

# 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 M $\Omega$ .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  $\mu\text{m}$ .

#### **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<sup>TM</sup>. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Waters (Saint-Quentin-en-Yvelines, France) X SELECT<sup>®</sup> HSS T3 (100 × 2,1 mm, 2,5  $\mu\text{m}$ ) 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  $\mu\text{L}$ . 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  $\pm 20$  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<sup>®</sup> TF 1.7.1 (Sciex, Toronto, Canada). L'application MasterView<sup>™</sup> du logiciel PeakView<sup>®</sup> 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<sup>™</sup> 2.1.1 (Sciex, Toronto, Canada) utilisant des

courbes de calibration en solvant. Les différents signaux acquis et traités automatiquement par Masterview™ ont été contrôlés visuellement via MultiQuant™, 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 :

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

Où «  $\sigma_b$  » 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

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

Avec  $x$  = valeur mesurée

$X$  = valeur assignée par le LRUE

$\sigma$  = 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<sub>18</sub>, 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<sub>18</sub> 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.

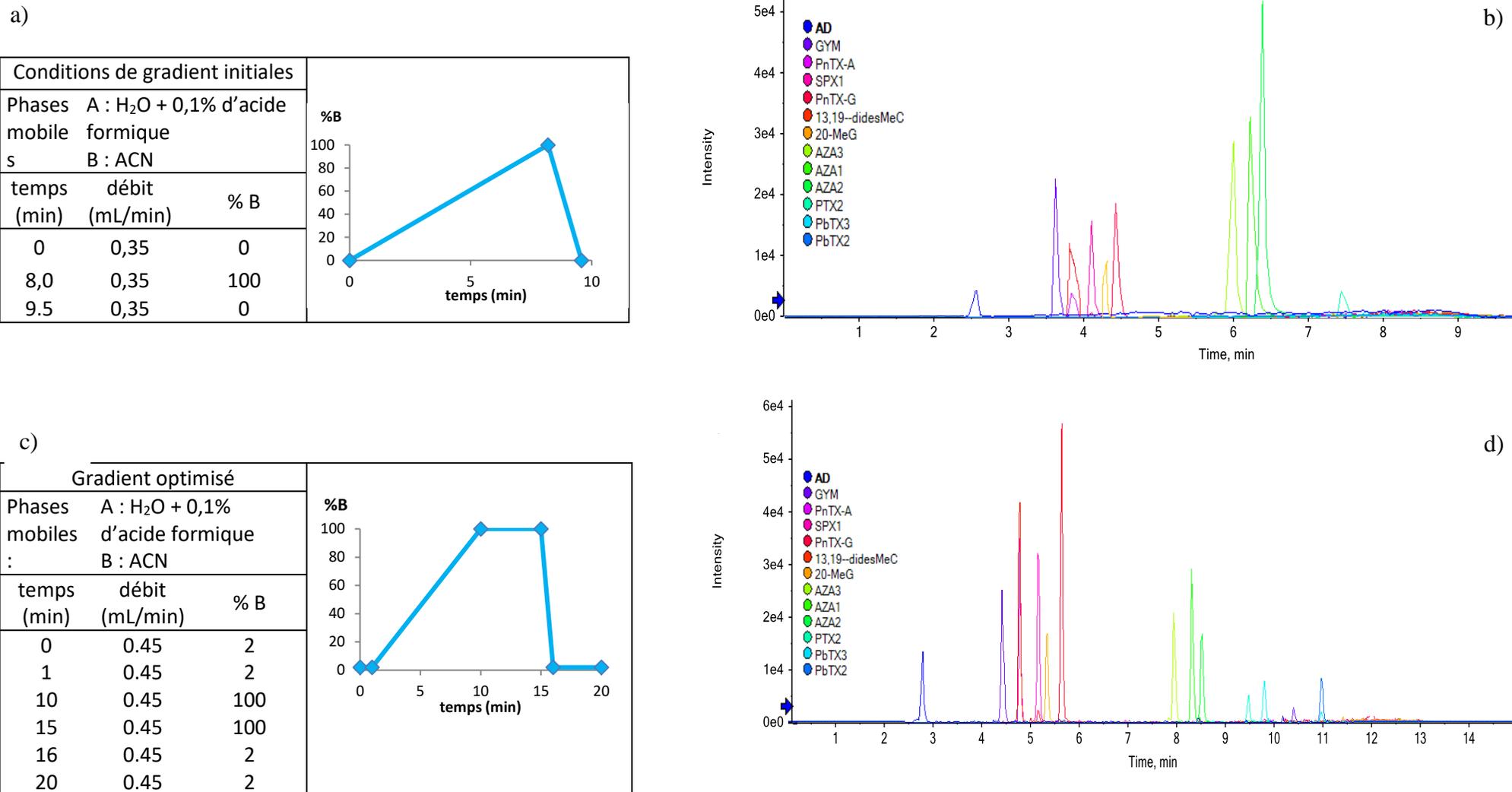
Une solution multitoxines contenant différentes toxines lipophiles et l'acide domoïque (I.3) à une concentration de 50 ng/mL a été analysée en triplicats. Les réponses des toxines aux différentes conditions d'analyse testées ont été étudiées en mode d'ionisation positif d'abord car plus nombreuses tout 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 brévéttoxines 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 :

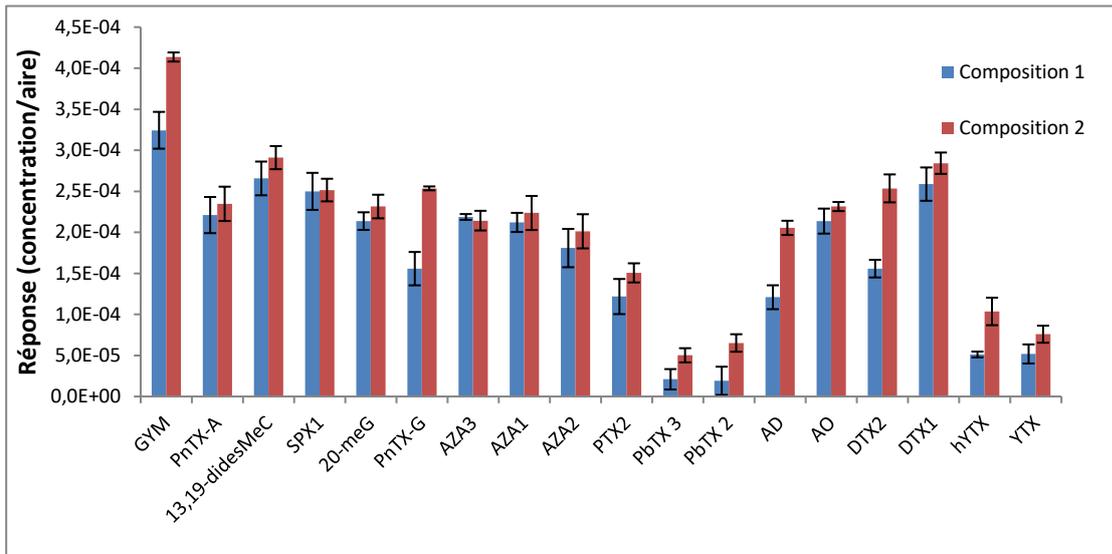
**-Composition 1 :** A : H<sub>2</sub>O + 0,1 % d'acide formique

B : ACN

**-Composition 2 :** A : H<sub>2</sub>O } + 2 mM formate d'ammonium

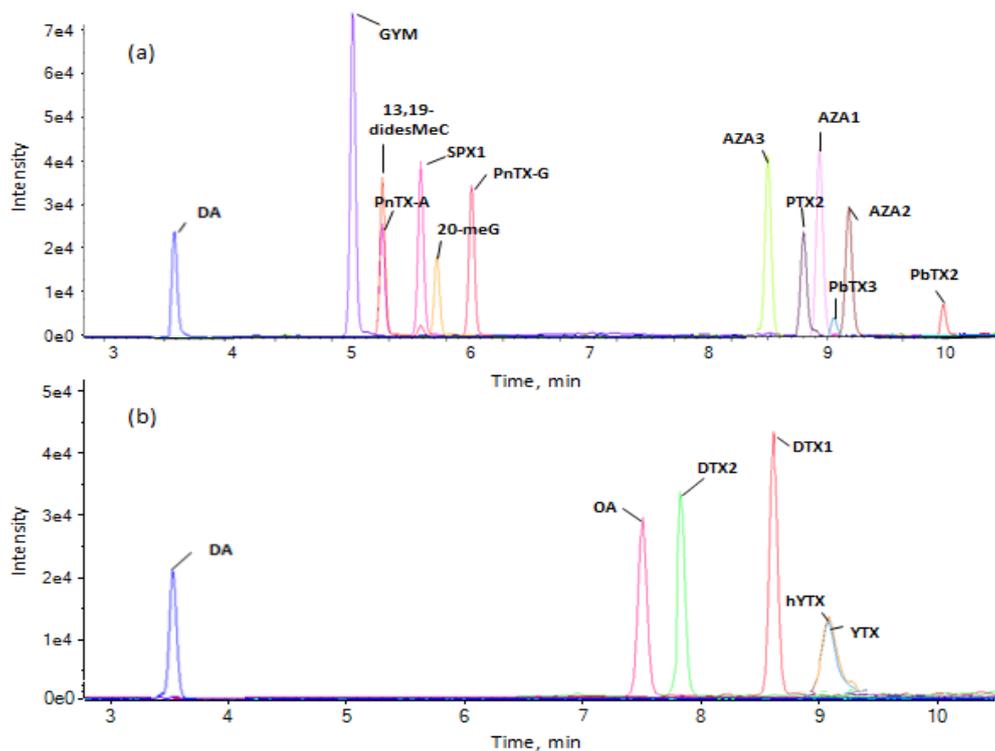
B : 95% ACN } +50 mM d'acide formique

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'éluion 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<sup>-</sup>, 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.

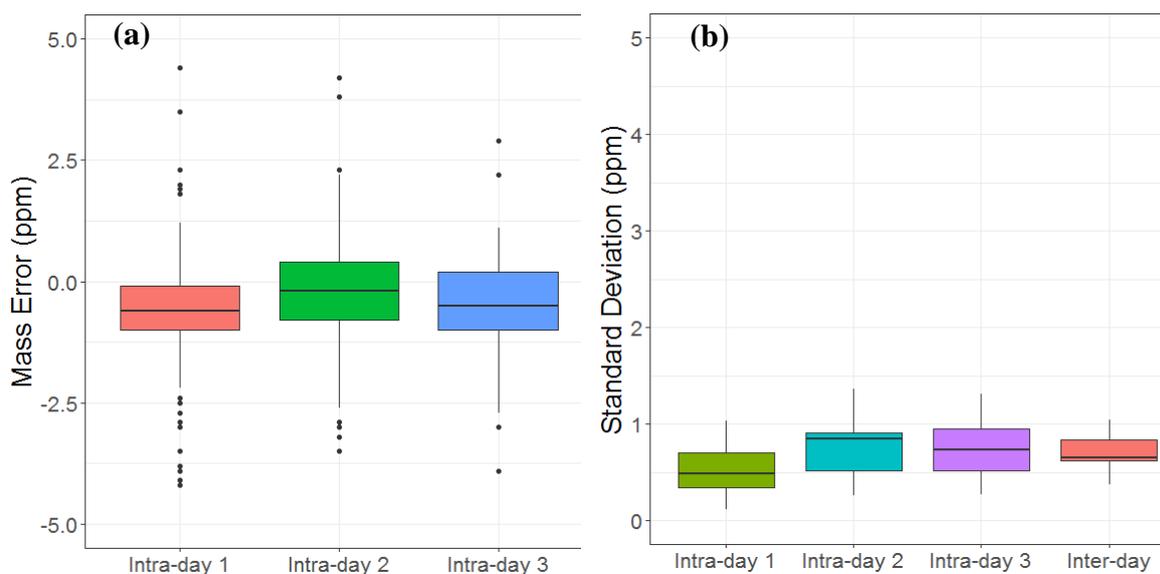
Comme l'identification des toxines se faisait en haute résolution, elle était principalement basée sur la masse exacte de chaque molécule. Ainsi, l'exactitude de la masse (exprimée en ppm) a été déterminée. Les écarts-types (SD) correspondants des masses pour la précision intra-journalière et inter-journalière 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; Zandong 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] <sup>+</sup>	508,3419	5,2
PnTX-A	C41H61NO9	[M + H] <sup>+</sup>	712,4415	5,4
PnTX-G	C42H63NO7	[M + H] <sup>+</sup>	694,4676	6,2
AZA1	C47H71NO12	[M + H] <sup>+</sup>	842,5042	8,9
AZA2	C48H73NO12	[M + H] <sup>+</sup>	856,5208	8,5
AZA3	C46H69NO12	[M + H] <sup>+</sup>	828,4884	9,2
SPX1	C42H61NO7	[M + H] <sup>+</sup>	692,4514	5,7
13,19-didesMeC	C41H59NO7	[M + H] <sup>+</sup>	678,4367	5,3
20-meG	C43H63NO7	[M + H] <sup>+</sup>	706,4679	5,8
PTX2	C47H70O14	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	876,5109	8,8
PbTx-2	C50H70O14	[M + H] <sup>+</sup>	895,4838	10,0
PbTx-3	C50H72O14	[M - H] <sup>+</sup>	897,4399	9,1
AD	C15H21NO6	[M - H] <sup>-</sup>	310,1296	3,5
AO	C44H68O13	[M - H] <sup>-</sup>	803,4616	7,5
DTX1	C45H70O13	[M - H] <sup>-</sup>	817,4762	8,6
DTX2	C44H68O13	[M - H] <sup>-</sup>	803,4616	7,9
YTX	C55H82O21S2	[M - H] <sup>-</sup>	1141,4729	9,2
hYTX	C56H84O21S2	[M - H] <sup>-</sup>	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 brevétotoxines 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 inférieurs 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.

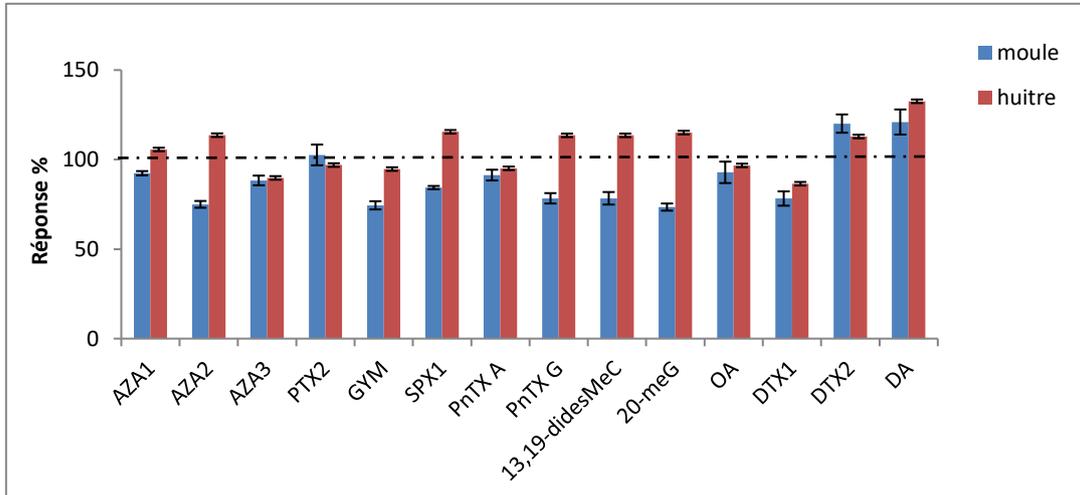
**Tableau 11.** Limites de quantification (LQ) des différentes toxines dans le MeOH, les extraits de moules et huîtres

	LQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
	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.

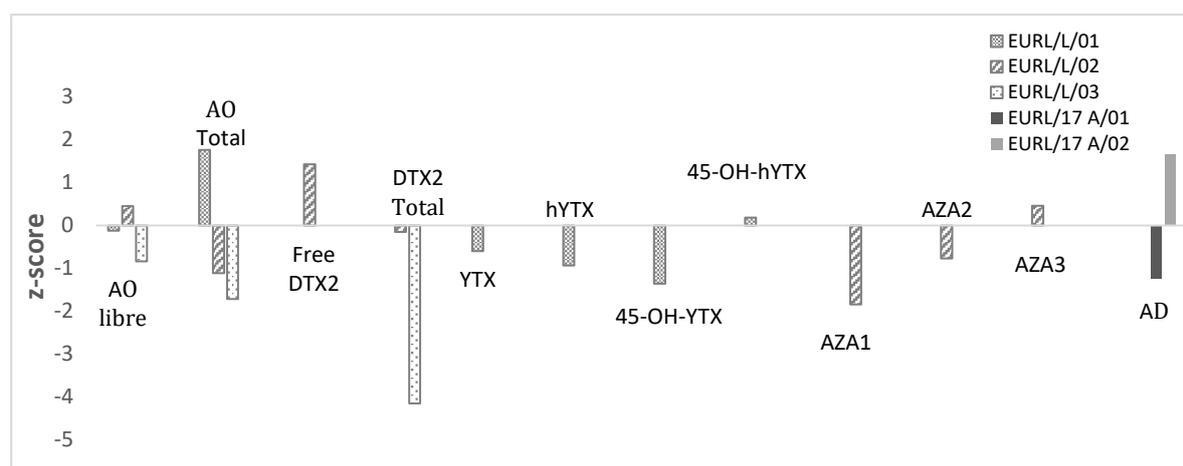
La précision de la méthode quantitative exprimée par la répétabilité et la fidélité intermédiaire, a été étudiée au moyen du coefficient de variation (CV). Les CV obtenus pour les variations intra-journalières (CV<sub>T</sub>) et inter-jours (CV<sub>R</sub>) allaient respectivement de 1,3% à 14,7% et 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 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Taux de récupération(%)	CVr (%)	CV <sub>R</sub> (%)
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 tétrodotoxine 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
Térodotoxine	TTX	80,7	25,8

\*Calculée à partir de la masse moléculaire de chaque toxine

### I.3. Préparation des solutions de travail

#### o 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'acide 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%.

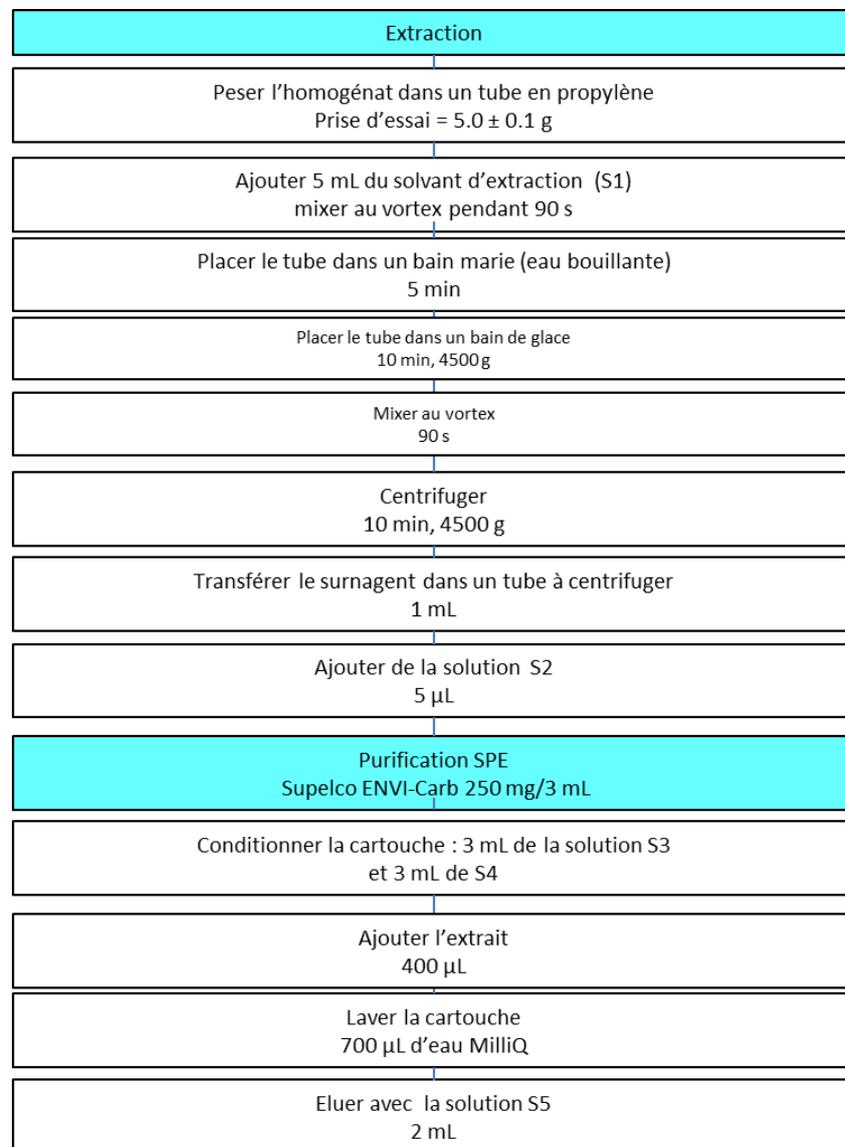
S3 : solution acide de conditionnement et élution SPE (20% d'acétonitrile avec 1% HAc) : 200 mL d'acétonitrile (HPLC) + 800 mL d'eau Milli-Q + 10 mL HAc.

S4 : solution basique de conditionnement SPE (0,025% NH<sub>3</sub>) : 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 chair 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 décrit 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.

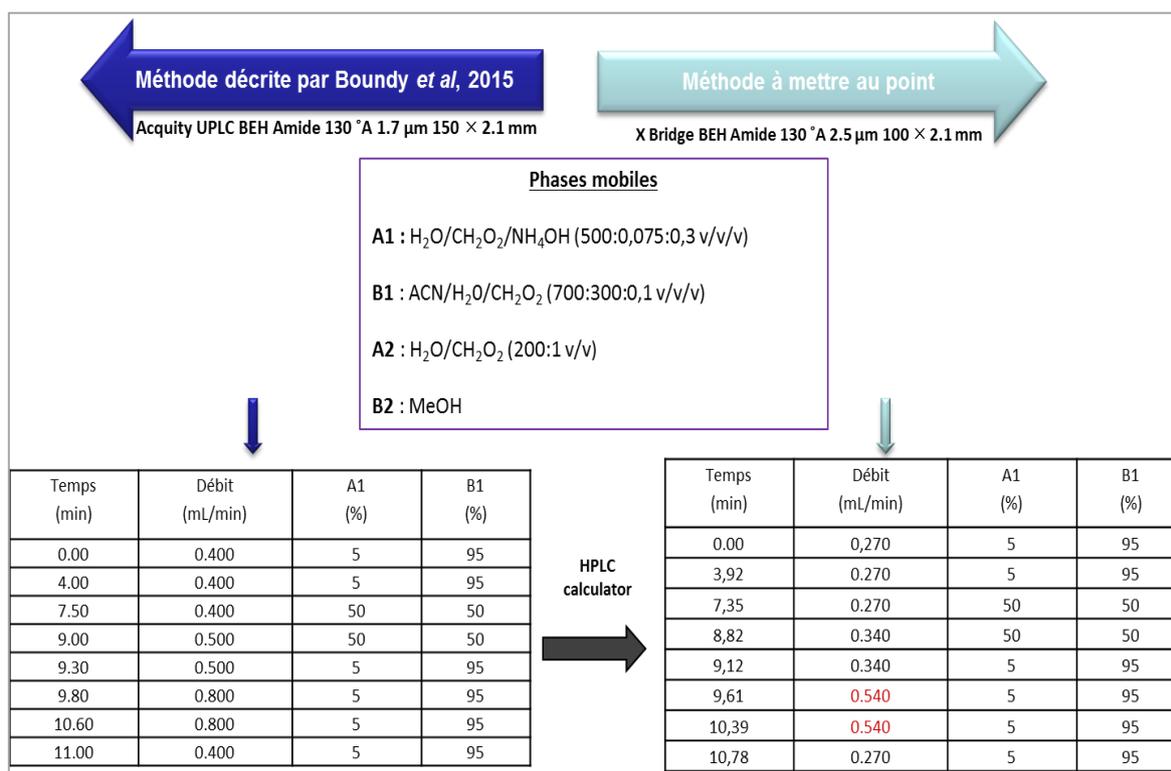
La colonne recommandée est une colonne HILIC Acquity UPLC BEH Amide 130 °A 1,7 µm 150 × 2,1 mm (Waters) nécessitant de travailler avec une chaîne UPLC. Dans le cadre des travaux de thèse l'appareillage mis à disposition pour l'analyse HRMS est composé d'une chaîne HPLC Dionex 3000 ne permettant pas de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

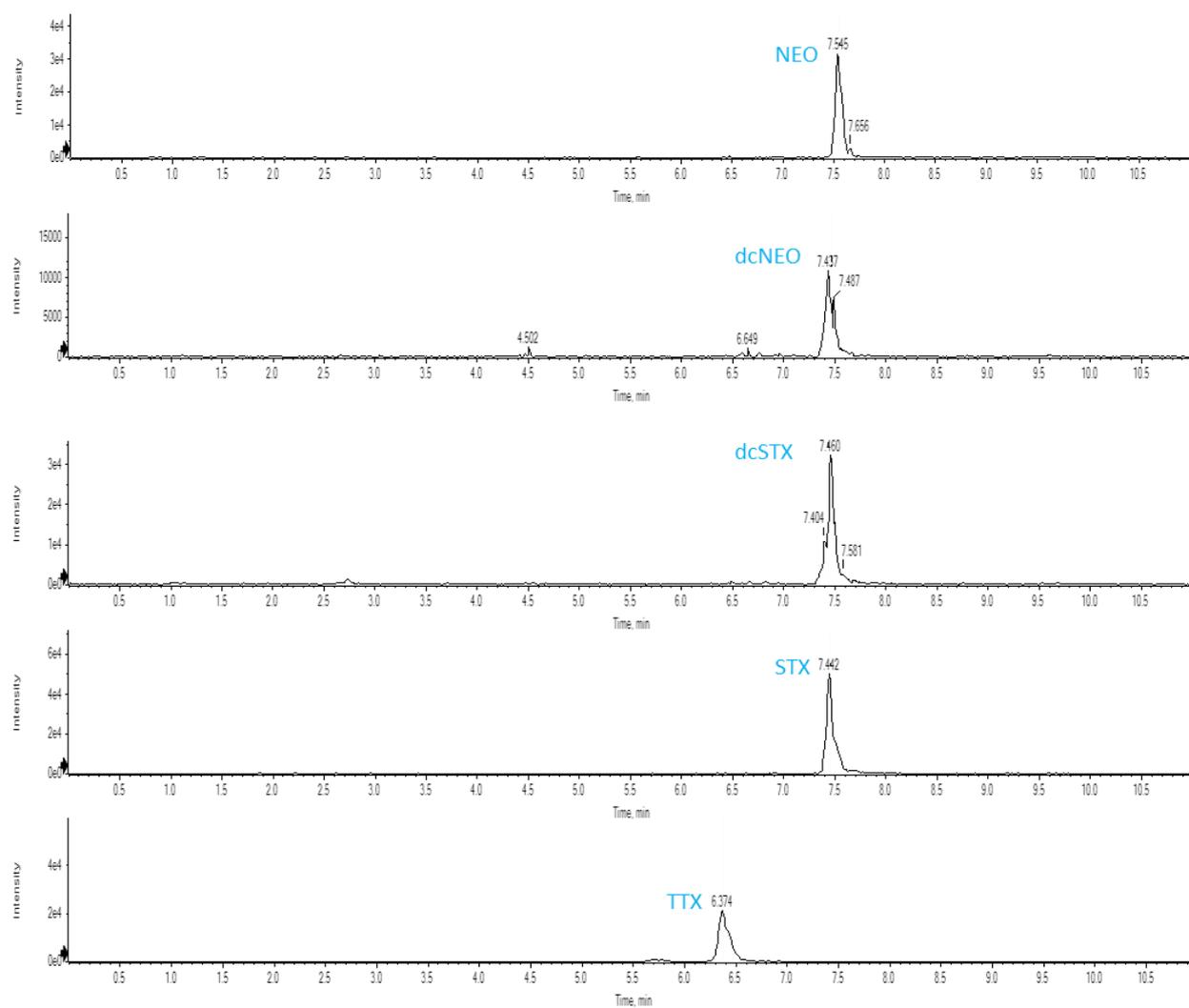
**Tableau 19.** Conditions chromatographiques optimisées

<b>Colonne</b>	X Bridge BEH Amide (130 °A, 2,5 µm 100 ×2,1 mm)		
<b>Volume injecté</b>	5 µL		
<b>Température</b>	60 °C		
<b>Time (min)</b>	<b>Débit (mL/min)</b>	<b>A1 (%)</b>	<b>B1 (%)</b>
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

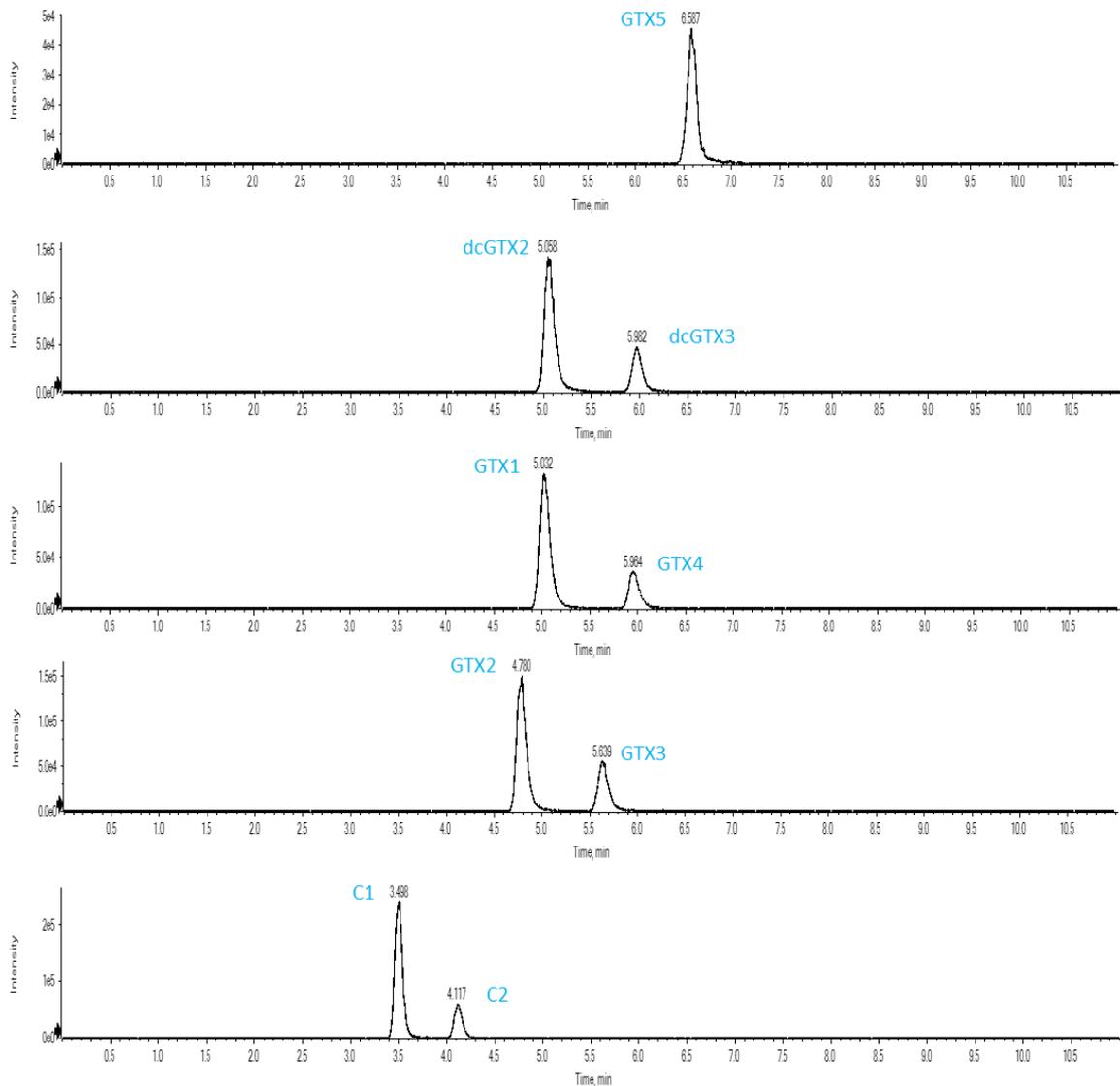
Temps (min)	% B1
0,00	100
3,90	100
7,35	50
8,80	50
9,10	100
9,60	100
10,4	100

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 SO<sub>3</sub> 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

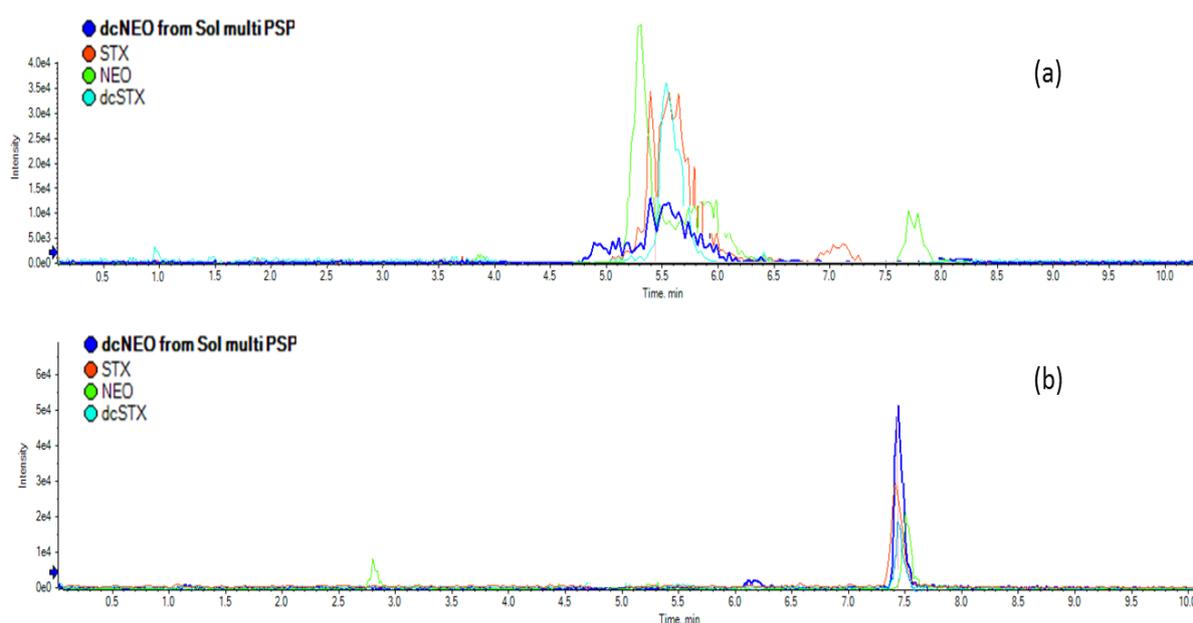
Toxine	Formule brute	Ion parent	Masse mesurée m/z	Tr (min)
C1	C10H17N7O11S2	[M - H] <sup>-</sup>	474,0354	3,5
C2	C10H17N7O11S2	[M - H] <sup>-</sup>	474,0354	4,1
dcGTX2	C9H16N6O7S	[M - H] <sup>-</sup>	351,0728	5,1
dcGTX3	C9H16N6O7S	[M - H] <sup>-</sup>	351,0728	6,0
GTX2	C10H17N7O8S	[M - H] <sup>-</sup>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

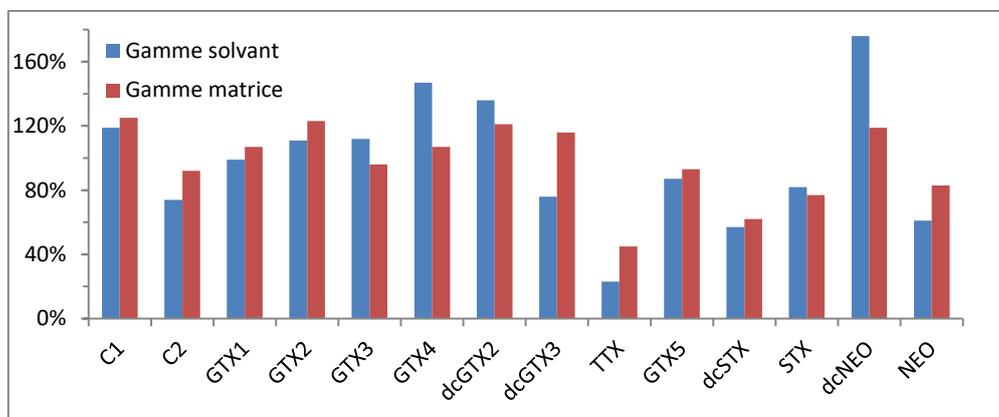


**Figure 29.** Chromatogramme d'ions extraits (en ESI+) correspondant à l'extrait (a) brut sans purification et (b) après purification de l'échantillon de moule supplémenté

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.