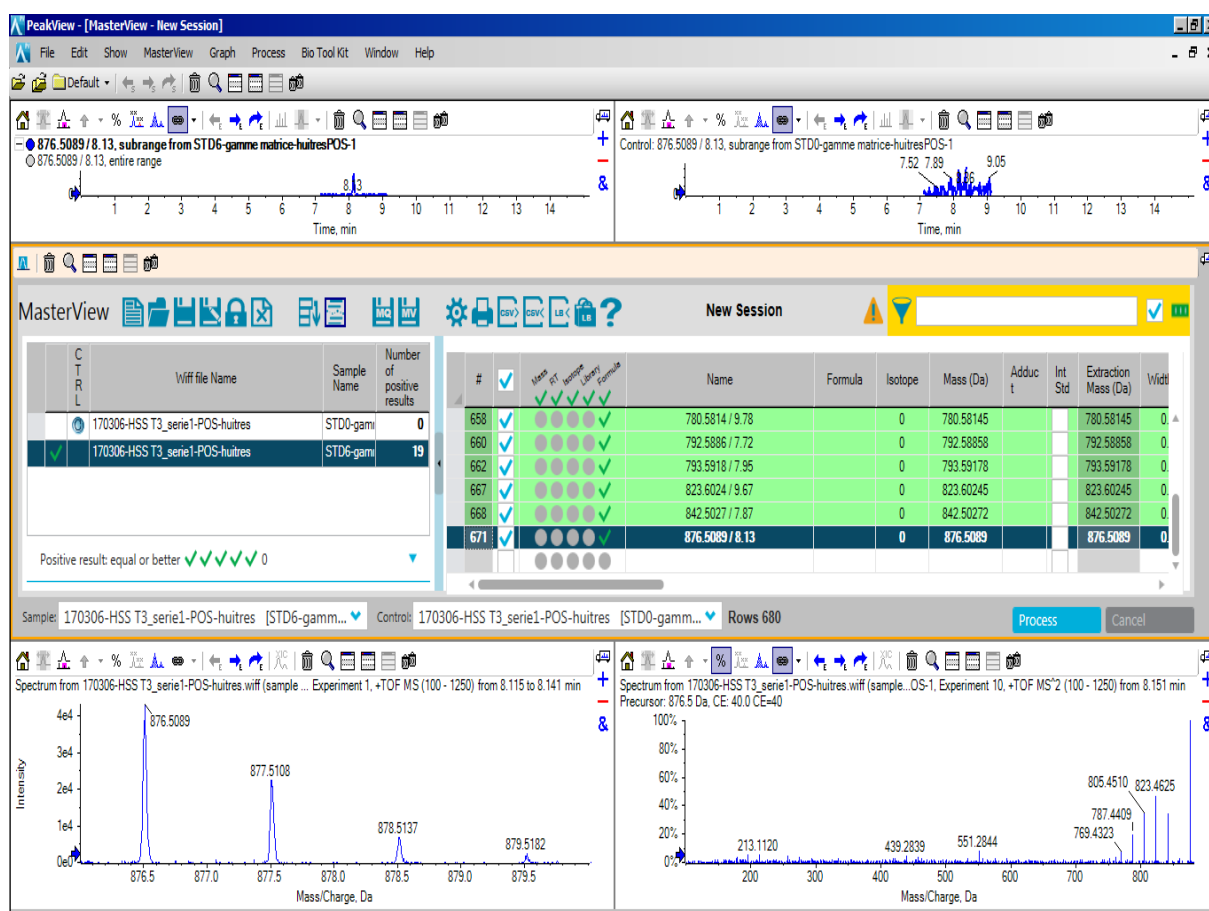


Figure 33. Screening comparatif, échantillon contaminé (chromatogramme en haut à gauche) vs échantillon de contrôle (chromatogramme en haut à droite) avec MasterViewTM

Nous avons d'abord testé différentes vitesses d'extraction « peak detection sensitivity » (**Figure 32**) : « fast » pour un traitement rapide, « exhaustive » pour un traitement plus long et entre les deux pour un temps de traitement moyen. Ce test réalisé sur les répliqués des niveaux les plus contaminés nous a permis de comparer le nombre de signaux générés à chaque fois et de vérifier si nos toxines figuraient dans la liste. Plus la recherche en mode « untarget peak finding » devient exhaustive, plus le nombre de signaux générés augmente, ce qui implique un temps plus long pour l'investigation des ions générés (environ 600). Le traitement rapide n'a pas permis d'extraire les ions correspondants à nos composés d'intérêt, mais avec le temps intermédiaire on arrive à un taux de recouvrement de 90% sur les 5 toxines dans les 6 répliqués testés. L'option « exhaustive » a permis d'extraire 100% des composés d'intérêt. Bien que plus long en termes de temps de traitement et d'investigation des signaux, nous avons opté pour cette dernière option qui permet d'éviter de passer à côté de signaux potentiellement intéressants.

Après le traitement des différents échantillons, nous avons observé que le nombre d'ions extraits entre différentes injections d'un même échantillon peut varier ($CV_{\max} = 3,2\%$).

Aussi, selon le nombre d'échantillons traités, le nombre de signaux générées n'est pas le même. Nous avons donc étudié les échantillons deux par deux (contaminé et contrôle) pour avoir une liste la plus exhaustive possible des ions présents. Les résultats obtenus pour la matrice huître sont présentés dans le **Tableau 26** pour les deux modes d'ionisation. Les résultats relatifs à la matrice moule sont présentés en **Annexe 3**.

Les résultats indiquent qu'après l'application du screening comparatif, le nombre total des signaux initialement générés est réduit d'environ 95 à 99%. C'est à dire que de l'ensemble des signaux détectés, seulement 1 à 5 % sont potentiellement intéressants à investiguer. Les ions retenus après ce premier filtre automatisé sont investigués manuellement ; d'abord visuellement pour vérifier la présence d'un pic chromatographique, ensuite les ions restants sont comparés aux deux autres injections, seuls les composés communs aux trois réplicats sont retenus pour l'étape d'identification. Cette étape permet de réduire le nombre de faux positifs potentiels. Une fois la liste finale des composés établie, nous procédons à l'identification des composés retenus en suivant les étapes décrites dans le paragraphe 0. Un exemple de la procédure d'identification de la SPX1 est présenté en **Figure 34**.

L'analyse sans a priori utilisant l'option « untarget peak finding » de Masterview, nous a permis de retrouver l'ensemble des toxines recherchées sans ambiguïté dans 66% des échantillons analysés à l'aveugle. Cette approche bien qu'efficace, présente certaines limites notamment pour les niveaux de contamination les plus bas. Tel que montré dans le (**Tableau 27**) aucune des toxines n'a été retrouvée pour les deux premiers niveaux de concentration (20 et 40 $\mu\text{g/kg}$) qui représentent 5 à 10 fois les LQ déterminées par la méthode ciblée. Cela montre qu'il faut bien distinguer sensibilité instrumentale et pouvoir discriminant des logiciels d'extraction de données. Pour les deux toxines AZA1 et PnTX-A au niveau 3, les signaux correspondants ont été éliminés automatiquement de la liste initiale de signaux car présents dans seulement 2 des 3 réplicats investigués. Cette observation montre que bien que l'étape de comparaison des données entre les différents réplicats d'un même échantillon nous ait permis d'éliminer un certain nombre de faux positifs, elle nous a fait également passer à côté de certains composés d'intérêts. Cela montre que malgré la robustesse du système et de l'algorithme utilisé, la détection de pics de faible intensité peut être aléatoire. Pour remédier à ce problème, il faudrait considérer les ions présents dans au moins 2 répétitions plutôt que 3 ou bien augmenter le

nombre de réplicats mais cette dernière option implique un effort supplémentaire dans l'investigation manuelle des signaux.

L'identification des ions déterminés comme composés d'intérêt est l'une des étapes les plus importantes et parmi les plus complexe. En effet, les algorithmes utilisés tel que Formula Finder génèrent un nombre très important de formules possibles pour une même masse exacte. À cette étape intervient l'esprit critique de l'analyste et sa connaissance des compositions élémentaires probables des familles de composés recherchés pour limiter le nombre de formules à confirmer par la comparaison des spectres de fragmentation théoriques (*in silico*) et empiriques. La deuxième difficulté rencontrée lors de l'identification est soit (i) l'indisponibilité des spectres de fragmentations théoriques dans les bases de données pour certains composés, ce qui est notamment le cas pour les biotoxines marines, soit (ii) l'absence d'acquisition d'un spectre de fragmentation exploitable. En effet, bien que l'acquisition en mode IDA soit l'un des meilleurs compromis possibles pour une analyse non ciblée, tous les composés d'intérêt ne sont pas forcément fragmentés à cause de la richesse des matrices analysées. L'une des solutions possibles qui permettrait de résoudre ce problème serait de ré-analyser l'échantillon avec le mode d'acquisition « Product ion » à différentes énergies de collisions en rentrant la masse exacte de l'ion à investiguer. On obtiendrait ainsi des spectres de fragmentation plus riches à étudier.

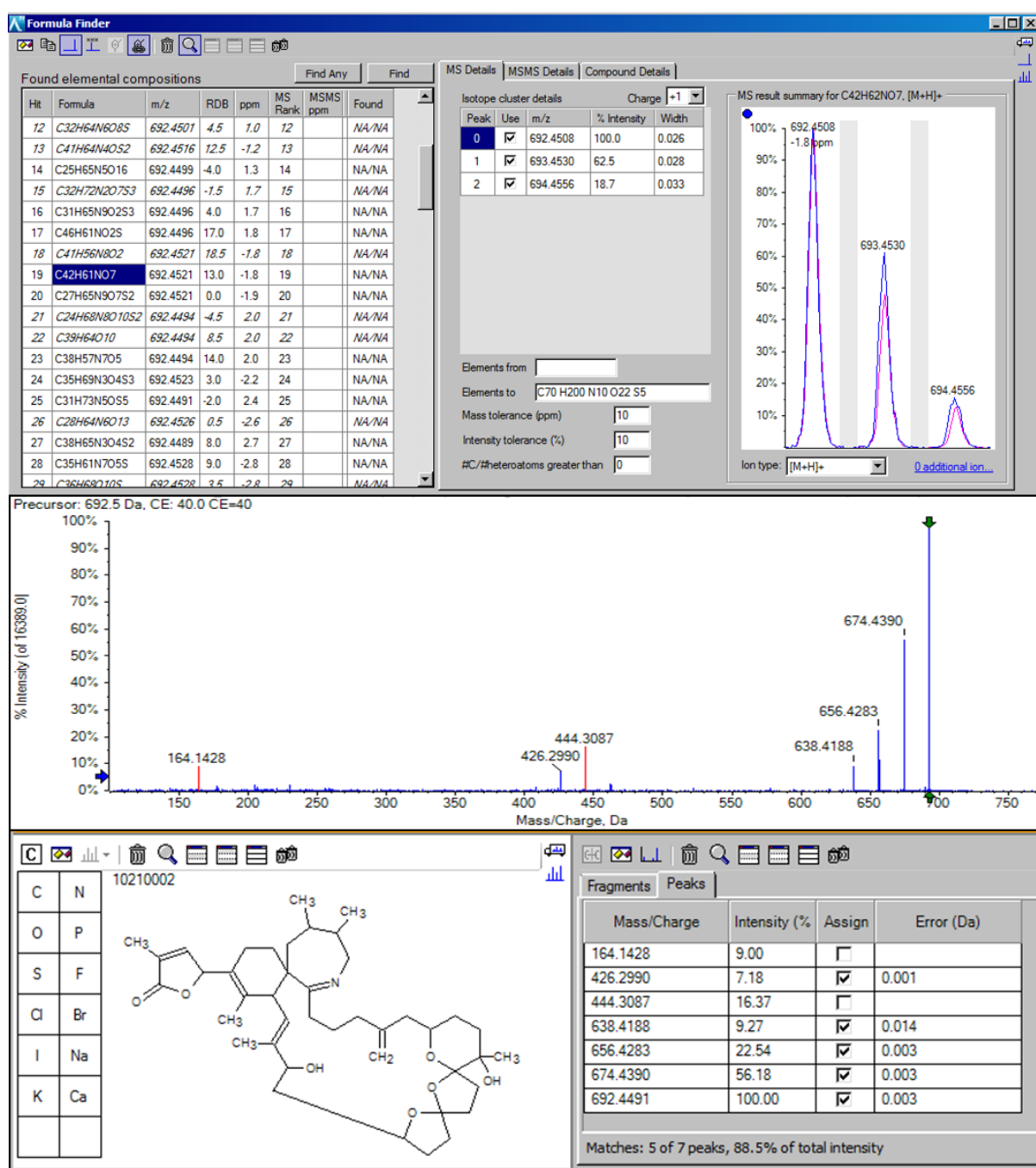


Figure 34. Étapes d'identification d'un composé inconnu (exemple : SPX1) : 1- Recherche de la formule brute dans Chemspider à partir du spectre TOF-MS, comparaison des profils isotopique, 2- Confirmation de la structure par comparaison du spectre de fragmentation acquis avec le spectre de fragmentation théorique (*in silico*)

Tableau 26. Tableaux récapitulatifs des résultats de l'extraction des données avec le logiciel MasterView pour les échantillons d'huître :

(a) ESI+ ET (b) ESI-

(a) ESI+	N1			N2			N3			N4			N5			N6		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Nombre des ions extraits	585	600	590	590	602	582	608	600	590	590	589	603	595	604	607	617	598	589
Nombre d'ion après extraction du contrôle	3	7	5	7	10	6	16	20	13	18	15	18	17	22	19	32	22	27
Nombre d'ions après vérification visuelle	2	3	1	4	2	0	3	4	5	5	5	7	9	6	9	6	5	9
Nombre de faux positifs	2	1	0	2	0	0	1	1	2	0	0	2	3	2	4	1	0	2
nombre de composés Identifiés	0\5	0\5	0\5	0\5	0\5	0\5	3\5	3\5	3\5	5\5	5\5	5\5	5\5	4\5	5\5	5\5	5\5	5\5

(b) ESI-	N1			N2			N3			N4			N5			N6		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Nombre des ions extraits	432	439	412	449	450	437	442	439	430	436	429	438	440	435	439	432	438	437
Nombre d'ion après extraction du contrôle	4	7	4	7	10	5	12	12	9	15	13	13	18	15	18	19	17	20
Nombre d'ions après vérification visuelle	0	2	1	3	2	0	2	1	4	5	6	6	4	5	7	9	6	7
Nombre de faux positifs	0	2	0	1	0	0	1	0	0	0	1	2	0	0	2	1	0	1
nombre de composés Identifiés	0\4	0\4	0\4	0\4	0\4	0\4	3\4	3\4	3\4	4\4	4\4	4\4	4\4	4\4	4\4	4\4	4\4	4\4

Tableau 27. Identification des toxines pour les différents niveaux de contamination par le logiciel MasterView™

✓ : toxine identifiée ; ✗ : toxine non identifiée

	ESI +					ESI -			
	SPX1	GYM	AZA1	PnTX A	PTX 2	AD	AO	DTX	DTX2
N 1	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
N 2	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
N 3	✓	✓	✓	✗	✗	✗			
N 4							✓	✓	✓
N 5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
N 6	✓	✓	✓	✓	✓	✓			

II.3.2. MarkerView

Le logiciel MarkerView™ a permis d'extraire les données acquises à partir des empreintes LC-HRMS en ESI+ et ESI- de tous les échantillons analysés. Une stratégie de réduction des données a d'abord été appliquée afin de réduire la liste des signaux à investiguer. Les données ont ensuite été analysées par des tests statistiques univariés (t-test) et multivariés (ACP, ACP-DA) afin de déterminer et identifier les composés d'intérêt.

II.3.2.i. Résultats du t-test

L'extraction des données avec le logiciel MarkerView™ a généré 7135 et 6952 signaux pour les échantillons d'huîtres respectivement en ESI+ et ESI- contre 6340 et 6518 signaux pour les échantillons de moules. La stratégie de réduction des données appliquée suivant différentes étapes de préfiltrage basées sur le temps de rétention, et l'élimination des isotopes a permis d'éliminer 55 à 79 % des données initialement extraites (**Tableau 28**). Les données retenues ont ensuite été analysées par un t-test. Le t-test représente une étape supplémentaire de filtrage de données qui permet d'éliminer les signaux redondants dans le set de données et détecter les différences significatives entre les groupes d'échantillons.

Tableau 28. Résumé des résultats de la stratégie de réduction des données pour l'identification manuelle des signaux, après des étapes de préfiltrage et de comparaison par paires en utilisant le t-test avec comme facteurs discriminants la p-value et le log du fold-change

		Huîtres		Moules	
1. Etapes de préfiltrage		ESI+	ESI-	ESI+	ESI-
	nombre total de signaux extraits	7135	6952	6340	6518
	1,2 min < RT < 10 min	6290	6175	5567	5841
2. Résultats du t-test (comparaison par paire N6 et N0)	Masse monoisotopique	2830	2715	1824	1216
	P-value < 0,05	147	99	125	133
	Log (fold change) > 0,2	48	28	62	17
	Code tricolore	vert : 20 Orange : 18 Rouge : 10	vert : 9 Orange : 7 Rouge : 12	vert : 19 Orange : 26 Rouge : 17	vert : 15 Orange : 2 Rouge : 0
	Liste finale des signaux pour identification manuelle	20	9	19	15

Les données obtenues à l'issue du t-test ont été classées selon les valeurs croissantes de la p-value. Seuls les ions avec une p-value $< 0,05$ considérés comme signaux significatifs dans la différence entre les deux groupes d'échantillons « dopé » et « contrôle » ont été retenus. Ces signaux ont ensuite été filtrés en fonction du log du « fold change » qui représente le rapport entre l'intensité du signal dans l'échantillon contrôle et contaminé. Seuls les signaux avec un log « fold change » $> 0,2$ ont été retenus à cette étape. La liste des ions pertinents déterminés par le t-test est ensuite importée dans le logiciel PeakView pour visualiser les données. Ces dernières sont alors à nouveau filtrées grâce au code tricolore défini sur la base des critères de confiance déterminés précédemment (II.2). Nous obtenons ainsi une liste finale avec un nombre réduit de composés d'intérêt à identifier (**Figure 35**). On note que le nombre de composés potentiels augmente globalement en fonction du niveau de dopage, une tendance plus perceptible en mode d'ionisation positive puisqu'on passe de 10-12 signaux pour le niveau N1 à 19-20 signaux pour le niveau N6. Le workflow adopté s'est montré très efficace dans la réduction du nombre de signaux à investiguer manuellement ; le nombre de composés d'intérêt représente moins de 1% (entre 0,1 et 0,3%) des signaux totaux extraits.

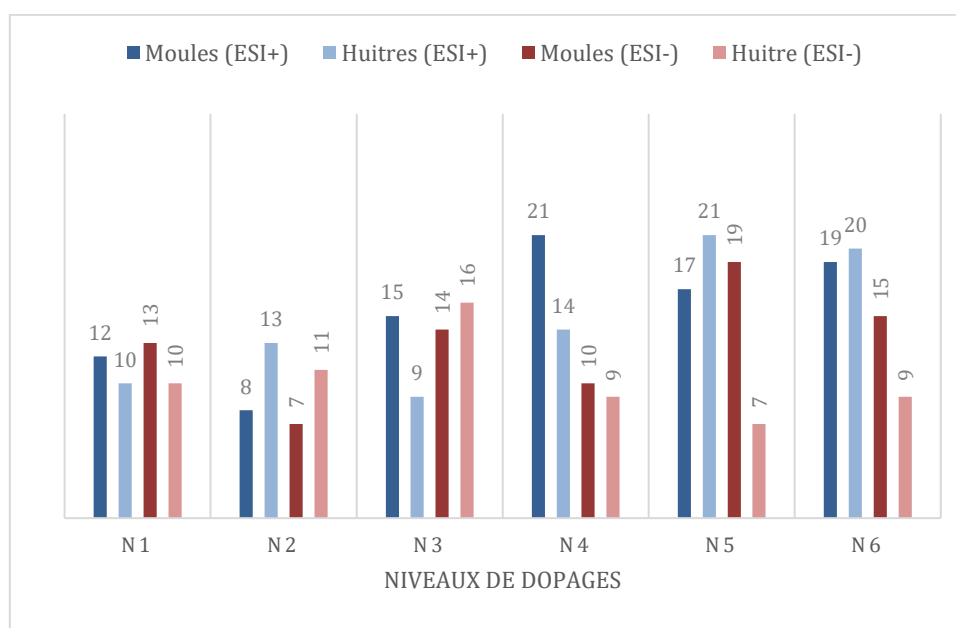


Figure 35. Nombre de signaux restant à identifier manuellement après analyse statistique (t-test) préalable pour les différents niveaux de dopage

Dans cet exercice, le but était d'évaluer l'efficacité de cette approche pour l'identification des toxines dopées aux échantillons de moules et d'huîtres. Nous avons donc simplement vérifié la présence des ions correspondant à ces toxines dans les listes finales d'ions pour chacun des niveaux de contamination. Pour les deux matrices moules et huîtres, les toxines présentes dans nos échantillons ont été identifiées parmi les ions responsables des variabilités observés entre contrôles et contaminés sans ambiguïté pour les niveaux de contamination les plus élevés avec une p-value < 0,01. Pour le niveau de contamination le plus faible, des 5 toxines étudiées seule la SPX 1 a pu être identifiée. Pour la GYM, ce n'est qu'à partir du deuxième niveau de concentration (4 ng/mL) qu'on a pu la retrouver, à partir du niveau 3 (8 ng/mL) pour l'AZA1 et la PnTX-A et à partir du niveau 4 (12 ng/mL) pour la PTX2 (**Tableau 29**).

Tableau 29. Résultats du t-test pour l'identification des toxines en fonction du niveau de concentration étudié, par comparaison avec l'extrait non dopé (niveau N0)

Niveau de contamination comparé à N0	p-value				
	SPX1	GYM	AZA1	PnTX A	PTX 2
N1	✓	×	×	×	×
N2	✓	✓	×	×	×
N3	✓	✓	✓	✓	×
N4	✓	✓	✓	✓	✓
N5	✓	✓	✓	✓	✓
N6	✓	✓	✓	✓	✓

✓ : toxine identifiée (p-value < 0,05) ; × : toxine non identifiée (p-value > 0,05)

II.3.2.i. Résultats des analyses multivariées

Après l'analyse univariée, confirmant la présence de toxines dopées et analysées dans le cadre de l'étude, nous avons voulu tester l'analyse multivariée, également permise par la suite logicielle Sciex.

Initialement, les données extraites par MarkerView™ des différents échantillons, moules, huîtres et solutions standards ont été analysées par une ACP non supervisée. Le graphique des scores plot des deux premières composantes montrent la présence de trois groupes différents correspondant respectivement aux échantillons d'huîtres, de moules et aux solutions multitoxines (étalons) dans le solvant (**Figure 36**).

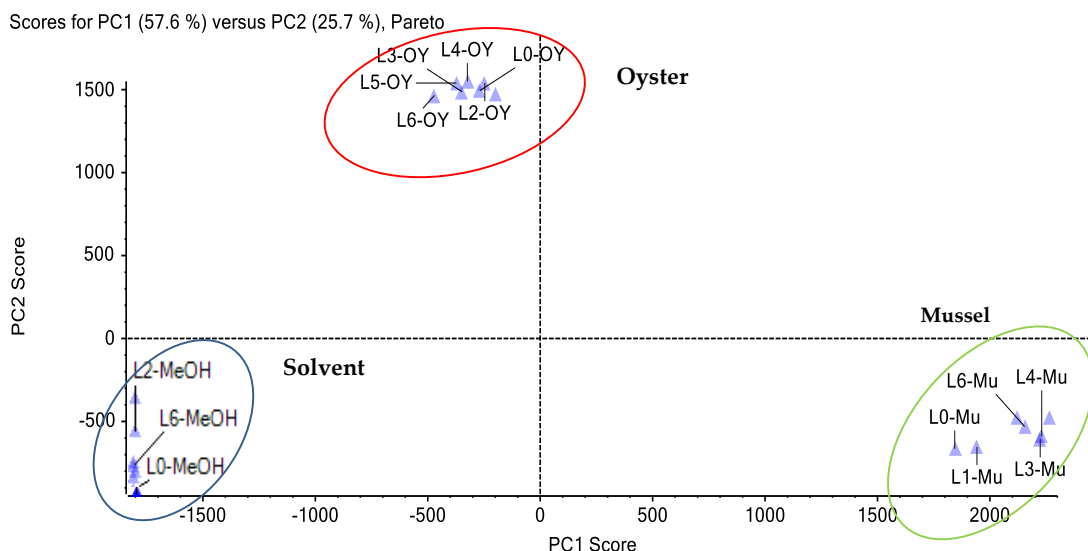


Figure 36. Scores plot obtenu après l'analyse ACP des données générées en ESI+ pour les échantillons de moules, d'huîtres et les solutions multitoxines dans le MeOH

Le score plot montre que les composantes PC1 (57,6 %) et PC2 (25,7%) expliquant à elles deux 83% de la variabilité reflètent en définitive la variabilité liée aux composantes matricielles. Cette distribution n'est pas surprenante dans la mesure où les ions matriciels prédominent par rapport aux ions représentatifs des composés d'intérêt. L'étude des autres composantes (PC3 à PC6) n'a pas révélé non plus de clusterisation basée sur la présence ou non de toxines dans les échantillons. Pour surmonter ou réduire l'impact de la variabilité matricielle qui était prépondérante lors du premier test, nous avons réalisé une analyse supervisée (ACP-DA) plus discriminante, permettant de définir les échantillons de moules et d'huîtres comme appartenant au même groupe. Le scores plot correspondant (**Figure 37**) montre que tous les « L0 » (échantillons non contaminés) sont bien regroupés dans la partie supérieure du graphique et bien séparés des échantillons contaminés. Les autres échantillons sont classés en fonction de leurs niveaux de concentration, du moins contaminé au plus contaminé. Nous observons quatre groupes correspondant aux contrôles (rouge), aux niveaux de contamination faible (vert), moyen (orange) et élevé (bleu), sans distinction des matrices moules (\square) et huîtres (Δ).

Scores for D1 (22.9 %) versus D2 (22.3 %), Pareto (DA)

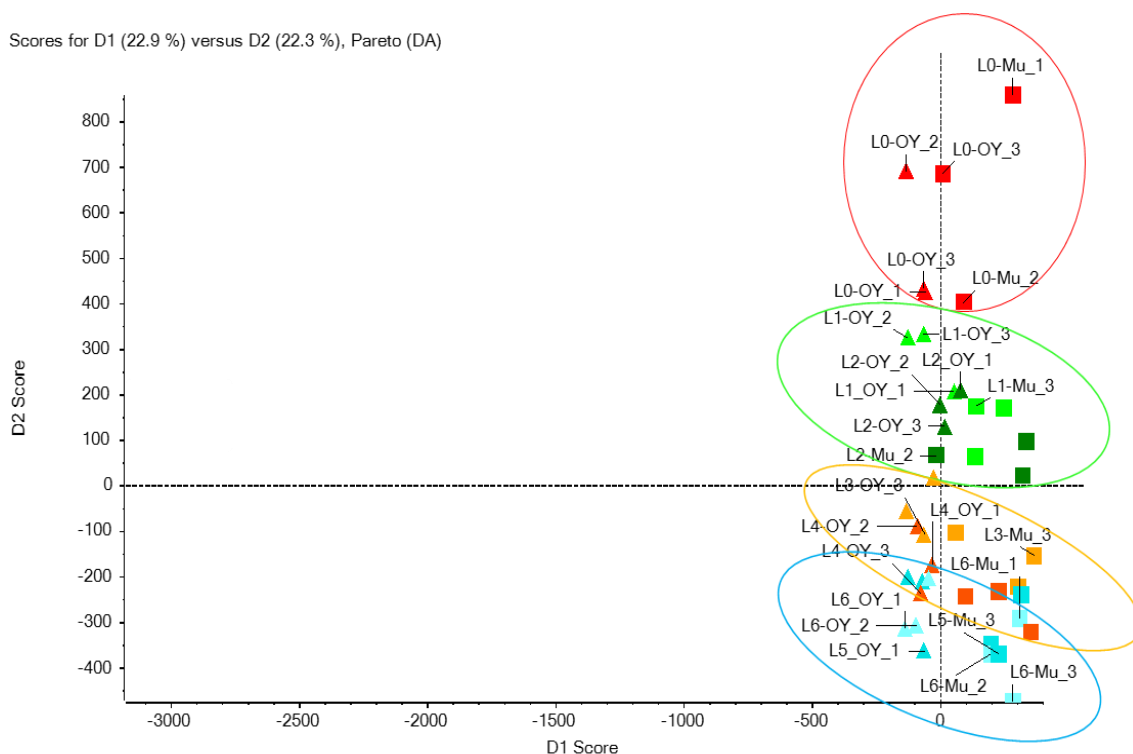


Figure 37. Scores plot obtenu après l'analyse ACP-DA des données générées en ESI+ pour les échantillons de moules et d'huîtres.

□ =moules (Mu), △ = huîtres (OY) ; rouge =niveau 0 ; vert clair = niveau 1 ; vert foncé = niveau 2 ; orange = niveau 3 ; rouge = niveau 4 ; bleu = niveaux 5 et 6.

Pour identifier les ions responsables de la discrimination entre les groupes, nous nous sommes intéressés au graphique des LAOdings plot (**Figure 38**) qui permet de visualiser la distribution des ions en corrélation avec le scores plot. Nous avons donc sélectionné les ions (entourés en bleu) susceptibles de représenter les niveaux les plus contaminés. Nous avons ainsi obtenu une liste de 70 signaux réduites à 55 après l'élimination des isotopes. Les 55 ions monoisotopiques retenus ont été réintroduits dans PeakView® et vérifiés suivant les mêmes étapes que précédemment pour les ions issus du t-test. Les étapes de filtrage manuel ont permis de réduire la liste à 38 et 36 ions pour les matrices d'huîtres et de moules respectivement. Les toxines (GYM, SPX1, AZA1, PnTX-A et PTX2) marquées d'une étoile sur la **Figure 38** ont bien été identifiées parmi la liste finale des signaux responsables de la discrimination observée entre les échantillons contaminés et contrôles. Bien que cette approche ait permis de retrouver les signaux correspondant à toutes les toxines présentes dans la liste des ions d'intérêt, le nombre de faux positifs reste assez important (85 et 87% pour les échantillons de moules et d'huîtres, respectivement). Cela illustre la difficulté qu'il peut y avoir à identifier des composés inconnus par cette approche, du fait du nombre important de signaux qu'il faut investiguer

individuellement pour arriver à identifier le signal d'intérêt, correspondant au composé recherché.

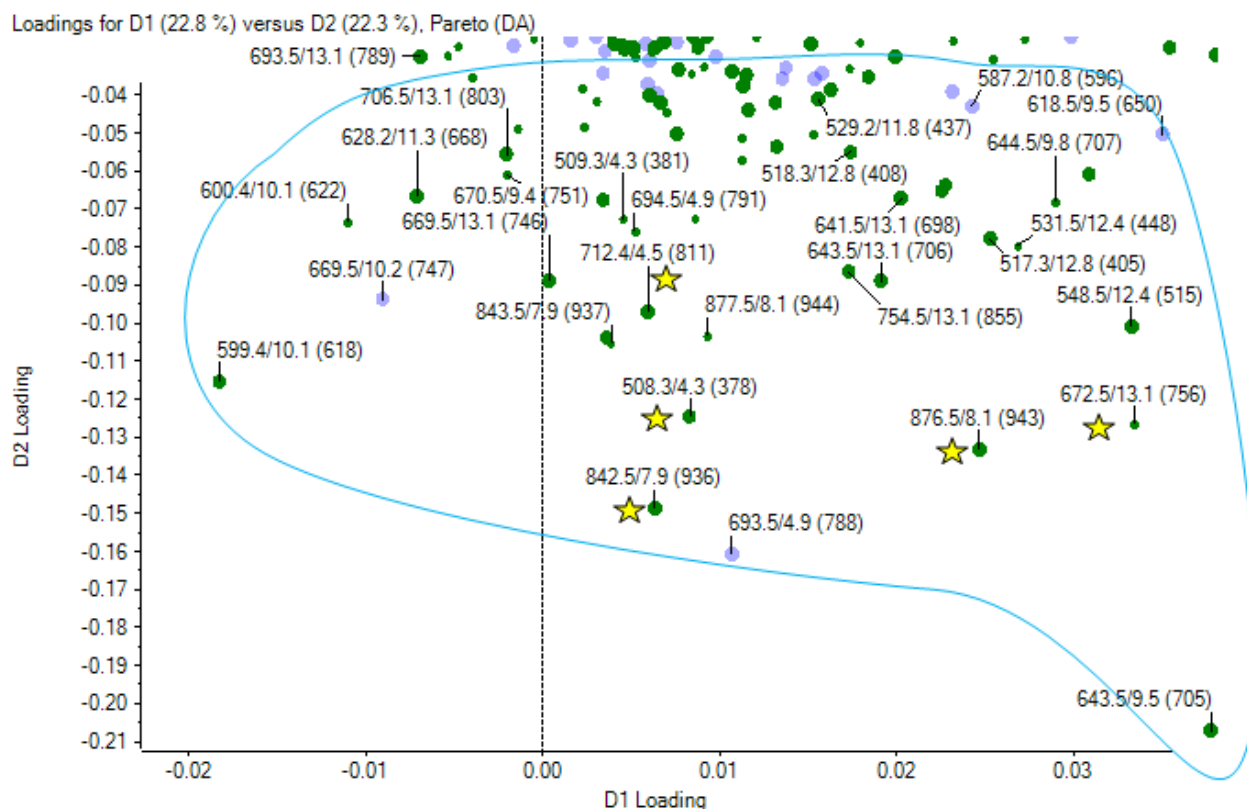


Figure 38. Zoom sur le graphique des loadings plot (ACP-DA): les ions encerclés en bleu correspondent aux variables représentatives (points verts) du niveau le plus contaminé (L6). Les ions correspondant aux toxines d'intérêt sont marqués par des étoiles jaunes. Les trois chiffres indiqués à côté de chaque point vert (tels que 508.3 / 4.3 (378)) représentent respectivement la masse exacte, le temps de rétention et l'aire du pic.

II.1. Conclusions

Dans le cadre d'une preuve de concept, un training test a été mené sur des échantillons de moules et d'huîtres supplémentés avec différentes toxines à différents niveaux analysés par LC-HRMS. Les échantillons analysés ont été traités comme des échantillons inconnus tout au long de l'étude afin d'évaluer les performances des workflows (**Figure 39**) développés pour l'approche « suspect screening » et l'approche non-ciblée sans a priori.

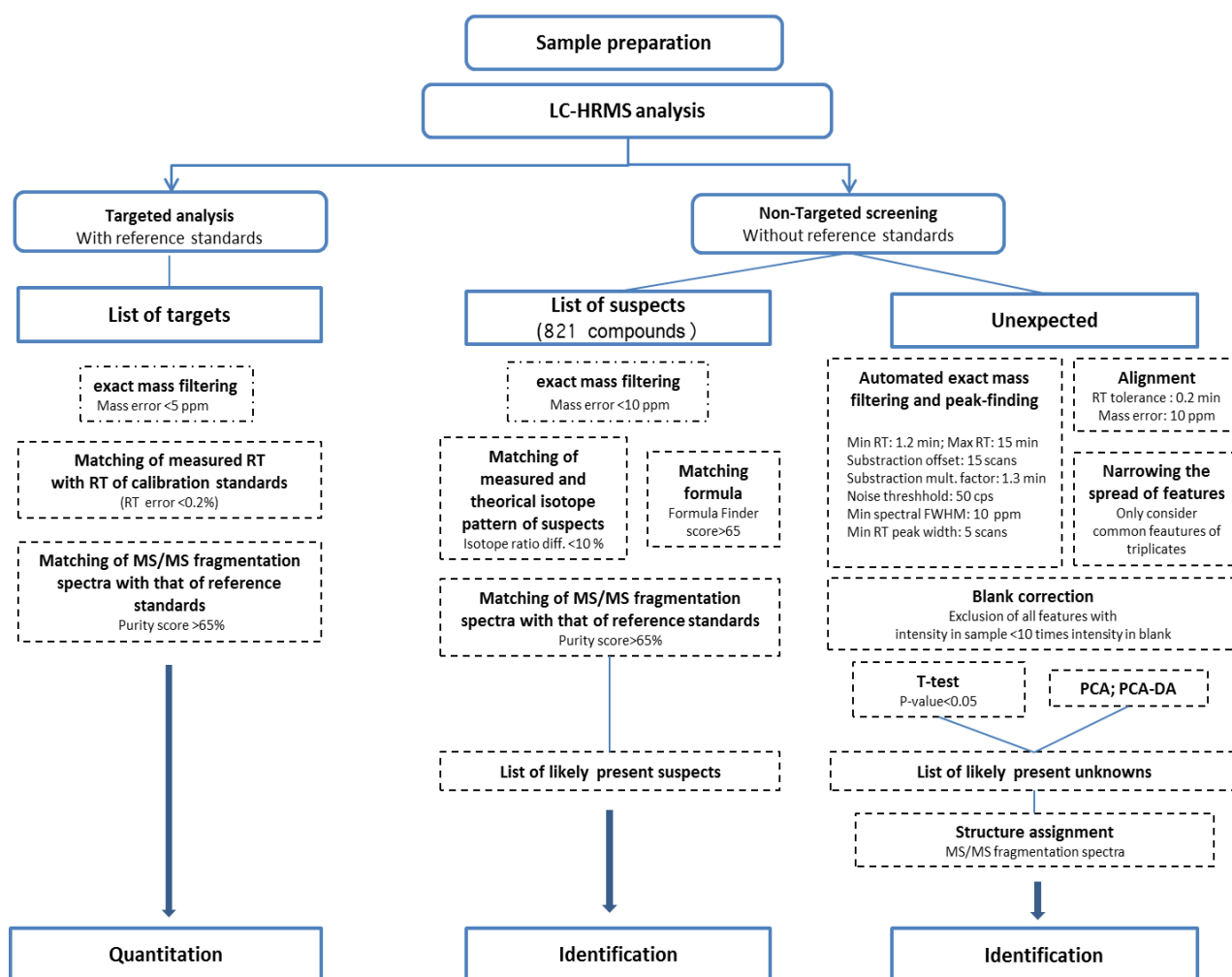


Figure 39. Workflow optimisé pour l'analyse des données LC-HRMS selon les trois approches : (i) screening ciblée, (ii) suspect screening et (iii) screening non ciblée sans a priori

L'optimisation des différentes étapes du workflow développé pour le suspect screening a permis de réduire efficacement le nombre de faux positifs et de faux négatifs. Nous avons réussi à identifier l'ensemble des toxines dans tous les échantillons à tous les niveaux de contamination étudiés. La présence de plusieurs analogues isobares dans la liste des suspects présente une difficulté supplémentaire dans l'identification sans équivoque des composés d'intérêt.

Deux logiciels d'extraction de pics ont été testés pour l'approche non ciblée sans a priori. L'application MasterView™ du logiciel PeakView® s'est avérée très efficace pour l'extraction des composés d'intérêt avec l'approche de screening comparatif avec un pourcentage très faible de faux positifs. Nous avons ainsi réussi à confirmer la présence des toxines étudiées sans difficultés dans l'ensemble des échantillons exceptés pour les 2 niveaux de contamination les plus bas.

Les données extraites avec le logiciel MarkerView™ a permis d'extraire un nombre beaucoup plus important de signaux qu'avec l'application MasterView™. L'analyse univariée des données en appliquant un t-test a permis de recenser les composés responsables des différences significatives entre les échantillons contaminés et contrôle. Les toxines étudiées ont pu être retrouvées et identifiées parmi la liste finale des ions. Bien que le pouvoir discriminant du test statistique se soit montré efficace, il n'était pas possible d'attribuer les différences entre les groupes d'échantillons uniquement aux toxines présentes.

L'analyse multivariée par ACP nous a permis de conclure que ce test n'était pas le plus adapté pour l'analyse des données générées en HRMS. L'analyse supervisée (ACP-DA) s'est avérée plus adéquate et a permis de discriminer les échantillons en différents groupes contaminés et contrôles mais aussi en fonction du niveau de contamination des échantillons. La liste des ions considérés par ce test comme responsables des variabilités entre les échantillons était plus importante qu'avec le t-test. Nos toxines d'intérêt ont bien été retrouvées parmi cette liste, toutefois le nombre de faux positifs restent assez important.

L'identification des ions déterminés comme composés d'intérêt est l'une des étapes les plus importantes et parmi les plus complexes du workflow. En effet, les algorithmes utilisés tel que « Formula Finder » génèrent un nombre très important de formule possibles pour une même masse exacte. À cette étape intervient l'esprit critique de l'analyste et sa connaissance des compositions élémentaires probables des familles de composés recherchés pour limiter le nombre de formules à confirmer par les spectres de fragmentation. La deuxième difficulté rencontrée lors de l'identification est soit (i) l'indisponibilité des spectres de fragmentations théoriques dans les bases de données pour certains composés ce qui est notamment le cas pour les biotoxines marines soit (ii) l'absence d'acquisition d'un spectre de fragmentation exploitable lors de l'analyse LC-HRMS. En effet, bien que l'acquisition en mode IDA soit l'un des meilleurs compromis possibles pour une analyse non ciblée, tous les composés d'intérêt ne sont pas forcément fragmentés à cause de la richesse des matrices analysées. L'une des solutions possibles qui permettrait de résoudre ce problème serait de procéder à une analyse ciblée avec le mode d'acquisition « Product ion » à différentes énergies de collisions en considérant la masse exacte de l'ion à investiguer pour obtenir des spectres de fragmentation plus complets à étudier. Dans le cas d'analyse d'un échantillon réellement contaminé, en la présence d'un nouveau composé, on parlerait plutôt d'élucidation structurale en étudiant les spectres de fragmentation mais l'identification resterait provisoire et devrait être confirmée par d'autres techniques spectrales telles que la RMN.

C. Traitement des données HRMS logiciel open source : XCMS

I. Matériels et Méthodes

I.1. Préparation des échantillons et des contrôles qualité (QC)

Préparation des échantillons

Pour cette étude, nous avons choisi d'élargir la variabilité matricielle de nos échantillons. Nous avons donc sélectionné 3 groupes différents de coquillages (moules *Mytilus edulis*, huîtres *Crassostrea gigas* et coquilles St-Jacques *Pecten maximus*) composés chacun de quatre échantillons différents (**Tableau 30**). L'ensemble des échantillons a été extrait selon le même protocole décrit précédemment (I.4).

Quatre solutions ont été préparées à partir de chacun des extraits : un échantillon contrôle (N0) et 3 échantillons dopés à 3 niveaux (4, 8 et 16 ng/mL) (**Tableau 31**) par un mix de solutions étalons de toxines (GYM, SPX1, PnTX-A et AZA1) (**Tableau 32**). La PTX2 n'a pas été retenue pour cette étude car il a fallu faire un choix en matière de toxines en raison du coût associé au dopage des matrices plus nombreuses dans cette étude-ci. De plus, le pouvoir discriminant du test statistique a montré que la PTX2 n'est identifiable qu'à partir de 12 ng/mL avec les logiciels constructeurs. Même si un autre logiciel est prévu pour l'exploitation des données générées dans cette partie, nous avons préféré ne pas prendre de risque et passer à côté de deux des trois niveaux de dopage prévus.

Préparation des contrôles qualité (QC)

- **QC 1** est composé de 50 µL de solution étalon de boscalid (10 ng/µL) utilisé comme étalon interne (EI) complété avec 450 µL de MeOH. Il est injecté en début de séquence d'analyse pour vérifier l'état du système analytique.
- **QC 2** est composé de 50 µL de la solution étalon de boscalid et 450 µL de l'extrait correspondant au contrôle réactif (blanc de procédure obtenu en procédant à l'ensemble de la méthode d'extraction mais sans échantillon, l'objectif étant d'identifier les ions apportés par les solvants et autres réactifs utilisés).
- **QC 3** ou QC pool correspond à un extrait représentatif de la totalité des échantillons de la série d'analyse. Pour réaliser le QC pool, il est nécessaire de prélever le même volume (50 µL) de chaque échantillon (« dopés » et « contrôles »). La totalité des volumes prélevés est regroupée, mélangée et répartie dans plusieurs vials d'injection.

Tableau 30. Echantillons utilisés dans le cadre de l'étude

Moules (<i>M. edulis</i>)	11 PHYCO 523 18 BM 008 15 PHYCO 205 15 PHYCO 375
Huîtres (<i>C. gigas</i>)	15 BM 374 15 BM 376 18 BM009 10 PHYCO 013
Coquilles St Jacques (<i>P. maximus</i>)	16 BM 399 17 BM 068 17 BM 059 13 PHYCO 024

Tableau 31. Récapitulatif des niveaux de dopage et des contrôles utilisés

N0	Contrôle (non dopé)
N1	4 ng/mL
N2	8 ng/mL
N3	16 ng/mL
QC 1	MeOH + EI
QC 2	Contrôle réactif + EI
QC 3	QC pool (mélange des extraits)

Tableau 32. Toxines et étalon interne (EI) utilisés pour doper les échantillons

Molécule	Abréviation	Formule brute	Masse exacte (Da)
13-desmethyl spirolide C	SPX 1	C42H61N07	691,4448
Azaspiracid 1	AZA 1	C47H71N012	841,49763
Gymnodimine A	GYM	C32H45N04	507,33486
Pinnatoxine A	PnTX-A	C41H61N09	711,43463
Boscalid*	Boscalid	C18H12Cl2N2O	342,03267

*: utilisé comme EI

I.2. Conditions d'analyse par LC-HRMS

Les analyses ont été menées par LC-HRMS en mode d'ionisation positif utilisant les mêmes conditions chromatographiques et paramètres de masses que ceux décrits pour l'étude précédente (I.5).

Les échantillons ont été analysés de manière aléatoire. Pour cela, le séquençage des échantillons a été randomisé grâce au logiciel R (fonction « rand »). L'ordre d'injection des échantillons est un paramètre important à prendre en compte lors de la préparation de la séquence d'injection pour réduire l'effet de la variabilité du signal sur les résultats. La séquence commence toujours par plusieurs injections de QC standard et de solvant afin de s'assurer de la stabilité du système

analytique, puis de deux injections de QC2 suivie des QC pool (**Figure 40**). Les échantillons sont ensuite insérés dans la séquence en intercalant un QC3 tous les 5 échantillons.

QC 1	15 PHYCO 205-N 1
QC 2	17 BM 059-N2
QC3-1	15 PHYCO 376-N1
13 PHYCO 024-N1	QC3
13 PHYCO 024-N3	[...]
15 PHYCO 375-N2	17 BM 068-N2
18 BM 008- N3	15 PHYCO 375-N3
11 PHYCO 523 -N3	16 BM 399-N0
QC3	QC 3
18 BM 008- N1	QC 2
15 PHYCO 374-N3	QC1

Figure 40. Exemple d'une séquence d'injection

I.3. Traitement des données

I.3.1. Conversion des données

Avant de procéder au traitement des données par les logiciels open source, les données brutes au format constructeur (.raw) ont été converties dans le format mzXML, qui est un format libre, à l'aide de la commande msconvert du logiciel ProteoWizard disponible gratuitement sur Internet (<http://proteowizard.sourceforge.net/>).

I.3.2. Traitement des données brutes

Le traitement des données brutes a été réalisé avec les packages XCMS et CAMERA du logiciel RStudio, tous deux disponibles sur la plateforme Galaxy « Work4metabolomics » (<http://workflow4metabolomics.org/the-galaxy-environment>). Les détails des fonctions (utilisées sous R) ainsi que les paramètres XCMS utilisés sont répertoriés en **Annexe 4**. Les étapes de traitement sont présentées ci-dessous :

- 1- Extraction des pics : Cette étape réalisée avec l'algorithme « Centerwave » consiste en la sélection des signaux analytiques présents dans les données brutes acquises correspondant à l'ensemble des ions détectés dans l'ensemble des échantillons (fonction, « xmsSet »)
- 2- Alignement des empreintes et correction des temps de rétention (Tr) : le logiciel détermine quelles sont les variables qui correspondent à la détection d'un même signal dans différents échantillons. Cela revient à créer des groupes de variables alignées selon un m/z et un temps

de rétention proche (fonctions « group »). Une fois les échantillons alignés, avec la fonction « rector », les légers décalages en temps de rétention sont corrigés.

3- Complétion des données manquantes : il est très fréquent que les variables soient détectées dans certains échantillons et absentes dans d'autres. Pour chaque variable l'étape de complétion des données va déterminer des limites de temps de rétention et de m/z basées sur les différents échantillons dans lesquels celle-ci est présente, puis va intégrer le signal présent dans cette plage de temps de rétention et m/z dans les échantillons où la variable étudiée est absente (fonction « fillpeaks »).

4- Création d'une table de données : avec le package CAMERA une matrice est créée comportant l'ensemble des « variables » avec création pour chacun les EIC (Extracted Ion chromatogram) et boxplots correspondants.

5- Normalisation des variables : la variabilité intra-série du signal des ions présents dans les QC est corrigée en appliquant une régression linéaire pour l'ensemble des échantillons.

6- Filtration des variables : les variables sont filtrées selon leur intensité par rapport aux contrôles analytiques et leur coefficient de variation. Les ions issus des contrôles réactifs sont éliminés. La filtration des variables est réalisée en fonction du rapport des coefficients de variation : les variables ayant un rapport $\frac{CV_{QC\ pool}}{CV_{\text{échantillons}}} > 1$ sont éliminées.

I.4. Analyses statistiques

Les données ont été analysées par des méthodes chimiométriques univariées et multivariées grâce à l'outil « Statistical Analysis » de la plateforme **w4m** regroupant des packages R dont le package « ropls » pour les analyses multivariées.

I.4.1. Analyses univariées

Deux tests paramétriques de Student et non-paramétriques Wilcoxon-Mann-Whitney ont été réalisés avec une erreur α de 5% pour déterminer la significativité (p-value) des variables entre les deux groupes (« dopés » et « contrôles »). Une variable est considérée comme significative dans la discrimination entre deux groupes si sa p-value est inférieure à 0.05.

I.4.2. Analyses multivariées

Une transformation logarithmique des intensités de toutes les variables, puis une normalisation par centrage et mise à l'échelle standard ont été effectuées avant les analyses multivariées.

Dans un premier temps, une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée afin de visualiser la répartition des échantillons dans un espace en deux dimensions. Dans un second temps, une analyse supervisée de type PLS-DA (de l'anglais, Partial Least Square Discriminant Analysis) a été appliquées au jeu de données afin d'affiner les résultats et de déterminer quelles variables participent le plus à la différenciation des groupes (dopés /contrôle).

Les modèles de PLS-DA permettent de mettre en évidence les variables les plus impliquées dans la discrimination des groupes « dopés » et « contrôles » qui sont matérialisées par leur score VIP (de l'anglais, Variable Importance in the Projection). Nous considérons ici une variable comme discriminante pour le modèle si son score VIP est supérieur à 5. Des tests de permutations ($k = 1000$) ont été réalisées pour valider les modèles de PLS-DA.

Une comparaison des variables discriminantes obtenus en PLS-DA et en analyses univariées a été réalisée pour conforter ou non les résultats.

II. Résultats et discussions

II.1. Traitement des données brutes

L'ensemble des empreintes acquises par LC-HRMS en ESI+ de tous les échantillons analysés (sans différenciation entre les matrices) a été traité avec le workflow développé. Le logiciel XCMS a permis dans un premier temps d'extraire **9464** signaux. Ces données ont ensuite subi les différentes étapes de prétraitement : alignement (**Figure 41**), complétion des données, etc. pour générer ensuite une matrice des données et une matrice des variables avec le logiciel CAMERA (**Figure 42**). Les données ont été ensuite normalisées (**Annexe 5**) et filtrées en fonction du coefficient de variation des intensités et cette étape a permis d'éliminer 16% des données extraites initialement pour réduire le nombre de signaux à exploiter à **7949**. Pour visualiser et comprendre l'information contenue dans les tableaux de données, deux types d'analyses statistiques univariées et multivariées ont été effectuées.

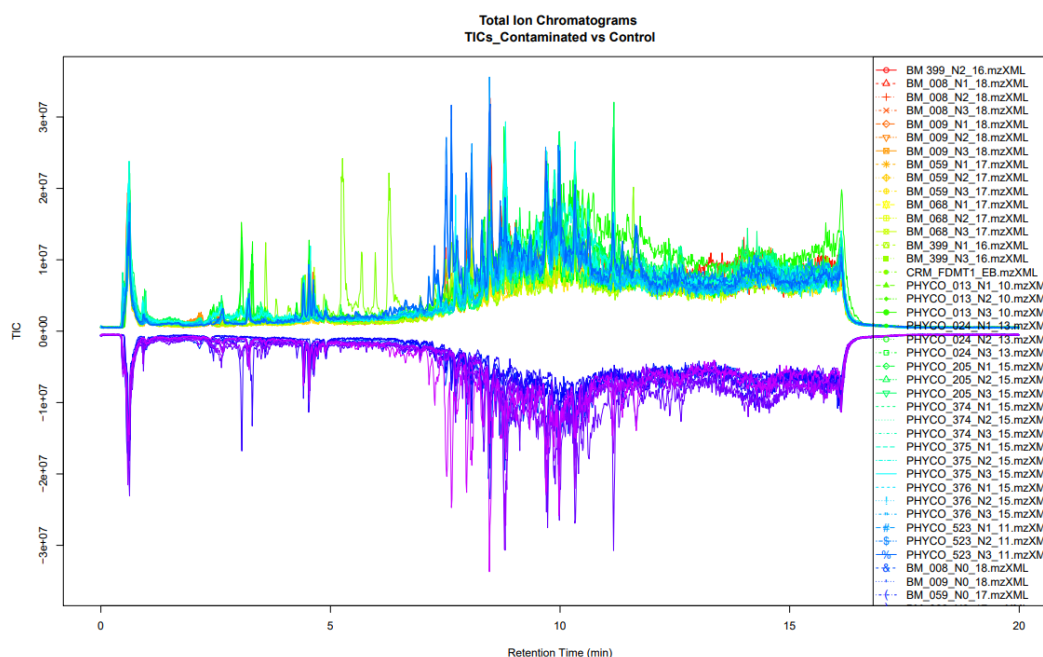


Figure 41. Alignement des pics avec le logiciel XCMS (fonction « rector »)

II.2. Analyses statistiques des données

Les données ont été dans un premier temps analysées en globalité à l'aide d'une l'analyse non supervisée (ACP) afin de visualiser la répartition « spontanée » des échantillons dans un espace à deux dimensions. Les résultats ont ensuite été affinés à l'aide d'une deuxième analyse multivariée supervisée de type PLS-DA et confirmés par les analyses univariées (t-test et test de Wilcoxon).

Résultats des analyses ACP

La première ACP a été réalisée sur les données relatives à l'ensemble des échantillons (toutes matrices confondues). La carte factorielle du poids des individus, appelée « scores plot », est représentée en **Figure 43a**. Elle montre que les QC pool sont tous regroupés au centre confirmant la qualité du jeu de données et la validité de la séquence analytique. La capacité descriptive du modèle signifiée par la valeur $R^2X = 0,503$ indique que la moitié de la variabilité du jeu de données est prise en compte par ce modèle. La distribution graphique des échantillons ne montre aucune discrimination entre les deux groupes dopés et contrôles et ce, quel que soit le niveau de dopage. La variabilité représentée par les composantes principales 1 (21%) et 2 (8%) traduit majoritairement les différences en fonction de la nature des échantillons et ne prend pas en compte la présence ou absence de toxines. Les projections des autres composantes principales ne permettent pas non plus de mettre en évidence des discriminations en fonction de « l'état

Matrice des variables

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1	name	namecustom	mz	mzmin	mzmax	rt	rtmin	rtmax	npeaks	Contaminate	Control	QCpool	isotopes	adduct	pcgroup	
2	M100T153	M100.0751T2	100.0751493	100.0725249	100.0766498	2.557107696	2.523931472	2.846375535	52	32	9	11	[1][M]+		2209	
3	M101T84	M101.0226T1	101.0225650	101.0205450	101.0250089	1.392093128	1.321302377	1.482403757	57	35	11	11			2623	
4	M101T283	M101.0597T4	101.0589671	101.0559372	101.0616328	4.713784418	4.652087093	4.757730385	50	30	10	9			2548	
5	M101T232	M101.0597T3	101.0589730	101.0564126	101.0629229	3.859034512	3.816899900	3.903985610	45	27	9	9			2338	
6	M101T153	M101.0779T2	101.0779250	101.0771727	101.0795163	2.553219829	2.524374090	2.584490676	40	22	7	11	[1][M+1]+		2210	
7	M101T277	M101.0949T4	101.0949166	101.0930078	101.0969674	4.624462584	4.596154644	4.648586713	58	36	12	10			1767	
8	M102T158	M102.0451T2	102.0451070	102.0432884	102.0485835	2.597564085	2.648550246		12	7	5	0			1484	
9	M102T38	M102.0536T2	102.0536119	102.0515823	102.0580687	0.625832945	0.577615713	0.993719573	54	32	9	10			1317	
10	M102T153	M102.0803T2	102.0802984	102.0772933	102.0829835	2.548728397	2.526696031	2.572477900	25	11	5	9	[1][M+2]+		2211	
11	M103T982	M102.9694T1	102.9693648	102.9675901	102.9726437	16.36093789	16.30698074	16.42949676	39	23	9	7			670	
12	M103T159	M103.0536T2	103.0535995	103.0516071	103.0566601	2.649602312	2.605442138	2.958418004	56	33	12	10			1485	
13	M104T58	M104.0527T0	104.0520386	104.0477565	104.0548871	0.972440574	0.649506386	1.030397239	57	34	11	10			2064	
14	M104T38	M104.1058T2	104.1057648	104.1038621	104.1082548	0.631096635	0.616035601	0.731134465	57	34	12	11	[2][M]+		1318	
15	M105T180	M105.0695T2	105.0695022	105.0651024	105.0710200	2.995518356	2.966543707	3.008756555	40	22	7	11			1416	
16	M105T418	M105.0695T6	105.0695442	105.0670807	105.0742795	6.966688855	6.938861314	6.986499439	25	13	7	5			68	
17	M105T40	M105.1089T2	105.1088815	105.1062908	105.1108967	0.670803856	0.612658259	0.721475670	33	19	5	9	[2][M+1]+		1319	
18	M106T67	M106.0676T1	106.0675746	106.0658819	106.0702710	1.119104560	1.080527220	1.193147726	20	10	4	6			1978	
19	M106T179	M106.0724T2	106.0723626	106.0674750	106.0749249	2.983970366	2.958787062	3.000532893	25	12	5	8			1417	
20	M107T159	M107.0484T2	107.0483861	107.0450090	107.0508061	2.646541072	2.615430488	2.799949298	35	25	8	2			33	
21	M107T278	M107.0697T4	107.0697074	107.0672182	107.0724291	4.630754765	4.605177798	4.644386734	60	37	12	11			1768	
22	M107T523	M107.0701T6	107.0701209	107.0672146	107.0737661	8.723373718	8.376706166	8.771652913	24	15	6	2			944	
23	M108T38	M108.0101T2	108.0101422	108.0070872	108.0130624	0.638232029	0.598462789	0.710970731	36	24	6	6			1320	
24	M109T61	M109.0397T1	109.0390065	109.0368207	109.0419902	1.012591476	0.990241572	1.054321024	18	7	3	8			1979	
25	M109T256	M109.0641T4	109.0640778	109.0598004	109.0661150	4.262664769	4.174942796	4.343067261	57	35	11	11		[M+3H]+ 32	39	
26	M109T365	M109.0641T6	109.0641267	109.0613325	109.0663194	6.082034717	6.021618312	6.103418493	53	34	9	10			2788	
27	M109T332	M109.0996T5	109.0995630	109.0980496	109.1027658	5.536273308	5.478466689	5.591255378	41	27	9	5			2390	
28	M110T976	M110.0079T1	110.0079179	110.0060210	110.0096048	16.27425088	16.21890487	16.30698482	60	37	12	11			10	
29	M110T30	M110.0078T2	110.0078455	110.0064853	110.0095168	0.500110237	0.471293839	0.527535743	51	31	10	10			2938	
30	M110T37	M110.0262T2	110.0261595	110.0242644	110.0285967	0.613136958	0.587942412	0.639835840	24	17	5	2			1321	
31	M111T30	M111.0082T2	111.0081984	111.0036924	111.0108239	0.494828419	0.475422534	0.516136543	36	23	6	7			2939	
32	M111T976	M111.0101T2	111.0101228	111.0080715	111.0128577	16.27183416	16.24741657	16.29918670	14	4	5	5			671	
33	M111T262	M111.0796T4	111.0796135	111.0778975	111.0816687	4.361797121	4.303826021	4.413939954	60	37	12	11			1652	
34	M111T468	M111.1157T7	111.1157481	111.1140305	111.1176893	7.805216050	7.786022282	7.827915568	60	37	12	11	[3][M]+		1159	
35	M111T228	M111.1154T3	111.1153621	111.1125236	111.1183270	3.802837185	3.754911948	4.074776350	46	29	10	7			2339	
36	M112T30	M112.0065T2	112.0065331	112.0035642	112.0110396	0.491993097	0.468701904	0.520178465	40	27	8	5			2940	

Matrice des données

name	BM_399_N2	BM_008_N1	BM_008_N2	BM_008_N3	BM_009_N1	BM_009_N2	BM_009_N3	BM_059_N1	BM_059_N2	BM_059_N3	BM_059_N4
M100T153	3417.787687	317429.4413	316912.9786	313386.2365	6563.1342	5429.0175	4583.956866	3251.075257	3979.520574	2916.109761	2916.109761
M101T84	2914.62	7212.560409	6888.119142	3906.138901	6376.314230	7439.358411	7083.982317	1102.739205	1841.435016	1222.179895	1222.179895
M101T283	16290.90606	13985.78857	8778.944954	9489.723571	13887.54759	16565.22197	9206.129310	9949.675437	9129.601538	5647.439118	5647.439118
M101T232	12014.25970	12539.13313	5673.45725	9756.960447	9250.773648	12927.42646	13323.71486	11568.32592	13443.21325	8791.691072	8791.691072
M101T153	1998.788455	29202.85714	24290.7904	25188.51977	2303.181991	2252.165924	2622.283954	2182.254499	2777.946260	2334.697655	2334.697655
M101T277	11793.84431	10701.67635	14073.19107	18560.31767	14448.37771	12240.006	15916.44846	12162.10931	16166.51255	15356.20978	15356.20978
M102T158	806.7200750	1169.151960	2026.521615	2105.508937	859.9362335	775.6458056	798.0776576	629.1453675	671.9386176	647.8366150	647.8366150
M102T38	18462.3543	13215.98068	10861.52100	9836.328705	11521.92	13842.28613	13377.81087	25193.95875	27623.50297	27753.87537	27753.87537
M102T153	926.3442694	2327.188880	2539.250297	1045.310142	984.3785442	1084.766732	1197.483987	947.4686056	964.9805571	1109.895324	1109.895324
M103T982	2186.347333	2026.072612	1890.643530	2008.859523	2094.431379	1849.386272	1965.500945	2251.318914	1541.426554	1829.812363	1829.812363
M103T159	2319.910588	3625.884285	2934.429473	4970.066617	2515.812391	2799.605122	4013.009	1405.591058	604.4396249	1323.073079	1323.073079
M104T58	2137.161142	3251.28	4073.246307	3636.8316	4969.530085	1123.235466	2121.5115	1660.125	1469.208888	1264.1578	1264.1578
M104T38	132209.8008	47112.53433	42522.25785	34947.51959	92525.40670	85675.28114	96854.38252	19285.82712	24542.291	19331.95387	19331.95387
M105T180	2040.287975	2682.693090	2665.505045	3309.265387	4960.030537	4546.32768	4151.3235	2581.489827	2670.190061	2019.897146	2019.897146
M105T418	2309.322157	4408.253577	1817.694923	5680.262506	6242.242128	4956.829230	5723.770461	4754.53775	4216.346001	3389.778088	3389.778088
M105T40	3273.639694	5538.124533	5177.241641	5057.825162	7073.140376	9100.393778	8641.130084	2885.170197	3838.118068	3182.302856	3182.302856
M106T67	1351.962106	1004.829343	919.2020555	1215.961992	1202.513395	1075.358601	1819.239069	1053.164978	1415.864576	1045.420388	1045.420388
M106T179	789.4928185	1068.413053	686.6546739	835.9996234	645.4572769	995.9769502	934.8793218	821.3269774	798.4172649	619.9877728	619.9877728
M107T159	1154.692208	1557.735739	1208.41875	979.2648571	1448.572101	1743.757306	1551.760573	1087.017091	1170.902944	1434.066995	1434.066995
M107T278	26682.43349	26529.85636	35587.00326	22574.89096	38482.152	27945.78660	29309.06314	30110.58014	32906.58193	31427.69784	31427.69784
M107T523	9019.211731	11473.47405	10879.36333	9590.413759	10656.33100	9665.826542	9766.806020	1125.059000	10579.40323	8175.943548	8175.943548
M108T38	3555.566527	8797.086315	11785.40764	6479.475714	7374.984085	9650.924043	12861.77765	8732.377284	2715.852615	6595.040897	6595.040897
M109T61	1930.350143	3936.933	2550.9792	4452.684857	871.8793197	727.7776141	1225.203409	1625.055598	1816.193637	1230.350710	1230.350710
M109T256	17229.69282	15977.28214	12930.75202	15384.92663	19343.49035	18560.212	26232.04942	12870.22762	22395.70069	17660.84916	17660.84916
M109T365	13282.76434	7947.491416	11676.156	7265.261714	7970.480571	7615.344812	9415.034566	5452.231885	12505.32244	6131.239333	6131.239333
M109T332	3902.6865	6699.866218	6472.400434	3943.135	9675.723540	10404.99923	9587.086714	3910.956799	16529.89466	7288.903934	7288.903934

Figure 42. Tables de données générées avec le logiciel CAMERA

de contamination » des échantillons. Ces résultats sont cohérents avec les observations faites lors de la première étude avec MarkerView™ et expliquées par la prédominance des composantes matricielles.

Les analyses ACP réalisées à partir des données issues des échantillons (contrôle N0 et dopés au niveau N3) et traitées individuellement pour chacune des trois matrices (moules, huîtres et CSJ) ont été effectuées et ont abouti aux mêmes conclusions, à savoir une absence de discrimination entre échantillon dopé et contrôle (non dopé). Le graphique des scores plot issu de l'ACP correspondant à la matrice moule est représentée en **Figure 43b**. Les ACP correspondant aux autres matrices sont présentées en **Annexe 6**.

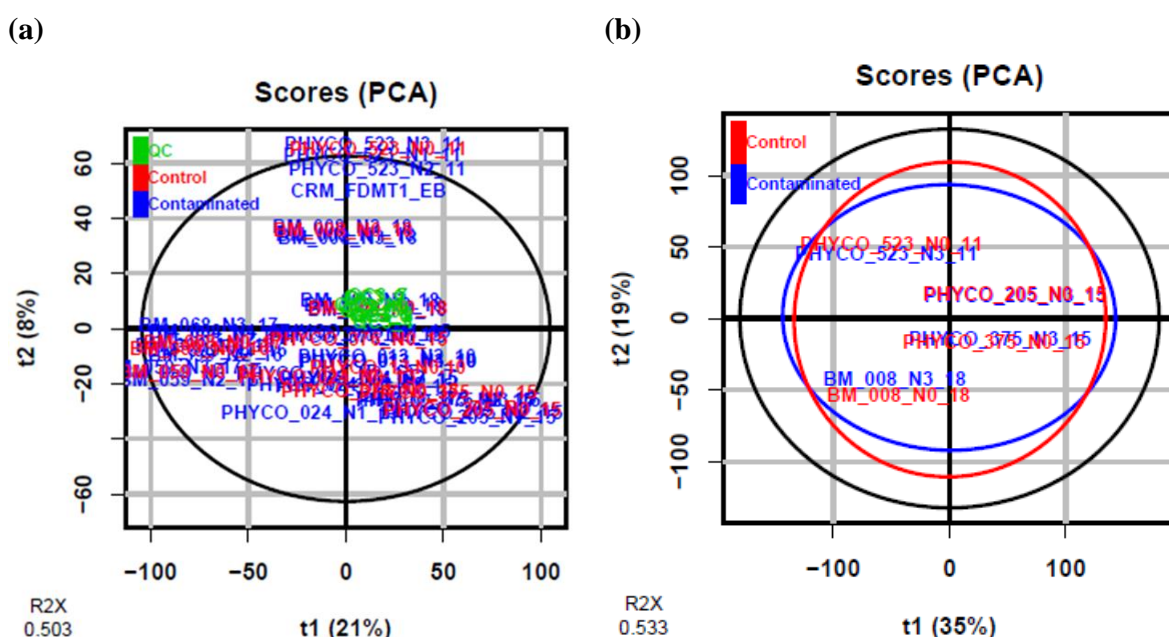


Figure 43. Représentation « scores plot » de l'ACP réalisée (a) pour l'ensemble des échantillons (moules, huîtres et CSJ) et (b) pour les échantillons de la matrice moule

Résultats des analyses PLS-DA et des tests univariés

La PLS-DA, autre modèle dit cette fois « supervisé », a été réalisée sur le même jeu de données utilisées pour l'analyse ACP. Les deux PLS-DA réalisées d'abord sur l'ensemble des échantillons (**Figure 44a**) puis uniquement sur les échantillons de la matrice moule (**Figure 44b**) ont permis d'obtenir des résultats différents de ceux observés avec les ACP. Les graphiques des scores montrent une discrimination assez nette des échantillons en deux groupes correspondant respectivement aux échantillons dopés (en bleu à gauche du graphique) et contrôles (en rouge à droite).

La qualité des modèles ainsi construits peut être évaluée par trois paramètres : $R^2(Y)$, qui correspond au pourcentage de la variabilité qui peut être expliquée par la variable Y , et $Q^2(Y)$ la capacité à restituer (prédire) la variable Y . R^2X correspond à la proportion de la variabilité représentée par le modèle.

Les graphiques correspondant respectivement à l'ensemble des échantillons (PLS-DA 1) et à la matrice moule (PLS-DA 2) montrent qu'une faible proportion de la variabilité ($R^2X=0,286$ et $0,422$) est représentée par le modèle. Cette proportion bien qu'inférieure à la moitié de la variabilité totale a permis une bonne discrimination des échantillons en fonction de leur état de contamination. Le pourcentage de variabilité (R^2Y) expliqué par le modèle est de 98,3% et 99,6% pour la PLS-DA 1 et 2 respectivement. Le pouvoir prédictif (Q^2Y) du modèle est de 68,8% et 78,7% pour les PLS-DA 1 et 2 respectivement. Ces données montrent que le modèle est excellent d'un point de vue descriptif et satisfaisant pour expliquer et prédire l'appartenance d'un échantillon à un groupe donné.

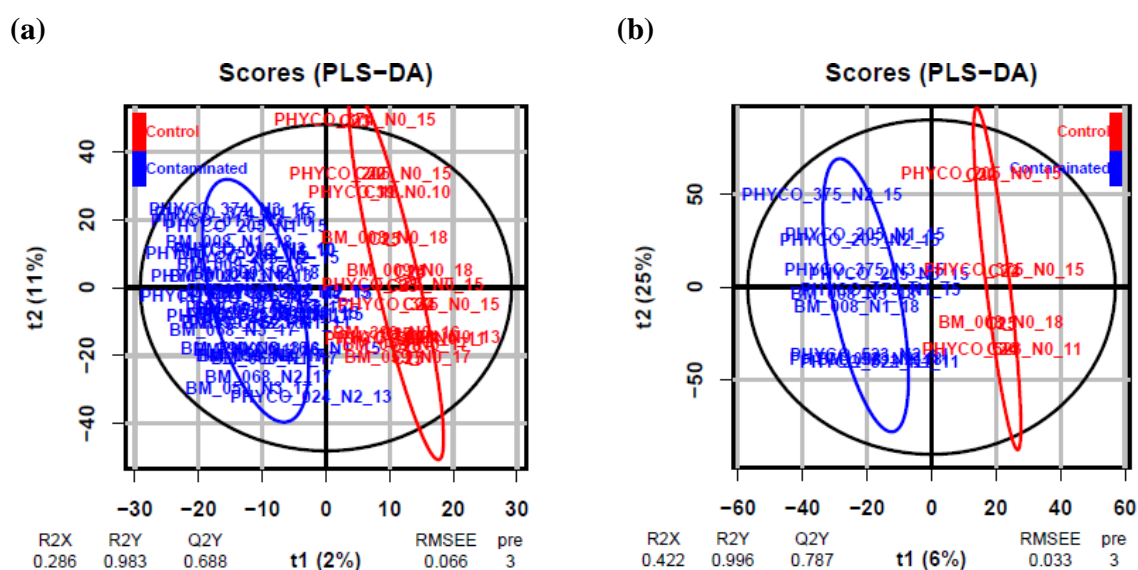


Figure 44. PLS-DA 1 (a) sur l'ensemble des échantillons (moules, huîtres, CSJ) et PLS-DA 2 (b) sur les échantillons de la matrice moule

Le nombre d'échantillons analysés étant nettement inférieur au nombre de variables exploitées, il est important de vérifier que la discrimination observée n'est pas liée à des variables non significatives et par conséquent à un facteur chance.

Des tests de permutations des étiquettes de données ($k=1000$) ont alors été effectués pour évaluer la significativité des critères diagnostiques R^2Y et Q^2Y . Le test de permutation consiste en la permutation aléatoire des étiquettes de données Y des échantillons de façon à obtenir un

nouveau jeu de données. À chaque permutation des valeurs de Y, un nouveau modèle statistique est construit auquel sont associés de nouveaux $pR2Y$ et $pQ2Y$.

Si le modèle obtenu est aussi robuste statistiquement qu'avec les données réellement observées, alors la validité du modèle peut être remise en question. On obtient ainsi des valeurs de p (ou p-value), $pR2Y$ et $pQ2$, qui sont des indicateurs de performances du modèle. Les valeurs obtenues de $pR2Y$ inférieure à 0.01 et $pQ2$ inférieure à 0.05 traduisent la performance du modèle construit et confirme sa validité (**Figure 45**).

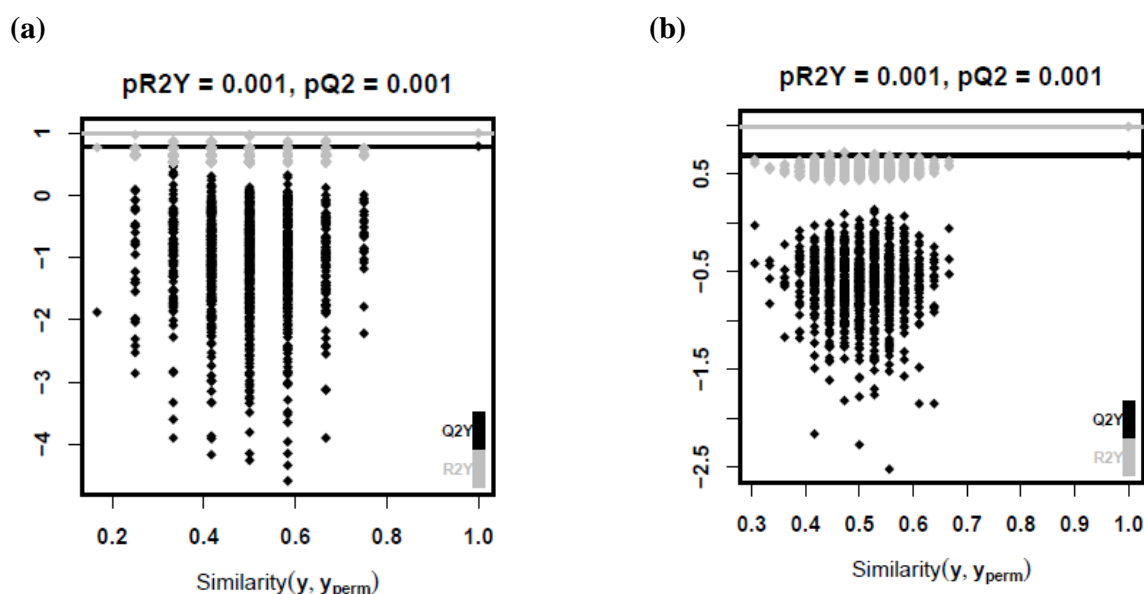


Figure 45. Représentation de la validation du modèle PLS-DA par des tests de permutations ($k=1000$) : (a) PLS-DA 1 (moules, huîtres et CSJ ensemble) et (b) PLS-DA 2 (moules)

Les variables issues de la PLS-DA, ont été classées par ordre croissant selon le critère VIP qui prend en compte l'importance de chaque variable dans la création de la composante et dans la prédiction de Y (variables significatives). Nous avons dans un premier temps sélectionné par défaut les variables pour lesquelles le critère VIP était supérieur à 2 ; 428 variables ont été retenues parmi les 7949 initialement générées après l'analyse LC-HRMS. Dans cette liste, nous avons observé que 12 variables se détachaient du reste avec un VIP supérieur à 5. Ces variables sont définies par le test statistique comme étant les plus significatives dans la discrimination entre les deux groupes « dopés » et « contrôle ».

Les résultats des analyses univariées (t-test et Wilcoxon) pour une p-value $< 0,05$ ont permis d'identifier les mêmes 12 variables issues de la PLS-DA confirmant ainsi la significativité de

ces variables dans la discrimination des deux groupes. Ces variables ont alors été retenues pour l'annotation (**Tableau 33**).

Dans la liste des 12 variables retenues, certaines correspondent simplement à différents isotopes d'un même ion (M844T534, M509T303, M693T339) et d'autres à un même ion détecté avec un décalage négligeable dans la précision en masse ou en temps de rétention mais identifiés comme variables différentes par le logiciel. Il ne s'agit finalement que de 5 ions responsables des différences observées. Pour chacune des variables nous avons recherché les chromatogrammes (XIC) correspondants et représenté leur présence dans les différents groupes d'échantillons par des boxplots (**Figure 46**). Ces représentations montrent bien que les cinq ions identifiés comme significatifs pour expliquer les différences entre les deux groupes d'échantillons (dopés et contrôle) ne sont présents que dans les échantillons dopés. Quatre des cinq ions jugés pertinents par le test statistique ont été identifiés comme correspondant aux quatre toxines avec lesquelles nous avons dopé nos échantillons (GYM, PnTX-A, SPX1, AZA1). L'identité du 5^{ème} ion (m/z 227,1752, Tr 3,33 min) reste inconnue. Le fait qu'il soit seulement présent dans les échantillons dopés est probablement due à une contamination apportée lors des expériences de dopage. Quoi qu'il en soit, le traitement des données a permis de mettre en évidence un ion que nous ne nous attendions pas à retrouver, prouvant ainsi l'efficacité de l'approche utilisée via XCMS.

Ces résultats confirment le pouvoir discriminant du modèle créé qui a permis d'attribuer les différences observées entre les groupes à la présence des toxines qui ont été ajoutées aux échantillons testés.

Tableau 33. Extraction de la matrice des données issues de l'analyse PLS-DA
Variables classées par ordre croissant selon le critère VIP

variableMetadata	m/z	Tr	npeaks	Contaminated	Control	QCpool	class_PLSDA_VIP
M758T966_1	757,5371	16,1048	14	7	5	1	2,001
M229T92	229,1196	1,5364	19	9	5	4	2,002
M703T819	703,2102	13,6556	32	18	6	8	2,938
M185T545	185,1167	9,0751	37	24	7	6	2,940
M743T620_2	742,5597	10,3311	29	18	2	4	2,945
M895T701	894,7663	11,6766	27	9	7	5	2,959
M391T824	391,3019	13,7399	8	1	5	0	2,961
M677T600	677,4987	9,9952	10	3	5	0	2,982
M340T267_2	340,2400	4,4450	19	15	1	3	2,983
M280T553_2	280,1814	9,2240	33	23	4	6	2,985
[...]							
M819T620	818,5633	10,3383	20	8	5	4	2,986
M795T604	794,6179	10,0617	28	16	2	3	3,002
M794T701_1	793,5906	11,6881	20	11	0	6	3,002
M762T904	761,5882	15,0649	20	9	0	5	3,007
M724T819	724,1397	13,6554	10	4	1	5	3,130
M762T921	761,5715	15,3578	21	15	1	2	3,141
M774T621	773,5294	10,3462	20	5	7	4	3,153
M804T620_2	803,5304	10,3334	17	5	7	3	3,156
M784T966_4	783,5755	16,0976	19	12	2	5	3,169
M735T547	734,5763	9,1163	20	8	8	2	3,178
[...]							
M536T867_1	536,1477	14,4467	16	7	7	2	3,246
M432T418_2	432,2386	6,9690	36	24	3	9	3,254
M785T965_2	784,5899	16,0758	28	19	2	3	3,262
M702T819_2	702,2388	13,6517	25	16	4	5	3,271
M789T967	788,5618	16,1124	21	13	1	7	3,283
M769T965_2	768,6060	16,0805	29	17	4	3	3,305
M721T740	720,5730	12,3331	8	3	5	0	3,310
M447T724	447,3550	12,0625	28	21	4	2	3,312
M769T965_1	768,5590	16,0818	25	13	3	6	3,320
M735T773	734,5383	12,8894	17	7	7	3	3,324
M844T534_1	843,5015	8,9071	20	15	0	5	5,289
M844T534_2	843,5114	8,9079	17	10	1	6	5,621
M227T199	227,1752	3,3239	58	35	12	10	5,795
M508T303_1	508,3185	5,0479	19	16	0	3	5,859
M843T534	842,5026	8,9070	21	16	0	5	5,957
M509T303	509,3436	5,0452	31	24	0	7	6,852
M508T303_2	508,3427	5,0479	33	26	0	7	6,879
M712T318	712,4394	5,3005	27	20	0	7	6,913
M693T339	693,4511	5,6460	23	19	0	4	6,976
M692T339_2	692,4512	5,6487	28	23	0	5	7,158
M692T339_3	692,4571	5,6536	10	5	0	5	7,220
M692T339_1	692,4454	5,6489	9	4	0	5	7,223

Les variables significatives avec un score VIP > 5 (cf. colonne « class_PLSDA_VIP ») sont surlignées en orange

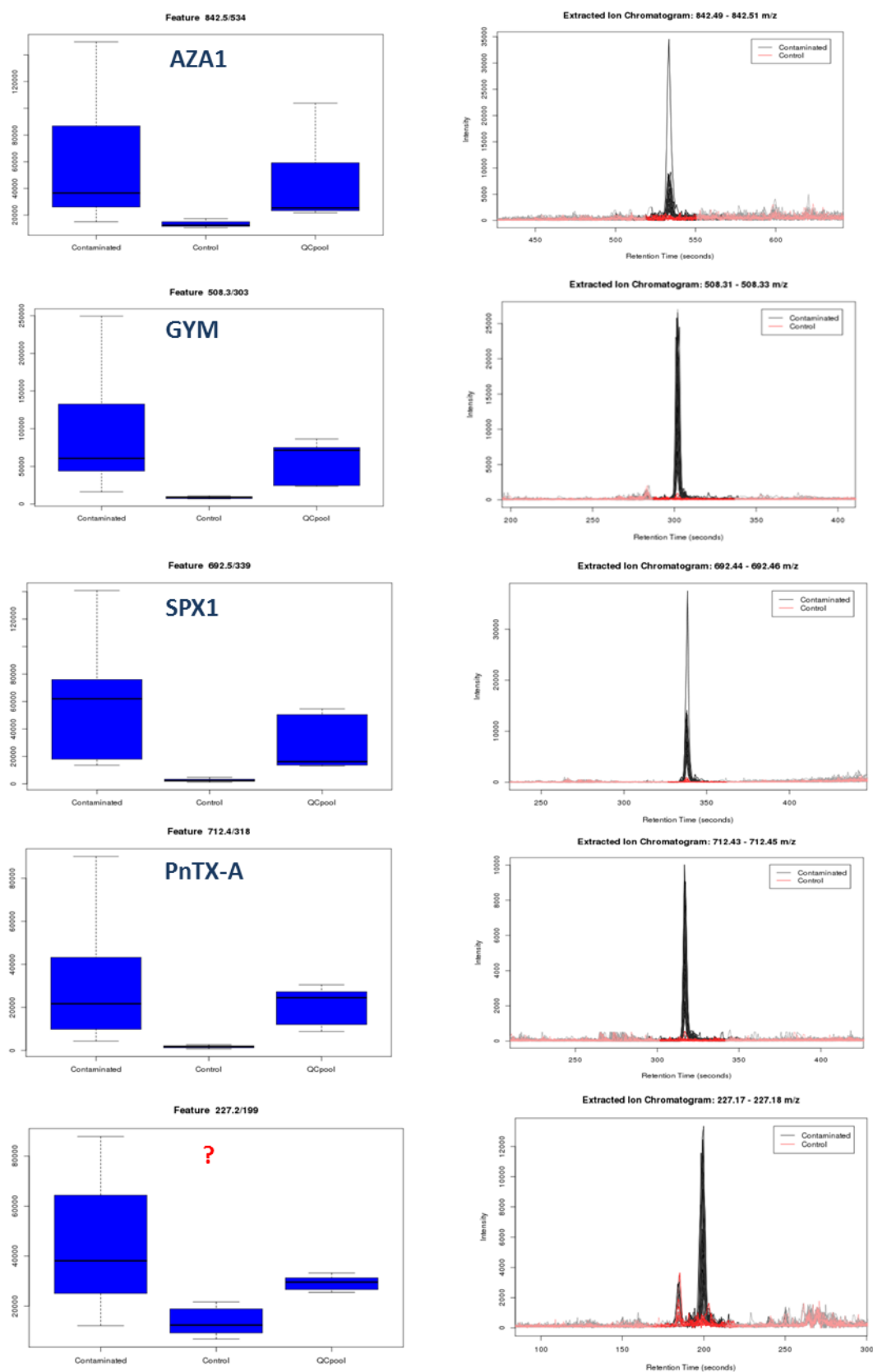


Figure 46. Boxplot (de gauche à droite : contaminé, contrôle et QC pool) et EIC des cinq ions déterminés par la PLS-DA comme étant les plus significatifs dans la discrimination des échantillons dopés et contrôles

II.3. Conclusions

Le logiciel XC/MS dispose d'un algorithme très puissant qui a permis une extraction assez exhaustives de pics à partir des empreintes acquises par LC-HRMS des différents échantillons étudiés. Les étapes de prétraitement des données a permis d'éliminer 16% des pics extraits initialement. Les données ont ensuite été analysées utilisant deux approches statistiques univariées et multivariées afin de détecter les toxines supplémentées dans les échantillons et traitées comme des composés « inconnus ».

Les résultats des analyses statistiques multivariées non supervisées de type ACP ont montré que ce test statistique n'était pas le plus adapté dans le cadre de notre étude car ne permettant pas de mettre en évidence une discrimination entre les échantillons «contaminés » et les échantillons de « contrôles ». Les répartitions observées étaient principalement reliées aux composantes matricielles.

Le test supervisé PLS-DA a démontré un pouvoir discriminant plus intéressant. Le modèle créé a permis de discriminer les échantillons en deux groupes en fonction de leur état de contamination (supplémentés vs blancs). L'étude des données utilisant le score VIP a permis d'attribuer les différences significatives entre les deux groupe essentiellement à la présence/absence de toxines. En effet, les ions relatifs aux toxines étudiées ont pu être identifiés comme étant les variables les plus pertinentes du modèle qui a été validé par les tests de permutation.

Les résultats obtenus par PLS-DA ont été confirmés par les tests statistiques univariés (t-test et Wilcoxon) qui ont également permis d'identifier nos toxines sans ambiguïté dans les échantillons supplémentés.

Cette approche s'est montrée très efficace pour la détermination des toxines à l'aveugle et ceux quel que soit la matrice étudiée.

D. Investigation de cas de TIAC liés à la consommation de violets du genre *Microcosmus*

I. Introduction

Les violets, également appelés bijus, figures de mer ou encore patates de mer, sont des ascidies comestibles présentes en Méditerranée notamment (**Figure 47**). Ces organismes marins se nourrissent en filtrant l'eau de mer et sont très prisés pour leur goût fortement iodé. Si tous les violets du genre *Microcosmus* sont comestibles, l'espèce *M. sabatieri* est la plus commercialisée.

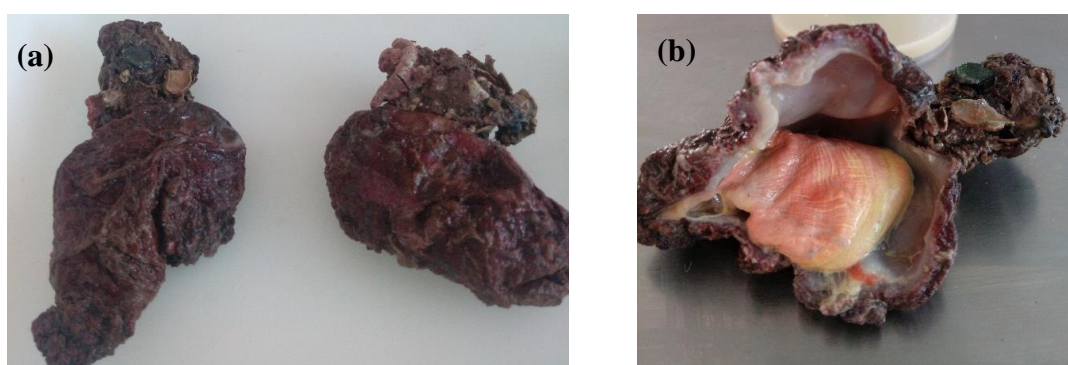


Figure 47 : Violets du genre *Microcosmus* (a) entiers et (b) ouverts longitudinalement

Entre janvier 2011 et mars 2014, 10 cas de toxi-infections alimentaires (collectives ou non ; TIAC/TIA), liés à la consommation de violets ont été recensés par le centre antipoison et de toxicovigilance de Marseille (CAPTVM) et l'Agence régionale de santé (ARS). Au total 15 personnes (7 femmes et 8 hommes) âgées de 23 à 80 ans résidant dans les régions Provence-Alpes-Côte d'Azur et Occitanie ont été intoxiquées (**Tableau 34**). Les symptômes présentés par les patients concernés sont apparus entre 10 min et 1h30 après ingestion des violets ; ils étaient d'ordre neurologique avec comme manifestations principales des troubles de la vue (diplopie), une ataxie et des vertiges. L'ensemble des symptômes rapportés est présenté dans la **Figure 48**. Début 2018, une femme de 56 ans a contacté le CAPTVM pour des troubles neurologiques d'apparition brutale (1 h) de type diplopie et vertiges survenus suite à la consommation de violets. Dans tous les cas rapportés, les personnes intoxiquées se sont remises rapidement (généralement en moins de 24 h).

Le(s) composé(s) à l'origine de ces intoxications n'a(ont) toujours pas été identifié(s) et dans le cadre de cette partie, nous avons souhaité appliquer le workflow développé à l'investigation de cas de TIAC survenus en 2014 et 2018, en analysant les échantillons concernés.

Tableau 34 : Cas de TIA en région Provence-Alpes-Côte d'Azur et en Occitanie entre janvier 2011 et mars 2014, associés à la consommation de violets

	Date, Lieu	Nombre d'intoxiqués	Age
Cas n°1	Janvier 2011, Aude (11)	2 hommes	30 et 52 ans
Cas n°2	Décembre 2011, Bouches du Rhône (13)	2 femmes	70 et 78 ans
Cas n°3	Janvier 2012, Bouches du Rhône (13)	1 femme	55 ans
Cas n°4	Mars 2012, Bouches du Rhône (13)	2 hommes	33 et 40 ans
Cas n°5	Aout 2012, Hérault (34)	1 femme	42 ans
Cas n°6	Décembre 2012, Bouches du Rhône (13)	1 homme	60 ans
Cas n°7	Octobre 2013, Bouches du Rhône (13)	1 homme	80 ans
Cas n°8	Novembre 2013, Bouches du Rhône (13)	1 femme et 1 homme	23 et 29 ans
Cas n°9	Février 2014, Bouches du Rhône (13)	1 femme et 1 homme	33 et 57 ans
Cas n°10	Mars 2014, Bouches du Rhône (13)	1 femme	51 ans

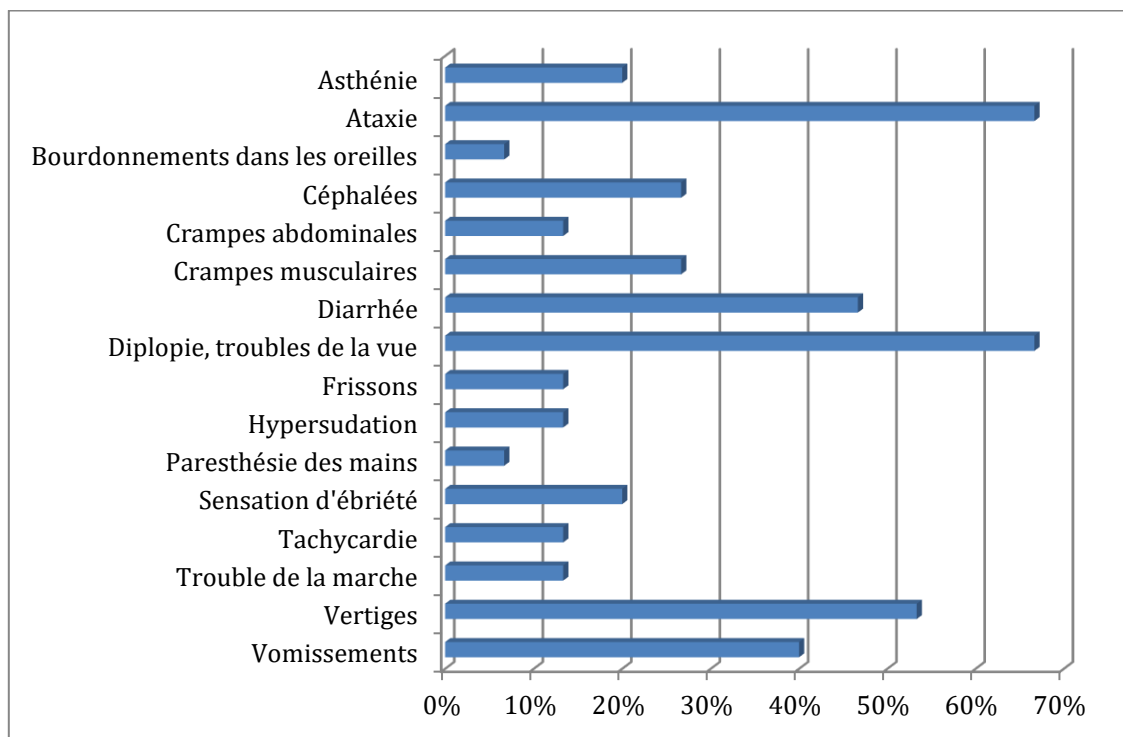


Figure 48 : Symptômes associés aux TIA liées à la consommation de violets du genre *Microcosmus*. Cas recensés entre 2011 et 2014 par le CAPTVM et l'ARS.

II. Matériels et Méthodes

II.1. Produits chimiques et réactifs

Les produits et réactifs chimiques utilisés pour les expériences décrites dans cette partie sont les mêmes que ceux présentés précédemment dans ce chapitre (I.1).

II.2. Echantillons de violets du genre *Microcosmus*

Nous avons pu récupérer des échantillons de 2014 et 2018, impliqués dans des cas de TIAC. Il s'agit de violets originaires de Croatie (14PHYCO096 et 14PHYCO097) et de France (18BM141), respectivement. Les échantillons de Croatie nous ont été fournis sous la forme d'homogénats de violets alors que l'échantillon français a été récupéré au domicile de la patiente de 56 ans ayant été intoxiquée début 2018. Cet échantillon est constitué de cinq violets qui ont été broyés et extraits individuellement ; de même, les exsudats récupérés à l'ouverture des violets ont été conservés et extraits au même titre que la chair des ascidies.

Afin de pouvoir disposer d'un échantillon de référence non contaminé, nous avons utilisé un échantillon originaire de l'étang de Thau (14PHYCO484), acheté dans le commerce en décembre 2014 et constitué de six violets. Les ascidies ont été traitées individuellement, mais sans distinction de chair ni d'exsudat.

Les échantillons de violets (contaminés et référence) ont été extraits selon le mode opératoire standard du LRUE pour les biotoxines marines décrit dans le chapitre II (I.4). La prise d'essai utilisée était de 2 g de chair ou d'exsudat. La méthode d'extraction utilisée est la même quelle que soit la nature de la matrice.

Un contrôle réactif a été également préparé selon le même protocole.

II.3. Conditions d'analyse par LC-HRMS

Les analyses ont été menées par LC-HRMS. Les détails de la méthode d'analyse sont décrits dans le chapitre II (I.5). Chacun des échantillons a été injecté en triplicate et pour éviter tout biais lié à la séquence d'injection, cette dernière a été randomisée.

II.4. Acquisition et traitement des données

Les modalités d'acquisition et de traitement des données sont les mêmes que celles décrites précédemment (I.4). La suite logicielle Sciex a été utilisée pour les approches de suspect screening et d'analyse sans a priori. De même, les données ont été analysées par le biais de tests univariés (t-test) et multivariés (ACP-DA).

III. Résultats et discussion

Les échantillons de violets, contaminés ou non ont été analysés selon l'approche suspect screening. En mode négatif très peu de feux tricolores ont été allumés dans la table contenant les 821 toxines. Certaines saxitoxines comme les dcCTX1 à 4 ou encore la *Gymnodinium catenatum* toxine 6 (GC6) ont été détectées dans quelques échantillons mais il s'agit de faux positifs car ces toxines ne sont pas retenues dans les conditions d'analyses utilisées, en raison de leur caractère très hydrophile. Si les spectres MS2 avaient été acquis durant l'analyse, il aurait été possible de le confirmer par comparaison avec le spectre *in silico* de ces toxines.

En mode positif, davantage de toxines potentielles ont été détectées dans les échantillons de violets contaminés ou non. Il s'agit notamment de cyanotoxines hydrophiles (anatoxine-a (ATX-a), homo-anatoxine-a (hATX-a)), de GC3a et de portimine. La présence d'ATX-a a été confirmée dans un seul des triplicats d'injection de l'échantillon 14 PHYCO 097 par comparaison avec le spectre de fragmentation *in silico* (8 fragments confirmés sur 8). Ce résultat unique remet en question le fait qu'il s'agisse effectivement d'ATX-a, d'autant qu'il pourrait s'agir de phénylalanine, un acide aminé qui est un composé isobare de l'ATX-a présentant des similitudes au niveau du spectre de fragmentation avec cette dernière (Furey et al., 2005). La présence d'hATX-a et de portimine a également été écartée après comparaison des spectres empiriques et *in silico*.

A l'issue de l'étape de suspect screening, aucune toxine n'a été identifiée dans les échantillons de violets originaires de France ou de Croatie et responsables de TIAC. Nous avons ensuite procédé à une analyse sans a priori.

La **Figure 49** présente les résultats de l'analyse multivariée (ACP-DA) réalisée sur les échantillons de violets à partir des données générées en ESI+. On note que les échantillons contaminés sont séparés de l'échantillon non contaminé par la composante principale D1 qui explique à elle seule 34,1% de la variabilité observée. On distingue quatre clusters correspondant respectivement aux violets non contaminés (14PHYCO484) et contaminés, originaires de France (18 BM 141) et de Croatie (14 PHYCO 096 et 097). L'Analyse de la chair et de l'exsudat des violets contaminés originaires de France montre une différence en matière de composition puisqu'on distingue deux clusters différents séparés par la composante principale D2. En revanche, les échantillons

originaires de Croatie sont assez proches du point de vue de leur composition comme en atteste leur proximité au niveau de la **Figure 49**. On note également que les exsudats des violets français (18 BM 141) sont plus proches des violets croates qu'ils ne le sont de la chair des violets dont ils sont issus. Ceci illustre l'importance du choix de la référence lorsque l'on souhaite procéder à des analyses sans a priori car la variabilité matricielle est telle que deux matrices de même nature (ex. moules) peuvent être plus distantes l'une de l'autre que deux matrices différentes (ex. moule et huître). Si l'on souhaite être en mesure d'identifier les composés responsables d'une TIAC, il est donc nécessaire d'avoir une matrice non contaminée de composition similaire. Or dans les cas de TIAC, nous ne disposons pas toujours de matrice témoin et sommes obligés de faire avec ce que l'on trouve. C'est ainsi qu'on en arrive à utiliser des violets de l'étang de Thau comme référence pour l'analyse de violets de Croatie. Une solution pour pallier ce problème de référence serait de constituer des bibliothèques matricielles permettant d'appréhender la différence qu'il peut y avoir du fait de paramètres tels que la saisonnalité, la localisation, le genre et l'espèce des organismes considérés, leur âge etc. C'est l'approche choisie par le LRUE fruits et végétaux qui a constitué des bibliothèques pour différentes matrices entrant dans son périmètre d'action, appartenant à huit groupes définis par la DG SANTE (Anonymous, 2018).

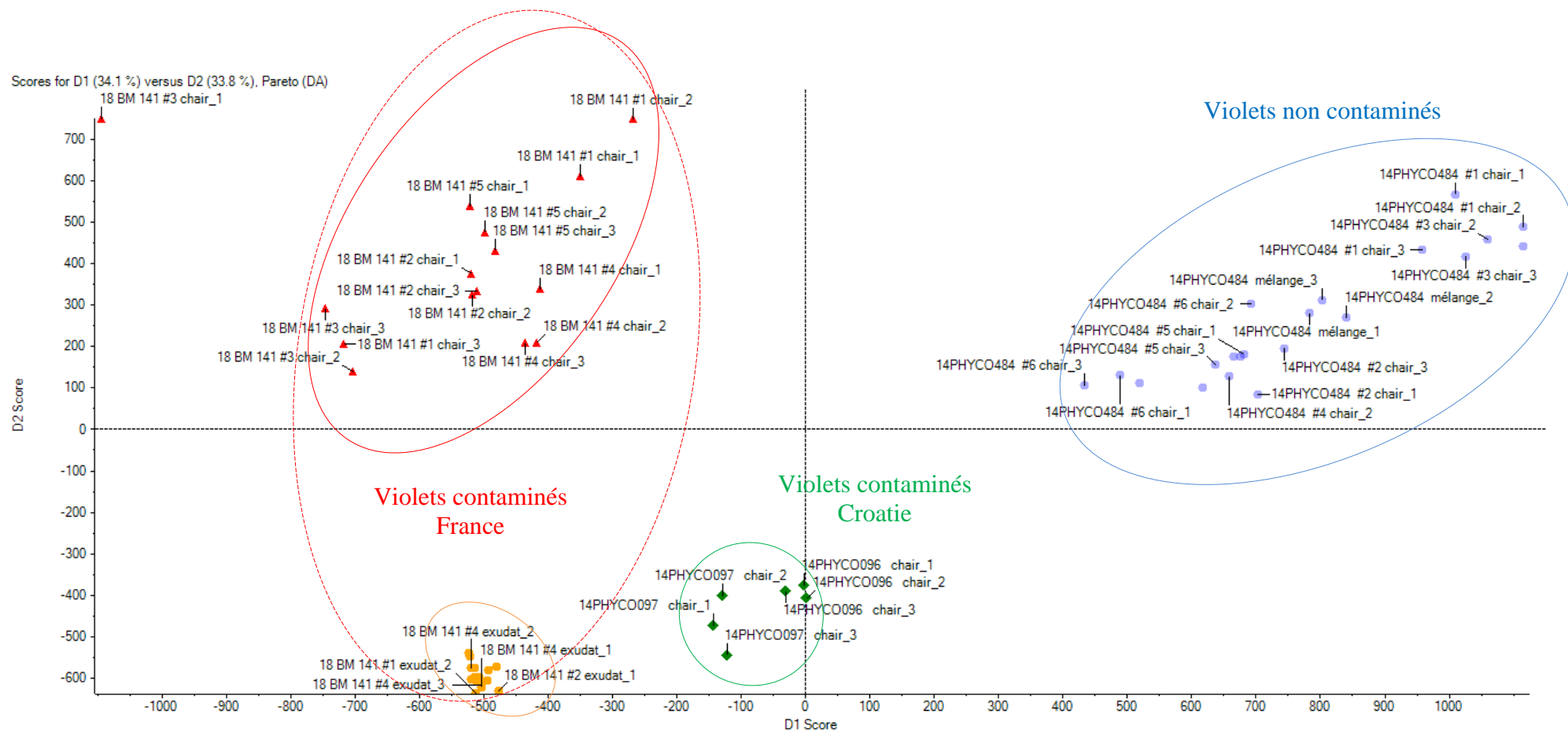


Figure 49 : Scores plot obtenu après l'analyse ACP-DA des données générées en ESI+ pour les échantillons de violets.

Pour identifier les signaux à l'origine des différences de composition entre violets contaminés et non contaminés et espérer identifier les composés responsables des TIAC, nous avons procédé à une analyse univariée entre échantillons contaminé et non contaminé. Le **Tableau 35** présente la stratégie adoptée pour réduire le nombre de signaux. Cette stratégie a permis de réduire de plus de 99% les données initialement générées avec au final entre 7 et 56 signaux potentiels, selon le mode d'ionisation et les violets concernés. A l'issue de cette étape, les signaux restants ont été analysés via l'application MasterviewTM afin de vérifier qu'il s'agissait bien de pics chromatographiques, caractéristiques des violets contaminés.

Tableau 35. Résumé des résultats de la stratégie de réduction des données pour l'identification manuelle des signaux, après des étapes de préfiltrage et de comparaison par paires en utilisant le t-test avec comme facteurs discriminants la p-value et le fold-change.

		Violets Croatie		Violets France	
		ESI+	ESI-	ESI+	ESI-
1. Etapes de préfiltrage	nombre total de signaux extraits	9894	9922	9894	9922
	1,2 min < RT < 10 min	5690	4289	5690	4289
2. Résultats du t-test	P-value < 0,05	1565	1489	2113	2485
	Fold change > 10	40	108	210	446
	Signaux ayant une intensité > 100	11	7	56	19

Ainsi, 14 ions ont été identifiés dans les violets originaires de France et 9 dans ceux de Croatie (**Tableau 36**). On note qu'aucun de ces ions n'est commun aux deux origines. Il peut y avoir plusieurs explications à cela, la première étant que bien que la symptomatologie associée aux TIAC à violets soit similaire, les composés impliqués peuvent être différents, comme le sont les analogues d'une famille de toxines. Dans ce cas, il pourrait être intéressant d'utiliser l'approche des réseaux moléculaires basée sur la fragmentation des ions car elle permet d'affilier les composés inconnus au groupe dont elles sont le plus proche du point de vue spectral et ainsi d'identifier d'éventuels nouveaux analogues. Une autre explication à l'absence de signaux communs peut venir du fait que lors du traitement des données et en particulier durant les étapes de filtrage, nous soyons passés à côté d'un signal important. Il est également possible que le problème soit bien en amont du traitement et soit lié à l'étape d'extraction qui ne serait pas appropriée. Ne sachant par définition pas ce que l'on cherche lors d'analyses non ciblées, il est difficile de savoir si on est passé à côté de quelque chose.

Des propositions de formules brutes ont été faites automatiquement par l'application MasterviewTM mais ne correspondent pas nécessairement à des composés réels. Il nous faut poursuivre le travail d'annotation des signaux identifiés et vérifier leur potentiel toxique, sur lignées cellulaires par exemple afin de vérifier

si le(s) composé(s) responsable(s) des TIAC figurent bien dans la liste des signaux identifiés. Dans le cas d'investigations comme celle que nous avons entreprise, il pourrait être intéressant de combiner l'analyse dirigée par l'effet et l'analyse non ciblée afin d'identifier les fractions chromatographiques toxiques sur lignées cellulaires et rechercher dedans les composés responsables de cette cytotoxicité.

Tableau 36. Liste des signaux retenus et formules brutes proposées par l'application Masterview™. Les ions issus des violets de France sont en bleu et ceux des violets de Croatie sont en noir. Les ions en gras ne sont présents que dans les violets contaminés

Ionisation	Masse (Da)	TR (min)	Formules proposées par Masterview™
ESI+	252,0243	4,6	C11H8O7
	268,0393	4,7	C6H6N8Na2O2
			C6H13NaO10
			C16H4N4O
	277,2398	6,5	C18H31NO
	281,2435	9,7	C14H32N3NaO
	287,9846	5,1	C7H9N2NaO5S2
	299,2541	9,7	C12H29N9
	316,2801	9,7	C12H32N10
	356,0486	4,9	C15H10N4Na2O4
	399,3651	4,9	C23H49N3S
	413,3801	5,0	C24H51N3S
	426,3911	5,6	C20H46N10
			C25H52N2Na2
	456,2623	9,9	C22H45N2NaS3
			C24H42Na2O3S
			C26H36N2O5
			C27H32N6O
			C27H40N2S2
	562,3444	8,2	C23H46N8O8
			C26H47N6NaO6
			C28H52Na2O8
	585,3778	8,5	C26H51N9O4S
			C30H55N3O6S
			C32H48N7NaO2
			C34H47N7O2
ESI -	129,0431	1,2	C5H7NO3
	197,9183	2,6	C4HNa3OS2
	324,9060	8,2	C7H7NNa4S4
	343,9488	6,3	C7H12N2Na4S4
			C9H9Na5O3S2
			C9HN4Na5O4
			C10H3N2Na7O2
			C13H7Na3O3S2
	358,8644	8,9	C8HN3Na4S4
			C8H2NNaO6S4
	410,9662	6,6	C8H12NNa7O6S
			C10H10N7NaO2S4

Ionisation	Masse (Da)	TR (min)	Formules proposées par Masterview™
			C10H16NNa3O4S4 C12H12NNa7O5S2 C13H4N5Na3O5S C14H7NNa2O9S C24H45NO4S
	443,3059	9,5	
	503,2471	6,6	C16H38N9Na5S C22H33N9O3S C23H43NNa6S
	629,9846	9,9	C17H16N2Na2O19S C21H18Na8O9S C16H23Na9O9S2 C16H14N2Na2O22 C17H29Na5O6S6 C18H21N4NaO10S5 C18H33Na5OS8

IV. Conclusions

Le workflow développé dans le cadre des travaux de thèse a été utilisé pour tenter d'élucider les TIAC associées à la consommation de violets du genre *Microcosmus*. L'approche suspect screening a permis d'écarter l'ensemble des 821 toxines de la liste des composés potentiellement impliqués. L'approche sans a priori a permis d'identifier une liste de signaux absents de l'échantillon de référence (violets de l'étang de Thau) ou alors présents en quantité bien moindre. Néanmoins, nous touchons là aux limites de l'exercice avec la suite logicielle Sciex. Il serait intéressant d'utiliser XCMS pour confirmer les résultats obtenus en matière d'identification et éventuellement aller plus loin. De même, la combinaison de l'analyse dirigée par l'effet et de l'analyse non ciblée pourrait s'avérer intéressante et aurait l'avantage d'avoir comme indicateur une mesure de la toxicité cellulaire confirmant le caractère toxique des composés identifiés.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Afin d'assurer la salubrité des produits de la pêche destinés à la consommation humaine, il existe en France un système de surveillance de certaines familles de biotoxines marines connues qui sont efficacement analysées à l'aide de méthodes dites ciblées utilisant la chromatographie liquide couplée à différents types de détection, dont la spectrométrie de masse. Cependant, en raison du grand nombre de biotoxines marines et de leur gamme de polarité étendue, les méthodes de détection actuelles se focalisent sur un nombre limité de toxines et ne sont pas en mesure de mettre en évidence des phénomènes d'émergences. Dans l'optique de renforcer le dispositif de veille d'urgence et proposer une alternative à la pratique controversée du bioessai sur souris utilisé comme outil de vigilance en France jusqu'à fin 2017, nous nous sommes intéressés à l'apport de la spectrométrie de masse haute résolution pour l'analyse non ciblée des biotoxines marines connues et émergentes. Si les processus de caractérisation et de validation de méthodes ciblées sont bien connus et appliqués dans bien des domaines, il en est tout autrement de l'analyse non ciblée.

Afin d'évaluer le potentiel de la LC-HRSM pour l'analyse non ciblée des toxines marines dans une démarche de veille d'urgence, nous nous sommes fixé deux objectifs dans le cadre de la thèse : (i) développer et caractériser une méthode d'analyse des biotoxines marines selon l'approche classiquement utilisée en mode ciblé, le but étant de nous assurer que la méthode développée permet *a minima* d'analyser des toxines témoins avec des critères de performances satisfaisants et (ii) d'adopter une approche de type preuve de concept pour évaluer les performances de la méthode dans le domaine de l'analyse non ciblée et développer un workflow ensuite appliqué à des échantillons de violets du genre *Microcosmus* impliqués dans des cas de TIAC.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'analyse ciblée de toxines connues, de polarité différente. Une première méthode utilisant une colonne C18 (HSS T3) a été développée pour l'analyse par LC-HRMS de 18 toxines marines de familles différentes, de caractère lipophile et moyennement hydrophile (AD, AZA1-3, PTX2, AO, DTX1 et -2, YTX, hYTX, SPX1, PnTX-G et GYM, PnTX-A, 13,19-didesMeC, 20-meG, PbTx-2 et -3). Le choix a été fait d'utiliser un protocole de préparation d'échantillons le plus simple possible pour avoir un caractère exhaustif, non discriminant adapté pour les analyses non-ciblées ultérieures. Les performances de la méthode ont été évaluées. Ainsi, les taux de récupération sont satisfaisants pour l'ensemble des toxines et les effets matrices observées sont acceptables. La méthode a montré de bonnes performances en termes de sensibilité, de précision et de répétabilité. Les résultats obtenus sont comparables aux études décrites précédemment dans la littérature.

La deuxième méthode mise en place s'est intéressée aux toxines hydrophiles qui ne sont pas retenues sur la première colonne de phase inverse. La séparation des toxines a été réalisée sur une colonne de type HILIC. La méthode optimisée a permis de détecter 14 toxines hydrophiles dont les analogues de STX et la TTX. Les épimères de GTX ont été bien séparés dans les conditions choisies. L'évaluation des performances de la méthode n'a pas été finalisée en raison des difficultés inhérentes aux conditions d'analyse mais les premiers résultats sont satisfaisants. En effet, cette méthode nécessite l'utilisation d'une étape préalable de purification sur cartouche SPE, étape susceptible d'être préjudiciable à une approche non ciblée puisqu'il y a un risque que certains composés soient piégés par la cartouche. De plus, les méthodes HILIC sont sujettes aux variations de temps de rétention, ce qui est problématique dans le cadre d'une approche non ciblée qui se base sur la comparaison des temps de rétention comme facteur discriminant important.

Les deux méthodes combinées ont permis de créer une bibliothèque de spectres avec les empreintes HRMS et les spectres de fragmentations des 32 toxines étudiées.

Si les méthodes développées et caractérisées permettent l'analyse de plusieurs familles de toxines (lipophiles et hydrophiles), il serait nécessaire d'étendre le champ d'application à d'autres familles telles que la PITX et OVTX ainsi que les CTX.

Pour la mise en place de l'approche non-ciblée nous avons choisi d'utiliser la première méthode en phase inverse, caractérisée en mode ciblé dans le cadre d'une approche de type preuve de concept. Pour évaluer les performances de la méthode non ciblée, des toxines représentatives de chacune des familles étudiées ont été supplémentées dans des matrices blanches de moules et d'huîtres à différents niveaux de concentration. Les échantillons ainsi préparés ont été analysés à l'aveugle et les toxines présentes ont été considérées tout au long de l'exercice comme des composés inconnus.

La première approche étudiée est celle du suspect screening permettant de rechercher des composés potentiellement présents via une liste de toxines. La liste utilisée pour cette étude était composée de 821 analogues de biotoxines marines et cyanotoxines avec comme seules informations préalables, la formule brute et la masse exacte des composés. Cette approche n'exige pas l'utilisation d'étalons, car la capacité d'identification repose principalement sur le rapport m/z , le profil isotopique et le profil de fragmentation MS/MS pour la confirmation. L'optimisation des différents critères de confiance pour la recherche automatisée des composés suspects nous a permis d'identifier sans ambiguïté l'ensemble des toxines étudiées dans les différentes matrices et ce quel que soit le niveau de concentration. Le seul facteur limitant de cette approche est la difficulté de distinguer les composés isobares générant des spectres de fragmentation identiques.

La liste des composés suspects doit constamment être mise à jour avec les données de la littérature les plus récentes pour assurer un screening le plus exhaustif possible. De même, la bibliothèque des données spectrales des toxines marines doit être complétée.

Pour l'analyse non-ciblée sans a priori, le traitement de données HRMS est l'étape la plus longue et la plus déterminante. Deux logiciels de traitement de données ont été testés ; les logiciels constructeurs (Sciex) MasterViewTM et MarkerViewTM et le logiciel open source XCMS. L'analyse par screening comparatif utilisant le logiciel MasterViewTM est la stratégie la plus simple à mettre en œuvre et ne nécessite pas d'utiliser des tests statistiques pour l'analyse des données. Cette stratégie a permis d'identifier efficacement les toxines présentes dans les échantillons supplémentés avec un nombre assez réduit de faux positifs. Toutefois, le nombre de signaux détectés est bien inférieur à celui obtenu avec MarkerviewTM, logiciel permettant une détection plus exhaustive. Deux traitements statistiques sont possibles avec le logiciel MarkerviewTM : une ACP supervisée ou non (analyse multivariée) et un t-test (analyse univariée). L'approche multivariée est limitée et ne permet malheureusement pas d'aller très loin dans l'exploitation des données générées. Dans le cadre du test en aveugle réalisé, il nous a été possible d'identifier toutes les toxines supplémentées dans les échantillons mais l'exercice s'avère plus compliqué dans le cas d'échantillons inconnus. En revanche, l'approche univariée est plus efficace en matière d'identification des signaux présents. Elle repose sur l'utilisation d'un échantillon de référence pour pouvoir procéder à une comparaison deux à deux. Le choix de l'échantillon de référence est important ; ce dernier doit être de composition très proche de celle de l'échantillon inconnu. L'utilisation du t-test nous a permis d'identifier les toxines supplémentées dans les échantillons testés, avec des nuances selon les toxines considérées. Ces différences illustrent le pouvoir discriminant du test statistique, qui traduit la capacité du test à identifier les toxines, un paramètre bien différent de la limite de détection analytique.

Le logiciel XCMS est très performant puisqu'il a permis d'identifier sans équivoque les toxines supplémentées dans les échantillons testés. De plus, il a permis de mettre en évidence la présence d'un signal inattendu correspondant à une contamination apportée par la solution de supplémentation, prouvant ainsi l'efficacité du logiciel.

Le workflow développé pour l'analyse non ciblée des toxines marines a ensuite été utilisé pour l'investigation de TIAC impliquant des violets du genre *Microcosmus*. En effet, des échantillons de violets contaminés, originaires de Croatie et de France ont été analysés et les données traitées avec les logiciels constructeur (Sciex). Il a ainsi été possible d'identifier un certain nombre de signaux associés aux violets contaminés ; l'annotation est en cours pour permettre d'identifier les composés correspondants. Compte tenu de l'efficacité du logiciel XCMS, il serait intéressant de l'utiliser pour

l'investigation des cas de TIAC associés à la consommation des violets car cela n'a pas pu être fait dans le cadre de la thèse.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus dans le cadre de la preuve de concept montrent que la combinaison des workflows développés et optimisés s'est avérée appropriée pour détecter une contamination inattendue dans les produits de la pêche. Cependant l'application de cette approche pour l'analyse d'échantillons de TIAC reste largement tributaire de la possibilité de disposer d'échantillons de référence pertinents.

Le potentiel de cette approche non ciblée, pour l'identification d'éventuelle toxines inconnues, serait d'autant plus intéressant si elle était combinée à l'analyse dirigée par l'effet (fractionnement bioguidé) qui aurait l'avantage d'avoir comme indicateur une mesure de la toxicité cellulaire confirmant le caractère toxique des ions jugés pertinents par les outils statistiques. L'application de cette démarche est prévue dans le cadre d'un projet faisant suite aux travaux de cette thèse.

Comme le soulignent nos résultats, l'identification sans équivoque des composés non ciblés et inconnus à l'aide de spectres MS et MS/MS reste toutefois difficile. Des outils informatiques tels que des prédictors de fragments *in silico* ou des logiciels tels que Metfusion pourraient être combinés avec d'autres propriétés physico-chimiques telles que l'indice de temps de rétention ou des coefficients de partage octanol-eau pour aider à résoudre ce problème. Dans le cas des nouveaux analogues de toxines connues l'approche des réseaux moléculaires serait intéressante à mettre en place.

Il convient également de souligner que la méthode d'extraction joue un rôle important dans l'approche non ciblée car elle conditionne le résultat. Il est nécessaire de pouvoir disposer d'une méthode non discriminante, susceptible d'être la plus exhaustive possible en matière d'extraction. Cet aspect n'a pas été suffisamment étudié dans le cadre de ce travail de thèse mais mériterait que l'on s'y penche.

Compte tenu de l'importance des échantillons de référence pour les screening comparatifs, il serait judicieux de constituer des bibliothèques matricielles permettant d'appréhender la variabilité de composition des matrices non contaminées.

Ces travaux se sont focalisés sur la recherche des biotoxines marines dans certains produits de la pêche mais cette approche serait intéressante à exploiter pour la recherche de biomarqueur(s) permettant une évaluation plus large de l'état de contamination des organismes, des compartiments environnementaux ou alimentaires, et de l'impact que la pollution marine, naturelle ou pas, peut avoir sur eux.

En conclusion, les résultats de ces travaux montrent que les analyses non ciblées de type métabolomique par spectrométrie de masse haute résolution sont un outil prometteur pour la sécurité sanitaire des produits de la pêche. Durant cette thèse, seules quelques pistes ont été explorées mais de nombreuses applications restent possibles. Les enjeux futurs se situent tant au niveau analytique (amélioration des protocoles de traitement de l'échantillon, de la sensibilité et de la robustesse des méthodes chromatographiques), qu'au niveau du traitement automatisé de la grande quantité de données générée par ces approches.

ANNEXE 1

Protocole d'extraction du LRUE pour les biotoxines marines

- Peser avec précision $2,00 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$ d'homogénat tissulaire dans un tube à centrifuger
- Ajouter 9 ml de méthanol à 100%
- Homogénéiser l'échantillon à l'aide d'un homogénéisateur (5.5) pendant 2 min à environ 10000 tours/min.
- Centrifuger à $2000 \times g$ ou plus pendant 10 min à environ 20°C (5.6). Transvaser ensuite le surnageant dans une fiole jaugée de 20 ml
- Répéter l'extraction du culot de tissu résiduel avec 9 ml supplémentaires de méthanol à 100%
- Homogénéiser ensuite pendant 1 min à l'aide d'un homogénéisateur
- Centrifuger à $2000g$ ou plus pendant 10 min à environ 20°C
- Prélever le surnageant, combiner celui-ci avec le premier extrait, et ajuster le volume à 20 ml avec du méthanol à 100%.
- Filtrer sur un filtre PTFE $0,45 \mu\text{m}$

ANNEXE 2

Coefficients de détermination (R^2) pour les courbes d'étalonnage en solvant et en matrice

Toxine	Gamme de concentration ($\mu\text{g/kg}$)	R^2		
		MeOH	Moule	Huître
AZA1	10–120	0,9961	0,9939	0,9965
AZA2	10–120	0,9963	0,9920	0,9938
AZA3	10–120	0,9953	0,9946	0,9919
PTX2	20–240	0,9959	0,9927	0,9948
GYM-A	10–120	0,9973	0,9981	0,9988
SPX1	10–120	0,9972	0,9935	0,9946
PnTX-A	10–120	0,9979	0,9966	0,9968
PnTX-G	10–120	0,9981	0,9974	0,9949
13,19-didesMeC	10–120	0,9974	0,9962	0,9969
20-meG	10–120	0,9970	0,9958	0,9977
AO	20–240	0,9975	0,9966	0,9982
DTX1	20–240	0,9982	0,9990	0,9969
DTX2	20–240	0,9917	0,9926	0,9906
AD	60–720	0,9930	0,9931	0,9905

ANNEXE 3

Tableaux récapitulatifs des résultats de l'extraction des données avec le logiciel MasterView pour les échantillons d'huître : (a) ESI+ ET (b) ESI-

(a) ESI+	N1			N2			N3			N4			N5			N6		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Nombre des ions extraits	592	607	597	597	609	589	615	607	597	597	596	610	602	611	614	624	605	596
Nombre d'ions après extraction du contrôle	3	7	5	7	10	6	16	20	13	18	15	18	17	22	19	32	22	27
Nombre d'ions après vérification visuelle	3	2	1	3	2	0	3	4	5	5	5	7	9	6	8	6	5	7
Nombre de faux positifs	2	1	0	2	0	0	1	1	2	0	0	2	3	2	4	1	0	2
nombre de composés Identifiés	0\5	0\5	0\5	0\5	0\5	0\5	3\5	3\5	3\5	5\5	5\5	5\5	5\5	4\5	5\5	5\5	5\5	5\5
(b) ESI-	N1			N2			N3			N4			N5			N6		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Nombre des ions extraits	441	448	421	458	459	446	451	448	439	445	438	447	449	444	448	441	447	446
Nombre d'ions après extraction du contrôle	4	7	4	7	10	5	12	12	9	15	13	13	18	15	18	19	17	20
Nombre d'ions après vérification visuelle	1	2	3	3	2	0	2	1	4	5	7	6	4	5	6	8	6	5
Nombre de faux positifs	0	2	1	1	0	0	1	0	0	0	1	2	0	0	2	1	0	1
nombre de composés Identifiés	0\4	0\4	0\4	0\4	0\4	0\4	3\4	3\4	3\4	4\4	4\4	4\4	4\4	4\4	4\4	4\4	4\4	4\4

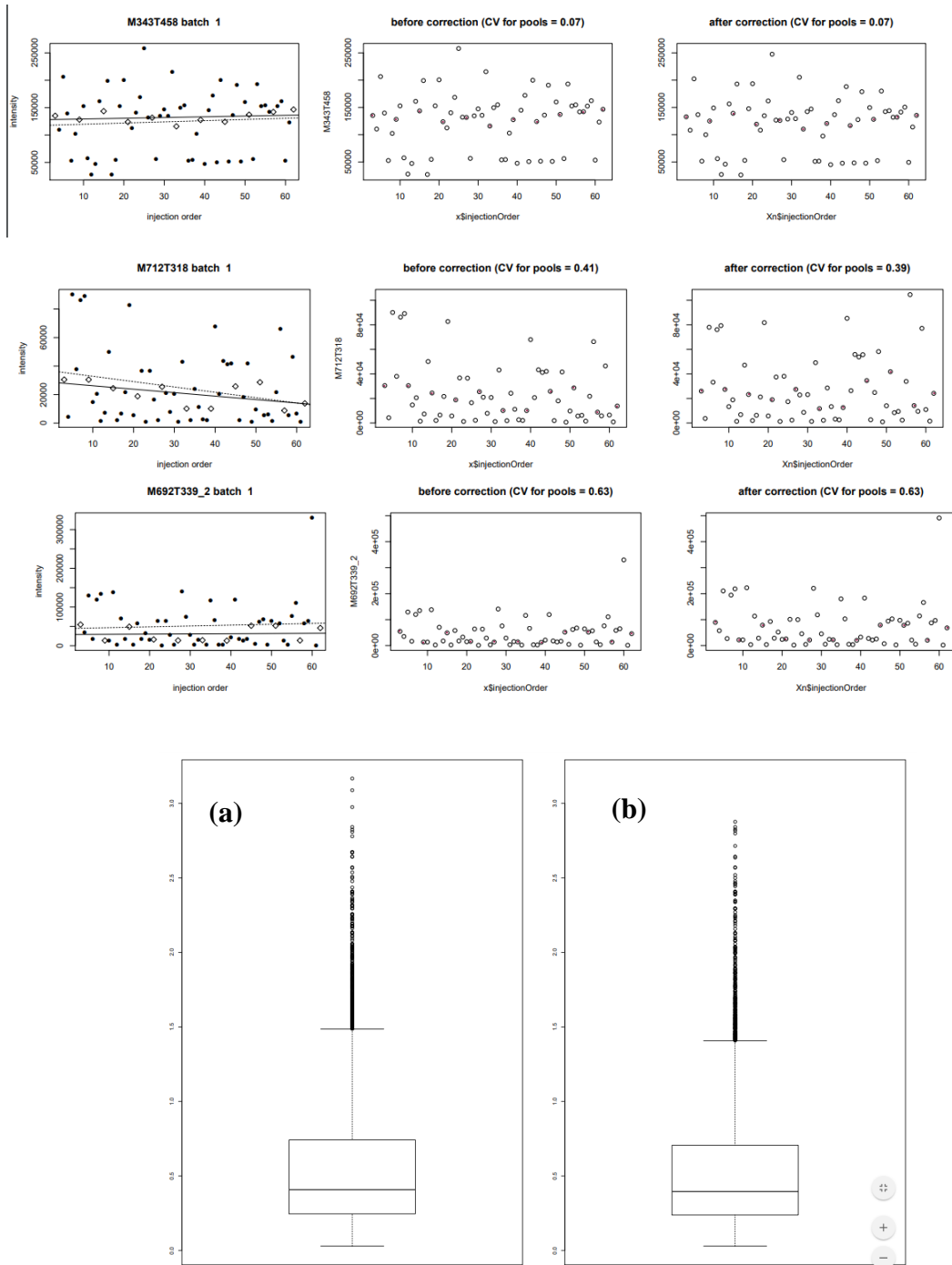
ANNEXE 4

Paramètres utilisés pour le prétraitement des données avec le logiciel XCMS sous la plateforme w4m

function	argument	value
xcmsSet	nSlaves	4
	method	centWave
	ppm	15
	peakwidth	1050
	mzdiff	0.015
	snthresh	5
	integrate	1
	noise	0
	prefilter	0
group	method	density
	minfrac	0.4
	bw	9
	mzwid	0.008
	sleep	0.001
	max	60
	convertRTM	FALSE
	inute	FALSE
	numDigitsM	4
	numDigitsR	3
	intval	into
retcor	method	peakgroups
	smooth	loess
	extra	1
	missing	1
	span	0.2
	family	gaussian
	plotype	none
	method	density
	minfrac	0.4
	bw	9
group	mzwid	0.008
	sleep	0.001
	max	60
	convertRTM	FALSE
	inute	FALSE
	numDigitsM	4
	numDigitsR	3
	intval	into
fillPeaks	method	chrom
	convertRTM	FALSE
	inute	FALSE
	numDigitsM	4
	numDigitsR	3
	intval	into
annotateDiff	nSlaves	4
	sigma	6
	perfwidm	0.6
	ppm	5
	mzabs	0.015
	maxcharge	3
	maxiso	4
	minfrac	0.5
	quick	FALSE
	cor_elc_th	0.75
	graphMethod	hcs
	pval	0.05
	calcIS	TRUE
	calcISO	FALSE
	calcCaS	FALSE
	polarity	positive
	max_peaks	100
	multiplier	3
	runDiffreport	TRUE
	elcmax	50
	elcwidth	200
	value	into
	sortpval	FALSE
	h	480
	w	640
	mzdec	2
	convertRTM	TRUE
	inute	FALSE
	numDigitsM	4
	numDigitsR	3
	intval	into

ANNEXE 5

Normalisation des données



Variation des CV intensité : (a) avant et (b) après la normalisation des données

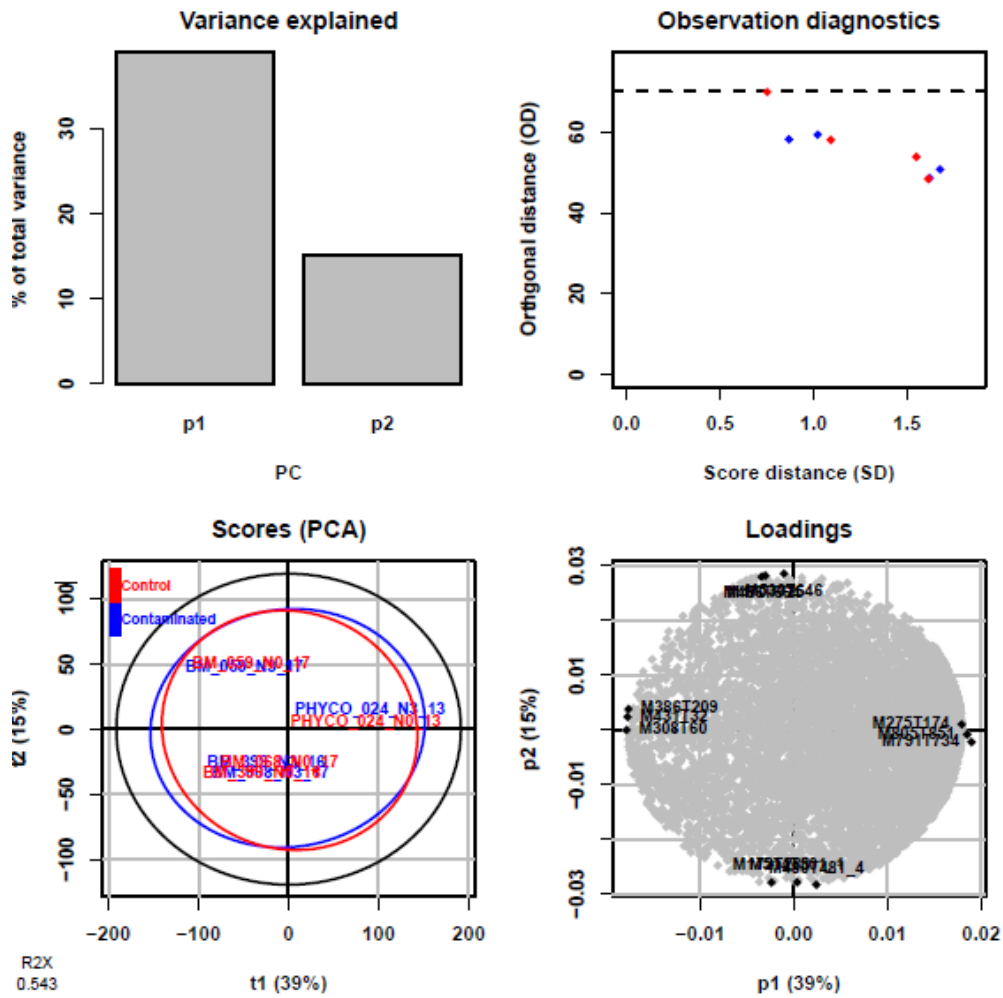
ANNEXE 6

Résultats des analyses ACP réalisées sur les données extraites par le logiciel XCMS :

(a) Matrice CSJ

(b) Matrice huitres

(a)





Article

Extended Targeted and Non-Targeted Strategies for the Analysis of Marine Toxins in Mussels and Oysters by (LC-HRMS)

Inès Dom ^{1,2}, Ronel Biré ^{1,*}, Vincent Hort ¹, Gwenaëlle Lavison-Bompard ¹, Marina Nicolas ¹ and Thierry Guérin ¹

¹ Laboratory for Food Safety, ANSES, Université Paris-Est, F-94701 Maisons-Alfort, France; ines.dom@anses.fr (I.D.); vincent.hort@anses.fr (V.H.); gwenaëlle.lavison-bompard@anses.fr (G.L.-B.); marina.nicolas@anses.fr (M.N.); thierry.guerin@anses.fr (T.G.)

² Agreenium, the French Agricultural, Veterinary and Forestry Institute, 75116 Paris, France

* Correspondence: ronel.bire@anses.fr; Tel: +33-149-772-722

Received: 11 July 2018; Accepted: 11 September 2018; Published: 14 September 2018



Abstract: When considering the geographical expansion of marine toxins, the emergence of new toxins and the associated risk for human health, there is urgent need for versatile and efficient analytical methods that are able to detect a range, as wide as possible, of known or emerging toxins. Current detection methods for marine toxins rely on a priori defined target lists of toxins and are generally inappropriate for the detection and identification of emerging compounds. The authors describe the implementation of a recent approach for the non-targeted analysis of marine toxins in shellfish with a focus on a comprehensive workflow for the acquisition and treatment of the data generated after liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) analysis. First, the study was carried out in targeted mode to assess the performance of the method for known toxins with an extended range of polarities, including lipophilic toxins (okadaic acid, dinophysistoxins, azaspiracids, pectenotoxins, yessotoxins, cyclic imines, brevetoxins) and domoic acid. The targeted method, assessed for 14 toxins, shows good performance both in mussel and oyster extracts. The non-target potential of the method was then challenged via suspects and without a priori screening by blind analyzing mussel and oyster samples spiked with marine toxins. The data processing was optimized and successfully identified the toxins that were spiked in the blind samples.

Keywords: marine toxins; LC-HRMS; targeted analysis; suspects screening; non-targeted analysis; method characterization

Key Contribution: (1) Efficient liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) targeted quantitative method developed and characterized for the analysis of many marine toxins of different polarities, including lipophilic toxins and domoic acid. (2) Optimized strategy for non-targeted analysis of marine toxins, including suspect and without a priori screening. (3) Combination of targeted and non-targeted strategies allowing for good characterization of analyzed shellfish samples.

1. Introduction

Marine toxins are natural compounds produced by certain microalgae that can contaminate a wide variety of marine species, including fish, crabs, or filter feeding bivalves (shellfish), such as mussels, oysters, scallops, and clams [1]. Different groups of toxins have been identified: saxitoxins (STXs), domoic acid (DA) and its isomers, tetrodotoxins (TTXs), okadaic acid (OA) and dinophysistoxins (DTXs), pectenotoxins (PTXs), yessotoxins (YTXs), azaspiracids (AZAs), ciguatoxins

(CTXs), palytoxins (PLTXs) and ovatoxins (OVTXs), brevetoxins (PbTx) and cyclic imines (spirolides (SPXs), gymnodimines (GYMs), pinnatoxins (PnTXs), pteriatoxins, prorocentrolides, portimine) [2]. These toxins are responsible for various biological activities and can exert deleterious effects on human health [3,4].

To protect human health from these toxigenic compounds and to avoid food poisoning, the presence of certain toxins in food destined for human consumption is regulated within the European Union (EU) [5,6] and is submitted to monitoring programs. These regulations clearly mention the toxins to monitor, the thresholds that should not be surpassed and the methods of analysis. Biological assays using mice and rats were prescribed as reference methods for certain toxins but are subject to controversy due to ethical issues and their lack of specificity [7]. To perform official monitoring of some toxins, such as saxitoxins and lipophilic toxins, chemical methods replace animal bioassays [8,9]. This is the case of liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS). LC-MS methods are reported for the analysis of several toxin families in shellfish either individually or together [10–15]. Target monitoring approaches are fit for regulatory purposes as they achieve good sensitivity and specificity. These methods are based on a targeted screening that only seeks to find a short list of predetermined compounds, while missing all other toxins that could be present in the sample. To be fully integrative with respect to consumers' safety, monitoring programs should be able to detect the appearance of so called "emerging toxins". The latter include newly discovered toxins/toxin analogues, as well as the detection of known toxins in areas where they had not been previously described. Methods using high resolution mass spectrometry (HRMS) have been recently developed and used for the analysis of a larger panel of marine toxins in a single run [16–18]. The HRMS technology enables reliable analysis with excellent specificity and selectivity that are necessary to resolve the interference from complex matrices, such as mussels and oysters [19–21]. Besides, this technology offers new monitoring capabilities such as retrospective analysis and the possibility to move from targeted to non-targeted analysis allowing the identification of "unknowns". Yet, the non-targeted analysis is a very challenging task, as it requires extensive processing of the generated dataset. To render these data meaningful, multistep strategies using chemometric tools are required before the final identification of a specific signal among a forest of interfering signals.

While there are several studies in the literature regarding the characterization and validation of targeted methods for the analysis of marine toxins in different matrices, both in low and high resolution [11,15,16,18,22–25], there are no studies presenting an appropriate characterized strategy for the non-targeted approach in the field of marine toxins. Only a few papers, inspired from the metabolomics approaches dealing with the analysis of environmental samples (wastewaters), addressed this challenge [26–31].

This paper describes the implementation and the characterization of an LC-HRMS method for the analysis of different toxins with an extended range of polarities, including lipophilic toxins and domoic acid, by the accurate measurement in MS and MS/MS modes in a single run while using a hybrid quadrupole time of flight mass spectrometer (QTOF). The expression "method characterization" should be understood throughout the manuscript as the assessment of some performances of the method but is different from a method validation, which is a more extensive and complete process. The method developed relies on a workflow (Figure 1) combining both targeted and non-targeted analysis composed of three approaches; (1) targeted screening similar to low resolution MS where reference standards are used to search for the compounds of interest; (2) suspect screening that consists of querying a database/library including an exhaustive list of suspect compounds for which reference standards might not be available; and, (3) non-targeted screening performed without a priori, thus, without reference standards or suspects to identify unexpected compounds [26,28]. First, suitable chromatographic conditions are chosen for the separation of the selected toxins with a broad range of polarities. The performance of the targeted quantitative analysis is assessed as a prerequisite for the non-targeted analysis. A multistep specific data filtering strategy from data acquisition to the final tentative identification of interesting ions is established and optimized by reducing the size of the

search space. The general workflow for suspects and without a priori screening is tested and critically evaluated through the analysis in blinds of shellfish samples that are spiked with marine toxins.

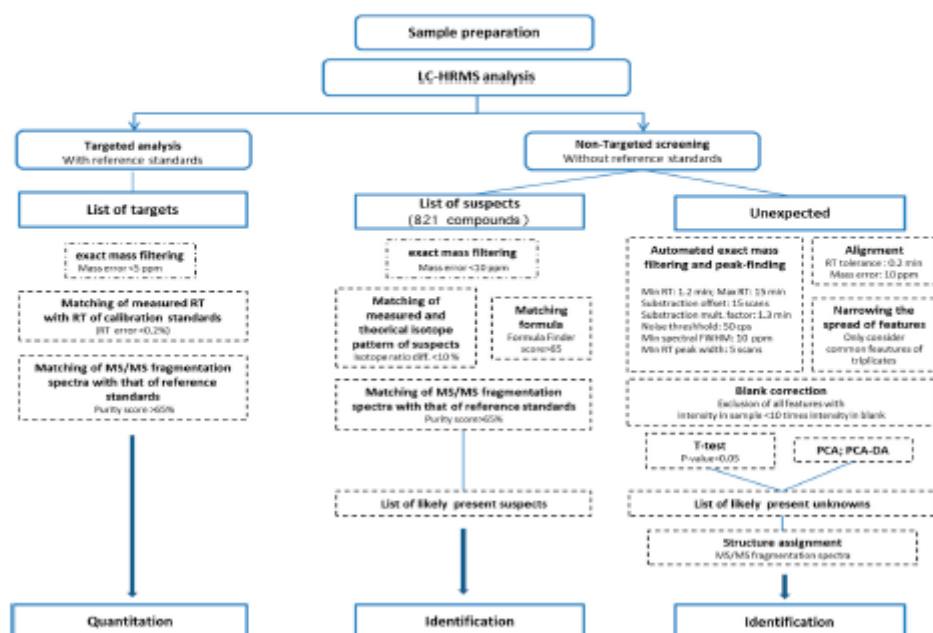


Figure 1. Processing workflow with optimized parameters for (1) quantitative targeted analysis, (2) suspect screening and (3) non-targeted screening of unknowns using liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) (adapted from Krauss et al. [26] and Nürenberg et al. [28]).

2. Results

2.1. Targeted Analysis

2.1.1. Method Development

The method was developed to analyze a large range of lipophilic and relatively polar toxins. A total of 18 toxins for which certified standard solutions were available were analyzed either in positive or negative ionization mode; azaspiracids 1, 2, and 3 (AZA1–3), pectenotoxin 2 (PTX2), okadaic acid (OA), dinophysistoxins 1 and 2 (DTX1 and 2), yessotoxin (YTX), homo-yessotoxin (hYTX), 13-desmethyl spirolide C (SPX1), pinnatotoxin A and G (PnTX-A, PnTX-G), gymnodimine A (GYM), 13,19-didesmethyl Spirolide-C (13,19-didesMeC), 20-methyl spirolide-G (20-meG), domoic acid (DA), and brevetoxins 2 and 3 (PbTx-2 and PbTx-3).

Regarding all the toxins analyzed in ESI⁺ (GYM, SPX1, 13,19-didesMeC, 20-meG, PnTX-A and G, AZA1 to -3, PTX2, PbTx-2, and -3), protonated molecules [M + H]⁺ were detected except for PTX2, for which the [M + NH₄]⁺ adduct was chosen as the characteristic ion. Concerning ESI[−], the deprotonated form [M − H][−] was detected for OA, DTX1 and 2, YTX and hYTX. DA was detected in both ionization modes, but a better sensitivity was observed in ESI[−]. The deprotonated form [M − H][−] of DA (*m/z* 310.12961) was used for identification and quantitation purposes.

Since working in high resolution, toxin identification was mainly based on the exact mass of each molecule. Thus, the mass accuracy (expressed in ppm) was determined while using the suspects list. The corresponding standard deviations (SDs) of the masses for the intra-day and inter-day precision

ranged from 0.4 to 1.7 ppm (Supplementary Material Figure S1). These results show good stability in mass measurements in the current analytical conditions.

Optimized LC conditions while using the C18 HSS T3 column allowed for a good separation of most of the toxins analyzed in both ionization modes (Figure 2). Chromatographic resolution was mostly important in the case of isobaric toxins (OA/DTX2), for which satisfactory separation was achieved. The inter-day and intra-day deviations in retention time (RT) did not exceed 0.2% over the course of the study, and were therefore negligible for all the targeted toxins.

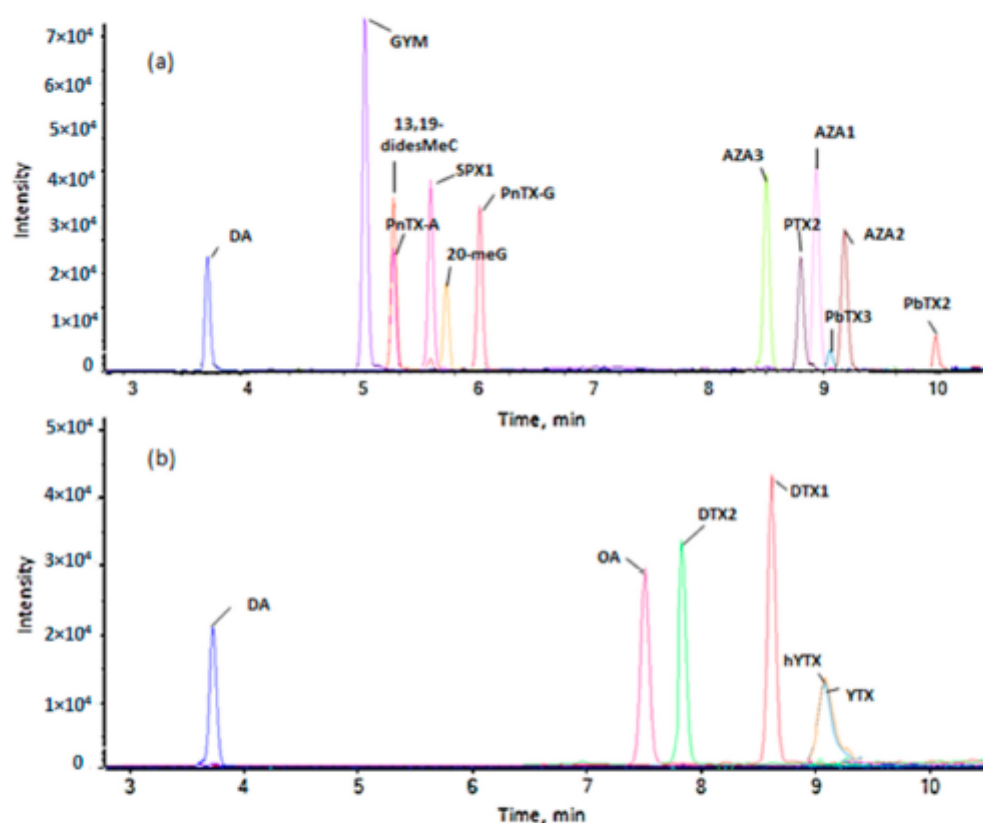


Figure 2. Separation of the different marine toxins in the optimized chromatographic conditions, analyzed on a 5600 quadrupole time of flight mass spectrometer (QTOF) (a) in positive ionization and (b) negative ionization mode.

A target compound list was created, including information, such as exact mass, adduct, and retention time, of all toxins analyzed to be used for quantitation (Supplementary Material Table S1). A library including the MS and MS/MS spectra of the available standards was also created for further confirmation purposes.

2.1.2. Characterization Study of the Quantitative Method

Several criteria were investigated to evaluate the suitability of the quantitative method. The linearity of the calibration curves was verified by a correlation study. All of the determination coefficients (R^2) were above 0.99 for both solvent and matrix-matched calibration curves (Supplementary Materials Table S2). Specificity was assessed by analyzing and comparing non-spiked and spiked blank mussel and oyster samples. Results showed that all the toxins were only detected in the spiked samples at specific retention times. The high resolution in MS analysis also contributed to

the specificity of the method and confirmed that toxins in real shellfish samples can be screened and clearly identified.

The sensitivity of the method was evaluated by the assessment of LODs and LOQs in MeOH and two different matrices, typically mussels and oysters (Table 1). Good sensitivity was achieved for the 14 toxins included in the characterization study. Using mussel extract, limits of quantification (LOQs) were comprised between 2.0 µg/kg (GYM) and 8.9 µg/kg (OA). DA had a higher LOQ (30 µg/kg). LOQs determined in the oyster extract were slightly lower for all toxins compared to the sensitivity in mussel extract, except for PnTX-G, DTX1, and DA. The lowest LOQs were achieved in MeOH, in the absence of matrix, with values ranging from 1.1 to 26 µg/kg for GYM and DA respectively.

Regarding YTXs, LOQs were relatively higher than expected when compared to a triple quadrupole detector, but it can still be considered as acceptable. Brevetoxins were the least sensitive among the studied toxins in the presented conditions. A change in the mobile phase B from ACN to MeOH (keeping the rest of the composition the same as reported in the materials and methods section) allowed for a much better sensitivity for PbTx-2 and 3 (by a factor of 6–10). As most of the toxins analyzed responded well in the ACN mobile phase, the authors decided to keep this composition and evaluate the method for the 14 toxins with the lowest LOQs, excluding YTXs and PbTx.

Table 1. Limits of quantification (LOQs) of the different toxins in methanol (MeOH) and matrix (mussel and oyster).

	LOQ (µg/kg)		
	MeOH	Mussel	Oyster
AZA1	4.3	4.6	4.5
AZA2	2.7	4.4	3.2
AZA3	5.6	7.6	6.5
PnTX2	6.7	8.7	8.4
GYM-A	1.1	2.0	1.6
SPX1	1.7	3.1	2.2
PnTX-A	4.4	5.1	4.6
PnTX-G	5.0	4.4	4.6
13,19-didesMeC	3.3	4.7	4.1
20-meG	3.5	5.0	4.0
OA	6.0	8.9	5.6
DTX1	3.6	4.4	5.6
DTX2	4.2	5.4	5.0
DA	26	30	31
YTX *	87	119	132
hYTX *	84	121	128
PbTx-2 *	280	312	324
PbTx-3 *	300	321	337

* These toxins were not part of the characterization study for sensitivity issues. Corresponding LOQs were estimated in a preliminary study, as equivalent to an S/N of 10, by analyzing in triplicate low level spiked extracts.

Matrix effects for mussel and oyster extracts were determined by a comparison of the mean slope of MeOH calibration curves ($n = 3$) to those of the matrix-matched calibration curves ($n = 3$). Observed effects can be described either as signal enhancement (responses >100%) or signal suppression (response <100%). Concerning the mussel extract, 11 of the toxins tested exhibited an ion suppression effect ranging from −8% for AZA1 to −27% for 20-meG (Figure 3). No matrix effect was observed for PTX2, while DTX2 and DA were responsible for ion enhancement with a +20% signal gain in mussel matrix. Concerning the oyster matrix, ion enhancement was observed for eight toxins (8 out of 14) with values generally <+20%, ranging from +6% (AZA1) to +15% (for SPX1 and 20-meG), except for DA (+33%). The six remaining toxins showed ion suppression ranging from −3% (PTX2) to −13% (DTX1). Matrix effects are globally considered as satisfactory and no correction factors were applied for quantitation.

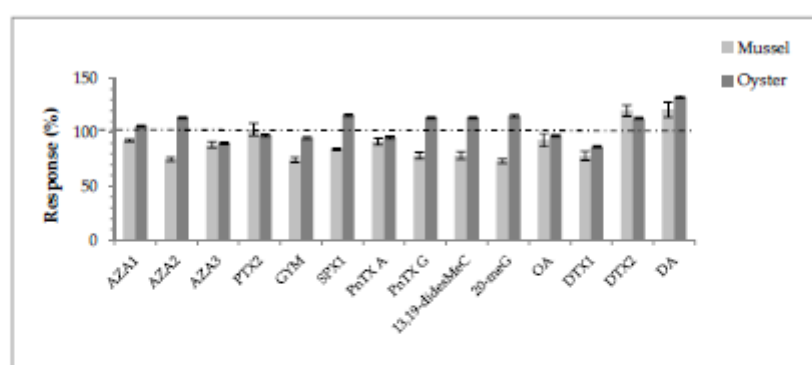


Figure 3. Matrix effects observed for the tested toxins in mussel and oyster extracts. The dashed line representing the 100% response corresponds to the results obtained in MeOH, used as a reference.

The accuracy of the method was verified by measuring the recoveries from blank mussels spiked at two concentration levels, six replicates for each fortification level. Following the EU Commission decision 2002/657/EC as a guideline, the proposed method was found to be accurate with satisfactory recoveries ranging from 86% to 110% for the low spike level and from 95% to 106% for the high spike level (Table 2). These results confirm that the extraction method is well adapted for all of the toxins analyzed. This shows that discriminating purification steps, which might be a limitation for non-targeted analysis, can be avoided. The precision of the assay, reflected by the repeatability and within-laboratory reproducibility, was investigated by means of the relative standard deviation (%RSD). The %RSD values that were obtained for intra-day (RSD_r) and inter-day variations (RSD_R) ranged from 1.3% to 13.7% and from 1.7% to 19.8%, respectively, depending on the toxins (Table 2). The precision was generally better for the high spike levels (120, 240 or 720 $\mu\text{g/kg}$). Results are within the acceptance criteria (<20%) demonstrating that the proposed method is considered as precise and it could be adopted for quantitative analysis.

Table 2. Accuracy and precision ($n = 6$) for the quantitative procedure in mussel matrix.

Toxins	Spike Level ($\mu\text{g/kg}$)	Recovery (%)	RSD_r (%)	RSD_R (%)
AZA1	10	96	13.7	17.1
	120	105	3.4	5.8
AZA2	10	86	8.2	11.3
	120	100	1.3	4.2
AZA3	10	103	12.9	19.8
	120	104	2.9	6.9
PTX2	20	110	9.4	11.0
	240	101	4.2	4.2
GYM	10	97	6.1	6.1
	120	100	7.3	7.3
SPX1	10	94	3.9	9.1
	120	103	1.6	1.7
PnTX-A	10	90	8.0	8.9
	120	97	4.8	6.2
PnTX-G	10	103	11.4	14.7
	120	95	11.4	14.7
13,19-didesMeC	10	91	8.7	12.1
	120	105	4.1	4.1
20-meG	10	88	9.1	14.1
	20	102	1.7	1.9

Table 2. Cont.

Toxins	Spike Level (µg/kg)	Recovery (%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)
OA	20	106	5.9	8.7
	240	103	8.0	9.2
DTX1	20	108	11.9	11.9
	240	106	3.0	3.2
DTX2	20	106	6.9	7.1
	240	104	7.6	8.3
DA	60	99	12.2	12.2
	720	99	1.4	2.7

2.1.3. Application

Homogenates of naturally contaminated mussel tissues (*Mytilus* spp.) containing lipophilic toxins or DA proposed by the European reference laboratory for marine biotoxins (EURLMB) as part of proficiency testing schemes were analyzed by LC-HRMS. The results highlighted a very good agreement with the assigned values (Figure 4). All the lipophilic toxins (OA, YTX, hYTX, 45-OH-YTX, AZA1 to 3) were correctly identified and quantified (Z-score values comprised between -2 and $+2$), except for total DTX2 in sample EURL/L/03 (Z-score value of -4.2), due to its concentration around the LOQ. Samples containing DA were quantified correctly and the results are within acceptable Z-score limits ($|z| < 2$). These results confirm that the method developed is suitable for the quantification of both lipophilic toxins and DA in naturally contaminated shellfish samples.

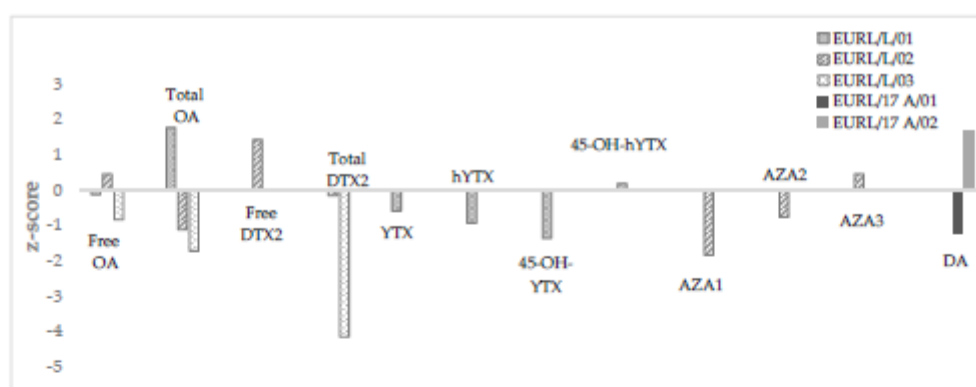


Figure 4. Z-scores obtained after analyzing, by LC-HRMS, the five samples provided by the EURLMB as part of a proficiency testing scheme for lipophilic toxins and DA.

The method developed has demonstrated good performances for the identification and quantification of many toxins belonging to different groups with a wide polarity range, proving that it is fit for targeted analysis. The method was fully characterized for the studied toxins, except for YTXs and PbTx.

2.2. Non-Targeted Analysis

2.2.1. Evaluation of the Suspect Screening Approach

Criteria for the identification and confirmation of suspects needed to be carefully chosen to minimize the risks for both false-positive (features erroneously identified as peaks of interest) and false-negative results. Different parameters were selected and optimized for accurate mass matches through the suspects list. A minimal intensity of 1000 counts was required for a minimal area representative for an actual peak. An imposed minimum signal-to-noise ratio was set to 6:1 (comprised

between the accepted criterion defining LOD (S/N 3) and LOQ (S/N 10)) as peak picking criterion to define the decision limit.

Identification criteria for suspect screening were determined from triplicate injections of reference standards. For each targeted compound, the software displays different parameters: mass error, formula finder score, isotope match, etc. The worst scores that were obtained in these experimental conditions were chosen and reported as confidence settings for the identification of compounds via the suspect list. Thus, it was empirically determined that selecting compounds with a formula finder score above 65 would reduce the number of potential false positives and reach the minimum number of false negatives. A 10 ppm mass error and 10% isotope ratio difference were selected as the best compromise for the suspect screening as it weeds out non-specific formula matches without losing too many matches for compounds that have peak distortions due to their large peak areas or detector saturation. Choosing appropriate values for different filtering criteria is the key step for suspect screening strategies.

The suspect screening strategy was tested on spiked mussel and oyster samples that were analyzed in ESI⁺. Comparable data were obtained for the different matrices, therefore only results relative to oyster samples are presented. After applying our final traffic light color-coding filtering step (retaining only 'green light' features) based on the chosen criteria mentioned above, 15 suspect compounds out of a list of 821 were first identified as toxins potentially present in the analyzed samples. For verification purposes, the presence of actual chromatographic peaks and coherence in retention times were checked for each compound in the replicate injections ($n = 3$). This second step led to the elimination of five candidates that were either not present in all three injections (and therefore considered as false positive features) or not fulfilling the criteria of an actual peak. This step led to a list of 10 candidates, including PnTX-A, PTX2, GYM, SPX1, and two of its isobaric analogues, AZA1 and three of its isobaric analogues. Since many molecular formulas can give the same accurate mass, it is only through the MS/MS fragmentation data that reliable identification of the peaks was achieved. A final confirmation step was then applied by means of the comparison of MS² spectra acquired with theoretical fragment spectra derived from mol files that were obtained from ChemSpider or PubChem databases (Supplementary Materials Figure S2). All the experimental spectra showed good correlation with theoretical fragments (>70%); SPX1 and AZA1 could be identified as the analogues present in the analyzed samples. An exception was observed for GYM, with only 20% matching fragments. The software automatically attributed the most intense peak present in the extracted chromatogram (XIC) as corresponding to the exact mass of the selected compound in the suspect list. The XIC of GYM was then checked visually and a second less intense peak was present at a different retention time (5.1 min) in the three different replicates. This peak was then manually selected and the correlation between the empirical and theoretical fragmentation spectra checked again, and this time the authors had a 100% match. This shows the importance of keeping a critical mind when handling results automatically generated and not taking them for granted until they have been verified.

2.2.2. Evaluation of the Non-Targeted Screening Approach

Data that were generated from the blind test (Section 5.7) were processed while using two different options as part of the non-targeted screening; the first one consisted of comparing contaminated and non-contaminated samples pairwise while using a *t*-test to identify features only present in the contaminated samples. This option required that a non-contaminated sample with the same characteristics (elemental composition, species, location, et al.) as the contaminated one be available. The second option was to perform a multivariate analysis while using another statistical test, a principal component analysis (PCA).

Pairwise Comparison: *t*-Test Results

A *t*-test was carried out on the 5000 most intense features (m/z) and the data were then classified according to the increasing values of the *p*-value. Only ions with a *p*-value below 0.05 were investigated.

Among all the data evaluated, only 100 to 150 ions (depending on the concentration level) out of the 5000 generated had a significant *p*-value below 0.05.

Regarding this test, the aim was to check whether the *t*-test is an appropriate tool allowing for the identification of the molecules of interest among the 100–150 ions selected based on their *p*-value. Selected ions were manually reprocessed while using PeakView® to confirm that they were (1) corresponding to actual peaks (2) absent from the blank control samples and (3) present in the three replicates. Features not responding to these criteria were eliminated; this step allowed for reducing by half the list of ions of interest. Concerning both mussel and oyster matrices, the authors could identify clearly the supplemented toxins among the final list of features considered as responsible for the significant differences between contaminated and blank samples.

Table 3 shows the *p*-values obtained corresponding to each toxin for the six studied levels of contamination; SPX1 was the only toxin with a *p*-value below 0.05 for all six concentration levels in the mussel matrix, meaning that significant differences could be observed between the contaminated and non-contaminated samples for all six levels. Inversely, PTX2 had *p*-values below 0.05 only for the three most concentrated levels, typically L4–L6. Significant differences were observed between the blank mussel sample and the contaminated ones for AZA1 and PnTX-A from level 3 onward. Regarding the case of GYM, five out of the six concentration levels had *p*-values below 0.05; the first concentration level was the only one that did not show a significant difference between the contaminated and non-contaminated samples. This illustrates the difference between the analytical determination limits inherent to the targeted method performances presented before and the discriminating power of the statistical tool. That proves that it is equally important to develop a sensitive method and to set up the adequate workflow able to pick up the signals of interest in a forest of features.

Table 3. *p*-values obtained in a *t*-test comparing pairwise a blank mussel sample with samples spiked at different concentration levels. Non-significant results (*p*-values > 0.05) are indicated in bold and italics.

Spike Levels	SPX1	GYM	AZA1	PnTX A	PTX2
L0/L1	<0.01	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
L0/L2	<0.01	<0.01	>0.05	>0.05	>0.05
L0/L3	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01	>0.05
L0/L4	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05
L0/L5	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
L0/L6	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

Multivariate Analysis: PCA and PCA-DA Results

Initially, an unsupervised PCA test was carried out on the data that were generated after the analysis of the MeOH and matrix-matched samples. The representation obtained following this first PCA test and the PC1/PC2 scores plot showed the presence of three different clusters corresponding respectively to solvent, oyster and mussel extracts (Supplementary Materials Figure S3). This shows that components 1 and 2 reflect the variability related to matrix ions. This distribution is not surprising as matrix ions are predominant when compared to the ions representative of the compounds of interest. The study of the other components did not reveal any clusterization based on the presence or absence of toxins either.

To overcome or reduce the impact of the matrix variability that was preponderant during the first test, the authors carried out a supervised PCA-DA, which allowed for a definition of the samples of mussels and oysters as belonging to the same group.

Figure 5a shows all the “L0” corresponding to uncontaminated samples are well grouped at the top of the scores plot and separated from the remaining contaminated samples. The other samples are classified according to their concentration levels from the least concentrated to the most concentrated ones. Despite this stratification, the different toxin levels are not clearly separated after the PCA-DA data treatment. This could be explained by the fact that concentrations between levels were close.

To identify the ions responsible for the clusterization presented in the loadings plot (Figure 5b), the authors selected those circled in blue as likely to be representative of the most contaminated levels; this included a total of 70 features reduced to 55 when removing the isotopes. The 55 selected features were further refined by excluding those not corresponding to actual peaks; this led to 38 and 36 features for the oyster and mussel matrices, respectively. Using each of the retained features, a tentative formula was generated in Peakview[®] while using Formula Finder. The number of suggested formulae was highly variable and ranged from 3 to 419 for the features in the oyster samples and from 3 to 426 in the mussels. The toxins were not necessarily among the first proposals in Formula Finder; as an example, PnTX-A was the fourth out of 169 proposed formulae in the mussel extracts, while AZA1 was 8 out of 357. The next step of the general workflow was to upload each generated formula in the ChemSpider database to identify the corresponding compound(s), knowing that several potential compounds could be proposed for each formula. Once a compound was identified, its mol file was downloaded to compare the theoretical (in-silico) and the experimental spectra, provided that a spectrum had been acquired in TOF MS/MS. Following all of this workflow, the toxins (GYM, SPX1, AZA1, PnTX-A, and PTX2) marked with a star in Figure 5b were among the features that were identified as being responsible for the clusterization.

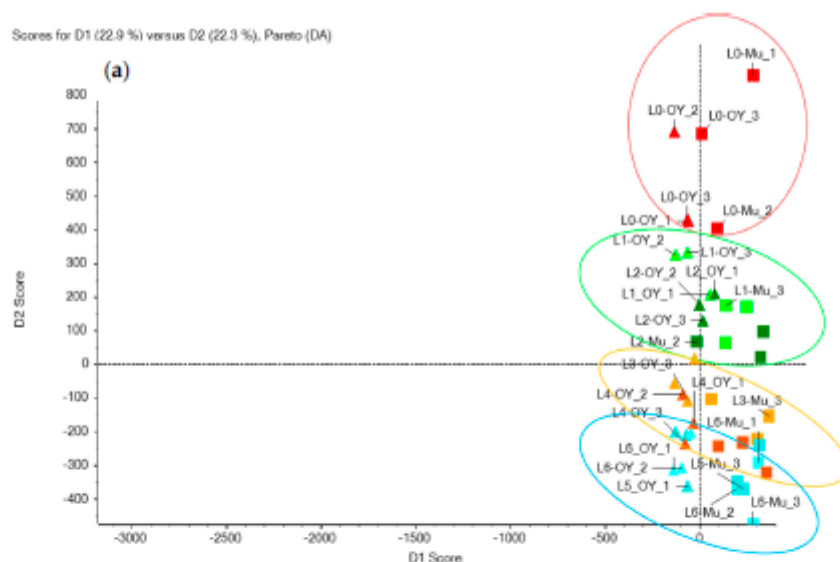


Figure 5. Cont.

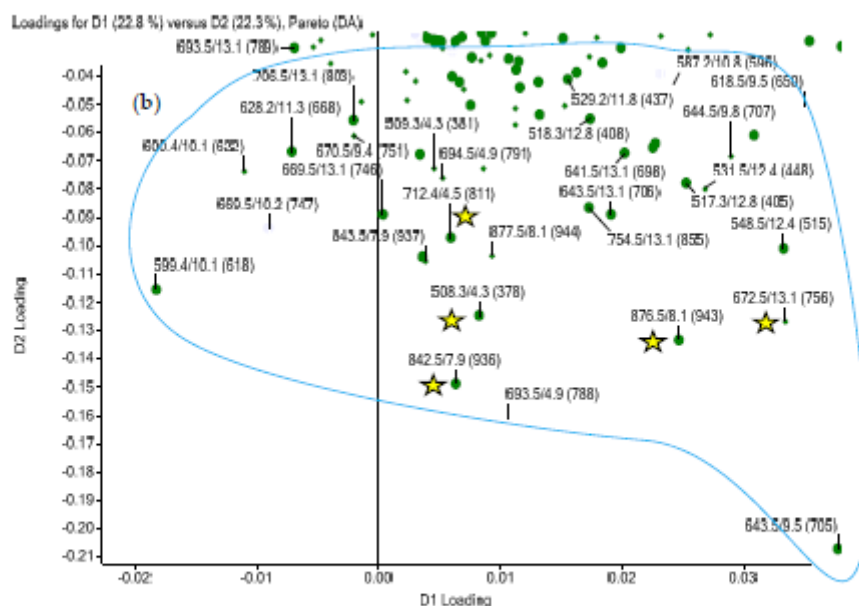


Figure 5. (a) Scores plot of a supervised PCA-DA analysis of the data generated after analyzing contaminated and non-contaminated extracts (MeOH, mussel, and oyster) by LC-HRMS in ESI⁺ (in red: L0; green: L1 and L2; orange: L3 and L4; blue: L5 and L6); (b) Zoom at the corresponding loadings plot ions circled in blue are the representative features (green dots) of the most contaminated level (L6). Ions corresponding to the toxins of interest are flagged with yellow stars. The three figures reported next to each green dot (such as 508.3/4.3 (378)) represent, respectively, the exact mass, the retention time, and the feature's area (in brackets).

3. Discussion

Several papers deal with the characterization/validation of methods for the analysis of targeted marine toxins in low [11,23,32] and high resolution [16,17,25,33–35], but there is no report in the literature of the proper characterization of the entire workflow for the non-targeted analysis of these compounds. More generally, there are no internationally recognized guidelines for the validation of non-targeted analysis [36], but tentative validation strategies were undertaken in the field of environmental pollutants [28,31,37]. The common feature between these studies lies in the fact that the validation procedure was carried out for known compounds or metabolites. The rationale behind this approach is that a validated targeted method is an essential step toward the production of a reliable and acceptable data set through the non-targeted approach. Furthermore, the compounds that are targeted should cover a range of polarity as wide as possible, from hydrophilic to lipophilic. This explains the choice of the 18 toxins that were used as part of this study.

3.1. Targeted Analysis

The LC-HRMS method developed enabled the separation and the analysis of the 18 marine toxins tested. The resolution of the mass spectrometer (QTOF) enables the unambiguous identification of the toxins. Initially, the HSS T3 column was selected, because it can withstand 100% water as mobile phase and it is indicated for the analysis of polar molecules, such as DA.

According to the criteria of the Commission Decision 2002/657/EC [38] and the associated cutoff values, the method developed gave satisfactory performances for the 14 marine toxins that were selected for the characterization study and spiked in the mussel and oyster matrices. Regarding the case of DA, positive ionization is mostly reported in the literature [39–43], but in this study's conditions,

better sensitivity was observed in ESI[−], as also reported by Ciminiello et al. [44]. The exact masses for the intra-day and inter-day precision, ranging from 0.4 to 1.7 ppm for the different toxins, showed good stability in mass measurements in this study's analytical conditions and are consistent with previously published mass accuracy data in LC-HRMS [16,18,45]. The sensitivity of the method was overall satisfactory and estimated LOQs are comparable to previous studies [25,34,39,46]. Regarding YTXs, LODs were relatively higher than expected, as compared to the triple quadrupole detector, but still were considered as acceptable, since they are well below the regulatory threshold of 3.75 mg/kg [5]. Concerning PbTx-2 and 3, even if it has been shown that MeOH improves the sensitivity of the method (by a factor of 6–10) when compared to ACN, in agreement with previous studies, the LOQs obtained under the current conditions remained below the threshold concentration of 800 µg PbTx-2 eq/kg defined in both the American and Australian legislations [32,47].

Concerning the matrix effects, the toxins were affected to different extents with either ion enhancement or ion suppression of different magnitudes. DA was the compound that was the most affected with +33% ion enhancement. To overcome such interferences, matrix-matched calibration curves might be a good solution, as reported elsewhere [11,48]. Sample treatments including purification steps such as solid phase extraction (SPE) or liquid-liquid extraction (LLE) could be effective in removing, or at least reducing the matrix effects but, in non-targeted analysis sample treatment should be kept as simple as possible to avoid losing potential compounds of interest. The matrix effects observed for the compounds spiked into the tested matrices and determined via targeted or suspect analysis can only define a degree of uncertainty for further evaluation [28]. Vergeynst et al. [31] developed a method, including a large volume injection (LVI) to avoid laborious sample enrichment and selective preconcentration of pharmaceuticals in surface waters. The use of a divert valve to eliminate highly polar organic and inorganic (salts) compounds at the beginning of the chromatographic run made the matrix effects comparable to those that were obtained with methods while using SPE as a sample treatment [31]. Dilution could also be advised to reduce the matrix effects, but, in the case of non-targeted analysis, there is a risk of reducing the intensity of the features of interest [28].

When dealing with a chemical method, such as LC-MS, there are several aspects, other than matrix effects, which are likely to impact the method performances. This has been largely reported in the literature [49–52] and it feeds the controversy upon the replacement of the mouse bioassay, used as a reference method for the analysis of certain toxins, with LC-MS. Although factors such as the availability and stability of standards and reference materials, as well as the difference in sensitivity of the MS analyzers, contribute to the gaps identified in food safety control for marine toxins by chemical methods, the non-targeted approach comes as an answer to one of the major criticisms of LC-MS methods: the analysis of pre-assigned masses, which hinders the detection of emerging and unknown toxins.

3.2. Non-Targeted Analysis

The suspect screening approach gives the ability to screen a large list of compounds and to do a retrospective analysis [17,28]. The list that was used as part of this study was composed of 821 compounds including both marine toxins and cyanotoxins with their exact masses. Using suspect screening no standard is required as the identification capability lies on different criteria, among which are the exact m/z ratio, the isotopic profile, the MS/MS fragmentation pattern.

Different parameters were selected and optimized for accurate mass matches through the suspect list, based on the experience acquired when using the suspect screening approach. As an example, the imposed minimum signal-to-noise ratio was set to 6:1 as a peak picking criterion to determine the decision limit that defines a peak. Nürenberg et al. [28] reported the same value while Krauss et al. went for a value of 5:1 [26]. Overall, based on the chosen criteria the authors defined a traffic light color-coding filtering step (retaining only 'green light' features) that was successfully applied to test samples and enabled identifying the marine toxins that were spiked into the blind samples. Although

this process was automated, it is important to keep a critical eye on the data generated and to check it to avoid errors.

To allow for confirmation purposes, the experimental fragmentation that was obtained for the toxin tentatively identified was compared to the built-in MS/MS spectrum in the library (when available) or to the in-silico fragmentation pattern that was obtained from a mol file (PubChem, ChemSpider). Regarding the case of in-silico fragmentation, it was necessary to be sure of the quality of the data available from the websites queried to avoid any misidentification.

Following the different optimized steps of the suspect strategy developed, tentative identification of emerging compounds was possible with a high confidence level. The interpretation of fragmentation patterns of HRMS/MS spectra was a successful way to elucidate the structure of a molecule, even in the case of isomeric structures provided that they had significant fragmentation patterns. To unequivocally identify the molecular structure of a compound, further analysis by nuclear magnetic resonance might be needed.

Using the non-targeted screening approach, two different options were tested for the data treatment. The first one consisted of performing a pairwise *t*-test between contaminated (spiked) and non-contaminated samples. This required that an appropriate reference sample be available. It should have the same elemental composition as the contaminated samples, except for the presence of toxins, to make sure that the significant difference that was picked by the statistical test was related to the contaminants and not to the difference in matrix composition. This condition is difficult to meet as there are many environmental factors that are likely to influence the matrix composition. Regarding the case of shellfish for instance, this could be the genus and species of the animal, its age, its geographical origin, the seasonality etc. To circumvent this difficulty in choosing the right reference, an approach consists of creating a library for each type of matrix that would apprehend the diversity in matrix composition mentioned previously. This approach was put in practice by the EURL for pesticides in fruit and vegetables to determine the matrix signature of different foodstuffs belonging to the eight groups that are defined by DG SANTE [53].

The key issue in the data treatment was to reduce the number of relevant features to screen. When using the *t*-test, this can be done with the *p*-value for which different cutoff values can be selected: *p*-value < 0.05 or *p*-value < 0.01. The cutoff value of 0.01 decreased the number of features from 5000 to a number ranging from 20 to 52 depending on the sample, in the current study. This value was too restrictive and some of the spiked toxins could not be found in the final list. A *p*-value of 0.05 was a better compromise, which reduced the final list of features that was composed of 100 to 150 ions without excluding compounds of interest. Mondeguer et al. [35] applied the same strategy and managed to drastically reduce the number of features for different sets of naturally contaminated mussel samples containing AZAs or unknown compounds from the Arcachon bay.

The *p*-values obtained in the pairwise comparison of the samples spiked with the different toxins at different concentrations and the blank sample illustrated the notion of the discriminating power of the statistical analysis. Therefore, depending on the toxins, the statistical test will be more or less efficient in picking the statistical differences between the sets of samples compared. This has nothing to do with the analytical sensitivity of the method. Using a non-targeted screening approach, it is necessary to have both a sensitive method and the appropriate statistical test with a good discriminating power.

Another data treatment option was tested: the multivariate analysis using a PCA or PCA and discriminant analysis (PCA-DA). The PCA was not appropriate as it discriminated the samples (spiked and blank) according to the nature of the matrix rather than according to the toxin composition (Figure S3). The PCA-DA gave a better clusterization of the samples based on the toxin composition by forcing the statistical test to not consider the matrix as a major discriminating factor (Figure 5). Even in PCA-DA, the identification of the features that were responsible for the clusterization of the samples, and likely to explain the differences in composition, is still time and labor intensive and requires a good methodology. Yet, the authors managed to identify the spiked marine toxins in the PCA-DA loadings plot as features potentially explaining the clusterization of the high toxin levels.

Despite the automation of several tasks of the workflow, some of them must be manually done. This is the case, for instance, for the identification of false positive and false negative features that require a visual inspection of the chromatograms [28,37].

Whatever the statistical approach that was chosen, it is necessary to reduce the number of features to facilitate the data treatment and the identification of the compounds of interest. Several options can be adopted: (1) blank exclusion or blank reduction. Using the first case, all of the features present in the blank will be removed from the samples to be analyzed, whereas for blank reduction, the features with intensity in the sample less than ten times higher than in the blank will be excluded. Nürenberg et al. [28] tested blank exclusion and blank reduction and did not see any significant difference. Two types of blanks can be concomitantly used: a procedural blank (solvent) and a blank sample to reduce even further the number of features not related to the contamination event; (2) elimination of the adducts and isomers to reduce further the number of features; (3) limitation of the number of replicates to three as a compromise between a repeatability requirement and the fact that each injection generates its own false positives, thus reducing the proportion of common features between the different injections [28].

Depending on the identification confidence desired and identified by Schymansky et al. [54] as levels one to five, the time needed to perform both the analysis and the data processing could vary significantly. It could take from days for the level 5 (exact mass of interest) to months to reach the level 1 of identification confidence (confirmed structure by reference standard).

The chromatographic conditions in this paper cover a wide range of marine toxins, but they are not the most suitable for specific toxin groups such as palytoxins, ciguatoxins and maitotoxins. However, the same optimized workflow for data treatment can be applied to different extraction and separation methods. The best strategy to enhance hazard identification would be the combination of LC-HRMS with toxicity tests to reduce the size of the search space. Fractions from chromatographic separation containing potential candidates can be collected and screened while using cellular tests to identify the toxic ones. This step allows for focusing analytical efforts on relevant contaminants and ensures the identification of significantly toxic compounds. A similar methodology, while using both cellular tests and mass spectrometry, recently permitted the identification of a novel maitotoxin, MTX-4 [55].

4. Conclusions

To assess the potential of the LC-HRMS method to detect marine toxins as part of a non-targeted analysis, the authors performed a proof of concept study as a first essential step toward a reliable characterization of samples naturally contaminated with unknown marine toxins and the identification of the toxins. Since there are no guidelines for the validation of a non-targeted method, the LC-HRMS method that was developed for the analysis of marine biotoxins was characterized according to the approach used in the field of water micropollutants. The method performances were first evaluated in targeted mode for marine toxins with different polarities spiked in mussel and oyster samples and were found to be satisfactory for the criteria tested (LODs, LOQs, specificity, matrix effects, accuracy, and precision). The performances of the optimized non-targeted strategy were then evaluated, both for the suspect screening approach relying on the use of a library of 821 toxins and for the without a priori screening of unknowns. The essential steps for the non-targeted procedure have been detailed and discussed. The overall workflow was tested on spiked samples that were analyzed blindly and was shown to be highly efficient in narrowing down the number of potential false positive and false negative findings. Whatever the approach selected, the marine toxins spiked in the samples analyzed as blind for the proof of concept were picked among the features detected in LC-HRMS. It is important to report that, although many tasks could be automated in the data treatment, it is essential to critically and manually review the results that were obtained to avoid any misinterpretation.

As the workflow is time and labor intensive, the number of features should be kept to a minimum by using blanks (procedural and sample) to exclude or reduce the corresponding features, according to

the option chosen. The question of the reference sample must be addressed to help in identifying the compounds of interest in the contaminated sample among interfering features; an option could be to create matrix libraries apprehending the wide diversity of the features that are likely to be present in non-contaminated matrices.

It will be necessary to analyze naturally contaminated samples and to isolate a novel or unknown toxic compound to confirm the efficiency of this methodology. The present study should be completed by testing the non-targeted approach in the ESI⁺ ionization mode while using blind samples spiked with the corresponding toxins. Further developments should be carried out by testing different techniques of extraction, separation, and so on to increase even further the range of the toxins falling into the scope (palytoxin-like, ciguatoxin-like). There is, therefore, a vast area of research on these non-targeted approaches to be investigated in the future to make non-targeted LC-HRMS more powerful for marine toxin monitoring and to guarantee consumer safety.

5. Materials and Methods

5.1. Standards and Reagents

All the solutions were prepared with analytical reagent-grade chemicals and ultrapure water (18.2 MΩ cm) produced by purifying deionized water with a Milli-Q Academic water purification system (Millipore S.A., Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

Hydrochloric acid (HCl; 37%) and sodium hydroxide (NaOH; 99%) were purchased from Merck (Fontenay-sous-Bois, France). Ammonium formate (>97%) was purchased from Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France. Formic acid (98–100%), acetonitrile (ACN; HPLC grade), and methanol (MeOH; HPLC grade) were purchased from Fisher Scientific SAS (Illkirch, France). Ammonium hydroxide (25%) was purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) calibration solutions were purchased from Sciex (Nieuwerkerk aan den IJssel, The Netherlands).

Certified reference materials (CRMs) were purchased from the National Research Council of Canada (NRCC, Halifax, NS, Canada). These included certified calibration solutions of the following toxins: DA, AZA1–3, PTX2, OA, DTX1 and 2, YTX, hYTX, SPX1, PnTX-G, and GYM. Standards of PnTX-A, 13,19-didesMeC, and 20-meG were purchased from Cifga (Lugo, Spain). PbTx-2 and 3 were purchased from Abcam (Cambridge, UK).

5.2. Sample Preparation

Blank mussels samples ($n = 3$) and oysters samples ($n = 3$) were prepared according to the standard operating procedure of the EURLMB by extracting 2 g of homogenized tissue with 2×9 mL of 100% MeOH [56]. Following centrifugation, the supernatants were combined into a volumetric flask and the volume adjusted to 20 mL while using MeOH.

To detect and quantify the total amount of OA group toxins present, including the esterified forms, an alkaline hydrolysis was performed before LC–MS/MS analysis [57]. Regarding the hydrolysis step, 500 µL of aqueous NaOH 2.5 M solution was added to 4 mL of methanolic extract, homogenised by vortex mixing for 0.5 min and heated at 76 °C for 40 min. Once cooled to room temperature, the extract was neutralised with 500 µL of aqueous HCl 2.5 M solution. Samples were filtered (0.45 µm) prior to analysis.

5.3. Preparation of Standards and Matrix-Matched Calibration Solutions

A toxin mixture stock solution was prepared in MeOH from the certified calibration solutions and contained PTX2, AZA1 to 3, OA, DTX1 and 2, PnTX-A, PnTX-G, YTX, h-YTX, SPX1, 13,19-didesMeC, 20-meG, GYM-A, and DA at concentrations ranging from 120 to 240 ng/mL depending on the toxins. This stock solution was serially diluted in MeOH to prepare six working solutions (L1–L6), each containing the studied toxins at different concentrations. Brevetoxins (PbTx-2 and 3) working

solutions were prepared separately while using a 250 ng/mL stock solution. These working solutions were then used to prepare matrix-matched standards with previously prepared blank mussel and oyster extracts to reach the appropriate concentration levels: 450 µL aliquots of shellfish extracts were dispensed into HPLC vials, and 50 µL of working solution was added, resulting in six different concentration levels per matrix. This operating procedure resulted in a consistent matrix concentration of 0.09 g/mL at each concentration level. Matrix-free standards were prepared similarly, while using pure MeOH instead of shellfish extracts.

The calibration curves for matrix effect assessments ranged from 1 to 12 ng/mL for AZAs and cyclic imines; 2–24 ng/mL for YTXs, OA, DTXs and PTX2; 6–72 ng/mL for DA.

MeOH and matrix-matched calibration curves, mean slopes, intercept and determination coefficients (R^2) were calculated based on triplicate injections of seven concentration levels (including the blank, L0).

5.4. LC-HRMS Analysis

Measurements were carried out by LC-HRMS. A Dionex Ultimate 3000 HPLC system (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) was coupled to a QTOF (Sciex 5600 Triple TOF, Darmstadt, Germany). The QTOF system was equipped with a DuoSpray ion source and a TurboIonSprayTM probe. The chromatographic separation was achieved on a Waters (Saint-Quentin-en-Yvelines, France) Xselect[®] HSS T3 column (100 × 2.1 mm, 2.5 µm) with a binary mobile phase of (A) water and (B) ACN–water (95/5, *v/v*), each containing 50 mM formic acid and 2 mM ammonium formate. The gradient of the LC method was composed by the following steps within a total run time of 20 min. Subsequent to an isocratic step for 1 min, a linear gradient was applied from 2% to 100% B within 9 min, and held at 100% of B for 5 min. The initial conditions were reached again and were kept constant for 5 min to re-equilibrate the column. The flow rate was 0.45 mL/min and the column temperature was 30 °C. The injection volume was set to 5 µL.

Concerning the MS detection, electrospray ionization (ESI) was used in positive and negative modes in separate runs. The parameters for positive and negative ionization were as follows (deviating values for negative ion mode are indicated in parentheses): ion source gas (GS) 1 and 2, 35 and 45 psi; curtain gas (CUR), 30 psi; source temperature (TEM), 500 °C; ion spray voltage floating (ISVF), 5.5 (–4.5) kV; declustering potential (DP), 60 V (–100 V); ion release delay (IRD), 67 ms; ion release width (IRW), 25 ms.

The MS was operated in full scan TOF MS and MS/MS modes with information dependent acquisition (IDA) in a single run analysis for targeted and non-targeted screening. The full scan experiment (100–1250 Da) was performed with an accumulation time of 0.2 s while using the high sensitivity mode. An additional eight MS2 spectra experiments (accumulation time: 0.05 s) were programmed. A collision energy spread (CES ± 20 eV) was applied in conjunction with the CE (40 eV) for IDA mode to perform both low and high collision-energy, simultaneously resulting in valuable fragmentation information for identification purposes. The mass spectrometer was recalibrated automatically after five measurements while using an automated calibrant delivery system (CDS) via the atmospheric pressure chemical ionization (APCI) probe of the DuoSpray ion source.

Each sample/standard solution was injected in triplicate to generate enough data to perform the chemometric processing (e.g., *t*-test), as described in the next section.

5.5. Post-Acquisition Data Processing

The data acquisition was carried out by Analyst[®] TF 1.7.1 software (Sciex, Toronto, ON, Canada). Data were then processed following three different approaches: (1) quantitative target analysis with reference standards; (2) suspect screening without reference standards; and, (3) non-target screening of unknowns. A diagram of the processing data strategy is shown in Figure 1.

The MasterViewTM application of the PeakView[®] 2.2 software (Sciex, Toronto, ON, Canada) was used to create target and suspect compound lists and display identification criteria while using

“traffic lights” on the basis of confidence settings for the following parameters: molecular formula, accurate mass (mass error), isotopic pattern, and MS/MS library (purity score), as well as further peak information, such as retention time, S/N (signal-to-noise ratio), or FWHM (full width at half maximum) (Supplementary Materials Figure S4). The traffic light turns green when the confidence settings of the above-mentioned parameters are met; this indicates a good confidence level in the identification of the compounds in the suspects list.

The quantitation of target toxins was achieved by MultiQuant™ 2.1.1 (Sciex, Toronto, ON, Canada). The decision of whether a feature was counted as a peak was done manually by visual control while using the integrated MultiQuant™ data sets of each XIC (extracted ion chromatogram). Decision criteria for a peak to be recognized as such were the peak shape (approximatively Gaussian), an S/N above 6, and a peak width at the base below 0.6 min.

Concerning the non-target screening purpose, the extraction and the alignment of the features from the full scan experiment were processed by MarkerView™ software 1.2.1 (Sciex, Toronto, ON, Canada). Statistical data analyses (*t*-test, principal components analysis (PCA)) were also performed while using this software. ChemSpider and PubChem databases were used for searching for possible structure identities and MS/MS fragment ion prediction to identify compounds and to characterize chemical structures.

5.6. Method Performance Characteristics for Target Quantitation

To assess the method performances and matrix effects, each concentration level of calibration curves was injected in triplicate, alternating between standards in methanol, standards in oyster matrix and standards in mussel matrix. Detection and quantification limits (LOD and LOQ) were first estimated as equivalent to an S/N of 3 and 10, respectively, by analyzing low level spiked extracts in triplicate. Regarding the characterization study, LODs and LOQs were determined with the ordinary least-squares regression data method [58,59] while using solvent and matrix-matched calibration curves. LODs and LOQs were calculated, respectively, as 3 and 10 times the standard deviation of the y-intercepts, over the slope of the calibration curve.

The suitability of the quantitation method for the studied toxins was evaluated following the EU Commission Decision 2002/657/EC as a guideline.

To determine the repeatability and the intermediate precision of the method, mussel samples that were spiked with marine toxins were extracted and injected twice daily, at three different days over the course of two weeks.

The relative standard deviation (RSD) was determined in repeatability (RSD_r) and within-laboratory reproducibility (RSD_R) conditions.

Samples provided by the EURLMB as part of proficiency testing schemes for lipophilic toxins and DA were analyzed by LC-HRMS after being extracted as described in Section 5.2., Z-scores [60] were determined for each toxin in the different samples, while using the following equation:

$$Z \text{ score} = \frac{x - X}{\sigma}$$

with

x = analytical result

X = assigned value as determined by the EURLMB

σ = standard deviation

$|z| < 2$: results are satisfactory

$2 < |z| < 3$: results are questionable

$|z| > 3$: results are unsatisfactory

5.7. Non-Targeted Screening of Marine Toxins

The workflow was tested by treating a selected set of target compounds (from different toxin families; GYM, SPX1, AZA 1, PrTX A, and PTX2) spiked in MeOH and shellfish extracts (mussel and oyster) at 6 different concentration levels L1–L6 (2, 4, 8, 12, 16, 24 ng/mL) as unknowns to check the performance of the procedure. Blind samples were analyzed in triplicate in ESI⁺. Suspect screening data were treated using PeakView[®] and MasterView[™] softwares, via an XIC list of 821 molecules, including marine toxins and cyanotoxins kindly provided by Dr. A. Gerssen (Rikilt Institute of food safety, Wageningen, The Netherlands). The only a priori information was the exact mass of the protonated ions $[M + H]^+$ or $[M + NH_4]^+$ of the toxins that were included in that list. The authors chose to test the workflow in positive mode only.

To contrast suspect screening, the unknown screening strategy was run without any a priori information. Data were processed using MarkerView[™] and the workflow included alignment, peak detection, deconvolution, component intensity comparison, and statistics. Two statistical approaches were applied; (1) *t*-test to determine if statistically significant differences between contaminated and non-contaminated samples could be associated to the presence of toxins; and, (2) multivariate statistical analysis (PCA) either supervised or not.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6651/10/9/375/s1>, Figure S1: Mass variations (mass-to-charge-ratio) for the toxins (positive and negative ion mode), Figure S2: Example of tentative identification of non-target compound, Figure S3: Scores plot of a PCA analysis of the data generated after analyzing contaminated and non-contaminated extracts (MeOH, mussel, and oyster) by LC-HRMS in ESI⁺, Figure S4: Example of result display of the MasterView software using “traffic lights” and selected confidence setting for target compounds identification, Table S1: Chemical formula, detected ion, measured mass, *m/z* (*n* = 15) and retention time for each toxin in mussel extracts obtained on 5600 Q-TOF, Table S2: Determination coefficients (*r*²) for both solvent and matrix-matched calibration curves.

Author Contributions: Conceptualization, R.B.; Data curation, I.D. and R.B.; Formal analysis, I.D. and V.H.; Methodology, I.D. and R.B.; Project administration, R.B., G.L.-B., M.N. and T.G.; Software, I.D. and R.B.; Supervision, R.B. and T.G.; Writing—original draft, I.D. and R.B.; Writing—review & editing, I.D., R.B., V.H., G.L.-B., M.N. and T.G.

Funding: This research was funded by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) and ABIES Doctoral School from Agreenium Institute.

Acknowledgments: The authors acknowledge A. Gerssen (Rikilt Institute for food safety, Wageningen, The Netherlands) for providing a list of 821 marine toxins and cyanotoxins for suspect screening. Christophe ROGER is acknowledged for his contribution in sample preparation and analysis and Loïc BEYET from Sciex (France) for his technical support with the softwares.

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

References

- Frémy, J.-M.; Lassus, P. *Toxines d'Algues dans l'Alimentation*; Ifremer: Issy-les-Moulineaux, France, 2001.
- UNESCO. *Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs*; Technical Report for UNESCO; UNESCO: Oslo, Norway, 2005.
- Asakawa, M. Marine Biotoxins: Occurrence, Toxicity, and Detection Methods. *Mater. Sci. Eng.* **2017**. [CrossRef]
- Morabito, S.; Silvestro, S.; Faggio, C. How the marine biotoxins affect human health. *Nat. Prod. Res.* **2018**, *32*, 621–631. [CrossRef] [PubMed]
- European Commission. Commission Regulation No 786/2013 of 16th August 2013 amending Annex III to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council as regards the permitted limits of yessotoxins in live bivalve molluscs Text with EEA relevance. *Off. J. Eur. Union* **2013**, *220*, 14.
- European Commission. Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2004**, *139*, 151.

7. Hess, P.; Grune, B.; Anderson, D.B.; Aune, T.; Botana, L.; Caricato, P.; Egmond, H.; Halder, M.; Hall, S.; Lawrence, J.F.; et al. Three Rs Approaches in Marine Biotoxin Testing. The Report and Recommendations of a joint ECVAM/DG SANCO Workshop (ECVAM Workshop 54). *Altern. Lab. Anim.* **2006**, *34*, 193–224. [[PubMed](#)]
8. European Commission. Commission regulation (EU) No 15/2011 of 10 January 2011 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs. *Off. J. Eur. Union* **2011**, *6*, 4.
9. European Commission. Commission regulation (EC) No 1664/2006 of 6 November 2006 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards implementing measures for certain products of animal origin intended for human consumption and repealing certain implementing measures. *Off. J. Eur. Union* **2006**, *320*, 33.
10. Fux, E.; McMillan, D.; Bire, R.; Hess, P. Development of an ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1157*, 273–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Gerssen, A.; van Olst, E.H.W.; Mulder, P.P.J.; de Boer, J. In-house validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of lipophilic marine toxins in shellfish using matrix-matched calibration. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 3079–3088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. MacKenzie, L.; Holland, P.; McNabb, P.; Beuzenberg, V.; Selwood, A.; Suzuki, T. Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. *Toxicon* **2002**, *40*, 1321–1330. [[CrossRef](#)]
13. Quilliam, M.A. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.* **1995**, *78*, 555–570. [[PubMed](#)]
14. 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 Alga from the Pacific. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8886–8891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Iacovo, E.D.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Tartaglione, L. LC-MS of palytoxin and its analogues: State of the art and future perspectives. *Toxicon* **2011**, *57*, 376–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Domènech, A.; Cortés-Francisco, N.; Palacios, O.; Franco, J.M.; Riobó, P.; Llerena, J.J.; Vichi, S.; Caixach, J. Determination of lipophilic marine toxins in mussels. Quantification and confirmation criteria using high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1328*, 16–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Gerssen, A.; Mulder, P.P.J.; de Boer, J. Screening of lipophilic marine toxins in shellfish and algae: Development of a library using liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *685*, 176–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Blay, P.; Hui, J.P.M.; Chang, J.M.; Melanson, J.E. Screening for multiple classes of marine biotoxins by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 577–585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Dzuman, Z.; Zachariasova, M.; Veprikova, Z.; Godula, M.; Hajslova, J. Multi-analyte high performance liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry method for control of pesticide residues, mycotoxins, and pyrrolizidine alkaloids. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *863*, 29–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Gago-Martinez, A.; Hungerford, J.M. Comment on “the effect of uncontrolled factors in a validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry method question its use as reference method for marine toxins: Major causes for concern”. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Gerssen, A.; Van Den Top, H.J.; Van Egmond, H.P. Comment on “effect of uncontrolled factors in a validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry method question its use as a reference method for marine toxins: Major causes for concern”. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 476–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Boundy, M.J.; Selwood, A.I.; Harwood, D.T.; McNabb, P.S.; Turner, A.D. Development of a sensitive and selective liquid chromatography-mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1387*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Turner, A.D.; McNabb, P.S.; Harwood, D.T.; Selwood, A.I.; Boundy, M.J. Single-laboratory validation of a multitoxin ultra-performance LC-hydrophilic interaction LC-MS/MS method for quantitation of paralytic shellfish toxins in bivalve shellfish. *J. AOAC Int.* **2015**, *98*, 609–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Wu, H.; Guo, M.; Yan, Z.; Cheng, H.; Li, Z.; Zhai, Y. Liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry for multiclass screening and identification of lipophilic marine biotoxins in bivalve mollusks. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1358*, 172–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Orellana, G.; Vanden Bussche, J.; Van Meulebroeck, L.; Vandegheuchte, M.; Janssen, C.; Vanhaecke, L. Validation of a confirmatory method for lipophilic marine toxins in shellfish using UHPLC-HR-Orbitrap MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 5303–5312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Krauss, M.; Singer, H.; Hollender, J. LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 943–951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Martínez Bueno, M.J.; Ulaszewska, M.M.; Gomez, M.J.; Hernando, M.D.; Fernández-Alba, A.R. Simultaneous measurement in mass and mass/mass mode for accurate qualitative and quantitative screening analysis of pharmaceuticals in river water. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1256*, 80–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Nürenberg, G.; Schulz, M.; Kunkel, U.; Ternes, T.A. Development and validation of a generic nontarget method based on liquid chromatography—High resolution mass spectrometry analysis for the evaluation of different wastewater treatment options. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1426*, 77–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Schymanski, E.L.; Singer, H.P.; Slobodnik, J.; Ipolyi, I.M.; Oswald, P.; Krauss, M.; Schulze, T.; Haglund, P.; Letzel, T.; Grosse, S.; et al. Non-target screening with high-resolution mass spectrometry: critical review using a collaborative trial on water analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 6237–6255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Vergeynst, L.; Van Langenhove, H.; Joos, P.; Demeestere, K. High-resolution time-of-flight mass spectrometry for suspect screening and target quantification of pharmaceuticals in river water. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **2013**, *78*, 9–14. [[PubMed](#)]
31. Vergeynst, L.; Van Langenhove, H.; Joos, P.; Demeestere, K. Suspect screening and target quantification of multi-class pharmaceuticals in surface water based on large-volume injection liquid chromatography and time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 2533–2547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. McNabb, P.S.; Selwood, A.I.; Van Ginkel, R.; Boundy, M.; Holland, P.T. Determination of brevetoxins in shellfish by LC/MS/MS: Single-laboratory validation. *J. AOAC Int.* **2012**, *95*, 1097–1105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Zeng, Z.; Bertrand, S.; Herrenknecht, C.; Abadie, E.; Jauzein, C.; Lemée, R.; Gouriou, J.; Amzil, Z.; Hess, P. Passive Sampling and High Resolution Mass Spectrometry for Chemical Profiling of French Coastal Areas with a Focus on Marine Biotoxins. *Environ. Sci. Technol.* **2016**, *50*, 8522–8529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zeng, Z.; McCarron, P.; Herrenknecht, C.; Sibat, M.; Amzil, Z.; Cole, R.B.; Hess, P. High resolution mass spectrometry for quantitative analysis and untargeted screening of algal toxins in mussels and passive samplers. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1416*, 10–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mondeguez, E.; Antignac, J.-P.; Guittou, Y.; Monteau, E.; Le Borgne, S.; Hess, P. 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). *Spectra Anal.* **2012**, *284*, 10.
36. Naz, S.; Vallejo, M.; Garcia, A.; Barbas, C. Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1353*, 99–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Heffernan, A.L.; Gomez-Ramos, M.M.; Gaus, C.; Vijayarathay, S.; Bell, L.; Hof, C.; Mueller, J.E.; Gomez-Ramos, M.J. Non-targeted, high resolution mass spectrometry strategy for simultaneous monitoring of xenobiotics and endogenous compounds in green sea turtles on the Great Barrier Reef. *Sci. Total Environ.* **2017**, *599–600*, 1251–1262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. European Commission. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Commun.* **2002**, *221*, 29.
39. McCarron, P.; Wright, E.; Quilliam, M.A. Liquid chromatography/mass spectrometry of domoic acid and lipophilic shellfish toxins with selected reaction monitoring and optional confirmation by library searching of product ion spectra. *J. AOAC Int.* **2014**, *97*, 316–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Beach, D.G.; Walsh, C.M.; McCarron, P. High-throughput quantitative analysis of domoic acid directly from mussel tissue using Laser Ablation Electrospray Ionization—Tandem mass spectrometry. *Toxicon* **2014**, *92*, 75–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

41. James, K.J.; Gillman, M.; Amandi, M.E.; López-Rivera, A.; Puente, P.E.; Lehane, M.; Mitrovic, S.; Furey, A. Amnesic shellfish poisoning toxins in bivalve molluscs in Ireland. *Toxicon* **2005**, *46*, 852–858. [CrossRef] [PubMed]
42. Wang, Z.; Maucher-Fuquay, J.; Fire, S.E.; Mikulski, C.M.; Haynes, B.; Doucette, G.J.; Ramsdell, J.S. Optimization of solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of domoic acid in seawater, phytoplankton, and mammalian fluids and tissues. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *715*, 71–79. [CrossRef] [PubMed]
43. Zhang, Y.; Chen, D.; Hong, Z. A rapid LC-HRMS method for the determination of domoic acid in urine using a self-assembly pipette tip solid-phase extraction. *Toxins* **2015**, *8*, 10. [CrossRef] [PubMed]
44. Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, G.S.; Tartaglione, L.; Quilliam, M.A.; Tubaro, A.; Poletti, R. Hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry for determination of domoic acid in Adriatic shellfish. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 2030–2038. [CrossRef] [PubMed]
45. Zendong, S.Z. Développement de Méthodes de Spectrométrie de Masse Haute Résolution (SMHR) Pour le Criblage des Phycotoxines dans les Echantillons Biologiques et Environnementaux. Ph.D. Thesis, Nantes University, Nantes, France, 2015.
46. Zhuo, L.; Fu, W.; Yang, Y.; Qiu, B.; Lin, Z.; Shan, L.; Zheng, L.; Li, J.; Chen, G. Simultaneous determination of biotoxins DSP and AZAs in bivalve molluscs and fish by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2014**, *28*, 1479–1488. [CrossRef] [PubMed]
47. Ishida, H.; Nozawa, A.; Nakaya, H.; Tsuji, K. Comparative concentrations of brevetoxins PbTx-2, PbTx-3, BtTX-B1 and BtTX-B5 in cockle, Austrovenus stutchburyi, greenshell mussel, Perna canaliculus, and Pacific oyster, Crassostrea gigas, involved neurotoxic shellfish poisoning in New Zealand. *Toxicon* **2004**, *43*, 779–789. [CrossRef] [PubMed]
48. Kilcoyne, J.; Fux, E. Strategies for the elimination of matrix effects in the liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of the lipophilic toxins okadaic acid and azaspiracid-1 in molluscan shellfish. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 7123–7130. [CrossRef] [PubMed]
49. Botana, L.M.; Alfonso, A.; Rodriguez, I.; Botana, A.M.; Louzao, M.C.; Vieytes, M.R. How safe is safe for marine toxins monitoring? *Toxins* **2016**, *8*, 208. [CrossRef] [PubMed]
50. Campbell, K.; Vilariño, N.; Botana, L.M.; Elliott, C.T. A European perspective on progress in moving away from the mouse bioassay for marine-toxin analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2011**, *30*, 239–253. [CrossRef]
51. Otero, P.; Alfonso, A.; Alfonso, C.; Rodriguez, P.; Vieytes, M.R.; Botana, L.M. Effect of uncontrolled factors in a validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry method question its use as a reference method for marine toxins: Major causes for concern. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 5903–5911. [CrossRef] [PubMed]
52. Otero, P.; Alfonso, C. Analysis of marine toxins: gaps on food safety control for marine toxins by chemical methods. In *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*, 2nd ed.; Botana, L.M., Alfonso, A., Eds.; John Wiley and Sons: Hoboken, NJ, USA, 2015; p. 22.
53. Molecular Components Map of Representative Matrices of Commodity Groups in document SANTE/11813/2017. Available online: [http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EURL-FV\(2018-M23\)%20Molecular%20component%20map.pdf](http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EURL-FV(2018-M23)%20Molecular%20component%20map.pdf) (accessed on the 12 September 2018).
54. Schymanski, E.L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H.P.; Hollender, J. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 2097–2098. [CrossRef] [PubMed]
55. Pisapia, E.; Sibat, M.; Herrenknecht, C.; Lhaute, K.; Gaiani, G.; Ferron, P.J.; 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**, *15*, 220. [CrossRef] [PubMed]
56. EU-Harmonised Standard Operating Procedure for Determination of Lipophilic Marine Biotoxins in Molluscs by LC-MS/MS. Available online: www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/laboratorios/LNRBM/ARCHIVO2EU-Harmonised-SOP-LIPO-LCMSMS_Version5.pdf (accessed on the 12 September 2018).
57. Mountfort, D.O.; Suzuki, T.; Truman, P. Protein phosphatase inhibition assay adapted for determination of total DSP in contaminated mussels. *Toxicon* **2001**, *39*, 383–390. [CrossRef]

58. Sanagi, M.M.; Ling, S.L.; Nasir, Z.; Hermawan, D.; Ibrahim, W.A.; Abu Naim, A. Comparison of signal-to-noise, blank determination, and linear regression methods for the estimation of detection and quantification limits for volatile organic compounds by gas chromatography. *J. AOAC Int.* **2009**, *92*, 1833–1838. [PubMed]
59. Vial, J.; Jardy, A. Experimental comparison of the different approaches to estimate LOD and LOQ of an HPLC method. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2672–2677. [CrossRef]
60. ISO 13528:2015. Statistical Methods for Use in Proficiency Testing by Interlaboratory Comparison. Available online: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:13528:ed-2:v2:en> (accessed on the 12 September 2018).



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aasen, J., MacKinnon, S.L., LeBlanc, P., Walter, J.A., Hovgaard, P., Aune, T., Quilliam, M.A., 2005a. Detection and identification of spirolides in Norwegian shellfish and plankton. *Chemical Research in Toxicology* 18(3), 509-515.
- Aasen, J., Samdal, I.A., Miles, C.O., Dahl, E., Briggs, L.R., Aune, T., 2005b. Yessotoxins in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*): uptake from *Protoceratium reticulatum*, metabolism and depuration. *Toxicon* 45(3), 265-272.
- Abraham, A., Jester, E.L.E., Granade, H.R., Plakas, S.M., Dickey, R.W., 2012. Caribbean ciguatera profile in raw and cooked fish implicated in ciguatera. *Food Chemistry* 131(1), 192-198.
- Agüera, A., Martínez Bueno, M.J., Fernández-Alba, A.R., 2013. New trends in the analytical determination of emerging contaminants and their transformation products in environmental waters. *Environmental Science and Pollution Research* 20(6), 3496-3515.
- Ahrens, L., Bundschuh, M., 2014. Fate and effects of poly- and perfluoroalkyl substances in the aquatic environment: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33(9), 1921-1929.
- Aligizaki, K., Katikou, P., Nikolaidis, G., Panou, A., 2008. First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece). *Toxicon* 51(3), 418-427.
- Amzil, Z., Pouchus, Y.F., Le Boterff, J., Roussakis, C., Verbist, J.-F., Marcaillou-Lebaut, C., Masselin, P., 1992. Short-time cytotoxicity of mussel extracts: A new bioassay for okadaic acid detection. *Toxicon* 30(11), 1419-1425.
- 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.
- Amzil, Z., Sibat, M., Royer, F., Masson, N., Abadie, E., 2007. Report on the first detection of pectenotoxin-2, spirolide-A and their derivatives in French shellfish. *Marine Drugs* 5(4), 168-179.
- Andrews, G.L., Simons, B.L., Young, J.B., Hawkrige, A.M., Muddiman, D.C., 2011. Performance Characteristics of a New Hybrid Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometer (TripleTOF 5600). *Analytical Chemistry* 83(13), 5442-5446.
- Anonyme, 1991. Directive 91/492/CEE du Conseil du 15 juillet 1991 fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants *Journal officiel de l'Union Européenne* L 268, 14.
- Anonyme, 2004a. Règlement (CE) N°853/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale. *Journal officiel de l'Union Européenne* L 139, 151.
- Anonyme, 2004b. Règlement (CE) N°854/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine. *Journal officiel de l'Union Européenne* L 226, 45.
- Anonyme, 2007. Règlement (CE) No 1244/2007 de la Commission du 24 octobre 2007 modifiant le règlement (CE) no 2074/2005 en ce qui concerne les mesures d'application relatives à certains produits d'origine animale destinés à la consommation humaine et établissant des règles spécifiques concernant les contrôles officiels relatifs à l'inspection des viandes. *Journal officiel de l'Union Européenne* L 281, 7.
- Anonyme, 2011. Règlement (UE) N° 15/2011 de la Commission du 10 janvier 2011 modifiant le règlement (CE) n° 2074/2005 en ce qui concerne les méthodes d'analyse reconnues des biotoxines marines chez les mollusques bivalves vivants. *Journal officiel de l'Union Européenne* L 6, 4.

- Anonyme, 2013. Règlement (UE) N° 786/2013 de la Commission du 16 août 2013 modifiant l'annexe III du règlement (CE) N° 853/2004 du Parlement Européen et du Conseil en ce qui concerne les limites autorisées de yessotoxines dans les mollusques bivalves vivants. Journal officiel de l'Union Européenne L 220, 1.
- Anonyme, 2017. Règlement (UE) 2017/1980 de la Commission du 31 octobre 2017 modifiant l'annexe III du règlement (CE) N° 2074/2005 en ce qui concerne la méthode de détection des toxines paralysantes (paralytic shellfish poison — PSP). Journal officiel de l'Union Européenne L 285, 2.
- Anonymous, 2018. Molecular Components Map of Representative Matrices of Commodity Groups in document SANTE/11813/2017, p. 29.
- Anses, 2015. Guide de validation des méthodes d'analyses, p. 67.
- Apffel, A., Fischer, S., Goldberg, G., Goodley, P.C., Kuhlmann, F.E., 1995. Enhanced sensitivity for peptide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containing mobile phases. Journal of Chromatography A 712(1), 177-190.
- Baden, D.G., Bourdelais, A.J., Jacocks, H., Michelliza, S., Naar, J., 2005. Natural and derivative brevetoxins: historical background, multiplicity, and effects. Environmental health perspectives 113(5), 621-625.
- Bane, V., Hutchinson, S., Sheehan, A., Brosnan, B., Barnes, P., Lehane, M., Furey, A., 2016. LC-MS/MS method for the determination of tetrodotoxin (TTX) on a triple quadrupole mass spectrometer. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment 33(11), 1728-1740.
- Bane, V., Lehane, M., Dikshit, M., #039, Riordan, A., Furey, A., 2014. Tetrodotoxin: Chemistry, Toxicity, Source, Distribution and Detection. Toxins 6(2), 693.
- Banzhaf, S., Filipovic, M., Lewis, J., Sparrenbom, C.J., Barthel, R., 2017. A review of contamination of surface-, ground-, and drinking water in Sweden by perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFASs). Ambio 46(3), 335-346.
- Barbaro, E., Zangrando, R., Rossi, S., Cairns, W.R.L., Piazza, R., Corami, F., Barbante, C., Gambaro, A., 2013. Domoic acid at trace levels in lagoon waters: Assessment of a method using internal standard quantification. Analytical and Bioanalytical Chemistry 405(28), 9113-9123.
- Bates S, T.V., 2006. The ecology of harmful diatoms. In Ecology on Harmful Algae, Graneli E, Turner T Eds. Springer: Berlin, 189.
- Biré, R., Kryś, S., Frémy, J.M., Dragacci, S., 2003. Improved Solid-Phase Extraction Procedure in the Analysis of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(22), 6386-6390.
- Biré, R., Kryś, S., Frémy, J.M., Dragacci, S., Stirling, D., Kharrat, R., 2002. First evidence on occurrence of gymnodimine in clams from Tunisia. Journal of Natural Toxins 11(4), 269-275.
- Biré, R., Trotereau, S., Lemée, R., Delpont, C., Chabot, B., Aumond, Y., Kryś, S., 2013. Occurrence of palytoxins in marine organisms from different trophic levels of the French Mediterranean coast harvested in 2009. Harmful Algae 28, 10-22.
- Biré, R., Trotereau, S., Lemée, R., Oregioni, D., Delpont, C., Kryś, S., Guérin, T., 2015. Hunt for palytoxins in a wide variety of marine organisms harvested in 2010 on the French Mediterranean coast. Marine Drugs 13(8), 5425-5446.
- Blay, P., Hui, J.P.M., Chang, J., Melanson, J.E., 2011. Screening for multiple classes of marine biotoxins by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry 400(2), 577-585.
- Boada, L.D., 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.
- Botana, L.M., Alfonso, A., 2015. *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry: Second Edition*.
- 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. *Environ Sci Technol* 45(12), 5403-5409.
- Boudah, S., Olivier, M.-F., Aros-Calt, S., Oliveira, L., Fenaille, F., Tabet, J.-C., Junot, C., 2014. Annotation of the human serum metabolome by coupling three liquid chromatography methods to high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 966, 34-47.
- Boundy, M.J., Selwood, A.I., Harwood, D.T., McNabb, P.S., Turner, A.D., 2015. Development of a sensitive and selective liquid chromatography–mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction. *Journal of Chromatography A* 1387, 1-12.
- Braña-Magdalena, A., Leão-Martins, J.M., Glauner, T., Gago-Martínez, A., 2014. Intralaboratory validation of a fast and sensitive UHPLC/MS/MS method with fast polarity switching for the analysis of lipophilic shellfish toxins. *Journal of AOAC International* 97(2), 285-292.
- Brissard, C., Herrenknecht, C., Séchet, V., Hervé, F., Pisapia, F., Harcouet, J., Lémée, R., Chomérat, N., Hess, P., Amzil, Z., 2014a. Complex toxin profile of French Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* strains, seafood accumulation and ovatoxins prepurification. *Marine Drugs* 12(5), 2851-2876.
- Brissard, C., Herrenknecht, C., Séchet, V., Hervé, F., Pisapia, F., Harcouet, J., Lémée, R., Chomérat, N., Hess, P., Amzil, Z., 2014b. Complex Toxin Profile of French Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* Strains, Seafood Accumulation and Ovatoxins Prepurification. *Marine Drugs* 12(5), 2851.
- Buszewski, B., Noga, S., 2012. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402(1), 231-247.
- Caillaud, A., de la Iglesia, P., Barber, E., Eixarch, H., Mohammad-Noor, N., Yasumoto, T., Diogène, J., 2011. Monitoring of dissolved ciguatoxin and maitotoxin using solid-phase adsorption toxin tracking devices: Application to *Gambierdiscus pacificus* in culture. *Harmful Algae* 10, 433-446.
- 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.
- Cassiday, L., 2008. First report of TTX in a European trumpet shell. *Analytical Chemistry* 80(15), 5675-5675.
- Castro-Puyana, M., Pérez-Míguez, R., Montero, L., Herrero, M., 2017. Reprint of: Application of mass spectrometry-based metabolomics approaches for food safety, quality and traceability. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 96, 62-78.
- Cembella, A.D., Lewis, N.I., Quilliam, M.A., 2000. The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins. *Phycologia* 39(1), 67-74.
- Chen, J., Gao, L., Li, Z., Wang, S., Li, J., Cao, W., Sun, C., Zheng, L., Wang, X., 2016. Simultaneous screening for lipophilic and hydrophilic toxins in marine harmful algae using a serially coupled reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography separation system with high-resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*.
- Chinain, M., Gatti, C., Roué, M., Laurent, D., Darius, H.T., 2014. Ciguatera : aspects écologiques, biologiques et toxicologiques. *Revue Francophone des Laboratoires* 2014(460), 27-39.

- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Forino, M., Tartaglione, L., 2015. Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for palytoxins in mussels. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407(5), 1463-1473.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., 2011a. A 4-decade-long (and still ongoing) hunt for palytoxins chemical architecture. *Toxicon* 57(3), 362-367.
- 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., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, G.S., Tartaglione, L., Quilliam, M.A., Tubaro, A., Poletti, R., 2005. Hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry for determination of domoic acid in Adriatic shellfish. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19(14), 2030-2038.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E.D., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F., Pistocchi, R., 2010. Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24(18), 2735-2744.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E.D., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., 2011b. LC-MS of palytoxin and its analogues: State of the art and future perspectives. *Toxicon* 57(3), 376-389.
- Clayden, J., Read, B., Hebditch, K.R., 2005. Chemistry of domoic acid, isodomoic acids, and their analogues. *Tetrahedron* 61(24), 5713-5724.
- Combes, R.D., 2003. The mouse bioassay for diarrhetic shellfish poisoning: a gross misuse of laboratory animals and of scientific methodology. *Altern Lab Anim* 31(6), 595-610.
- Cotton, J., Leroux, F., Broudin, S., Poirel, M., Corman, B., Junot, C., Ducruix, C., 2016. Development and validation of a multiresidue method for the analysis of more than 500 pesticides and drugs in water based on on-line and liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Water Research* 104, 20-27.
- Creppy, E.E., Traoré, A., Baudrimont, I., Cascante, M., Carratú, M.-R., 2002. Recent advances in the study of epigenetic effects induced by the phycotoxin okadaic acid. *Toxicology* 181-182, 433-439.
- Daneshian, M., Botana, L.M., Bottein, M.Y.D., 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.
- de Fouw, J., van Egmond, H., Speijers, G., 2001. Ciguatera fish poisoning: a review, Ciguatera visvergiftiging; een overzicht. RIVM, p. 66.
- Dechraoui Bottein, M.-Y., Wang, Z., Ramsdell, J.S., 2011. Toxicokinetics of the ciguatoxin P-CTX-1 in rats after intraperitoneal or oral administration. *Toxicology* 284(1-3), 1-6.
- Deeds, J., Landsberg, J., Etheridge, S., Pitcher, G., Longan, S., 2008. Non-Traditional Vectors for Paralytic Shellfish Poisoning. *Marine Drugs* 6(2), 308.
- Dell'Aversano, C., Hess, P., Quilliam, M.A., 2005. Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. *Journal of Chromatography A* 1081(2), 190-201.
- Dell'Aversano, C., Hess, P., Quilliam, M.A., 2005. Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. *Journal of Chromatography A* 1081(2), 190-201.
- Dickey, R., 2008. Ciguatera toxins: chemistry, toxicology, and detection. *Seafood and Freshwater toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. Ed Botana LM, 479-500.

- Diogène, J., Reverté, L., Rambla-Alegre, M., Del Rió, V., De La Iglesia, P., Campàs, M., Palacios, O., Flores, C., Caixach, J., Ralijsaona, C., Razanajatovo, I., Pirog, A., Magalon, H., Arnich, N., Turquet, J., 2017. Identification of ciguatoxins in a shark involved in a fatal food poisoning in the Indian Ocean. *Scientific Reports* 7(1).
- Domènech, A., Cortés-Francisco, N., Palacios, O., Franco, J.M., Riobó, P., Llerena, J.J., Vichi, S., Caixach, J., 2014. Determination of lipophilic marine toxins in mussels. Quantification and confirmation criteria using high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1328, 16-25.
- 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.
- EFSA, 2008. Marine biotoxins in shellfish - Okadaic acid and analogues, scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA Journal* (589), 1-62.
- EFSA, 2009a. Marine biotoxins in shellfish - Domoic acid. *EFSA Journal* 1181, 1-61.
- EFSA, 2009b. Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish - palytoxin group. *EFSA J.* 7(12), 1393-1430.
- EFSA, 2010. Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Brevetoxin group. *EFSA Journal* 8(7), 29.
- Elgarch, A., Vale, P., Rifai, S., Fassouane, A., 2008a. Detection of Diarrheic Shellfish Poisoning and Azaspiracids Toxins in Moroccan Mussels: Comparison of LC-MS Method with the Commercial Immunoassay Kit. *Marine Drugs* 6(4), 587.
- Elgarch, A., Vale, P., Rifai, S., Fassouane, A., 2008b. Detection of Diarrheic Shellfish Poisoning and Azaspiracids Toxins in Moroccan Mussels: Comparison of LC-MS Method with the Commercial Immunoassay Kit. *Marine Drugs* 6(4), 587-594.
- FAO, 2004. Marine biotoxins. *FAO Food and Nutrition Paper* 80, 280.
- Farabegoli, F., Blanco, L., Rodríguez, L.P., Manuel Vieites, J., García Cabado, A., 2018. Phycotoxins in marine shellfish: Origin, occurrence and effects on humans. *Marine Drugs* 16(6).
- Farooq, A.V., Gibbons, A.G., Council, M.D., Harocopos, G.J., Holland, S., Judelson, J., Shoss, B.L., Schmidt, E.J., Md Noh, U.K., D'Angelo, A., Chundury, R.V., Judelson, R., Perez, V.L., Huang, A.J.W., 2017. Corneal Toxicity Associated With Aquarium Coral Palytoxin. *Am. J. Ophthalmol.* 174, 119-125.
- Ferrer, I., Thurman, E.M., 2003. Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry (LC/TOF/MS) for the analysis of emerging contaminants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22(10), 750-756.
- Fiehn, O., Putri, S.P., Saito, K., Salek, R.M., Creek, D.J., 2015. Metabolomics continues to expand: highlights from the 2015 metabolomics conference. *Metabolomics* 11(5), 1036-1040.
- Fuhrman, F.A., 1986. Tetrodotoxin, Tarichatoxin, and Chiriquitoxin: Historical Perspectives, *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp. 1-14.
- Furey, A., Crowley, J., Hamilton, B., Lehane, M., James, K.J., 2005. Strategies to avoid the misidentification of anatoxin-a using mass spectrometry in the forensic investigation of acute neurotoxic poisoning. *Journal of Chromatography A* 1082(1), 91-97.
- Gainey, L.F., Jr., 1998. A compendium of the responses of bivalve molluscs to toxic dinoflagellate. *J. Shellfish Res.* 7, 623-628.
- Gao, X., Zhang, Q., Meng, D., Isaac, G., Zhao, R., Fillmore, T.L., Chu, R.K., Zhou, J., Tang, K., Hu, Z., Moore, R.J., Smith, R.D., Katze, M.G., Metz, T.O., 2012. A reversed-phase capillary ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry (UPLC-MS) method for comprehensive top-down/bottom-up lipid profiling. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402(9), 2923-2933.
- García-Mendoza, E., Sánchez-Bravo, Y.A., Turner, A., Blanco, J., O'Neil, A., Mancera-Flores, J., Pérez-Brunius, P., Rivas, D., Almazán-Becerril, A., Peña-Manjarrez, J.L., 2014. Lipophilic toxins in cultivated mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Baja California, Mexico. *Toxicon* 90, 111-123.

- García, C., Truan, D., M., L., Santelices, J., Díaz, J.C., N., L., 2005. Metabolic transformation of dinophysistoxin-3 into dinophysistoxin-1 causes human intoxication by consumption of O-acyl-derivatives dinophysistoxins contaminated shellfish. *The Journal of Toxicological Sciences* 30, 9.
- Gerssen, A., Klijnsma, M.D., 2017. The Determination of Marine Biotoxins in Seafood, *Analysis of Food Toxins and Toxicants*, pp. 321-362.
- Gerssen, A., Mulder, P.P.J., McElhinney, M.A., de Boer, J., 2009. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A* 1216(9), 1421-1430.
- Gerssen, A., van Olst, E.H.W., Mulder, P.P.J., de Boer, J., 2010. In-house validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of lipophilic marine toxins in shellfish using matrix-matched calibration. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397(7), 3079-3088.
- González, A.V., Rodríguez-Velasco, M.L., Ben-Gigirey, B., Botana, L.M., 2006. First evidence of spirolides in Spanish shellfish. *Toxicon* 48(8), 1068-1074.
- Gorrochategui, E., Jaumot, J., Lacorte, S., Tauler, R., 2016. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 82, 425-442.
- Gossner, C., xe, line, M.-E., Schlundt, J., xf, rgen, Embarek, P.B., Hird, S., Lo-Fo-Wong, D., Beltran, J.J.O., Keng Ngee, T., Tritscher, A., 2009. The Melamine Incident: Implications for International Food and Feed Safety. *Environmental Health Perspectives* 117(12), 1803-1808.
- Granade, H.R., Bencsath, F.A., Dickey, R.W., 1992. Isolation of analogues of okadaic acid from cultures of *Prorocentrum lima*. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique* (1990) 85(5 Pt 2), 478-480.
- Gribble, K.E., Keafer, B.A., Quilliam, M.A., Cembella, A.D., Kulis, D.M., Manahan, A., Anderson, D.M., 2005. Distribution and toxicity of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in the Gulf of Maine, USA. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 52(19), 2745-2763.
- Guardian, T., 2017. Aldi pulls Dutch eggs in Germany as insecticide scandal widens. . <https://www.theguardian.com/lifeandstyle/2017/aug/05/aldi-pulls-dutch-eggs-in-germany-as-insecticide-scandal-widens> consulté le 03 octobre 2018.
- Gustavsson, S.Å., Samskog, J., Markides, K.E., Långström, B., 2001. Studies of signal suppression in liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents. *Journal of Chromatography A* 937(1), 41-47.
- Hallegraeff, G.M., 2010. Ocean climate change, phytoplankton community responses and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge. *Journal of Phycology* 46(2), 220-235.
- Halme, M., Rapinaja, M.-L., Karjalainen, M., Vanninen, P., 2012. Verification and quantification of saxitoxin from algal samples using fast and validated hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method. *Journal of Chromatography B* 880, 50-57.
- Hamilton, B., Hurbungs, M., Jones, A., Lewis, R.J., 2002. Multiple ciguatoxins present in Indian Ocean reef fish. *Toxicon* 40(9), 1347-1353.
- Hamilton, B., Whittle, N., Shaw, G., Eaglesham, G., Moore, M.R., Lewis, R.J., 2010. Human fatality associated with Pacific ciguatoxin contaminated fish. *Toxicon* 56(5), 668-673.
- Harju, K., Rapinaja, M.L., Avondet, M.A., Arnold, W., Schär, M., Burrell, S., Luginbühl, W., Vanninen, P., 2015. Optimization of sample preparation for the identification and quantification of saxitoxin in proficiency test mussel sample using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Toxins* 7(12), 4868-4880.
- Hemström, P., Irgum, K., 2006. Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* 29(12), 1784-1821.

- Hess, P., Aasen, J.A.B., 2007. Chemistry, Origins, and Distribution of Yessotoxin and its Analogues, *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*, pp. 187-202.
- Hess, P., Abadie, E., Hervé, F., Berteaux, T., Séchet, V., Aráoz, R., Molgó, J., Zakarian, A., Sibat, M., Rundberget, T., Miles, C.O., Amzil, Z., 2013. Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon. *Toxicon* 75, 16-26.
- Hess, P., Grune, B., Anderson, D.B., Aune, T., Botana, L.M., Caricato, P., van Egmond, H.P., Halder, M., Hall, S., Lawrence, J.F., Moffat, C., Poletti, R., Richmond, J., Rossini, G.P., Seamer, C., Vilageliu, J.S., 2006. Three Rs approaches in marine biotoxin testing. *ATLA-Alternatives to Lab Animals* 34, 32.
- Hess, P., Nguyen, L., Aasen, J., Keogh, M., Kilcoyne, J., McCarron, P., Aune, T., 2005. Tissue distribution, effects of cooking and parameters affecting the extraction of azaspiracids from mussels, *Mytilus edulis*, prior to analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Toxicon* 46(1), 62-71.
- Holmes, M.J., Teo, S.L.M., 2002. Toxic marine dinoflagellates in Singapore waters that cause seafood poisonings. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 29(9), 829-836.
- 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 ciguateras: LOAEL estimated from eight ciguatera fish poisoning events in Guadeloupe (French West Indies). *Environmental Research* 143, Part B, 100-108.
- Hotelling, H., 1933. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology* 24(6), 417-441.
- Hu, T., Burton, I.W., Cembella, A.D., Curtis, J.M., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Wright, J.L.C., 2001. Characterization of spirolides A, C, and 13-desmethyl C, new marine toxins isolated from toxic plankton and contaminated shellfish. *Journal of Natural Products* 64(3), 308-312.
- Hu, T., Curtis, J.M., Walter, J.A., McLachlan, J.L., Wright, J.L.C., 1995. Two new water-soluble dsp toxin derivatives from the dinoflagellate *Prorocentrum maculosum*: possible storage and excretion products. *Tetrahedron Letters* 36(51), 9273-9276.
- Hu, T., Doyle, J., Jackson, D., Marr, J., Nixon, E., Pleasance, S., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Wright, J.L.C., 1992. Isolation of a New Diarrhetic Shellfish Poison from Irish Mussels. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1, 39-41.
- Hua, Y., Cole, R.B., 2000. Electrospray ionization tandem mass spectrometry for structural elucidation of protonated brevetoxins in red tide algae. *Analytical Chemistry* 72(2), 376-383.
- Huang, B., Han, Z., Cai, Z., Wu, Y., Ren, Y., 2010. Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in peanuts and their derivative products by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 662(1), 62-68.
- Ibrahim, A.-R., Shier, W.T., 1987. Editorial Review: Palytoxin: Mechanism of Action of a Potent Marine Toxin. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* 6(2), 159-187.
- Ishida, H., Nozawa, A., Nukaya, H., Tsuji, K., 2004. Comparative concentrations of brevetoxins PbTx-2, PbTx-3, BTX-B1 and BTX-B5 in cockle, *Austrovenus stutchburyi*, greenshell mussel, *Perna canaliculus*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, involved neurotoxic shellfish poisoning in New Zealand. *Toxicon* 43(7), 779-789.
- Iverson, F., Truelove, J., Nera, E., Tryphonas, L., Campbell, J., Lok, E., 1989. Domoic acid poisoning and mussel-associated intoxication: Preliminary investigations into the response of mice and rats to toxic mussel extract. *Food and Chemical Toxicology* 27(6), 377-384.
- James, K.J., Fidalgo Sáez, M.J., Furey, A., Lehané, M., 2004. Azaspiracid poisoning, the food-borne illness associated with shellfish consumption. *Food Additives & Contaminants* 21(9), 879-892.

- James, K.J., Gillman, M., Amandi, M.F., López-Rivera, A., Puente, P.F., Lehane, M., Mitrovic, S., Furey, A., 2005. Amnesic shellfish poisoning toxins in bivalve molluscs in Ireland. *Toxicon* 46(8), 852-858.
- James, K.J., Moroney, C., Roden, C., Satake, M., Yasumoto, T., Lehane, M., Furey, A., 2003. Ubiquitous 'benign' alga emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, azaspiracid poisoning. *Toxicon* 41(2), 145-151.
- Jauffrais, T., Kilcoyne, J., Séchet, V., Herrenknecht, C., Truquet, P., Hervé, F., Bérard, J.B., Nulty, C., Taylor, S., Tillmann, U., Miles, C.O., Hess, P., 2012. Production and isolation of azaspiracid-1 and -2 from *Azadinium spinosum* culture in pilot scale photobioreactors. *Marine Drugs* 10(6), 1360-1382.
- Jen, H.C., Nguyen, T.A.T., Wu, Y.J., Hoang, T., Arakawa, O., Lin, W.F., Hwang, D.F., 2013. Tetrodotoxin and paralytic shellfish poisons in gastropod species from Vietnam analyzed by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*.
- Joreskog, K.G., 1982. The ML and PLS techniques for modeling with latent variables : Historical and comparative aspects. *Systems under Indirect Observation, Part I*, 263-270.
- Junot, C., 2010. L'analyse métabolomique par spectrométrie de masse: un nouvel outil pour la biochimie clinique ? *Bio tribune magazine* 34(1), 10-15.
- Kao, C.Y., 1966. Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacological Reviews* 18(2), 997-1049.
- Katajamaa, M., Orešič, M., 2005. Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. *BMC Bioinformatics* 6(1), 179.
- Kerbrat, A.S., Amzil, Z., Pawlowicz, 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*. *Mar Drugs* 9(4), 543-560.
- Kilcoyne, J., Fux, E., 2010. Strategies for the elimination of matrix effects in the liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of the lipophilic toxins okadaic acid and azaspiracid-1 in molluscan shellfish. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A* 1217(45), 7123-7130.
- Kirkland, J.J., 2004. Development of some stationary phases for reversed-phase HPLC. *Journal of Chromatography A* 1060(1), 9-21.
- Krauss, M., Singer, H., Hollender, J., 2010. LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397(3), 943-951.
- Krock, B., Seguel, C.G., Cembella, A.D., 2007. Toxin profile of *Alexandrium catenella* from the Chilean coast as determined by liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Harmful Algae* 6(5), 734-744.
- Krogh, P., 1979. Measurements of paralytic shellfish poisons. A review of biological and chemical procedures. *Nord Vet Med* 31(7-8), 302-308.
- Krys, S., Frémy, J.-M., 2002. Phycotoxines et produits de la mer: risques sanitaires associés et mesures de prévention. *Revue Française des Laboratoires* 2002(348), 29-38.
- Kunzelmann, M., Winter, M., Aberg, M., Hellenas, K.E., Rosen, J., 2018. Non-targeted analysis of unexpected food contaminants using LC-HRMS. *Anal Bioanal Chem* 410(22), 5593-5602.
- Lago, J., Rodriguez, L.P., Blanco, L., Vieites, J.M., Cabado, A.G., 2015. Tetrodotoxin, an extremely potent marine neurotoxin: Distribution, toxicity, origin and therapeutical uses. *Marine Drugs* 13(10), 6384-6406.
- Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P.A., Andrinolo, D., Azevedo, S.M.F.Q., Oshima, Y., 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37(10), 1359-1373.

- Le Boucher, C., Courant, F., Royer, A.-L., Jeanson, S., Lortal, S., Dervilly-Pinel, G., Thierry, A., Le Bizec, B., 2015. LC–HRMS fingerprinting as an efficient approach to highlight fine differences in cheese metabolome during ripening. *Metabolomics* 11(5), 1117-1130.
- Lenoir, S., Ten-Hage, L., Turquet, J., Quod, J.-P., Bernard, C., Hennion, M.-C., 2004. First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarensis* (Dinophyceae) benthic bloom in Southwestern Indian Ocean. *Journal of Phycology* 40(6), 1042-1051.
- Lewis, R.J., 1991. QDPI research on ciguatera. *Bulletin La ciguatera* 1, 5.
- Li, S.-L., Shen, H., Zhu, L.-Y., Xu, J., Jia, X.-B., Zhang, H.-M., Lin, G., Cai, H., Cai, B.-C., Chen, S.-L., Xu, H.-X., 2012. Ultra-high-performance liquid chromatography–quadrupole/time of flight mass spectrometry based chemical profiling approach to rapidly reveal chemical transformation of sulfur-fumigated medicinal herbs, a case study on white ginseng. *Journal of Chromatography A* 1231, 31-45.
- Li, X., Li, Z., Chen, J., Shi, Q., Zhang, R., Wang, S., Wang, X., 2014. Detection, occurrence and monthly variations of typical lipophilic marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning in the coastal seawater of Qingdao City, China. *Chemosphere* 111, 560-567.
- Lin, C.L., Wu, Y.J., Lin, W.F., Hsieh, C.H., Hsieh, Y.L., Hwang, D.F., 2014. Seasonal characteristics and tetrodotoxin-producing ability of bacteria in gastropod *Oliva hirasei*. *Hydrobiologia* 741(1), 23-32.
- Louzao, M.C., Ares, I.R., Cagide, E., 2008. Marine toxins and the cytoskeleton: a new view of palytoxin toxicity. *The FEBS Journal* 275(24), 6067-6074.
- Lu, W., Bennett, B.D., Rabinowitz, J.D., 2008. Analytical strategies for LC–MS-based targeted metabolomics. *Journal of Chromatography B* 871(2), 236-242.
- MacKenzie, L., Holland, P., McNabb, P., Beuzenberg, V., Selwood, A., Suzuki, T., 2002. Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. *Toxicon* 40(9), 1321-1330.
- MacKinnon, S.L., Walter, J.A., Quilliam, M.A., Cembella, A.D., LeBlanc, P., Burton, I.W., Hardstaff, W.R., Lewis, N.I., 2006. Spirolides isolated from Danish strains of the toxigenic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *Journal of Natural Products* 69(7), 983-987.
- Maeda, M., Kodama, T., Tanaka, T., Ohfune, Y., Nomoto, K., Nishimura, K., Fujita, T., 1984. Insecticidal and Neuromuscular Activities of Domoic Acid and Its Related Compounds. *Journal of Pesticide Science* 9(1), 27-32.
- Mak, Y.L., Wai, T.C., Murphy, M.B., Chan, W.H., Wu, J.J., Lam, J.C., Chan, L.L., Lam, P.K., 2013. Pacific ciguatoxins in food web components of coral reef systems in the republic of kiribati. *Environ Sci Technol* 47(24), 14070-14079.
- Makarov, A., 2000. Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Analytical Chemistry* 72(6), 1156-1162.
- Marrouchi, R., 2008. Les spirolides : une famille de toxines émergentes qui contaminent les mollusques bivalves, In: Benoit, E., Goudey-Perrière, F., Marchot, P., Servent, D. (Eds.), *Toxines et fonctions cholinergiques neuronales et non neuronales*, pp. 13-17.
- Martinez I, J.D., Loréal H. , 2005. Application of modern analytical techniques to ensure seafood safety and authenticity. Food and Agriculture Organization of the United Nations 2005.
- Mattarozzi, M., Bianchi, F., Milioli, M., Cavazza, A., Careri, M., 2016a. An innovative method based on quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction coupled to desorption electrospray ionization-high resolution mass spectrometry for screening the presence of paralytic shellfish toxins in clams. *Talanta* 147, 416-421.
- Mattarozzi, M., Milioli, M., Bianchi, F., Cavazza, A., Pigozzi, S., Milandri, A., Careri, M., 2016b. Optimization of a rapid QuEChERS sample treatment method for HILIC-MS2 analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in mussels. *Food Control* 60, 138-145.
- McCarron, P., Rourke, W.A., Hardstaff, W., Pooley, B., Quilliam, M.A., 2012. Identification of pinnatoxins and discovery of their fatty acid ester metabolites in mussels (*mytilus*

- edulis) from eastern Canada. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(6), 1437-1446.
- McCarron, P., Wright, E., Quilliam, M.A., 2014. Liquid chromatography/mass spectrometry of domoic acid and lipophilic shellfish toxins with selected reaction monitoring and optional confirmation by library searching of product ion spectra. *Journal of AOAC International* 97(2), 316-324.
- McNabb, P., Selwood, A.I., Holland, P.T., 2005. Multiresidue method for determination of algal toxins in shellfish: Single-laboratory validation and interlaboratory study. *Journal of AOAC International* 88(3), 761-772.
- McNabb, P., Selwood, A.I., Munday, R., Wood, S.A., Taylor, D.I., MacKenzie, L.A., van Ginkel, R., Rhodes, L.L., Cornelisen, C., Heasman, K., Holland, P.T., King, C., 2010. Detection of tetrodotoxin from the grey side-gilled sea slug - *Pleurobranchaea maculata*, and associated dog neurotoxicosis on beaches adjacent to the Hauraki Gulf, Auckland, New Zealand. *Toxicon* 56(3), 466-473.
- McNabb, P.S., Selwood, A.I., Van Ginkel, R., Boundy, M., Holland, P.T., 2012. Determination of brevetoxins in shellfish by LC/MS/MS: Single-laboratory validation. *Journal of AOAC International* 95(4), 1097-1105.
- Mebs, D., Arakawa, O., Yotsu-Yamashita, M., 2010. Tissue distribution of tetrodotoxin in the red-spotted newt *Notophthalmus viridescens*. *Toxicon* 55(7), 1353-1357.
- Miles, C.O., Samdal, I.A., Aasen, J.A.G., Jensen, D.J., Quilliam, M.A., Petersen, D., Briggs, L.M., Wilkins, A.L., Rise, F., Cooney, J.M., Lincoln MacKenzie, A., 2005. Evidence for numerous analogs of yessotoxin in *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae* 4(6), 1075-1091.
- Miles, C.O., Wilkins, A.L., Munday, R., Dines, M.H., Hawkes, A.D., Briggs, L.R., Sandvik, M., Jensen, D.J., Cooney, J.M., Holland, P.T., Quilliam, M.A., Lincoln MacKenzie, A., Beuzenberg, V., Towers, N.R., 2004. Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities. *Toxicon* 43(1), 1-9.
- Miles, C.O., Wilkins, A.L., Stirling, D.J., MacKenzie, A.L., 2000. New analogue of gymnodimine from a *Gymnodinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(4), 1373-1376.
- Miles, C.O., Wilkins, A.L., Stirling, D.J., Mackenzie, A.L., 2003. Gymnodimine C, an isomer of gymnodimine B, from *Karenia selliformis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(16), 4838-4840.
- Mondeguer, F., 2015. La métabolomique et les biotoxines marines. *Anses - Bulletin de veille scientifique* 29, 5.
- 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., Shimatani, M., Sugitani, H., Oshima, Y., Yasumoto, T., 1982. Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48, 549-552.
- 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.
- Naar, J.P., Flewelling, L.J., Lenzi, A., Abbott, J.P., Granholm, A., Jacocks, H.M., Gannon, D., Henry, M., Pierce, R., Baden, D.G., Wolny, J., Landsberg, J.H., 2007. Brevetoxins, like ciguatoxins, are potent ichthyotoxic neurotoxins that accumulate in fish. *Toxicon* 50(5), 707-723.
- Narahashi, T., Haas, H.G., Therrien, E.F., 1967. Saxitoxin and tetrodotoxin: Comparison of nerve blocking mechanism. *Science* 157(3795), 1438-1440.

- Nézan, E., Chomérat, N., 2011. *Vulcanodinium rugosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae), un Nouveau Dinoflagellé Marin de la Côte Méditerranéenne Française. *Cryptogamie, Algologie* 32(1), 3-18.
- Nicolas, J., Hoogenboom, R.L.A.P., Hendriksen, P.J.M., Boderó, 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.
- Nielsen, L.T., Hansen, P.J., Krock, B., Vismann, B., 2016. Accumulation, transformation and breakdown of DSP toxins from the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* in blue mussels, *Mytilus edulis*. *Toxicon* 117, 84-93.
- Nonomura, T., Sasaki, M., Matsumori, N., Murata, M., Tachibana, K., Yasumoto, T., 1996. The Complete Structure of Maitotoxin, Part II: Configuration of the C135-C142 Side Chain and Absolute Configuration of the Entire Molecule. *Angewandte Chemie International Edition in English* 35(15), 1675-1678.
- Nozawa, A., Tsuji, K., Ishida, H., 2003. Implication of brevetoxin B1 and PbTx-3 in neurotoxic shellfish poisoning in New Zealand by isolation and quantitative determination with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Toxicon* 42(1), 91-103.
- Onuma, Y., Satake, M., Ukena, T., Roux, J., Chanteau, S., Rasolofonirina, N., Ratsimaloto, M., Naoki, H., Yasumoto, T., 1999. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon* 37(1), 55-65.
- Orellana, G., Vanden Bussche, J., Van Meulebroek, L., Vandegheuchte, M., Janssen, C., Vanhaecke, L., 2014. Validation of a confirmatory method for lipophilic marine toxins in shellfish using UHPLC-HR-Orbitrap MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406(22), 5303-5312.
- Otero, A., Chapela, M.-J., Atanassova, M., Vieites, J.M., Cabado, A.G., 2011. Cyclic Imines: Chemistry and Mechanism of Action: A Review. *Chemical Research in Toxicology* 24(11), 1817-1829.
- Pardo, O., Yusà, V., León, N., Pastor, A., 2007. Development of a pressurised liquid extraction and liquid chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for the determination of domoic acid in shellfish. *Journal of Chromatography A* 1154(1), 287-294.
- Paredes, I., Rietjens, I.M.C.M., Vieites, J.M., Cabado, A.G., 2011. Update of risk assessments of main marine biotoxins in the European Union. *Toxicon* 58(4), 336-354.
- Patocka, J., Gupta, R.C., Wu, Q.H., Kuca, K., 2015. Toxic potential of palytoxin. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science* 35(5), 773-780.
- Paz, B., Riobó, P., Luisa Fernández, M., Fraga, S., Franco, J.M., 2004. Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture. *Toxicon* 44(3), 251-258.
- Pelin, M., Brovedani, V., Sosa, S., Tubaro, A., 2016. Palytoxin-containing aquarium soft corals as an emerging sanitary problem. *Marine Drugs* 14(2).
- Pereira, H., Martin, J.-F., Joly, C., Sébédio, J.-L., Pujos-Guillot, E., 2010. Development and validation of a UPLC/MS method for a nutritional metabolomic study of human plasma. *Metabolomics* 6(2), 207-218.
- Perl, T.M., Teitelbaum, J., Hockin, J., Todd, E.C., 1990. Domoic acid toxicity. Panel discussion: definition of the syndrome. *Canada diseases weekly report* 16 Suppl 1E, 41-45.
- Pierce, R.H., Henry, M.S., 2008. Harmful algal toxins of the Florida red tide (*Karenia brevis*): Natural chemical stressors in South Florida coastal ecosystems. *Ecotoxicology* 17(7), 623-631.
- Pitcher, G.C., Cembella, A.D., Joyce, L.B., Larsen, J., Probyn, T.A., Ruiz Sebastián, C., 2007. The dinoflagellate *Alexandrium minutum* in Cape Town harbour (South Africa): Bloom characteristics, phylogenetic analysis and toxin composition. *Harmful Algae* 6(6), 823-836.

- Plakas, S.M., Dickey, R.W., 2010. Advances in monitoring and toxicity assessment of brevetoxins in molluscan shellfish. *Toxicon* 56(2), 137-149.
- Poyer, S., Loutelier-Bourhis, C., Coadou, G., Mondeguer, F., Enche, J., Bossée, A., Hess, P., Afonso, C., 2015. Identification and separation of saxitoxins using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to traveling wave ion mobility-mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 50(1), 175-181.
- Quilliam, M.A., 2001. Recent developments in the analysis of phycotoxins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Mycotoxins and phycotoxins. Proceedings of the Xth International IUPAC Symposium on Guarujá, Brazil, 2001*, 383-391.
- Quilliam, M.A., 2003. The role of chromatography in the hunt for red tide toxins. *Journal of Chromatography A* 1000(1-2), 527-548.
- Ramos, V., Vasconcelos, V., 2010. Palytoxin and Analogs: Biological and Ecological Effects. *Marine Drugs* 8(7), 2021.
- Regueiro, J., Álvarez, G., Mauriz, A., Blanco, J., 2011a. High throughput analysis of amnesic shellfish poisoning toxins in bivalve molluscs by dispersive solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography using a monolithic column. *Food Chemistry* 127(4), 1884-1891.
- Regueiro, J., Rossignoli, A.E., Álvarez, G., Blanco, J., 2011b. Automated on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of lipophilic marine toxins in shellfish. *Food Chemistry* 129(2), 533-540.
- Reguera, B., Riobó, P., Rodríguez, F., Díaz, P.A., Pizarro, G., Paz, B., Franco, J.M., Blanco, J., 2014. Dinophysis toxins: Causative organisms, distribution and fate in shellfish. *Marine Drugs* 12(1), 394-461.
- Rehmann, N., Hess, P., Quilliam, M.A., 2008. Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels (*Mytilus edulis*) by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22(4), 549-558.
- Rhodes, L., Selwood, A., McNabb, P., Briggs, L., Adamson, J., Van Ginkel, R., Laczka, O., 2006. Trace metal effects on the production of biotoxins by microalgae. *African Journal of Marine Science* 28(2), 393-397.
- Richard, D., Arsenault, E., Cembella, A., Quilliam, M., 2001. Investigations into the toxicology and pharmacology of spirolides - a novel group of putative biotoxins, In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J. (Eds.), *Harmful Algal Blooms 2000. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris*, pp. 383-387.
- Robertson, A., Garcia, A.C., Quintana, H.A., Smith, T.B., Ii, B.F., Reale-Munroe, K., Gulli, J.A., Olsen, D.A., Hooe-Rollman, J.I., Jester, E.L., Klimek, B.J., Plakas, S.M., 2013. Invasive Lionfish (*Pterois volitans*): A Potential Human Health Threat for Ciguatera Fish Poisoning in Tropical Waters. *Mar Drugs* 12(1), 88-97.
- Robertson, A., Stirling, D., Robillot, C., Llewellyn, L., Negri, A., 2004. First report of saxitoxin in octopi. *Toxicon* 44(7), 765-771.
- Rodríguez, L.P., González, V., Martínez, A., Paz, B., Lago, J., Cordeiro, V., Blanco, L., Vieites, J.M., Cabado, A.G., 2015. Occurrence of lipophilic marine toxins in shellfish from Galicia (NW of Spain) and synergies among them. *Marine Drugs* 13(4), 1666-1687.
- Rodriguez, P., Alfonso, A., Vale, C., Alfonso, C., Vale, P., Tellez, A., Botana, L.M., 2008. First Toxicity Report of Tetrodotoxin and 5,6,11-TrideoxyTTX in the Trumpet Shell *Charonia lampas lampas* in Europe. *Analytical Chemistry* 80(14), 5622-5629.
- 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.
- Ronzitti, G., Hess, P., Rehmann, N., Rossini, G.P., 2007. Azaspiracid-1 Alters the E-cadherin Pool in Epithelial Cells. *Toxicological Sciences* 95(2), 427-435.

- Rossi, R., Castellano, V., Scalco, E., Serpe, L., Zingone, A., Soprano, V., 2010. New palytoxin-like molecules in Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* (dinoflagellates) and in *Palythoa tuberculosa* detected by liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Toxicon* 56(8), 1381-1387.
- Rúbies, A., Muñoz, E., Gibert, D., Cortés-Francisco, N., Granados, M., Caixach, J., Centrich, F., 2015. New method for the analysis of lipophilic marine biotoxins in fresh and canned bivalves by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry: A quick, easy, cheap, efficient, rugged, safe approach. *Journal of Chromatography A* 1386, 62-73.
- Rundberget, T., Aasen, J.A.B., Selwood, A.I., Miles, C.O., 2011. Pinnatoxins and spirolides in Norwegian blue mussels and seawater. *Toxicon* 58(8), 700-711.
- Ruttkies, C., Schymanski, E.L., Wolf, S., Hollender, J., Neumann, S., 2016. MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation. *Journal of Cheminformatics* 8(1), 3.
- Satake, M., Ichimura, T., Sekiguchi, K., Yoshimatsu, S., Oshima, Y., 1999. Confirmation of yessotoxin and 45,46,47-trinoryessotoxin production by *protoceratium reticulatum* collected in Japan. *Natural Toxins* 7(4), 147-150.
- Schantz, E.J., 1969. Studies on shellfish poisons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 17(3), 413-416.
- Schmitt, C., Torrents, R., Domangé, B., Glaizal, M., Simon, N., de Haro, L., 2018. Palytoxin poisoning with soft coral from a tank in France: 3 cases reports. *Presse Med.* 47(2), 178-180.
- Schymanski, E.L., Singer, H.P., Slobodnik, J., Ipolyi, I.M., Oswald, P., Krauss, M., Schulze, T., Haglund, P., Letzel, T., Grosse, S., Thomaidis, N.S., Bletsou, A., Zwiener, C., Ibáñez, M., Portolés, T., de Boer, R., Reid, M.J., Onghena, M., Kunkel, U., Schulz, W., Guillon, A., Noyon, N., Leroy, G., Bados, P., Bogialli, S., Stipaničev, D., Rostkowski, P., Hollender, J., 2015. Non-target screening with high-resolution mass spectrometry: critical review using a collaborative trial on water analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407(21), 6237-6255.
- Seki, T., Satake, M., Mackenzie, L., Kaspar, H.F., Yasumoto, T., 1995. Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand oysters and the dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. *Tetrahedron Letters* 36(39), 7093-7096.
- Selwood, A.I., Miles, C.O., Wilkins, A.L., van Ginkel, R., Munday, R., Rise, F., McNabb, P., 2010. Isolation, Structural Determination and Acute Toxicity of Pinnatoxins E, F and G. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(10), 6532-6542.
- Selwood, A.I., van Ginkel, R., Harwood, D.T., McNabb, P.S., Rhodes, L.R., Holland, P.T., 2012. A sensitive assay for palytoxins, ovatoxins and ostreocins using LC-MS/MS analysis of cleavage fragments from micro-scale oxidation. *Toxicon* 60(5), 810-820.
- Selwood, A.I., Wilkins, A.L., Munday, R., Shi, F., Rhodes, L.L., Holland, P.T., 2013. Portimine: A bioactive metabolite from the benthic dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*. *Tetrahedron Letters* 54(35), 4705-4707.
- Shumway, S.E., Cucci, T.L., 1987. The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behaviour of bivalve molluscs. *Aquatic Toxicology* 10(1), 9-27.
- 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., Pratheepa, V.K., Botana, L.M., Vasconcelos, V., 2015a. Emergent toxins in north Atlantic temperate waters: A challenge for monitoring programs and legislation. *Toxins* 7(3), 859-885.
- Silva, M., Rodriguez, I., Barreiro, A., Kaufmann, M., Neto, A.I., Hassouani, M., Sabour, B., Alfonso, A., Botana, L.M., Vasconcelos, V., 2015b. First report of ciguatoxins in two starfish species: *Ophidiaster ophidianus* and *Marthasterias glacialis*. *Toxins* 7(9), 3740-3757.

- Sleno, L., Windust, A.J., Volmer, D.A., 2004. Structural study of spirolide marine toxins by mass spectrometry: Part I. Fragmentation pathways of 13-desmethyl spirolide C by collision-induced dissociation and infrared multiphoton dissociation mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(4), 969-976.
- Smith, C.A., Want, E.J., O'Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G., 2006. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Analytical Chemistry* 78(3), 779-787.
- Sommer, H., Meyer, K.F., 1937. Paralytic Shell-Fish Poisoning. *Arch. Pathol.* 24, 560-598.
- Stabell, O.B., Steffenak, I., Aune, T., 1992. An evaluation of the mouse bioassay applied to extracts of 'diarrhoetic' shellfish toxins. *Food and Chemical Toxicology* 30(2), 139-144.
- Stewart, I., Eaglesham, G.K., Poole, S., Graham, G., Paulo, C., Wickramasinghe, W., Sadler, R., Shaw, G.R., 2010. Establishing a public health analytical service based on chemical methods for detecting and quantifying Pacific ciguatoxin in fish samples. *Toxicon* 56(5), 804-812.
- Stewart, I., McLeod, C., 2014. The Laboratory Mouse in Routine Food Safety Testing for Marine Algal Biotoxins and Harmful Algal Bloom Toxin Research: Past, Present and Future. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL* 97(2), 356-372.
- Su, Z., Sheets, M., Ishida, H., Li, F., Barry, W.H., 2004. Saxitoxin Blocks L-Type ICa. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308(1), 324-329.
- Suarez-Gomez, B., Souto, M.L., Norte, M., Fernandez, J.J., 2001. Isolation and structural determination of DTX-6, a new okadaic acid derivative. *Journal of Natural Products* 64(10), 1363-1364.
- Suehiro, M., 1994. [Historical review on chemical and medical studies of globefish toxin before World War II]. *Yakushigaku Zasshi* 29(3), 428-434.
- Suzuki, T., Beuzenberg, V., Mackenzie, L., Quilliam, M.A., 2003. Liquid chromatography-mass spectrometry of spiroketal stereoisomers of pectenotoxins and the analysis of novel pectenotoxin isomers in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand. *Journal of Chromatography A* 992(1-2), 141-150.
- Suzuki, T., Uchida, H., Watanabe, R., 2017. LC/MS Analysis of Marine Toxins, In: Diogène, J., Campàs, M. (Eds.), *Comprehensive Analytical Chemistry - Recent Advances in the Analysis of Marine Toxins*. Elsevier, p. 43.
- Tachibana, K., Scheuer, P.J., Tsukitani, Y., Kikuchi, H., Van Engen, D., Clardy, J., Gopichand, Y., Schmitz, F.J., 1981. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *Journal of the American Chemical Society* 103(9), 2469-2471.
- Takada, N., Umemura, N., Suenaga, K., Uemura, D., 2001. Structural determination of pteriatoxins A, B and C, extremely potent toxins from the bivalve *Pteria penguin*. *Tetrahedron Letters* 42(20), 3495-3497.
- Takemoto, T., Daigo, K., 1958. Constituents of *Chondria armata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 6(5), 578-580.
- Tartaglione, L., Dell'Aversano, C., Mazzeo, A., Forino, M., Wieringa, A., Ciminiello, P., 2016a. Determination of Palytoxins in Soft Coral and Seawater from a Home Aquarium. Comparison between Palythoa- and *Ostreopsis*-Related Inhalatory Poisonings. *Environmental Science and Technology* 50(2), 1023-1030.
- Tartaglione, L., Pelin, M., Morpurgo, M., Dell'Aversano, C., Montenegro, J., Sacco, G., Sosa, S., Reimer, J.D., Ciminiello, P., Tubaro, A., 2016b. An aquarium hobbyist poisoning: Identification of new palytoxins in *Palythoa* cf. *toxica* and complete detoxification of the aquarium water by activated carbon. *Toxicon* 121, 41-50.
- Tengstrand, E., Rosén, J., Hellenäs, K.-E., Åberg, K.M., 2013. A concept study on non-targeted screening for chemical contaminants in food using liquid chromatography-mass spectrometry in combination with a metabolomics approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(4), 1237-1243.

- These, A., Klemm, C., Nausch, I., Uhlig, S., 2011. 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* 399(3), 1245-1256.
- Tikunov, Y., Lommen, A., de Vos, C.H.R., Verhoeven, H.A., Bino, R.J., Hall, R.D., Bovy, A.G., 2005. A Novel Approach for Nontargeted Data Analysis for Metabolomics. Large-Scale Profiling of Tomato Fruit Volatiles. *Plant Physiology* 139(3), 1125-1137.
- Tindall, D.R., Dickey, R. W., Carlson, R.D. & Morey-Gaines, G., 1984. Ciguatoxic dinoflagellates from the Caribbean sea. In *sea food toxins*, 225-240.
- Torgersen, T., Bremnes, N.B., Rundberget, T., Aune, T., 2008. Structural confirmation and occurrence of azaspiracids in Scandinavian brown crabs (*Cancer pagurus*). *Toxicon* 51(1), 93-101.
- Tubaro, A., Sosa, S., Altinier, G., Soranzo, M.R., Satake, M., Della Loggia, R., Yasumoto, T., 2004. Short-term oral toxicity of homoyessotoxins, yessotoxin and okadaic acid in mice. *Toxicon* 43(4), 439-445.
- Turner, A.D., Dhanji-Rapkova, M., Coates, L., Bickerstaff, L., Milligan, S., O'Neill, A., Faulkner, D., McEneny, H., Baker-Austin, C., Lees, D.N., Algoet, M., 2017. Detection of Tetrodotoxin Shellfish Poisoning (TSP) toxins and causative factors in bivalve molluscs from the UK. *Marine Drugs* 15(9).
- Turner, A.D., Higgins, C., Davidson, K., Veszelovszki, A., Payne, D., Hungerford, J., Higman, W., 2015a. Potential threats posed by new or emerging marine biotoxins in UK waters and examination of detection methodology used in their control: Brevetoxins. *Marine Drugs* 13(3), 1224-1254.
- Turner, A.D., Higgins, C., Higman, W., Hungerford, J., 2015b. Potential threats posed by tetrodotoxins in UK waters: Examination of detection methodology used in their control. *Marine Drugs* 13(12), 7357-7376.
- Turner, A.D., McNabb, P.S., Harwood, D.T., Selwood, A.I., Boundy, M.J., 2015c. Single-laboratory validation of a multitoxin ultra- performance LC-hydrophilic interaction LC-MS/MS method for quantitation of paralytic shellfish toxins in bivalve shellfish. *Journal of AOAC International* 98(3), 609-621.
- Turrell, E., Stobo, L., Lacaze, J.P., Piletsky, S., Piletska, E., 2008. Optimization of hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry and development of solid-phase extraction for the determination of paralytic shellfish poisoning toxins. *Journal of AOAC International* 91(6), 1372-1386.
- Twiner, M., Rehmann, N., Hess, P., Doucette, G., 2008. Azaspiracid Shellfish Poisoning: A Review on the Chemistry, Ecology, and Toxicology with an Emphasis on Human Health Impacts. *Marine Drugs* 6(2), 39.
- Vale, P., Botelho, M.J., Rodrigues, S.M., Gomes, S.S., Sampayo, M.A.d.M., 2008. Two decades of marine biotoxin monitoring in bivalves from Portugal (1986–2006): A review of exposure assessment. *Harmful Algae* 7(1), 11-25.
- van den Top, H.J., Gerssen, A., McCarron, P., van Egmond, H.P., 2011. Quantitative determination of marine lipophilic toxins in mussels, oysters and cockles using liquid chromatography-mass spectrometry: Inter-laboratory validation study. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 28(12), 1745-1757.
- Van Dolah, F.M., 2000. Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspectives* 108(SUPPL. 1), 133-141.
- Vilariño, N., Louzao, M.C., Abal, P., Cagide, E., Carrera, C., Vieytes, M.R., Botana, L.M., 2018. Human poisoning from marine toxins: Unknowns for optimal consumer protection. *Toxins* 10(8).

- Vilariño, N., Louzao, M.C., Fraga, M., Rodríguez, L.P., Botana, L.M., 2013. Innovative detection methods for aquatic algal toxins and their presence in the food chain. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(24), 7719-7732.
- Visciano, P., Schirone, M., Berti, M., Milandri, A., Tofalo, R., Suzzi, G., 2016. Marine Biotoxins: Occurrence, Toxicity, Regulatory Limits and Reference Methods. *Front Microbiol* 7, 1051.
- Wang, Z., Maucher-Fuquay, J., Fire, S.E., Mikulski, C.M., Haynes, B., Doucette, G.J., Ramsdell, J.S., 2012. Optimization of solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of domoic acid in seawater, phytoplankton, and mammalian fluids and tissues. *Analytica Chimica Acta* 715, 71-79.
- Watkins, S.M., Reich, A., Fleming, L.E., Hammond, R., 2008. Neurotoxic shellfish poisoning. *Marine Drugs* 6(3), 431-455.
- Werner, E., Heilier, J.-F., Ducruix, C., Ezan, E., Junot, C., Tabet, J.-C., 2008. Mass spectrometry for the identification of the discriminating signals from metabolomics: Current status and future trends. *Journal of Chromatography B* 871(2), 143-163.
- Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C., Neilan, B.A., 2010. Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs. *Marine Drugs* 8(7), 2185.
- Wilson, I.D., Plumb, R., Granger, J., Major, H., Williams, R., Lenz, E.M., 2005. HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics. *Journal of Chromatography B* 817(1), 67-76.
- Wold, S., Esbensen, K., Geladi, P., 1987. Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2(1), 37-52.
- Wong, C.K., Hung, P., Lo, J.Y., 2014. Ciguatera fish poisoning in Hong Kong-A 10-year perspective on the class of ciguatoxins. *Toxicon* 86, 96-106.
- Wright, J.L.C., Boyd, R.K., De Freitas, A.S.W., Falk, M., Foxall, R.A., Jamieson, W.D., Laycock, M.V., McCulloch, A.W., McInnes, A.G., Odense, P., Pathak, V.P., Quilliam, M.A., Ragan, M.A., Sim, P.G., Thibault, P., Walter, J.A., Gilgan, M., Richard, D.J.A., Dewar, D., 1989. Identification of domoic acid a neuroexcitatory amino acid in toxic mussels from eastern prince edward island canada. *CAN J CHEM* 67(3), 481-490.
- Wu, C.H., 2009. Palytoxin: Membrane mechanisms of action. *Toxicon* 54(8), 1183-1189.
- Wu, H., Guo, M., Tan, Z., Cheng, H., Li, Z., Zhai, Y., 2014a. Liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry for multiclass screening and identification of lipophilic marine biotoxins in bivalve mollusks. *Journal of Chromatography A* 1358, 172-180.
- Wu, J.J., Mak, Y.L., Murphy, M.B., Lam, J.C., Chan, W.H., Wang, M., Chan, L.L., Lam, P.K., 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. *Anal Bioanal Chem* 400(9), 3165-3175.
- Wu, Y.-J., Lin, C.-L., Chen, C.-H., Hsieh, C.-H., Jen, H.-C., Jian, S.-J., Hwang, D.-F., 2014b. Toxin and species identification of toxic octopus implicated into food poisoning in Taiwan. *Toxicon* 91, 96-102.
- Xiao, M., Chen, H., Shi, Z., Feng, Y., Rui, W., 2014. Rapid and reliable method for analysis of raw and honey-processed astragalus by UPLC/ESI-Q-TOF-MS using HSS T3 columns. *Analytical Methods* 6(19), 8045-8054.
- Xin, H., Stone, R., 2008. Chinese Probe Unmasks High-Tech Adulteration With Melamine. *Science* 322(5906), 1310-1311.
- Yasumoto, Naoko, Murakami, 1987. Marine Toxins Produced by Marine Dinoflagellates. *Biol Bull* 172, 128-131.
- Yasumoto, T., 1985. Recent progress in the chemistry of dinoflagellate toxins, In: Anderson, White, Baden (Eds.), *Toxic Dinoflagellate*. Elsevier Science Publishing Co., Inc., pp. 259-270.
- 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 spectrometry. *J AM CHEM SOC* 122(20), 4988-4989.

- Yasumoto, T., Murata, M., 1993. Marine toxins. *Chemical Reviews* 93(5), 1897-1909.
- 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. *J AOAC Int* 97(2), 398-402.
- Zaman, L., Arakawa, O., Shimosu, A., Onoue, Y., Nishio, S., Shida, Y., Noguchi, T., 1997. Two new isomers of domoic acid from a red alga, *Chondria armata*. *Toxicon* 35(2), 205-212.
- Zendong, Z., Bertrand, S., Herrenknecht, C., Abadie, E., Jauzein, C., Lemée, R., Gouriou, J., Amzil, Z., Hess, P., 2016. Passive Sampling and High Resolution Mass Spectrometry for Chemical Profiling of French Coastal Areas with a Focus on Marine Biotoxins. *Environmental Science and Technology* 50(16), 8522-8529.
- Zendong, Z., McCarron, P., Herrenknecht, C., Sibat, M., Amzil, Z., Cole, R.B., Hess, P., 2015. High resolution mass spectrometry for quantitative analysis and untargeted screening of algal toxins in mussels and passive samplers. *Journal of Chromatography A* 1416, 10-21.
- Zhang, A., Sun, H., Wang, X., 2012. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for disease: A systematic review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404(4), 1239-1245.
- Zhang, Y., Chen, D., Hong, Z., 2015. A rapid LC-HRMS method for the determination of domoic acid in urine using a self-assembly pipette tip solid-phase extraction. *Toxins* 8(1).
- Zhao, Y.-Y., Zhang, L., Long, F.-Y., Cheng, X.-L., Bai, X., Wei, F., Lin, R.-C., 2013. UPLC-Q-TOF/HSMS/MSE-based metabonomics for adenine-induced changes in metabolic profiles of rat faeces and intervention effects of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one. *Chemico-Biological Interactions* 201(1), 31-38.
- Zhuo, L., Fu, W., Yang, Y., Qiu, B., Lin, Z., Shan, L., Zheng, L., Li, J., Chen, G., 2014. Simultaneous determination of biotoxins DSP and AZAs in bivalve molluscs and fish by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 28(13), 1479-1488.
- Zhuo, L., Yin, Y., Fu, W., Qiu, B., Lin, Z., Yang, Y., Zheng, L., Li, J., Chen, G., 2013. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by HILIC-MS/MS coupled with dispersive solid phase extraction. *Food Chemistry* 137(1-4), 115-121.

Title : Non-targeted analysis of marine biotoxins in fishery products

Keywords : Non-targeted analysis, marine biotoxins, fishery products, LC-HRMS

Abstract :

Considering the globalisation of marine biotoxin distribution, the emergence of new toxins and the proven risk to human health, it is essential to have tools that are sufficiently versatile and effective to detect the widest possible range of known or emerging toxins in order to guarantee consumers' safety. This PhD falls within the scope of the monitoring of marine toxins. It aims to contribute to the evolution of the vigilance system by implementing a non-targeted approach based on the use of high-resolution mass spectrometry as an alternative to the use of the controversial mouse bioassay.

First, a liquid chromatography high-resolution mass spectrometry method was developed and characterized for the analysis of 32 marine toxins with a wide range of polarities, using a hybrid quadrupole time-of-flight (QTOF) mass spectrometer. Reversed-phase and hydrophilic interactions columns have been used for the separation of targeted lipophilic and hydrophilic toxins. A strategy describing the different steps of a non-targeted approach, from acquisition to data processing, by chemometric tools was then developed using two different softwares (the SCIEX software suite, commercially available, and XCMS, an open source software). The developed workflow was successfully tested as part of a proof, on blindly analysed spiked samples (mussels and oysters) with different toxins. The strategy was then applied to naturally contaminated samples involved in human intoxications and related to the consumption of sea squirts of the *Microcosmus* genus using two approaches to process the data generated by the non-targeted analysis; the first one consists in screening a list of suspects (suspect screening) and the second one is an analysis without a priori.

Titre : Analyse non ciblée des biotoxines marines dans les produits de la pêche

Mots-clés : Analyse non ciblée, biotoxines marines, produits de la pêche, LC-HRMS

Résumé :

Face à l'expansion géographique des biotoxines marines, à l'émergence de nouvelles toxines et compte tenu du risque avéré pour la santé humaine, il est essentiel de disposer d'outils suffisamment versatiles et performants pour détecter une gamme, la plus large possible, de toxines connues ou émergentes de manière à garantir la sécurité des consommateurs. Cette thèse s'inscrit dans la démarche de surveillance de la qualité sanitaire des produits de la pêche. Elle a pour finalité de contribuer à l'évolution du dispositif de veille d'émergence par le développement d'une approche non ciblée reposant sur l'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution comme alternative à la pratique controversée du bio-essai sur souris.

Les travaux entrepris ont permis dans un premier temps de développer et caractériser une méthode par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution pour l'analyse ciblée de 32 toxines marines avec une gamme étendue de polarités, utilisant un spectromètre de masse haute résolution. Deux types de séparations chromatographiques, en phase inverse et à interactions hydrophiles, ont été mises en place pour la séparation des toxines lipophiles et hydrophiles. Ensuite une stratégie décrivant les différentes étapes d'une approche non ciblée allant de l'acquisition au traitement des données par des outils chimiométriques a été développée. Le traitement des données acquises en mode non ciblé a été réalisé au moyen de deux types de logiciels différents : une suite logicielle commerciale (Sciex) et un logiciel open source (XCMS). Cette stratégie a été testée avec succès dans le cadre d'une preuve de concept sur des échantillons d'huîtres et de moules supplémentés avec certaines toxines et analysés en aveugle. Elle a ensuite été appliquée sur des échantillons impliqués dans des cas de toxi-infections alimentaires collectives liés à la consommation de violets du genre *Microcosmus*, selon les deux approches différentes, le suspect screening et l'analyse sans a priori.