

Aspects réglementaires et dispositifs de surveillance / veille d'émergence 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 brévétotoxines 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.

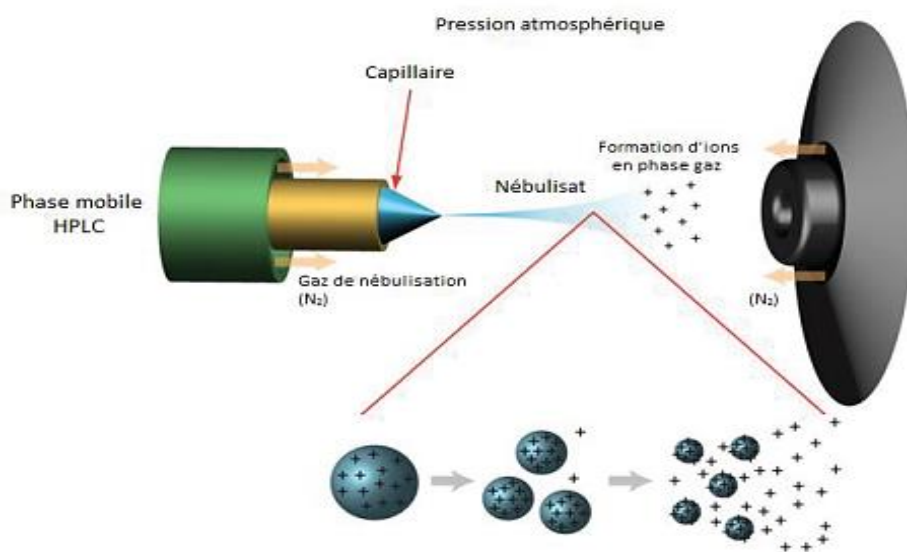


Figure 13. Principe de l'ionisation par électrospray
<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/esi-ionisation.xhtml>

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).

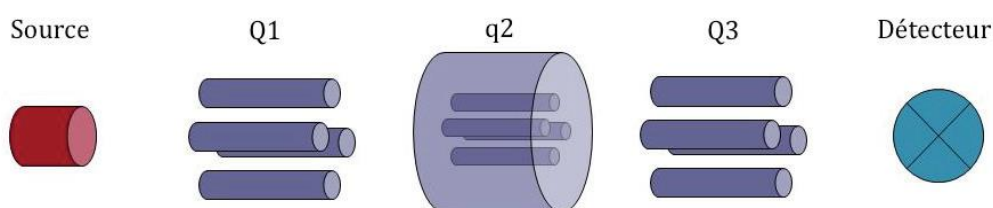


Figure 14. Représentation schématique d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle

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).

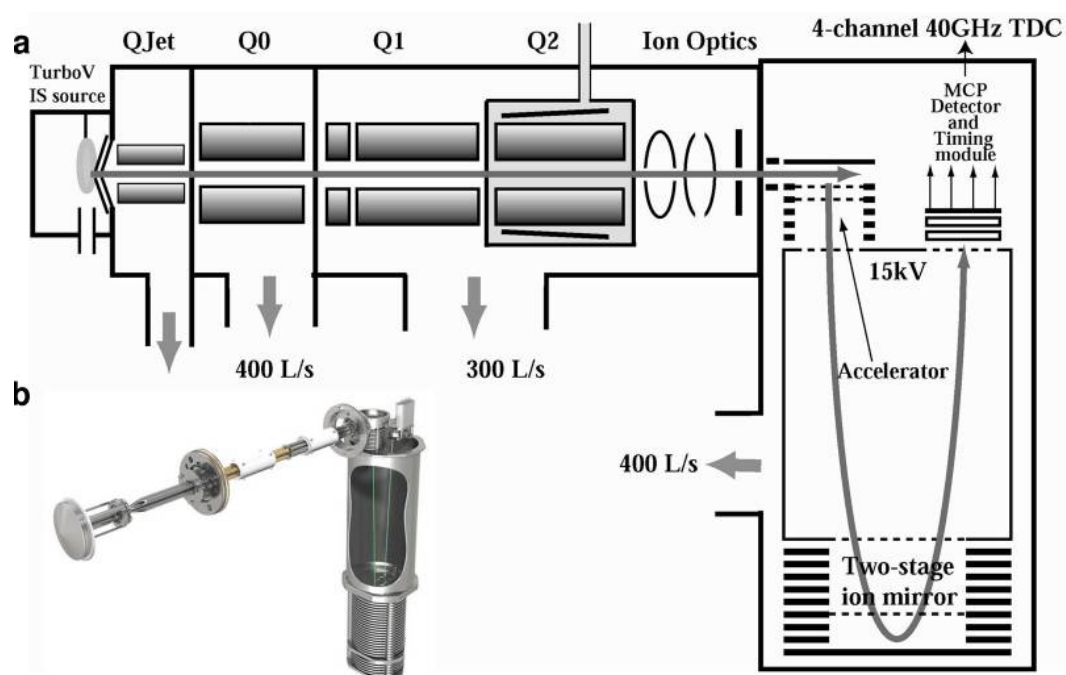


Figure 15. Représentation d'un analyseur Q-ToF (Sciex) (Andrews et al., 2011)

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 converties 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.

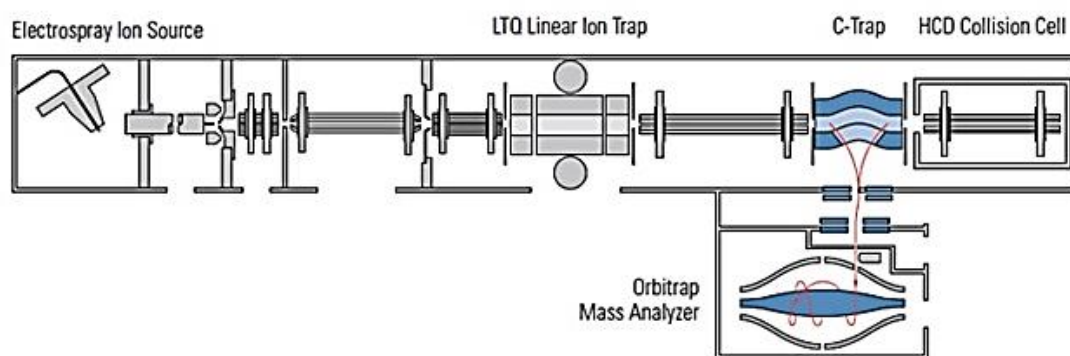


Figure 16. Schéma d'un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific).

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 H₂O 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 Tétrodotoxines

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	(Wang et al., 2012)
			(B) ACN Both containing 0.1% formic acid	(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**).

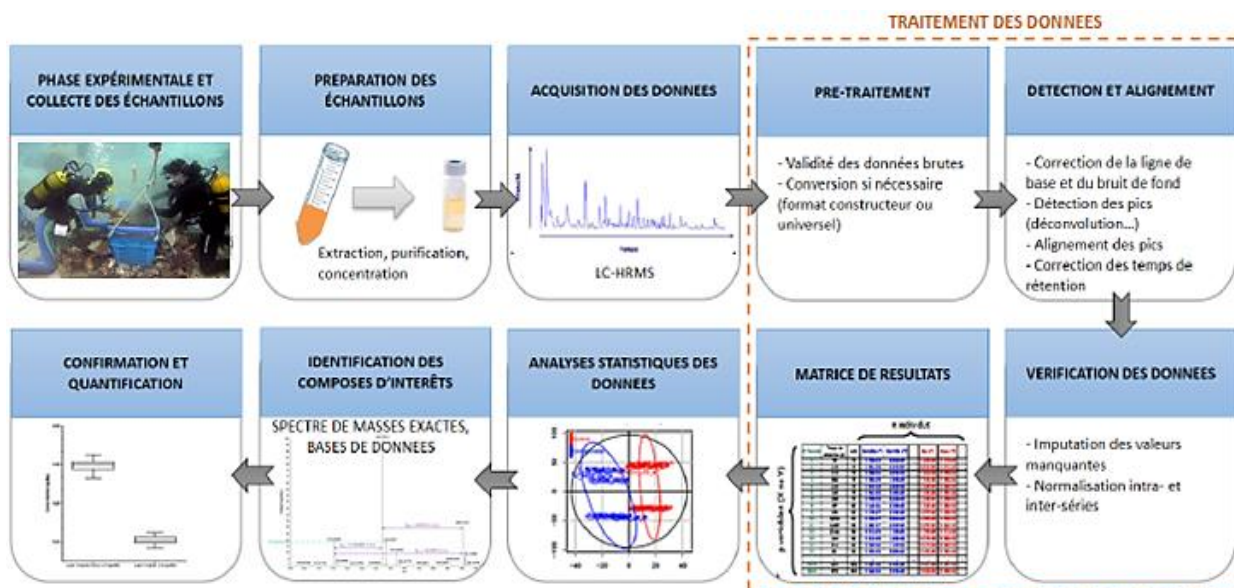


Figure 17. Les différentes étapes d'une analyse non-ciblée par spectrométrie de masse à haute résolution (adapté de la thèse de K. Slimani)

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.

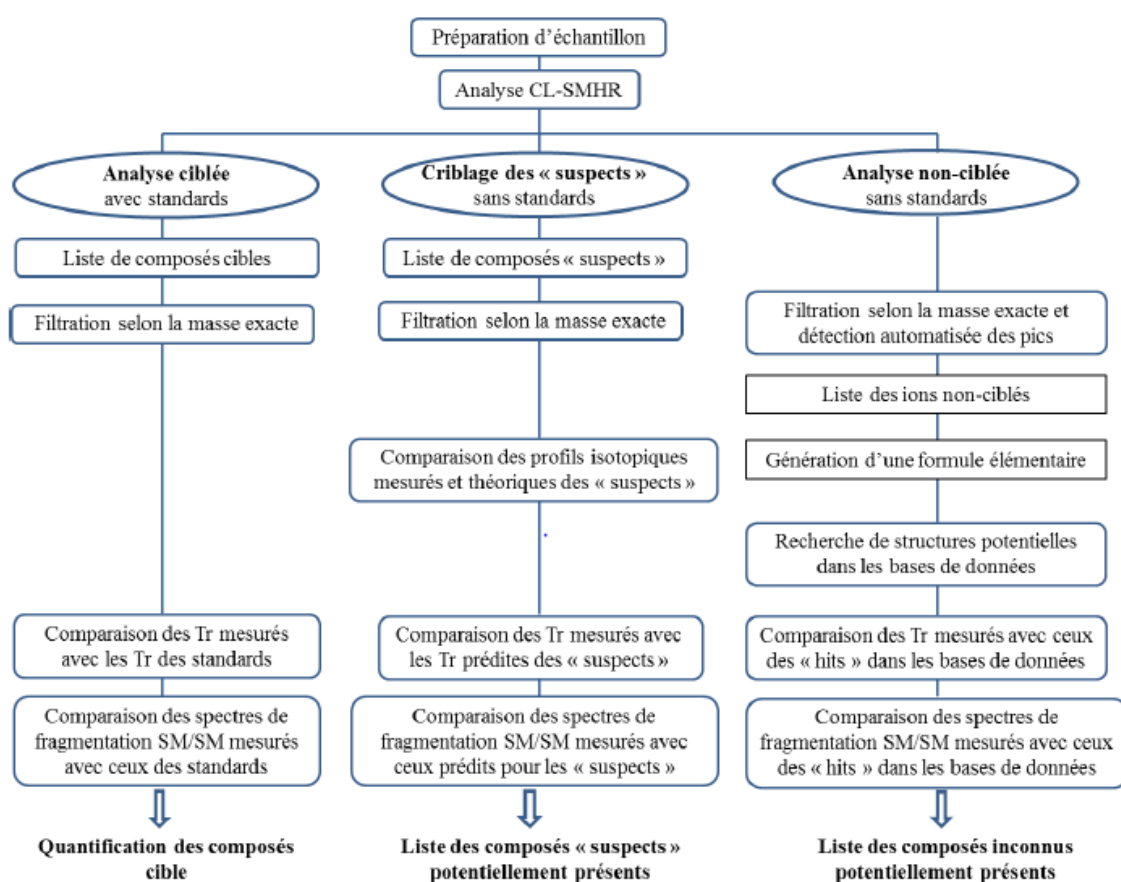


Figure 18. Stratégies d'analyses des données HRMS (adapté de Krauss et al. (2010))

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.