

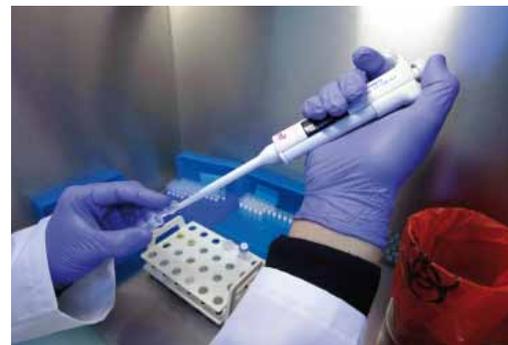


Méthodes

Biotoxines marines lipophiles : évolution des modalités de surveillance des coquillages, mise en place d'une méthode chimique en complément du bio-essai sur souris

S. Krysz, V. Hossen, S. Trotereau, R. Biré, Afssa, laboratoire national de référence (LNR) pour le contrôle des biotoxines marines, Maisons-Alfort (France)

Krysz S., Hossen V., Trotereau S., Biré R. (2010). *Biotoxines marines lipophiles, évolution des modalités de surveillance des coquillages, mise en place d'une méthode chimique en complément du bio-essai sur souris*, EuroReference, n° 3, ER03-10M01. <http://www.afssa.fr/euroreference/numero3/PN6001.htm>



Les phycotoxines marines peuvent se bio-accumuler dans les coquillages et provoquer des intoxications chez le consommateur. L'extension du nombre d'épisodes toxiques, l'émergence de toxines nouvelles et le développement d'une méthode multi-toxines par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) a conduit à une évolution de la stratégie de surveillance des toxines lipophiles au niveau européen. Celle-ci se traduit par le remplacement du bio-essai sur souris par une analyse physico-chimique en tant que méthode de référence. Depuis le 1^{er} janvier 2010, en France, le changement de méthode de référence a été intégré au dispositif de surveillance sur décision des autorités compétentes. Ce dispositif s'appuie sur les deux laboratoires nationaux (le LNR de l'Afssa et le laboratoire Phycotoxines d'Ifremer) qui disposent chacun d'une méthode multi-toxines validée en intra-laboratoire et ayant fait l'objet d'un exercice d'inter-comparaison organisé par le LNR. Ces méthodes permettent de détecter, d'identifier et de quantifier les 13 toxines lipophiles réglementées et deux toxines de familles émergentes, et répondent de ce fait aux exigences de la réglementation communautaire. Le bio-essai sur souris reste utilisé dans un dispositif complémentaire de vigilance permettant de détecter de nouveaux analogues et/ou l'émergence de nouvelles familles de toxines.

Les phycotoxines marines sont des métabolites secondaires produits par des microalgues toxigènes qui peuvent se bio-accumuler dans les coquillages et provoquer des intoxications chez le consommateur (Krysz et La Vieille, 2002). Cet ensemble de toxines non protéiques présente une grande diversité de structures chimiques et d'activités biologiques. Chaque famille structurale est constituée de nombreux analogues (FAO, 2005). Les familles des saxitoxines et de l'acide domoïque, toutes deux de caractère hydrophile, appartiennent respectivement aux alcaloïdes et aux acides aminés. Les phycotoxines lipophiles, quant à elles, regroupent plusieurs familles possédant une structure commune de type polyéther cyclique et dont la polarité varie selon ses groupements fonctionnels. Tandis qu'une seule famille lipophile était identifiée dans les années 1970 (acide okadaïque/dinophysistoxines) dans les eaux tempérées, on en compte, quelque 40 ans plus tard, huit autres (yessotoxines, pecténotoxines, brevétoxines, azaspiracides, gymnodimine, spirolides et ciguatoxines). Depuis 2003, certains produits de la mer Méditerranée ont été contaminés par des toxines amphiphiles (lipophile et hydrophile) de type palytoxines, jusqu'alors endémiques de régions tropicales.

Le plus souvent, la présence des toxines lipophiles a été révélée dans un contexte de surveillance par des réponses positives obtenues par bio-essai sur souris (administration intra-péritonéale), méthode de référence au niveau communautaire depuis 1991 (Directive du Conseil 91/492/CE). Cette méthode révèle la toxicité des échantillons de coquillages chez l'animal. Initialement développée pour détecter la toxicité de la famille de l'acide okadaïque (Yasumoto *et al.*, 1978) responsable d'intoxications de type diarrhéique, cette méthode a ensuite

permis de détecter de nouvelles familles au fur et à mesure de leur découverte. Parallèlement, à chaque apparition de toxines nouvelles, les scientifiques ont cherché à développer des approches analytiques complémentaires pour leur identification chimique, leur caractérisation toxicologique, la détermination de leur occurrence, et plus généralement, pour produire des données utiles à l'évaluation des risques pour l'Homme. Parmi ces approches, l'analyse chromatographique liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) a été la plus largement utilisée car elle permet la détection, l'identification et la quantification de plusieurs familles simultanément et fournit un profil toxinique détaillé de la contamination. L'extension du nombre d'épisodes toxiques, l'émergence de toxines nouvelles et le développement d'une méthode multi-toxines par CL-SM/SM a conduit à une évolution de la stratégie de surveillance des toxines lipophiles au niveau européen (Règlement 2074/2005/CE).

Contribution du LNR au développement d'une méthode multi-toxines par CL-SM/SM

La 1^{re} méthode multi-toxines basée sur la technique CL-SM/SM a été développée par une équipe néo-zélandaise en 2001 (MacKenzie *et al.*, 2002). Par la suite, de nombreux pays ont adapté leur propre méthode en fonction des toxines présentes et de leur instrumentation (Fernandez *et al.*, 2004; Stobo *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2005). Plusieurs difficultés techniques ont ralenti le développement de ces méthodes, notamment le manque d'étalons et de matériaux certifiés pour l'ensemble des analogues réglementés, la gamme étendue de polarité des toxines à analyser et la diversité des instruments. En 2005,



Méthodes

Cahier numéro 3
Juin 2010

le réseau européen des laboratoires de référence a entrepris d'optimiser et de valider une méthode harmonisée applicable dans tous les États membres. Les différents travaux ont d'abord montré une faiblesse de reproductibilité lors d'exercices de validation inter-laboratoires de la méthode proposée, mettant en exergue la difficulté de valider une méthode multi-toxines avec un protocole fixe alors que les laboratoires disposent d'instruments de spectrométrie de masse différents (marque, type etc.). Il a alors été proposé d'opter pour une validation selon une « approche critères » qui donne la possibilité aux utilisateurs d'adapter la méthode CL-SM/SM à leurs conditions de travail (voir encadré 1). Les résultats des premières études ont montré que cette approche est satisfaisante.

Critères de performance retenus dans le cadre du groupe de travail laboratoire de référence de l'Union européenne/LNR pour la validation d'une méthode multi-toxines d'analyse des toxines lipophiles

Les critères de performance fixés par le groupe de travail CL-SM du laboratoire de référence de l'Union européenne sont les suivants :

- selon la directive 2002/67/CE, les intensités relatives des ions détectés, exprimées en pourcentage de l'intensité de l'ion le plus intense ou de la transition la plus intense, doivent correspondre à celles de l'étalon (à des concentrations comparables et dans les mêmes conditions de mesure), avec un écart toléré de 20 % ;
- la gamme étalon doit contenir au moins cinq niveaux de concentrations avec $r^2 \geq 0,98$;
- la gamme de travail doit s'étendre de la limite de quantification (LOQ) (au moins 40 µg/kg) à 400 µg/kg ;
- la dérive de la réponse doit être < 20 % de la pente ou $r^2 \geq 0,98$ entre les gammes étalons intercalées entre les échantillons ;
- un blanc doit être injecté après le contrôle positif ou le point de gamme le plus élevé ;
- dérive des temps de rétention < 2 % ;
- utilisation de l'étalon disponible d'acide okadaïque pour le quantifier ainsi que ses analogues les dinophysistoxines 1 et 2 ;
- utilisation du matériau de référence certifié disponible pour déterminer le rendement d'extraction (les résultats sont ensuite corrigés de ce rendement).

Dans ce contexte, le LNR de l'Afssa a contribué à l'ensemble des études menées aussi bien au niveau européen qu'au niveau international et a ainsi participé :

- aux travaux du groupe de travail CL-SM du laboratoire de référence de l'Union européenne (deux études sur les effets matrices en 2007 ; un exercice de pré-validation pour la famille de l'acide okadaïque pour définir les critères de performance en 2008 ; un exercice de validation selon les critères de performances pour cette famille en 2009) ;
- aux travaux du projet BIOTOX (6^e PCRD) destiné notamment à développer, optimiser, valider une méthode multi-toxines d'analyse des toxines lipophiles (un exercice de pré-validation d'une méthode multi-toxines en 2006 ; un exercice de certification de matériaux de référence en 2007) ;
- aux essais inter-laboratoires d'aptitude proposés par l'organisme privé Quasimeme (deux participations annuelles depuis 2005) et par le laboratoire de référence de l'Union européenne (une participation annuelle depuis 2005).

Parallèlement, le laboratoire Phycotoxines d'Ifremer (PHYC) a également participé à différentes études de validation de la méthode d'analyse physico-chimique des toxines lipophiles en CL-SM/SM, organisées dans différents pays européens (BIOTOX, LNR-Allemand...).

Depuis 2009, le LNR ainsi que le laboratoire français PHYC (Ifremer-Nantes), disposent chacun d'une méthode multi-toxines validée en intra-laboratoire selon la norme V03-110 (voir encadré 2). Ces méthodes permettent de détecter, d'identifier et de quantifier 13 toxines lipophiles réglementées et 2 toxines de familles émergentes en cours d'évaluation de risques par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (Efsa).

Principales étapes de l'analyse CL-SM/SM des toxines lipophiles

Un homogénat de chair est extrait à deux reprises dans du méthanol 100 % par broyage au Turrax®. Si besoin, cet extrait peut-être filtré puis purifié sur cartouche SPE StrataX (polymère styrène divinylbenzène) avant d'être injecté dans une colonne HPLC pour séparer les molécules présentes dans l'échantillon selon leur polarité. La détection est réalisée par spectrométrie de masse avec une source ESI (électrospray) en mode MRM (multiple reaction monitoring, SM/SM). Pour chaque molécule à quantifier, lorsque la fragmentation de l'ion moléculaire le permet, deux transitions (ion parent-ion fils) sont systématiquement recherchées pour assurer une meilleure spécificité. À ce jour, un étalon certifié est commercialement disponible par famille de toxines (quatre réglementées et deux en cours d'évaluation). Ainsi, la quantification de chaque analogue est réalisée par extrapolation à partir de l'étalon disponible représentatif de sa famille. Une telle approche repose sur le postulat que toutes les molécules d'une même famille ont le même facteur de réponse instrumental, ce qui se justifie techniquement par leur analogie de structure. De plus, le calcul prend en compte la toxicité relative de chacun des analogues en appliquant les facteurs d'équivalence toxique proposés par l'Efsa.

Application de la méthode multi-toxines CL-SM/SM dans le cadre de la surveillance

Au niveau communautaire, le projet de texte entérinant le remplacement du bio-essai sur souris par l'analyse physico-chimique en tant que méthode de référence a été voté à la majorité qualifiée par les États membres en novembre 2009. Dans la perspective de cette évolution réglementaire et sur demande du ministre français de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche, l'Afssa et l'Ifremer ont contribué à la mise en place opérationnelle du nouveau dispositif de surveillance nationale des toxines lipophiles fondé sur une méthode physico-chimique multi-toxines.

Un des pré-requis a été de démontrer la fiabilité et la comparabilité des résultats obtenus par les deux laboratoires français, ce qui a conduit à l'organisation par le LNR d'un exercice d'inter-comparaison entre l'Ifremer et le LNR, sur des échantillons témoins et naturellement contaminés, dans des conditions de répétabilité et de reproductibilité. Des analyses multi-toxines sur deux échantillons de contrôle externes (fournis



Méthodes

Cahier numéro 3
Juin 2010

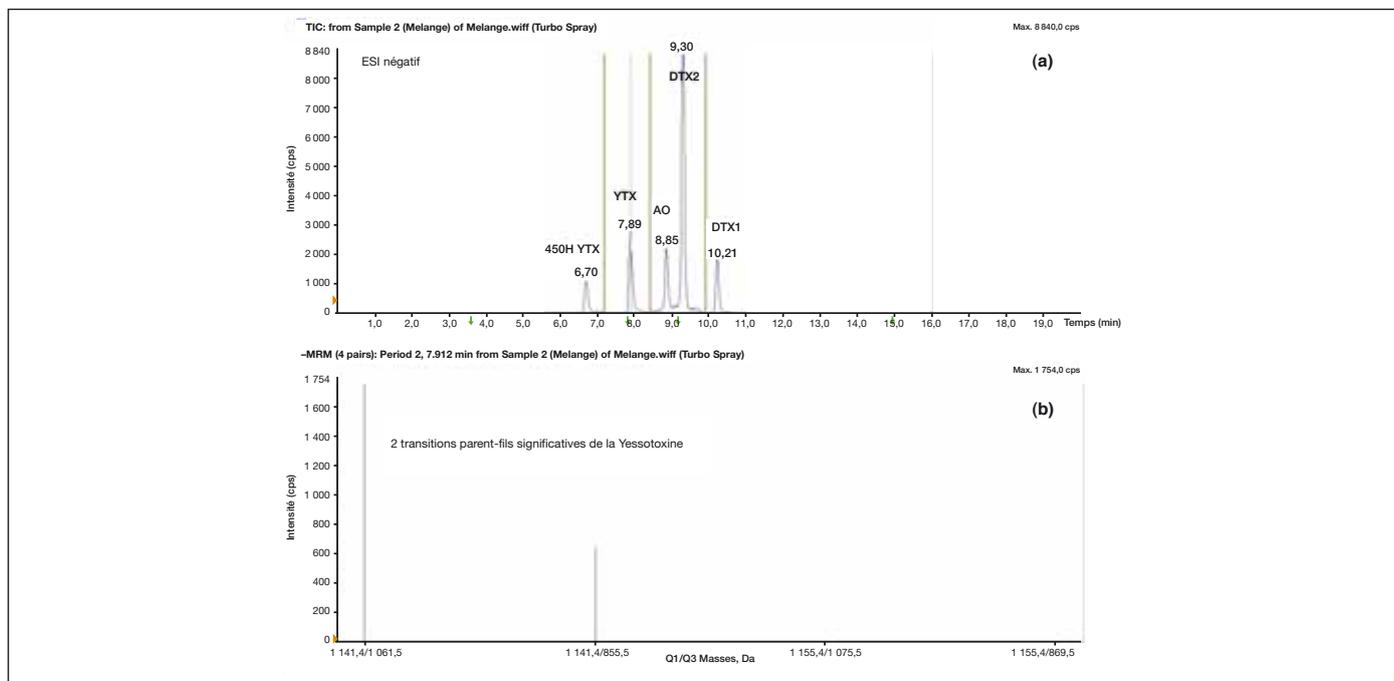


Figure 1: Évolution des modalités de surveillance des coquillages, mise en place d'une méthode chimique en complément du bio-essai sur souris
(a) Chromatogramme obtenu en mode d'ionisation négatif permettant la détermination du profil toxinique pour les familles de l'acide okadaïque et des yessotoxines; (b) Spectre de masse en mode MRM (multiple reaction monitoring) permettant l'identification de la yessotoxine.

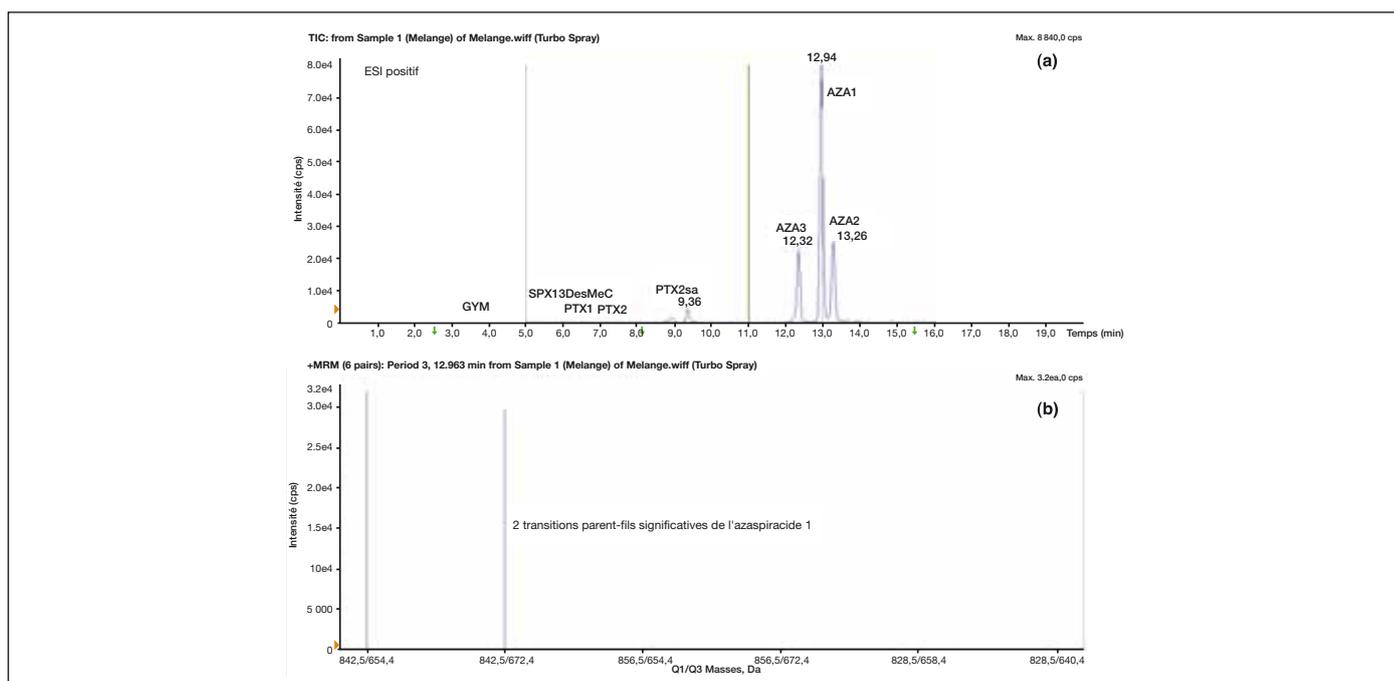


Figure 2: Évolution des modalités de surveillance des coquillages, mise en place d'une méthode chimique en complément du bio-essai sur souris
(a) Chromatogramme obtenu en mode d'ionisation positif permettant la détermination du profil toxinique pour les familles des pecténotoxines, azaspiracides, gymnodimine et spirolides; (b) Spectre de masse en mode MRM (multiple reaction monitoring) permettant l'identification de l'azaspiracide 1.



Méthodes

par Quasimeme) ont également été réalisées. Dans tous les cas, les résultats se sont avérés satisfaisants.

Par ailleurs, cet exercice a également permis de qualifier un matériel de référence interne (MRI, naturellement contaminé) qui servira de contrôle commun aux deux laboratoires assurant ainsi le suivi de la qualité des analyses.

Dans le cadre de l'application du nouveau dispositif, les autorités françaises, en concertation avec les membres du COPIL Surveillance des coquillages (Comité de pilotage regroupant des représentants de la DGAL, de la DGS, de la DGCCRF, de la DPMA, de l'Ifremer et de l'Afssa-LNR biotoxines marines), ont décidé d'une mise en place au niveau national en deux temps :

- jusqu'en 2012, consolidation et maîtrise de la méthode par les deux laboratoires par son application à large échelle et en intégrant ses possibles évolutions au niveau européen ;
- puis, transfert de la méthode européenne harmonisée vers les réseaux de laboratoires officiels de contrôle (Ifremer et laboratoires départementaux d'analyses).

Pratiquement, depuis le 1^{er} janvier 2010, il a été décidé d'une répartition des analyses de surveillance. Ainsi, l'Ifremer est en charge de l'ensemble des analyses des zones de production (soit environ 1 200 analyses par an). En plus de ses missions de LNR, l'Afssa assure les analyses du plan de surveillance de la Direction générale de l'Alimentation (500 analyses/an), les analyses d'auto-contrôle des professionnels (environ 300 analyses/an) et les analyses d'investigation des intoxications alimentaires.

Conclusion

L'évolution du nouveau dispositif se fonde sur une complémentarité entre surveillance et vigilance. En effet, la sensibilité et la spécificité de l'analyse physico-chimique par CL-SM/SM permettent de détecter, d'identifier et de quantifier les toxines réglementées de manière ciblée alors que le bio-essai sur souris permet de détecter de nouveaux analogues et/ou l'émergence de nouvelles familles de toxines (avis de l'Afssa 2009-SA-0205).

Références bibliographiques

Afssa. Saisine 2009-SA-0205 du 4 décembre 2009. Avis de l'agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif au dispositif de surveillance des phycotoxines lipophiles dans les zones conchylicoles concernant la détermination des périodes à risque et des points de référence.

Directive 91/492/CE du Conseil du 15 juillet 1991 fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants. JOCE n° L 268/1-14 du 24 septembre 1991.

Fernandez Puente P, Fidalgo Saez MJ, Hamilton B, Lehane M, Ramstad H, Furey A, James KJ (2004). Rapid determination of polyether marine toxins using liquid chromatography-multiple tandem mass spectrometry (2004). *J. Chromatogr. A*, 1056, 77-82.

FAO, 2005. Rapport de la consultation d'experts ad hoc mixte FAO-COI-OMS sur les biotoxines dans les mollusques bivalves, Oslo, Norvège, 26-30 septembre 2004. http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/biotoxin_report_en.pdf

Krys S., La Vieille S., 2002. Intoxications alimentaires par les phycotoxines. *La Revue du Praticien*, 52, 2209-2211.

MacKenzie L, Holland P, et al. (2002). Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. *Toxicon* 40(9), 1321-1330.

Règlement 2074/2005/CE de la Commission du 5 décembre 2005 établissant les mesures d'application relatives à certains produits régis par le règlement (CE) n° 853/2004 du Parlement européen et du Conseil et à l'organisation des contrôles officiels prévus par les règlements (CE) n° 854/2004 du Parlement européen et du Conseil et (CE) n° 882/2004 du Parlement européen et du Conseil, portant dérogation au règlement (CE) n° 852/2004 du Parlement européen et du Conseil et modifiant les règlements (CE) n° 853/2004 et (CE) n° 854/2004.

Stobo LA, Lacaze JPLC, Scott AC, Gallacher S, Smith EA, Quilliam M (2005). Liquid chromatography with mass spectrometry detection of lipophilic shellfish toxins. *J. AOAC. Int.*, 88 (5), 1371-1382.

Suzuki T, Jin T, Shiota Y, Mitsuya T, Okumura Y, Kamiyama T (2005). Quantification of lipophilic toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning in Japanese bivalves by liquid chromatography-mass spectrometry and comparison with mouse bioassay. *Fisheries Science*, 71, 1370-1378

Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M, 1978. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 44, 1249-1255.