

GDR PHYCOTOX - AXE 1

Phycotoxines & leurs dérivés

Caractérisation et devenir dans la
chaîne alimentaire

Zouher Amzil

Laboratoire Phycotoxines (PHYC)

1^{ère} Assemblée Générale, 4-6 février 2014

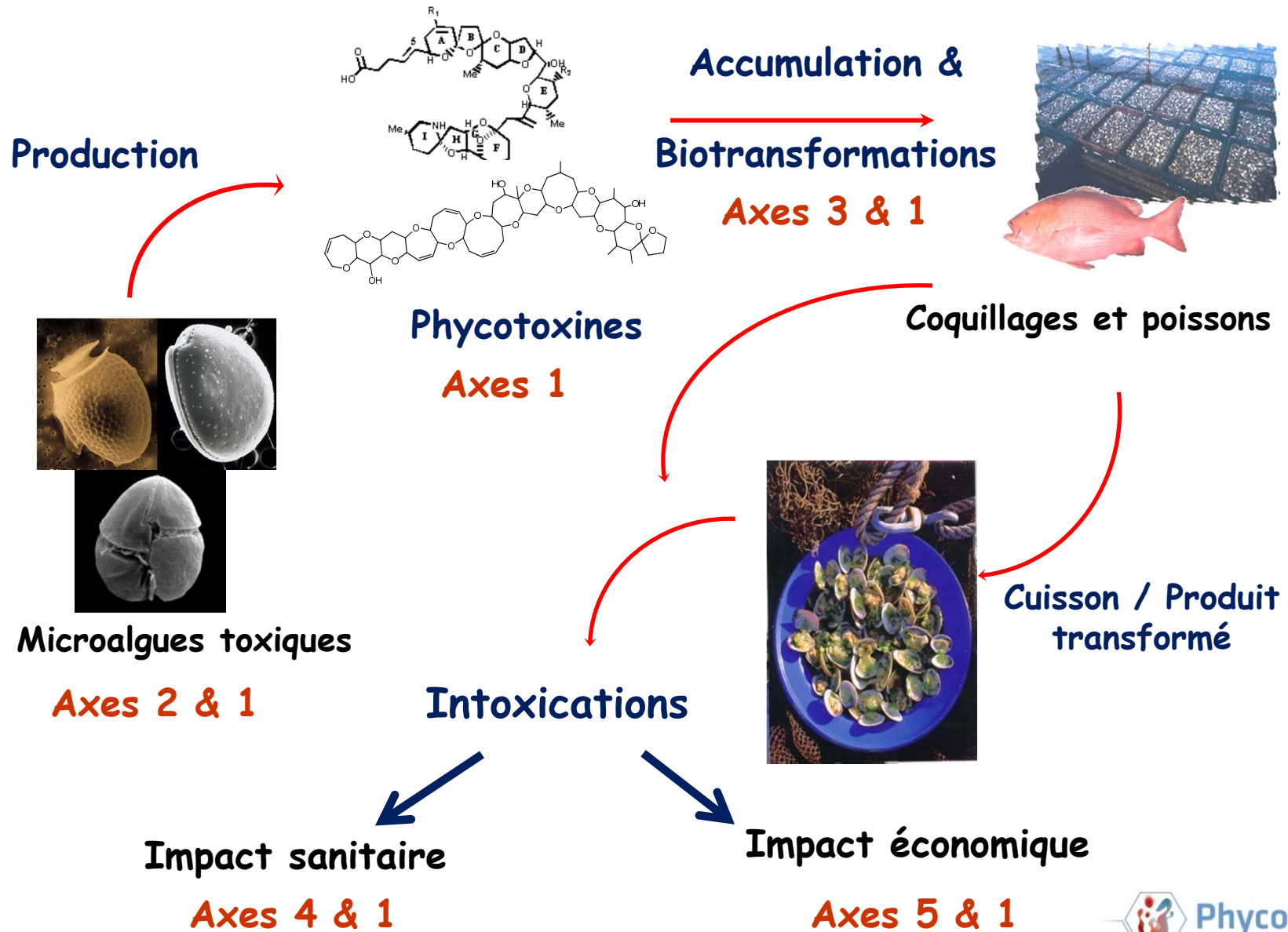
AXE 1 - Laboratoires impliqués



Phycotox
Groupement de Recherche

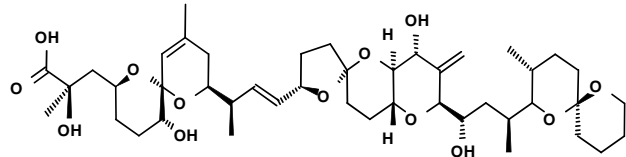
- **Laboratoire Phycotoxines (PHYC) - Ifremer**
- **LNR-Biotoxines de l'Anses**
(suite à une restructuration : projets en cours de montage)
- **Ifremer Sète & UMR 5119 ECOSYM**
(présenté dans l'axe 2)

Phycotoxines & microalgues toxiques

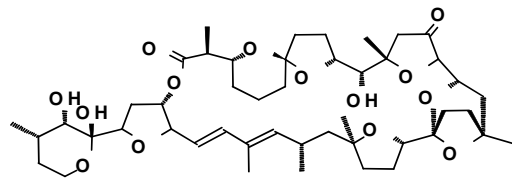


Phycotoxines répertoriées en France métropolitaine

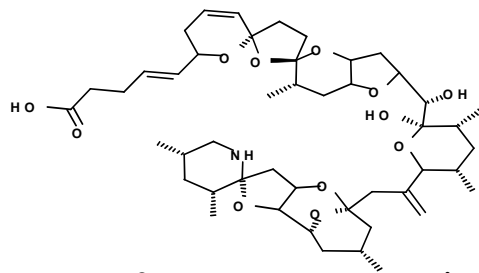
Phycotoxines lipophiles



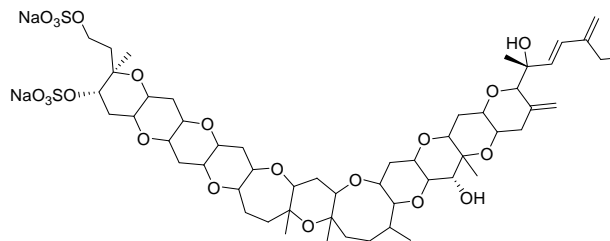
Groupe acide okadaïque



Groupe pectenotoxine



Groupe Azaspiracide



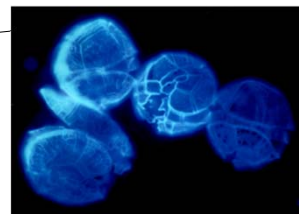
Groupe Yessotoxine



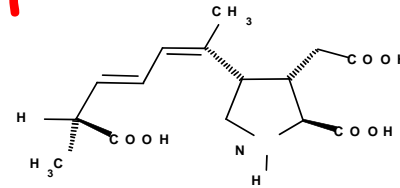
Dinophysis spp.



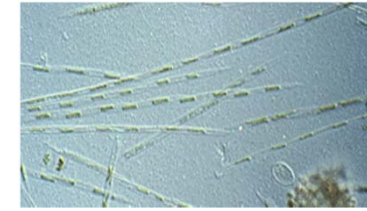
Azadinium sp.



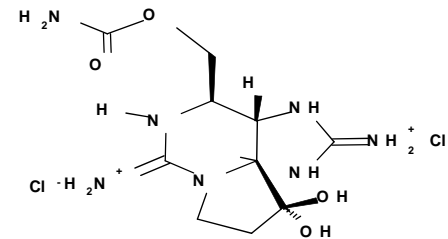
Protoceratium reticulatum



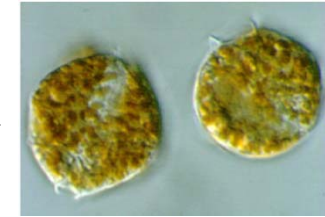
Groupe acide domoïque



Pseudonitzschia spp.

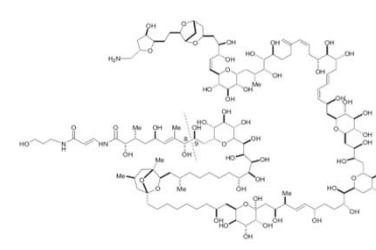


Groupe Saxitoxine

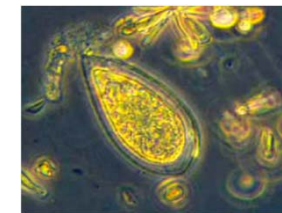


Alexandrium sp.

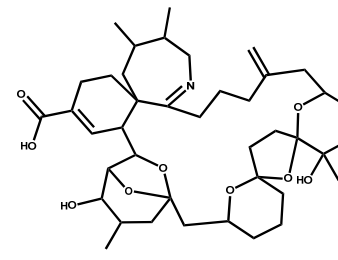
Toxines émergentes Non encore réglementées



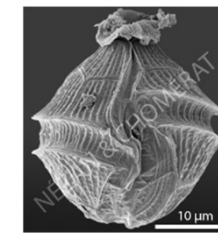
Ovatoxine/Palytoxine



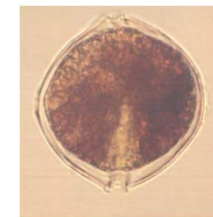
Ostreopsis (benthique)



Imines cycliques
(Pinnatoxines, spirolides)

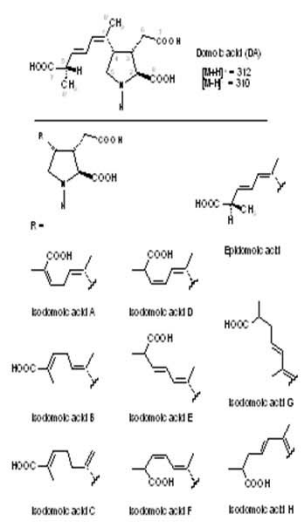


Vulcanodinium

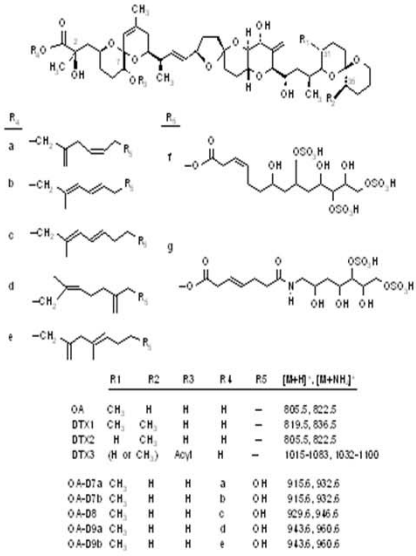


Alexandrium ostenfeldii

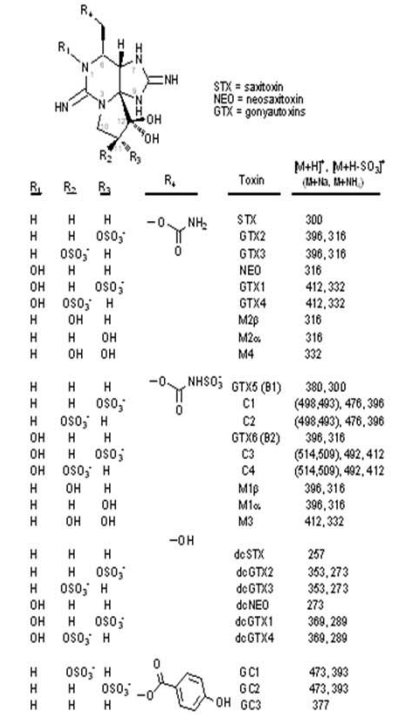
Domoic Acid Group:
Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)



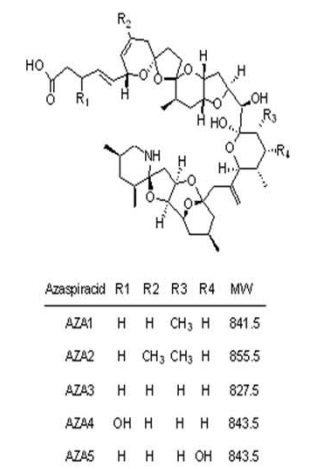
Okadaic Acid Group:
Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)



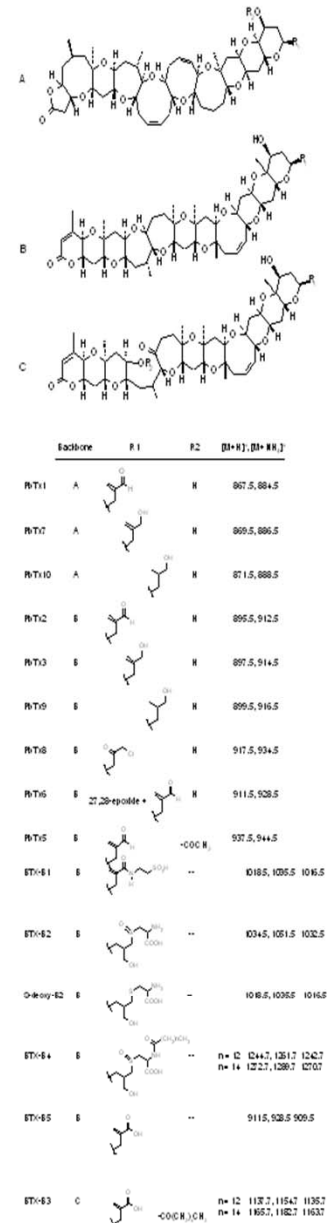
Saxitoxin Group:
Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)



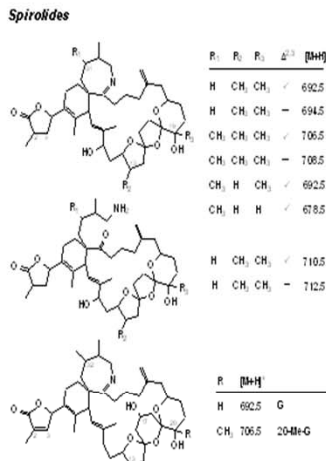
Azaspiracid Group:
Azaspiracid Shellfish Poisoning (AZP)



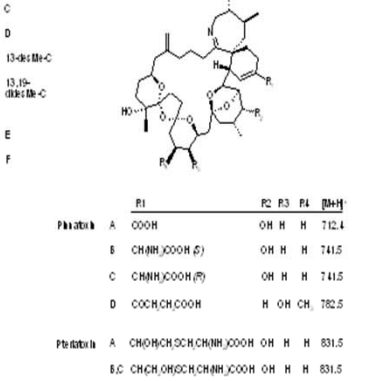
Brevetoxin Group:
Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP)



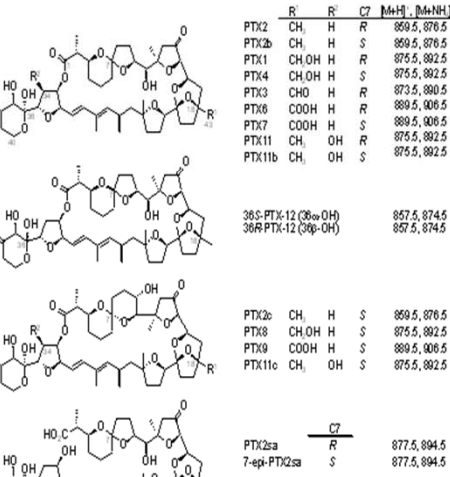
Cyclic Imine Group



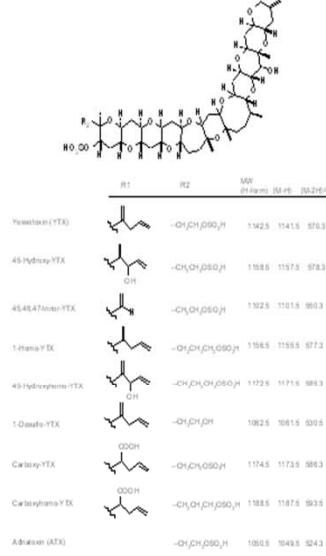
Pinnatoxins & Pteriatoxins



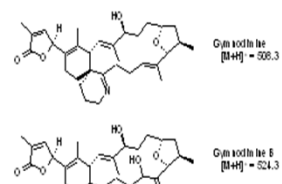
Pectenotoxin Group



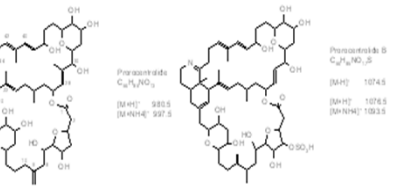
Yessotoxin Group



Gymnodimines



Proceratrolides



AXE 1 - Méthodes de caractérisation des phycotoxines

➔ Pour les Travaux de recherche

- ✓ Profils toxique des microalgues et des produits de la mer
- ✓ Etude des conditions de production des toxines par le phytoplancton
- ✓ Etude des Processus contamination/décontamination & métabolisation
- ✓ Identification de nouvelles toxines et/ou de métabolites
- ✓ Suivi des toxines dissoutes via les échantillonneurs passifs,
- ✓ etc...

➤ Il n'existe pas une seule méthode pour toutes les situations

➔ Approches analytiques ciblée et non ciblée

Mises en places à PHYC

En perspective au LNR - Anses

Criblage ciblé en CL-SMHR Q-TOF

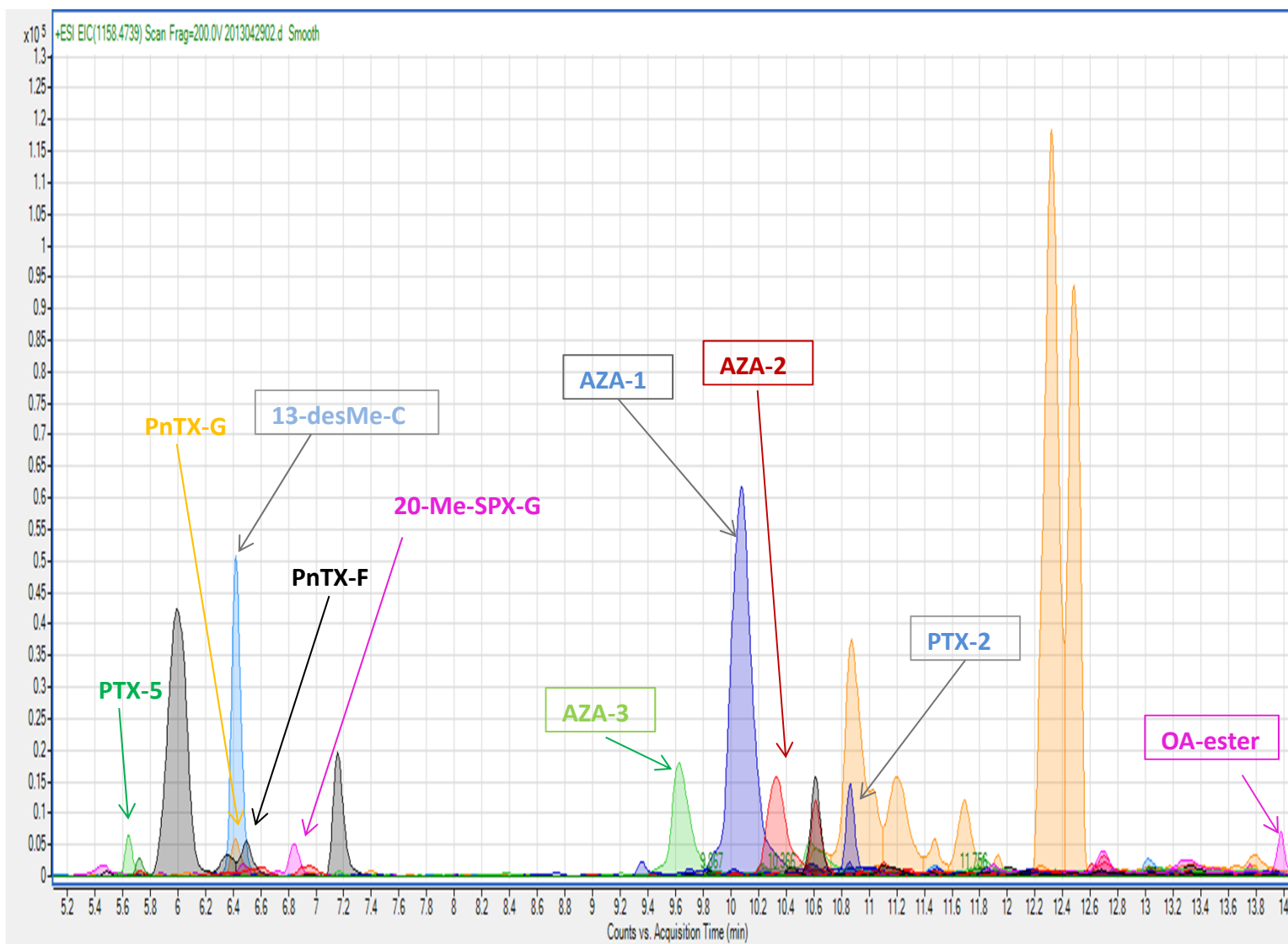
Construction en cours au lab. PHYC d'une base de données
et d'une bibliothèque de spectromètres de masses

Toxin family	Toxin group	Abbreviation	Number	
			Compound	Molecular structure
ASP	Domoic acid	DA	9	9
DSP	Okadaic acid & dinophysistoxins	OA+DTXs	65	10
	Azaspiracids	AZAs	30	/
	Pectenotoxins	PTXs	16	4
	Yessotoxins	YTXs	31	/
Cyanobacteria	Oscillatoxins	n/a	9	/
Cyclic imines (FAT)	Gymnodimines	GYMs	4	4
	Spirolides	SPXs	11	11
	Pinnatoxins and Pteriatoxins	PnTXs+PterTXs	12	12
PSP	Saxitoxins	STXs	18	18
	Tetrodotoxins	TTXs	18	/
NSP	Palytoxins	PLTXs	8	1
	Brevetoxins	PbTXs (BTX)	16	/
	Pacific Ciguatoxins	P-CTXs	27	/
	Caribbean Ciguatoxins	C-CTXs	2	/

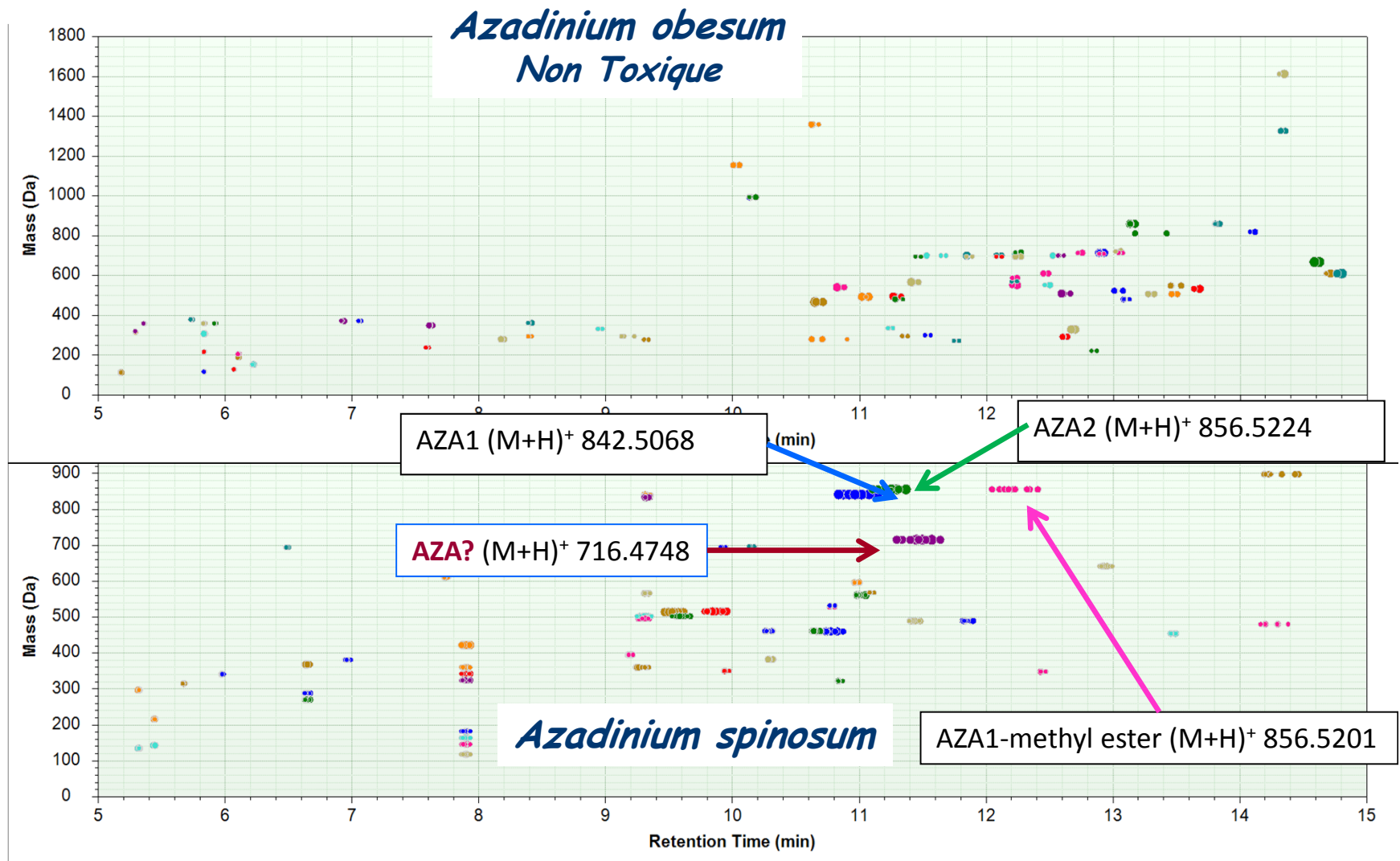
➤ Problème d'étalons : seulement 20 étalons environ pour l'ensemble des toxines répertoriées au niveau EU



Ex. criblage ciblé en CL-SMHR Q-TOF Via la base de données PHYC

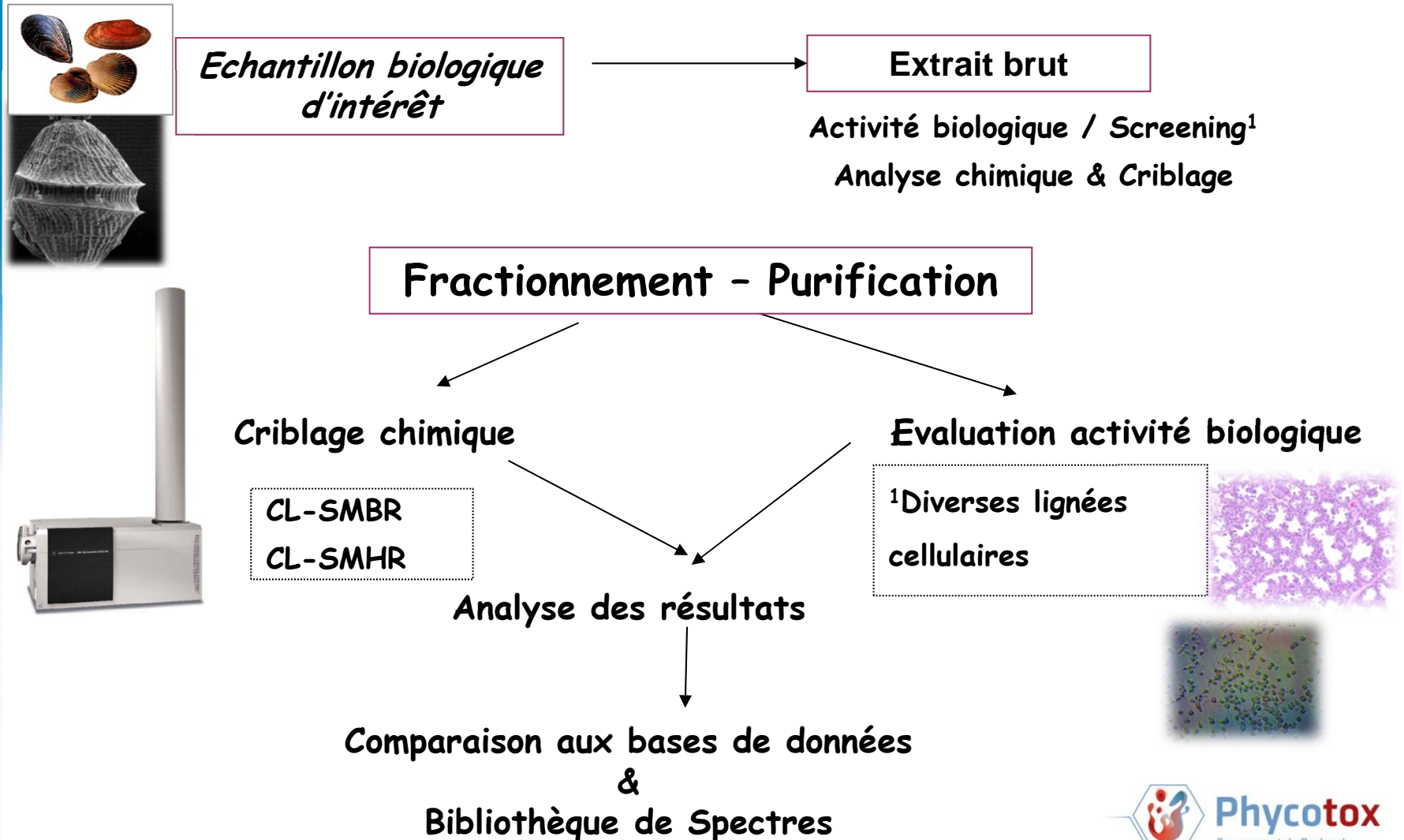


Ex. de criblage non-ciblé en CL-SMHR



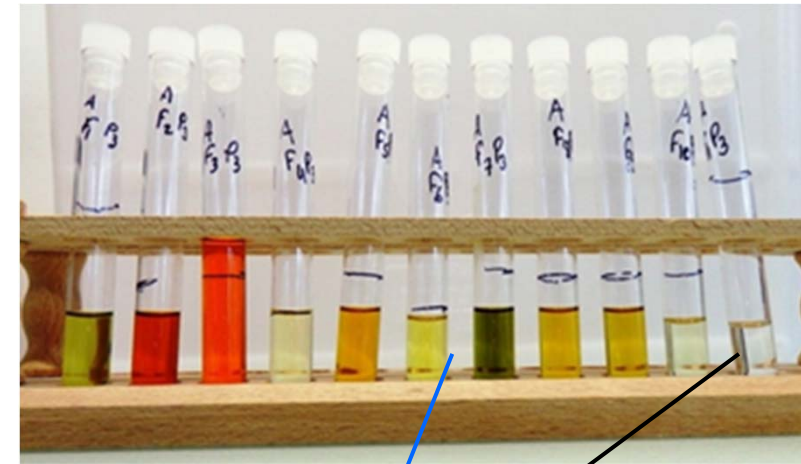
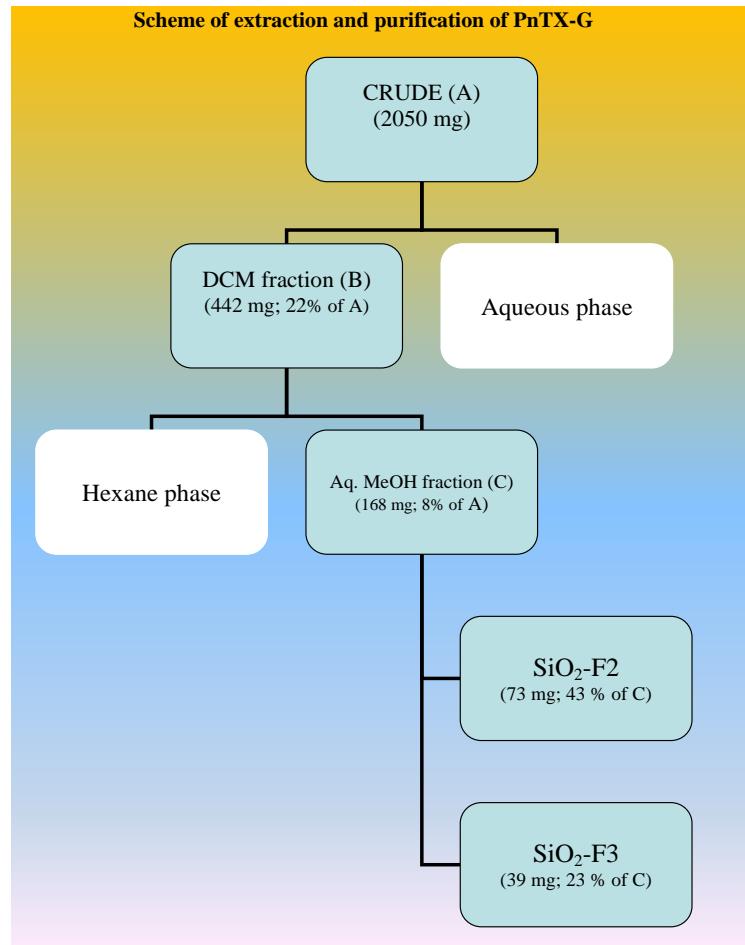
- 77 signatures caractéristiques d'*A. obesum*, 59 pour *A. Spinosum*.
- 95 signatures communes,

Criblage non ciblé : mise en évidence de toxines émergentes ou nouvelles via Fractionnement Bio-guidé



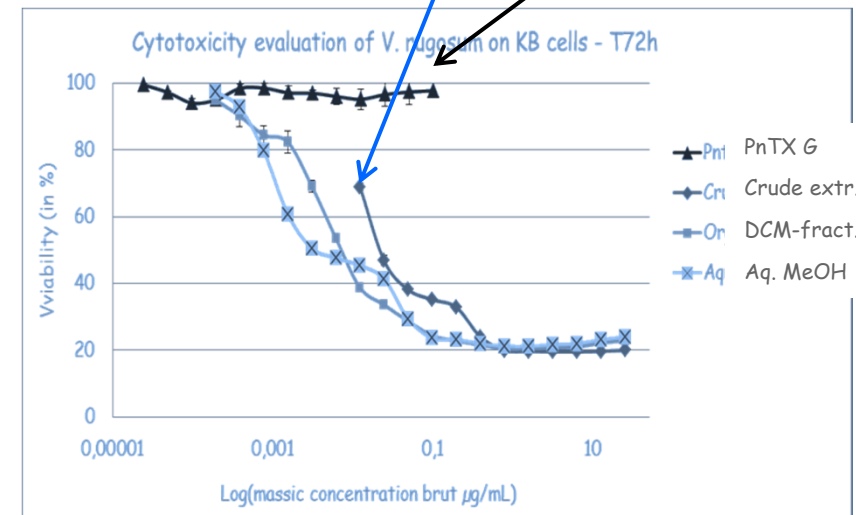
Ex. de Criblage non ciblé

Fractionnement d'extrait de culture de *V. rugosum*



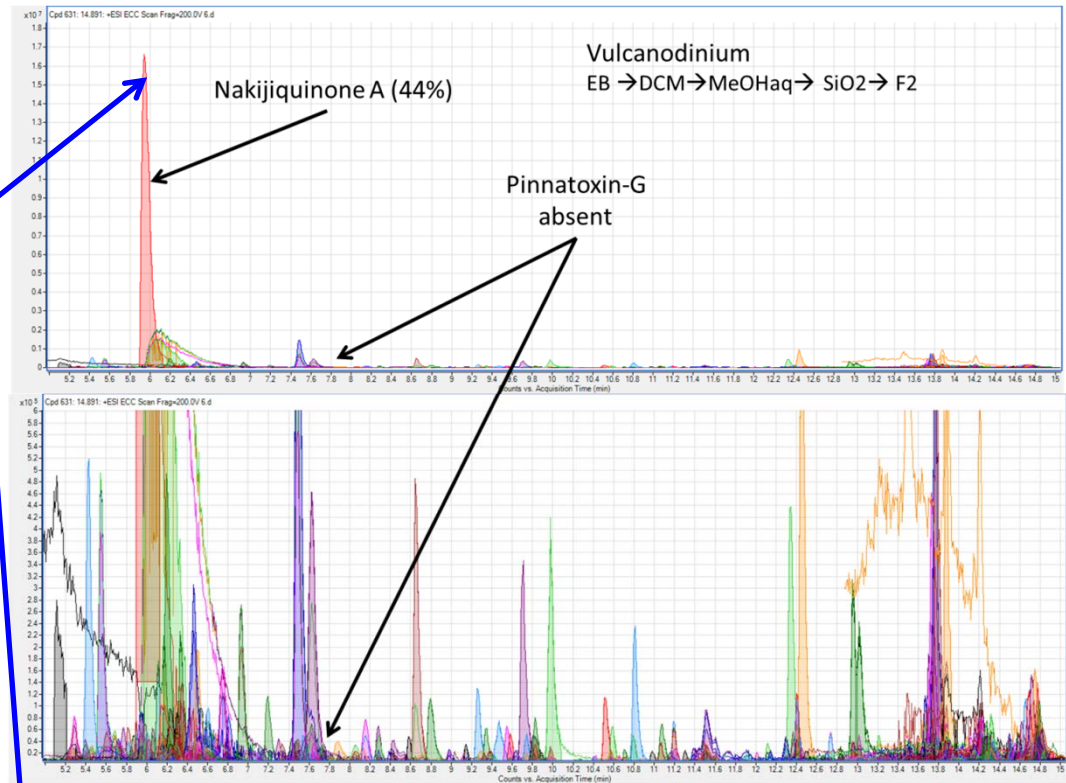
Extrait brut

Pinnatoxine-G



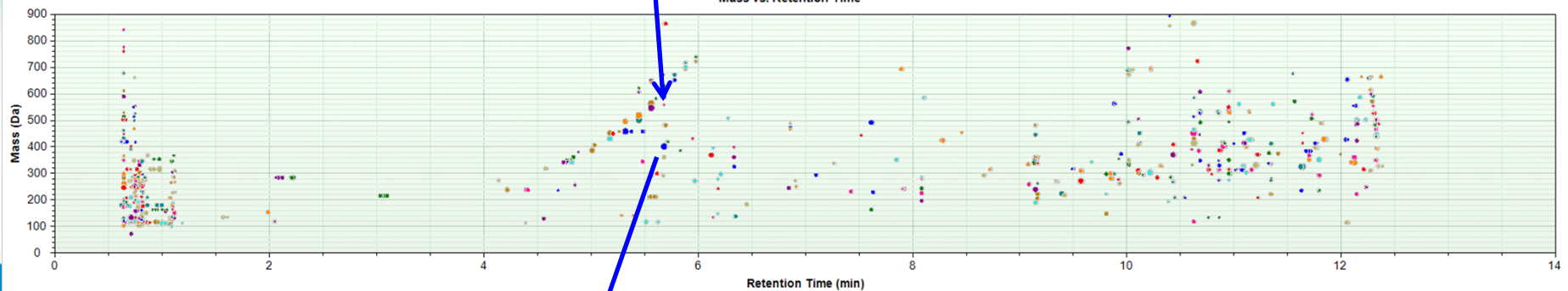
Mise en évidence d'un composé cytotoxique dans l'extrait de *Vulcanodinium*

- Identification rapide (15 min) par criblage via la base de données Munro (30000 composés)



Vulcanodinium
EB → DCM → MeOHaq → SiO₂ → F₂

Mass vs. Retention Time



Name	RT	m/z	Score (DB)	Diff (DB, ppm)
<u>Portimine</u>	5.68	402.2278	99.4	-0.82

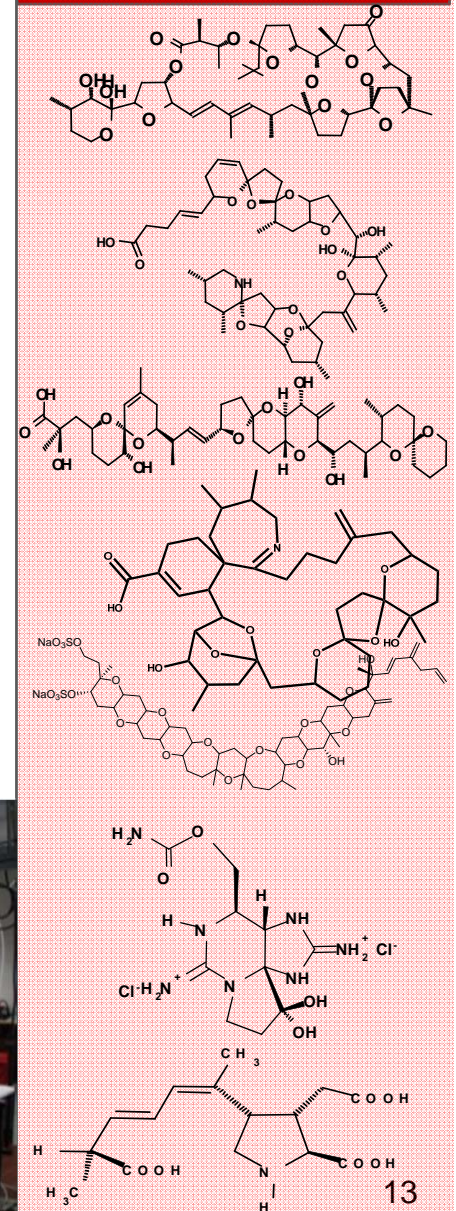
Laboratoire Phycotoxines - IFREMER



4 chercheurs (2 HDR), 3 ingénieurs, 5 TA,
3 thésards, 1 post-doc

Spécificité PHYC

- Cultures en continu de microalgues & Production de toxines
- Identification et Quantification des toxines marines & leurs métabolites via la CL/SM (BR & HR) et des outils chimio-informatiques.
- Bio-accumulation et métabolisation de biotoxines marines dans les produits de la mer.



Equipements & infrastructure PHYC

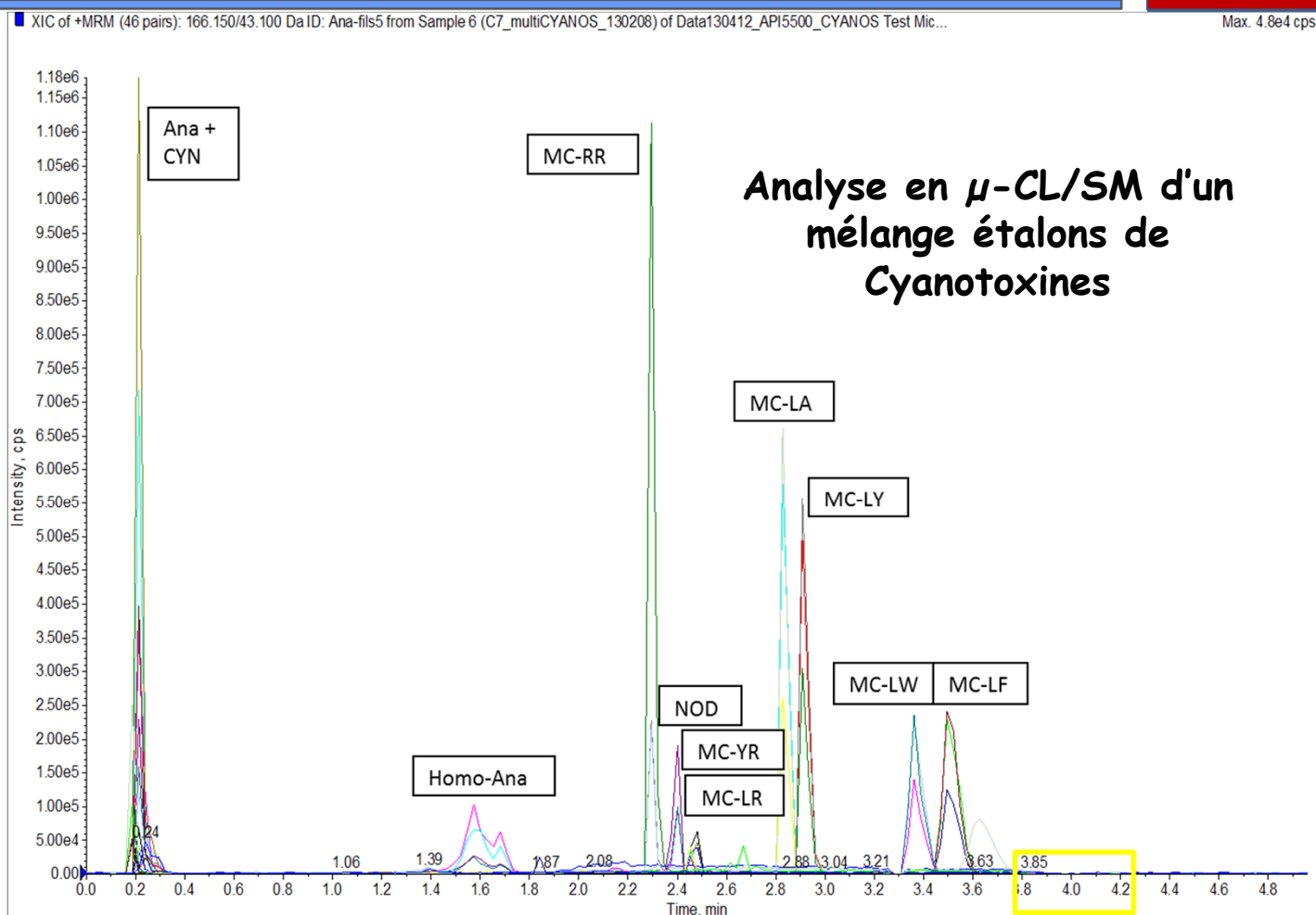
- 4 systèmes CL-SM/SM
- 2 CL-SMHR : Q-TOF & IT-TOF
- 1 CL/SM semi-préparative - isolement de toxines
- 3 CL/ fluorescence / barrette de diode
- 2 automates d'extraction, Chromoto flash- purification
- Lecteur de plaque - tests fonctionnels
- 6 salles de cultures de microalgues toxiques & non toxiques
- Laboratoire expérimentale humide
- Compteur de particules et un cytométrie de flux
- Photo-bioréacteurs : pilote (2,3 L) & 2X (3X100 L)
- Quatre microscopes & système d'acquisition d'images
-



Mise en place de méthodes de quantification

- ✓ Toxines amnésiantes (ASP) par CL/DAD : acide domoïque & dérivés
- ✓ Toxines lipophiles en CL-SM/SM : groupes acide okadaïque, Pectenotoxine, Azaspiracide, Yessotoxine, Spirolide, Gymnodimine, Pinnatoxine
- ✓ Toxines paralysantes (PSP) par CL/FLD après dérivation post-colonne
- ✓ Palytoxines & Ovatoxines (PITX) en CL-SM/SM
- ✓ Cyanotoxines en CL-SM/SM : cylindrospermospine, nodularine, anatoxines, microcystines, BMAA & analogues
- **Participation avec succès à 7 exercices de validation** inter-laboratoires, au niveau international, des méthodes de détection des toxines réglementées,
ainsi qu'aux exercices annuels d'inter-calibration Quasimeme.

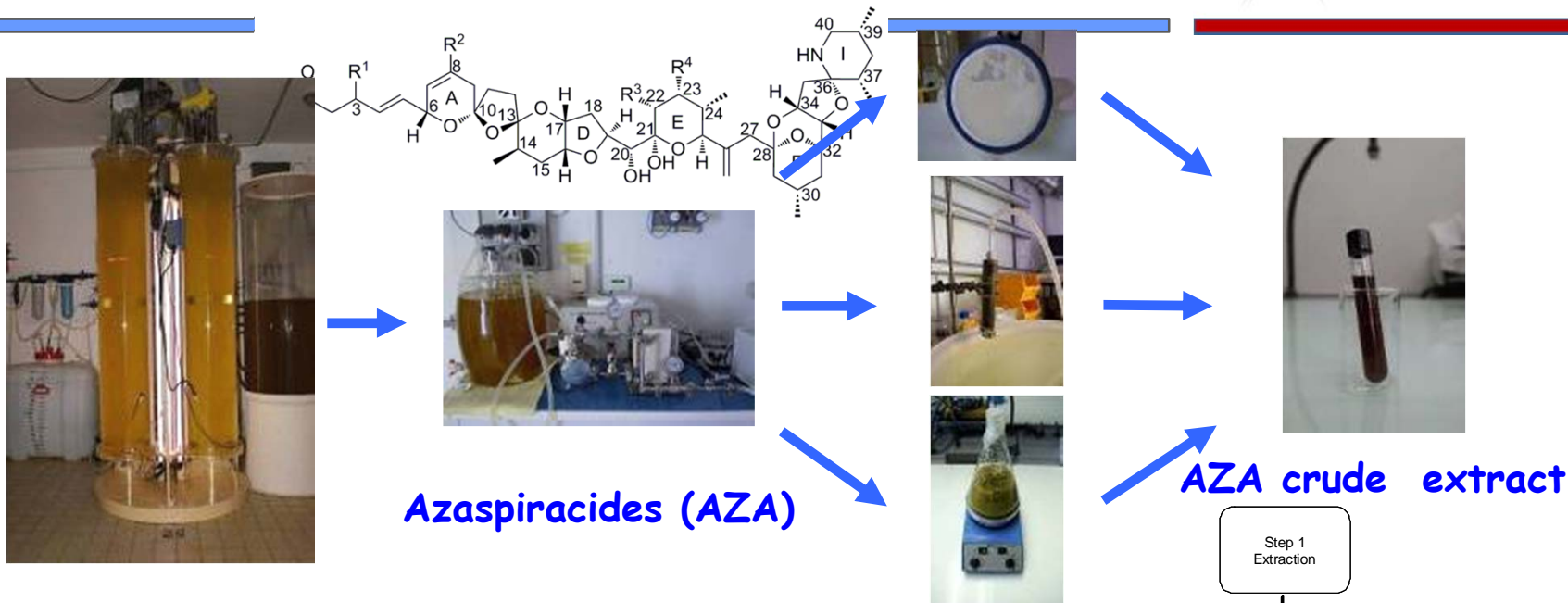
Evolution méthodo : vers le Micro débit en CL/SM



10

- ➔ 0,5 - 1 μ l injecté, au lieu de 5 μ l en CL/SM classique
- ➔ Temps d'analyse divisé par 3 & Sensibilité multipliée par 5

Production & isolement de phycotoxines



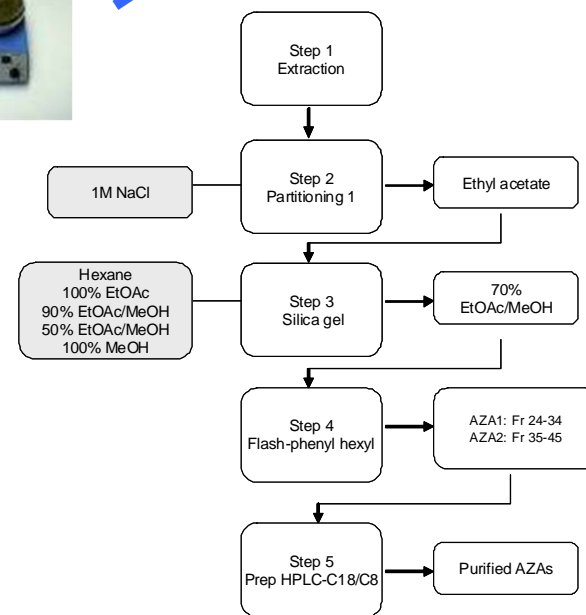
A partir de culture en continu de 60 jours (1200 L)

➔ production de 10 mg of pure AZA1

Prix du marché : 180,000 \$ / mg

➔ Isolement de nouveaux analogues :

AZA (m/z 716) & AZA (m/z 816)



Projets PHYC en cours / Caractérisation des toxines - Risques émergents (*Priorités EU*)

- ✓ Ovatoxines & Palytoxine / *Ostreopsis ovata* (*Thèse C. Brissard 2011-14*)
 - ✓ Ciguatoxines / *Gambierdiscus* - Est Atlantique (*en partenariat avec ILM & NOAA*)
 - ✓ Pinnatoxines / *Vulcanodinium rugosum* (*Etude DGAL/DGS/ANSES 2012-14*)
 - ✓ Cyanotoxines marines / Cyanobactéries (*Thèse D. Réveillon 2012-15*)
 - ✓ Développement d'outil de criblage & Chimiodiversité (*Thèse Z. Zendeng 2012-15*)
 - ✓
- ➔ **Besoins en étalons de toxines, matériaux de référence pour le développement de méthodes & les études toxicologiques, surveillance et étude d'impact...**

Amzil et al (2012) ; Séchet et al. (2012); Hess et al. (2013)

Zendong et al (soumis) ; Brissard et al (en prép) ; Réveillon et al (en prép.)

Equipe PHYC



*Merci pour votre
attention*

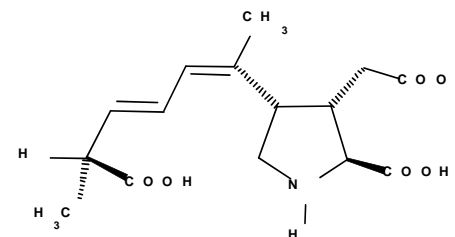


Des questions?



Méthodes officielles EU de détection des phycotoxines & leurs évolutions

Toxines amnésiantes (ASP)

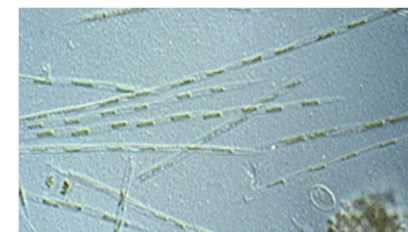


1) Analyse chimique en CL/UV validée AOAC.

2) Test ELISA validé AOAC, peut également être utilisé.

➔ *En cas de contestation, la méthode de référence est l'analyse chimique*

➔ *Pas de perspectives d'évolution à moyen terme*

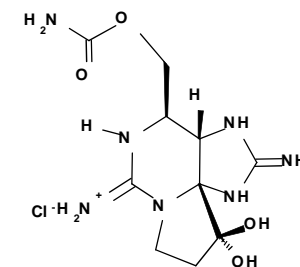
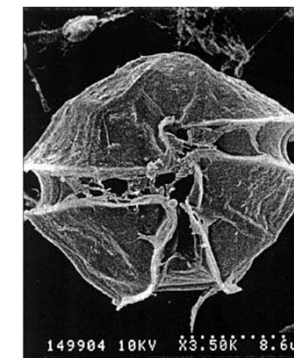


Méthodes officielles EU de détection des phycotoxines & leurs évolutions

Toxines paralysantes (PSP)

- 1) Bio-essai sur souris (BES), validé AOAC,
- 2) Analyse chimique en CL/Fluorescence : 2 méthodes validées AOAC via dérivation pré et post-colonne

➔ *En cas de contestation, la méthode de référence est le bio-essai sur souris*



Evolutions possibles

Méthode bio / récepteur du canal sodique

- Inconvénient : très faible marquage radioactif de l'étalon (3H-STX).
- Avantage : utilisée pour la détection des ciguatoxines (émergentes en EU)

Méthode de dépistage type ELISA : non encore validée.

➔ **Vers un remplacement du BES pour l'analyse des PSP ?**

Méthodes officielles EU de détection des phycotoxines & leurs évolutions

Toxines lipophiles réglementées

1) Analyse chimique en CL-SM/SM, validée EU, méthode de référence depuis 2011.

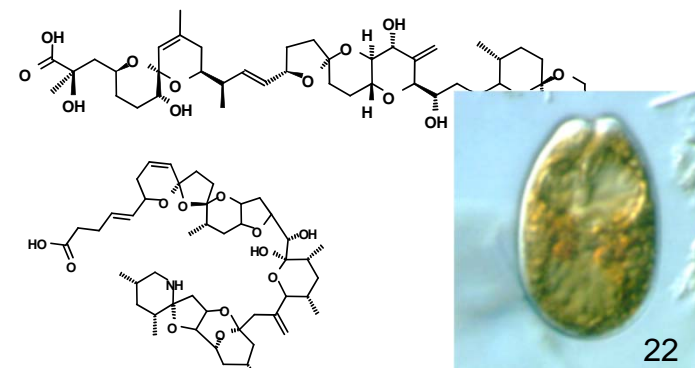
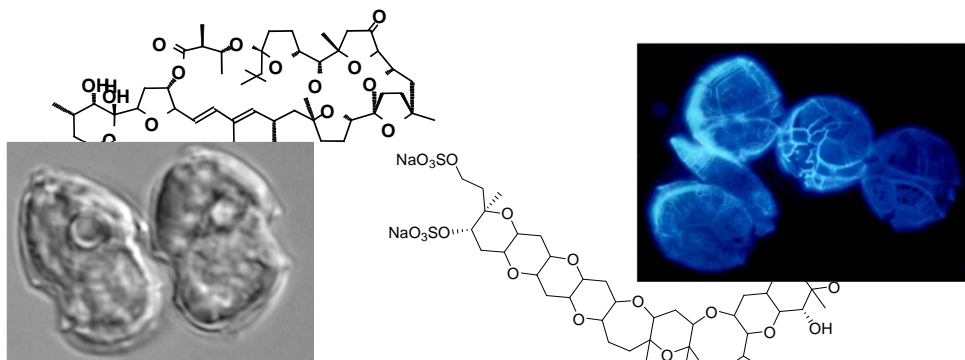


2) Bio-essai sur souris / toxicité globale : utilisé pour la détection de nouvelles toxines / système de vigilance.

➔ Période de transition : utilisation BES autorisée jusqu'au 31/12/2014



➔ *Pas de perspectives d'évolution EU à moyen terme*



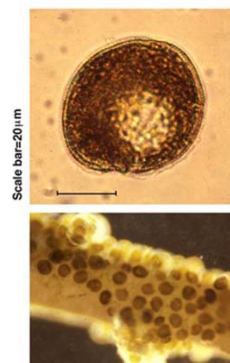
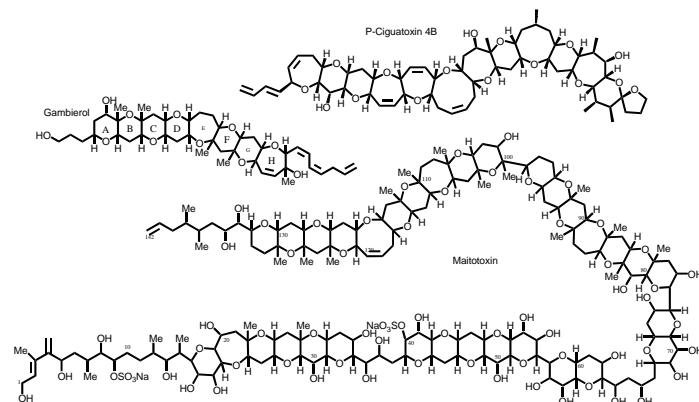
Toxines émergentes / Priorités EU

Besoin de données

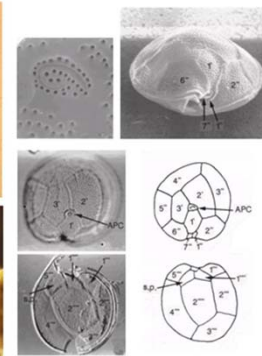
➔ Evaluation du risque lié aux toxines émergentes :

- ✓ Cigautoxines → *Gambierdiscus* sp.
- ✓ Ovatoxines & Palytoxines → *Ostreopsis* sp.
- ✓ Pinnatoxines → *Vulcanodinium* sp.

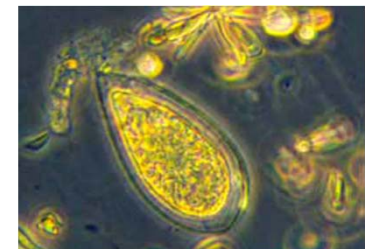
➔ Besoins en étalons de toxines, matériaux de référence pour le développement de méthodes & les études toxicologiques, surveillance et étude d'impact...



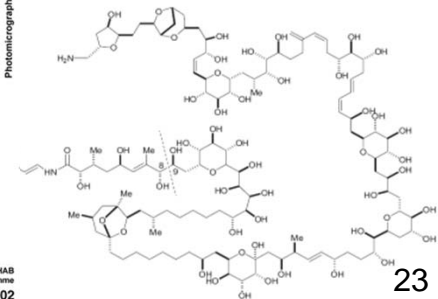
Gambierdiscus toxicus Adachi et Fukuyo



WESTRAC-HAB
IOC Harmful Algal Bloom Programme
T0002



Photomicrograph by Yasuwo Fukuyo



Projets en cours / Implication PHYC

Caractérisation des toxines - Risques émergents

OVATOXINES (thèse de C. Brissard 2011 - 14) (PHYC, LOV) : purification à partir de culture d'*Ostreopsis ovata* et niveaux d'accumulation dans les produits de la mer.

CYNOTOXINES MARINES (thèse de D. Réveillon 2012-15) (PHYC, LER-LR) : cultures de cyanobactéries marines productrices et niveaux d'accumulation dans les organismes marins.

VULCANO & Pinnatoxines (EC2CO & DGAL 2013-14) (PHYC, LER-LR, ECOSYM) : Etude de l'espèce émergente *Vulcanodinium rugosum*, producteur de pinnatoxines, découverte en Méditerranée en 2010 & acquisition de données pour l'évaluation du risque sanitaire.

LAGUNOTOX (Fondation TOTAL 2014-16) (PHYC, LER-LR, ECOSYM) : Espèces toxiques émergentes dans les lagunes méditerranéennes : mise en évidence des zones à risque, toxicité et traits écophysologiques - Aide à la mise en place d'outils de surveillance.

Chimiodiversité & analyse métabolomique des microalgues

ChiMiMar & AGILENT (Région PDL & Agilent, 2011 - 14) : développer des outils bio-informatiques pour la CL-SMHR & construction d'une base de données et d'une bibliothèque de spectres de masse Phycotoxines

COSELMAR (Région PDL 2012 - 16), développement de :

- Outils de criblage des toxines en CL-SMHR & d'échantillonneurs passifs (thèse Z. Zendong)
- Méthodes de détection des toxines paralysantes dissoutes dans l'eau de mer

Projets en cours / Implication PHYC

Ecophysiologie des microalgues toxiques

COSELMAR (Région PDL 2012 -2016) (PHYC, LER-MPL) : Toxicité de *Dinophysis acuminata* & mixotrophie - *développement et mise en place* de cultures associées de cryptophyte / cilié / *Dinophysis sp.*

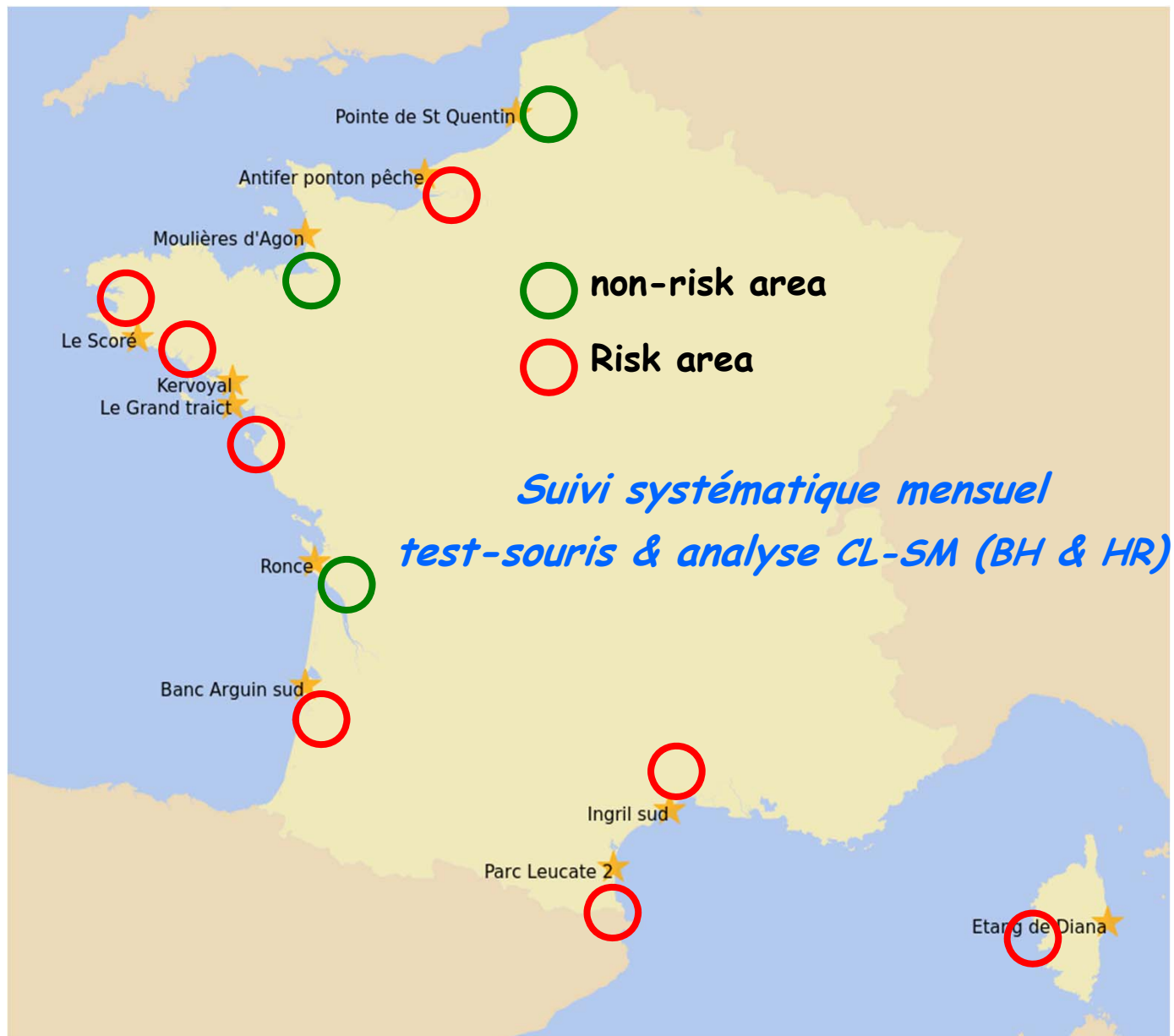
DOUALEX (Région Bretagne 2013-2015). Ifremer (Pélagos-coord, RDT, LER-BO & PHYC) & SBR : étude des efflorescences d'*Alexandrium minutum* survenues pour la 1^{ère} fois en 2012 en rade de Brest à Daoulas .

Inter-actions Toxines algales / Mollusques bivalves

ACCUTOX (ANR-CESA 2013 - 16), UMR-LEMAR-Coord., Ifremer (PHYC, LER-LR), EPOC, Anses : Evaluer l'impact des proliférations d'algues toxiques et des modifications de l'environnement sur les réponses physiologiques et la bioaccumulation des toxines dans les huîtres.

APOTOX (EC2CO 2012-2014) (UMRs-RIME-coord., ECOSYM), Ifremer (PHYC, LER-LR) : étude des effets apoptotiques induits par les neurotoxines du dinoflagellé *Al. catenella* chez l'huître *Crassostrea gigas* : conséquences sur la susceptibilité des huîtres aux pathogènes.

Système de vigilance / Recherche de toxines émergentes ou nouvelles



Seuils de sécurité sanitaires internationaux

par kg de chair de coquillage

Groupes Acide Okadaïque & Pectenotoxine = 160 μg

Groupe Azaspiracide = 160 μg

Groupe Yessotoxine = 3200 μg

Groupe Acide Domoïque = 20 000 μg

Groupe Saxitoxine = 800 μg

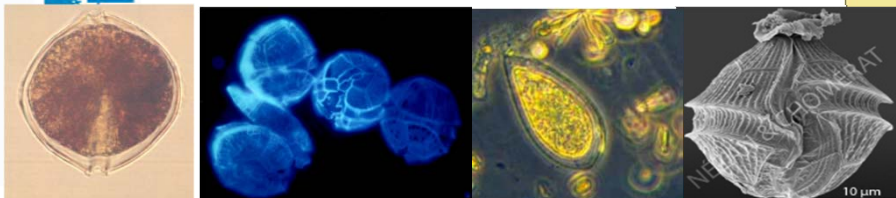
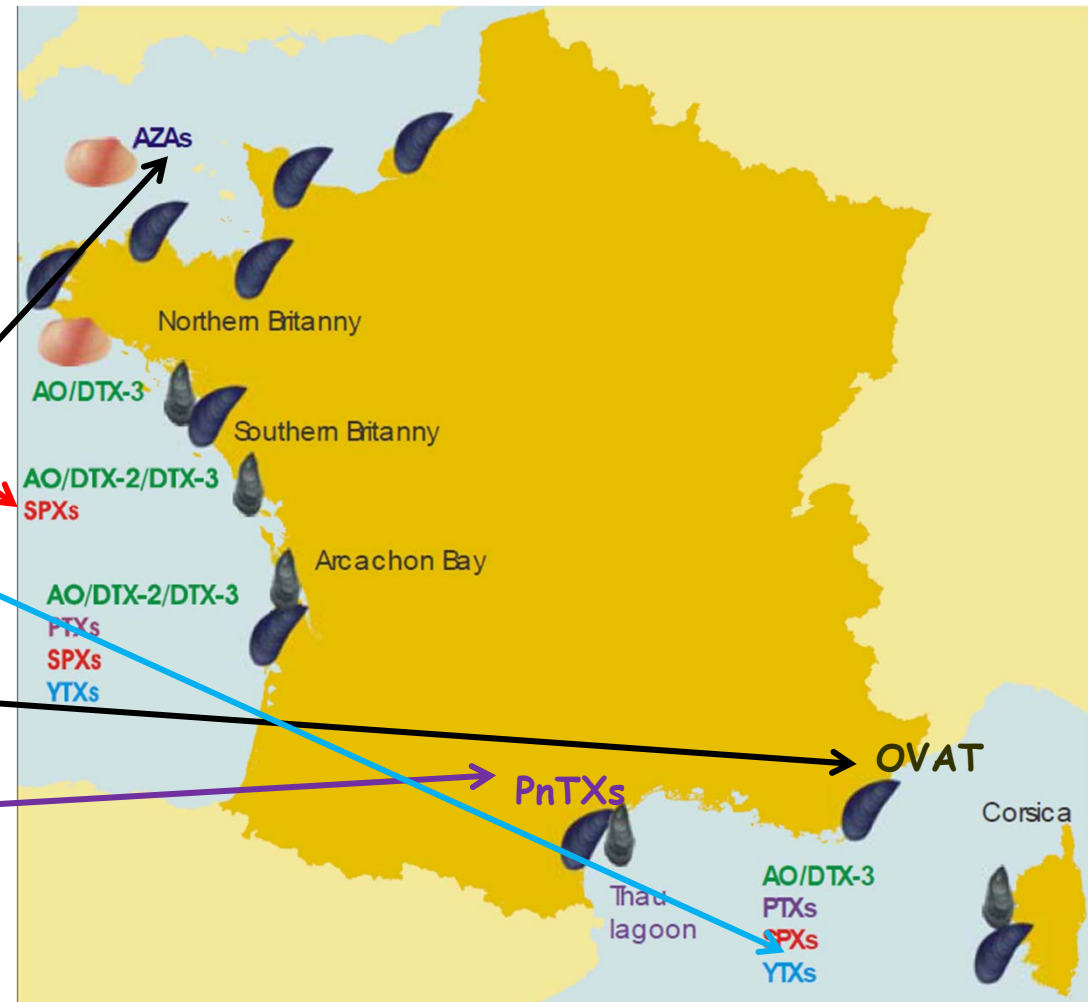
Groupe Brevetoxine = 800 μg

Groupe Palytoxine (30 μg , selon EFSA)

Mise en évidence des toxines lipophiles en France métropolitaine

En plus des groupes AO/DTXs, PTXs, mise en évidence pour la 1^{ère} fois en France des :

- Spirolides en 2006
- Azaspiracides en 2006
- Yessotoxines en 2007
- Ovatoxines en 2008
- Pinnatoxines en 2010



(Amzil et al, 2007 ; 2008 ; 2012, Séchet et al., 2012; Hess et al., 2013)

Stratégie de mise en évidence de toxines émergentes ou nouvelles

Fractionnement bio-guidé



**Vulcanodinium
rugosum**

Crude extract

Fractioning

Fractions

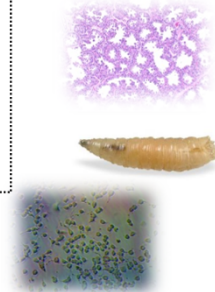
Biological Screening
and
Metabolomics: Dereplication^{1,2}

Chemical analysis

- CL-SMBR
- CL-SMHR Q-ToF

Evaluation of biological activity

- Cytotoxicity KB cells
- Fly larvae
- bacteria



Data analysis

(comparison to large natural product libraries²)

(1) Kristian F. Nielsen *et al.* *J Nat. Prod.* (2011) 74, p2338-2348

(2) <http://www.chem.canterbury.ac.nz/marinlit/marinlit.shtml>



Classification des Phycotoxines



Phycotox
Groupement de Recherche

Selon la nature chimique (toxine de base)

Selon les signes cliniques d'intoxication

Groupe Saxitoxine STX	→	PSP : Paralytic Shellfish Poisoning
Groupe Acide domoïque AD	→	ASP : Amnesic Shellfish Poisoning
Groupe Acide okadaïque AO	→	DSP : Diarrheic Shellfish Poisoning
Groupe Azaspiracide AZA	→	
Groupe Pectenotoxine PTX	→	Classées DSP
Groupe Yessotoxine YTX	→	
Groupe Imines cycliques (PnTX, SPX, Gym)	→	Toxicité non avérée chez l'Homme
Groupe Brevetoxine BTX	→	NSP : Neurologic Shellfish Poisoning
Groupe Ciguatoxine CTX	→	Ciguatera
Groupe Palytoxine PITX	→	«Palytoxicose»

Objectifs du laboratoire PHYC

Caractériser les toxines et métabolites accumulés dans la chaîne alimentaire en utilisant les procédés innovants de la spectrométrie de masse

Etudier l'influence des paramètres environnementaux sur la production de toxines par des micro-algues & cyanobactéries pélagiques et benthiques

Optimiser les procédés de culture en masse de microalgues pour les études expérimentales de contamination et pour la purification d'étalons de toxines

Explorer les voies métaboliques mises en jeu dans la bio-transformation de toxines et dérivés accumulés dans la chair des mollusques bivalves

En étroite liaison avec des équipes spécialisées, comprendre les processus de bio-accumulation, séquestration et élimination des toxines (Ex. Lemar-UBO)

Apporter une expertise scientifique et technique auprès du Rephy, des instances ministérielles et institutionnelles, ainsi qu'auprès des acteurs socio-économiques.