

La métabolomique et les biotoxines marines

Période : septembre 2015 à novembre 2015

Florence MONDEGUER | florence.mondeguer@ifremer.fr

Ifremer - Laboratoire phycotoxines – Nantes - France

Mots clés : **biotoxines, biomarqueurs, métabolomique, microalgues, moules, spectrométrie de masse haute résolution (HRMS), workflow**

La sécurité alimentaire est devenue un enjeu majeur mondial. De nombreuses contaminations alimentaires dues à des pathogènes ou à des toxines se produisent encore, à la fois dans des pays en développement ou industrialisés, sans que ces empoisonnements ne puissent toujours être reliés à un aliment en particulier. L'apparition de l'effet pouvant de fait, être progressif et ne pas avoir été détecté jusqu'à ce que des dommages chroniques ou permanents se soient produits(1).

C'est le cas des biotoxines marines qui sont produites par des microalgues, principalement des dinoflagellés, dont les populations peuvent proliférer, dans certaines conditions environnementales,

Au cours de ces efflorescences les biotoxines marines constituent un risque important de sécurité alimentaire lorsqu'elles s'accumulent dans des coquillages consommés par l'homme et qu'elles provoquent des syndromes divers (gastro-intestinaux, neurologiques etc...). On estime que les toxines des dinoflagellés provoquent de 50.000 à 500.000 cas d'intoxication par an, avec un taux global de mortalité de 1,5% (2)

En conséquence, il est nécessaire de disposer d'outils de surveillance sensibles et efficaces pour détecter les biotoxines marines (3-4-5) en particulier mais aussi leurs biomarqueurs(6), de manière à garantir à la fois la sécurité des consommateurs et protéger les industries aquacoles d'éventuels dommages financiers.

Les composés connus que sont les toxines, les résidus de substances chimiques et autres contaminants, sont efficacement analysés à l'aide de méthodes dites ciblées.

Cependant, ces approches classiques ne permettent pas de cartographier par exemple, la diversité chimique, ni la gamme étendue des métabolites secondaires bioactifs qui jouent un rôle important ou potentiel dans les interactions écologiques. Ainsi la mise en évidence de métabolites libérés par le phytoplancton, ou de biomarqueurs prédictifs et hiérarchisés liées à des perturbations toxiques, nécessitent de nouvelles stratégies sans à priori (7, 8).

Parmi ces nouvelles stratégies, qui compensent le manque d'exhaustivité des analyses conventionnelles, la métabolomique* met en jeu l'analyse d'un grand nombre de molécules organiques de petites tailles et inférieures à 1500 Da (9-10-11), à partir d'empreintes chimiques globales et d'outils bioinformatiques de fouille de données. Si la grande diversité structurale et physicochimique des métabolites met en œuvre un grand nombre de techniques analytiques, l'identification et la caractérisation des molécules de l'empreinte chimique (12) font appel à essentiellement des techniques de haute résolution comme la RMN et la spectrométrie de masse.

Ce type d'approche globale, en fort développement (13) est pourtant un outil encore peu utilisé dans le domaine des biotoxines marines. Ainsi pour cette note il n'a pas été possible de regrouper sur 2015, trois articles ne ciblant spécifiquement que le champ de la métabolomique et des biotoxines marines.

De ce fait, cette note explore divers sujets tels que (i) l'intérêt de caractériser le métabolisme d'organismes, comme des moules, vivants dans un environnement naturel, perturbé ou pas par la présence de contaminants, (ii) l'avantage du criblage non ciblé comparé, de toxines marines, dans des extraits de moules ou sur des échantillonneurs passifs et (iii) la perspective élargie d'un workflow indépendant pour décrire le métabolome d'une cyanobactérie marine.

Réponses métabolomique de palourdes en cage, *Ruditapes decussatus*, exposées aux intrants agricoles et urbaines d'une lagune côtière méditerranéenne (Mar Menor, SE Espagne)

Campillo, J.A., Sevilla, A., Albentosa, M., Bernal, C., Lozano, A.B., Canovas, M., Leon, V.M., 2015. Metabolomic responses in caged clams, *Ruditapes decussatus*, exposed to agricultural and urban inputs in a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain). *Science of the Total Environment* 524, 136-147.

Résumé

Dans cette étude, par le biais d'un design expérimental soigneusement construit et d'une plate-forme métabolomique, des données ont été collectées puis acquises par LC-MS^{*}. Des analyses statistiques multivariées et des identifications discriminatives ont été menées, ainsi que la caractérisation de métabolites. Plus de 70 métabolites primaires connus ont été mesurés simultanément dans 200 palourdes réparties sur 3 sites, de manière à caractériser, les réponses métaboliques de ces organismes face à une pollution environnementale (agriculture intensive et forte concentration urbaine). A cela s'ajoute une comparaison à J7 et J22 des réponses métaboliques données par les glandes

digestives de palourdes soumises à différents niveaux d'exposition aux contaminants présents dans cette lagune (principalement des pesticides et produits pharmaceutiques).

Commentaire

La contribution de cet article se fait à deux niveaux. Le premier, est de montrer qu'une diminution drastique de la concentration en taurine est un biomarqueur particulier des zones polluées, et le second est d'avoir réalisé l'étude en milieu naturel, alors que la majorité des études précédentes ont été réalisées dans des conditions contrôlées, en laboratoire.

Les seules limites de l'article proviennent de l'argumentaire final qui tendrait à faire croire que la détection SIM⁺ par LC-MS peut être considérée comme le moyen idéal pour valider les résultats obtenus et trouver de nouveaux biomarqueurs d'intérêt. Or, les profils métaboliques qui peuvent contenir de quelques centaines à des milliers de signaux (versus les 70 métabolites identifiés) sont impossibles à caractériser avec de tels systèmes analytiques dits de basse résolution⁺.

En effet il faut avoir recours à une détection HRMS⁺ pour identifier et distinguer des métabolites discriminants (14) qui soient des biomarqueurs connus mais aussi non prévus, en rapport direct avec l'hypothèse de la contamination suspectée.

Spectrométrie de masse haute résolution pour l'analyse quantitative et le dépistage non ciblé de toxines algales dans des moules et des échantillonneurs passifs

Zendong, Z., McCarron, P., Herrenknecht, C., Sibat, M., Amzil, Z., Cole, R.B., Hess, P., 2015. High resolution mass spectrometry for quantitative analysis and untargeted screening of algal toxins in mussels and passive samplers. *Journal of Chromatography A* 1416, 10-21.

Résumé

Dans l'analyse des contaminants, l'échantillonnage passif a plutôt été présenté comme un outil lié à des études complémentaires d'investigation, tandis que dans cet article le couplage de l'analyse d'échantillonneurs passifs par l'analyse non-ciblée HRMS est utilisé comme une nouvelle approche, originale, pour la détection des toxines produites par les microalgues (phycotoxines). Les auteurs ont comparé les apports d'une résolution basse (triple quadripôle) ou haute (quadripôle à temps de vol et Orbitrap) dans la détection d'un large éventail de toxines extraites de moules ou d'échantillonneurs passifs. Dans cette étude c'est précisément l'effet de la matrice moules (*Mytilus galloprovincialis*) qui a été comparé à celui des échantillonneurs passifs. Pour réaliser ce travail, les 2 types de matrice ont été dopés à l'aide d'une large gamme d'étalonnage de standards des phycotoxines. A travers la conduite d'une approche non ciblée il est démontré que les effets matrice sont plus intenses dans les extraits de moules que dans les échantillonneurs passifs.

Commentaire

De nombreux pays ont désormais fixé des directives réglementaires et établi les concentrations maximales admissibles pour les substances potentiellement dangereuses dans les fruits de mer.

Cependant, les toxines marines présentent une famille de molécules d'une grande variété aussi bien de par leurs structures chimiques, leurs masses moléculaires que leurs propriétés physico-chimiques et cette diversité rend non seulement difficile l'identification en routine des toxines connues, mais elle complique surtout la possibilité de déceler des indices de la présence d'autres toxines plus dangereuses mais inconnues, et/ou de leurs métabolites. Le développement de cette approche non-ciblée qui compare les profils d'organismes vivants métabolisant les toxines et de l'échantillonnage captant passivement les composés du milieu, ouvrent des perspectives multiples pour identifier ces composés rendus inaccessible par des matrices complexes et voir s'ils peuvent participer à établir une empreinte spatiale et temporelle d'un environnement donné.

Extension du métabolome de la cyanobactérie marine *Moorea producens* JHB expliqué à travers des Workflows indépendants de produits naturels.

Boudreau, P.D., Monroe, E.A., Mehrotra, S., Desfor, S., Korobeynikov, A., Sherman, D.H., Murray, T.F., Gerwick, L., Dorrestein, P.C., Gerwick, W.H., 2015. Expanding the Described Metabolome of the Marine Cyanobacterium *Moorea producens* JHB through Orthogonal Natural Products Workflows. *Plos One* 10.

Résumé

La cyanobactérie marine *Moorea-producens*-JHB, est une souche jamaïcaine qui a été très largement étudiée par le biais de toutes les techniques classiques appliquées aux produits naturels

Dans la présente étude, les auteurs ont utilisé une approche de «réseau moléculaire» par LC-MS/MS⁵, différente des étapes classiques d'isolement des ions pour l'élucidation structurale des molécules, pour représenter le métabolome de la cyanobactérie et découvrir de nouveaux dérivés halogénés de la famille des hectochlorines et des jamaïcarnides connus pour être les métabolites II principaux de cette souche. De plus, sachant que les autres métabolites II de cette souche seraient des composés mineurs, les auteurs ont croisé et retraité toutes les données issues de techniques analytiques alternatives réalisées sur leurs extraits brutes ou purifiés, dont le séquençage du génome, toutes conduites indépendamment les unes des autres « orthogonal workflows⁷ » pour ainsi montrer l'aptitude de cette souche à produire un autre composé isolé comme sans rapport avec les jamaïcarnides ou les hectochlorines.

Commentaire

Pour pouvoir explorer pleinement le métabolome secondaire d'un organisme, il est nécessaire de disposer d'une forme de plateau technique intégrant des logiciels de bioinformatique

permettant de visualiser les réseaux d'interactions moléculaires avec des profils d'expression des gènes et des données d'analyses de profilage métabolomique. L'ensemble des résultats obtenus dans la plateforme doit pouvoir également évoluer dans un environnement complété par des scripts et des connexions aux bases de données. Applicable à des échantillons complexes, récoltés directement sur le terrain, dans des environnements non axéniques, cette approche révèle des métabolites mineurs ou négligés mais pourtant impliqués de manière directe ou intermédiaire dans la biosynthèse du métabolome secondaire.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La métabolomique représente une approche nouvelle d'évaluation de l'état de contamination des organismes, des compartiments environnementaux ou alimentaires, et de l'impact que la pollution marine, naturelle ou pas, peut avoir sur eux. A travers l'analyse de la variation des métabolites présents dans la cellule, les tissus, les organes ou même l'organisme entier il est possible de définir un état physiologie, un stade de développement ou encore un état de contamination.

D'une manière générale, l'analyse des métabolites corrélée à des plans d'expérience bâtis autour d'une question biologique ou environnementale claire, supportée par des outils sensibles et reproductibles, et donnant accès à des bibliothèques « maison » ou internationales, apporte autant de réponses que de questions posées. Il est ainsi possible d'expliquer par exemple comment l'exposition aux polluants chimiques tels que le plomb, peut provoquer une neurotoxicité, des perturbations dans le métabolisme de l'énergie, des perturbations osmotiques, une altération du métabolisme des lipides. Certaines études ont même prouvé que les perturbations métaboliques liées à l'effet conjugué des médicaments et des toxiques environnementaux apparaissent souvent beaucoup plus tôt que les autres modifications induites par la pollution (15).

Néanmoins on le voit bien à la lecture des 3 articles, le potentiel de réponses apportées est bien fonction de la puissance des outils utilisés, plus la pluridisciplinarité des techniques est riche et plus les voies de biosynthèse sont compréhensibles. Seule l'approche de techniques complémentaires intégrées permet une détection holistique du métabolome, y compris ces composés produits en quantités infimes mais qui sont pourtant incontournables à la compréhension des mécanismes de biosynthèse. Il faut également souligner que la compréhension de l'état physiologique d'un organisme ou de sa perturbation suite à une contamination est une approche pluridisciplinaire nécessitant des échanges permanents entre le chimiste analyste, le statisticien / chimiométricien et le biologiste.

Un autre avantage non négligeable de l'analyse non ciblée HRMS et sans a priori, est qu'elle offre (sous couvert d'un archivage bien géré) des moyens significatifs pour des

études rétrospectives. Ces études pourraient contribuer à définir par exemple l'émergence réelle de contaminant, ce qui est particulièrement pertinent dans l'étude de l'évolution de l'environnement.

GENERAL CONCLUSION

Metabolomics is a new approach to assess the contamination of organisms, environmental compartments or foodstuffs, and the impact marine pollution, (natural or anthropogenic), can have on them. Through the analysis of the variation of the metabolite profiles present in the cell, tissues, organs or even the whole organism it is possible to define a physiological state, a stage of development, or the level and nature of a contamination.

Generally, analysis of metabolites correlates to experimental design built around a clear biological or environmental question, needs to be supported by sensitive and reproducible tools, and requires access to libraries "house" or international. Often, the non-targeted approach allows for evaluation of many hypotheses.

Thus, it is possible to explain how exposure to chemical pollutants such as lead, may cause neurotoxicity, disruptions in the energy metabolism, osmotic changes or disturbance in lipid metabolism. Some studies have shown that the metabolic disturbances associated with the combination of drugs and environmental toxicants often appeared much earlier than other changes induced by pollution (15).

Nevertheless, as is clear from these three articles, the potential answer given is based on the power of the tools used, the more techniques are integrated into the approach, the more it is balanced and the easier biosynthetic pathways will be understood. Only orthogonal workflows allow for the holistic detection of the metabolome, including compounds produced in trace quantities which may nonetheless be essential to the understanding of biosynthetic mechanisms. Another important advantage of non-targeted HRMS analysis is that, if used in conjunction with a well-managed archive, it provides for retrospective studies that may help define the emergence of contaminants.

Lexique

Analyse non ciblée : L'analyse de spectre total (ou « fullscan* ») permet de détecter la présence de tous les composés ionisés, l'analyse est alors dite non ciblée. Dans ce cas le pouvoir résolutif de l'analyseur est primordial car c'est cette précision sur la mesure de la masse exacte qui permet de limiter le nombre de candidats putatifs répondant cette masse exacte

Fullscan : Balayage d'une gamme de masse dans laquelle on observe la totalité des ions formés dans cette gamme

HRMS : Spectrométrie de masse haute résolution, met en jeu des analyseurs haute résolution (TOF, secteur magnétique, FTICR, Orbitrap) qui permettent de discriminer les espèces isobares (nombreuses dans les fluides biologiques complexes) en donnant accès à la formule brute des ions détectés.

LC-MS : Chromatographie liquide couplée spectrométrie de masse

LC-MS/MS : Chromatographie liquide couplée spectrométrie de masse en tandem. Le 1^{er} analyseur sélectionne l'ion «parent/précurseur», La cellule de collision fragmente (par collision induite) l'ion et le 2^e analyseur analyse les ions « fils/fragments »

Métabolome : Ensemble de métabolites cellulaires. La métabolomique est l'analyse qui conduit à l'identification et la quantification de ces métabolites.
<http://www.metabohub.fr/index.php?lang=fr>.

SIM ou (Single Ion Monitoring) : L'analyseur est un simple quadripôle, c'est-à-dire : un analyseur de basse résolution (1000 maximum) avec une gamme de masse m/z : allant généralement de (0-4000 Da) et dans lequel le quadripôle fonctionne en filtre de masse réglé pour ne laisser passer que les ions d'un rapport m/z donné. La méthode est plus sélective et plus sensible que le fullscan. C'est un mode utilisé pour la quantification.

Workflow : C'est un anglicisme qui définit les étapes d'un processus d'analyse, sans les jeux de données proprement dits. Un workflow rassemble les analyses qui sont destinés à être exécutés (un ou plusieurs fois) avec différents ensembles de données d'entrée fournies par l'utilisateur. Ainsi à titre d'exemple, l'instance Galaxy propose une liste de workflows publiés à tester.
<http://workflow4metabolomics.org/training/W4Mcourse2015>.

Publications de référence

- 1 **Giacometti J, Tomljanovic AB, Josic D.** Application of proteomics and metabolomics for investigation of food toxins. *Food Research International* 2013;**54**:1042-1051
- 2 **Martinez I, James D, Loréal H.** Application of modern analytical techniques to ensure seafood safety and authenticity: Food and Agriculture Organization of the United Nations 2005.
- 3 **Zhuo L, Yin Y, Fu W et al.** Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by HILIC-MS/MS coupled with dispersive solid phase extraction. *Food Chem* 2013;**137**:115-21.
- 4 **Rubies A, Munoz E, Gibert D et al.** New method for the analysis of lipophilic marine biotoxins in fresh and canned bivalves by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry: A quick, easy, cheap, efficient, rugged, safe approach. *Journal of Chromatography A* 2015;**1386**:62-73.

5 **Senyuva HZ, Gokmen V, Sarikaya EA.** Future perspectives in Orbitrap (TM)-high-resolution mass spectrometry in food analysis: a review. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 2015;**32**:1568-1606.

6 **Plakas SM, Dickey RW.** Advances in monitoring and toxicity assessment of brevetoxins in molluscan shellfish. *Toxicon* 2010;**56**:137-149.

7 **Ianora A, Bentley MG, Caldwell GS et al.** The Relevance of Marine Chemical Ecology to Plankton and Ecosystem Function: An Emerging Field. *Marine Drugs* 2011;**9**:1625-1648.

8 **Suarez-Ulloa V, Fernandez-Tajes J, Manfrin C, Gerdol M, Venier P, Eirin-Lopez JM.** Bivalve Omics: State of the Art and Potential Applications for the Biomonitoring of Harmful Marine Compounds. *Marine Drugs* 2013;**11**:4370-4389.

9 **Combourieu B.** Du métabolisme au métabolome: complémentarité des approches par RMN et spectrométrie de masse. *Spectra Analyse* 2007;**36**:20.

10 **Paris A.** Métabolomique et Sécurité Alimentaire. *Copyright – Académie d'Agriculture de France* 2008:Séance du 18 juin

11 **Junot C.** L'analyse métabolomique par spectrométrie de masse: un nouvel outil pour la biochimie clinique? *Bio tribune magazine* 2010;**34**:10-15.

12 **Villas-Bôas SG, Mas S, Åkesson M, Smedsgaard J, Nielsen J.** Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass spectrometry reviews* 2005;**24**:613-646.

13 **Fiehn O, Putri SP, Saito K, Salek RM, Creek DJ.** Metabolomics continues to expand: highlights from the 2015 metabolomics conference. *Metabolomics* 2015;**11**:1036-1040.

14 **Werner E, Heilier JF, Ducruix C, Ezan E, Junot C, Tabet JC.** Mass spectrometry for the identification of the discriminating signals from metabolomics: current status and future trends. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008;**871**:143-63.

15 **Jones OAH, Dondero F, Viarengo A, Griffin JL.** Metabolic profiling of *Mytilus galloprovincialis* and its potential applications for pollution assessment. *Marine Ecology Progress Series* 2008;**369**:169-179

Revue de la littérature

Beisken S, Eiden M, Salek RM. Getting the right answers: understanding metabolomics challenges. *Expert review of molecular diagnostics* 2015;**15**:97-109.

Gallart-Ayala H, Chéreau S, Dervilly-Pinel G, Bizet BL. Potential of mass spectrometry metabolomics for chemical food safety. *Bioanalysis* 2015;**7**:133-146.

Martínez A, Garrido-Maestu A, Ben-Gigirey B et al. Marine Biotoxins *Hb25_Springer Handbook of Marine Biotechnology*: Springer 2015;869-904.

Angel Garcia-Sevillano M, Garcia-Barrera T, Luis Gomez-Ariza J. Environmental metabolomics: Biological markers for metal toxicity. *Electrophoresis* 2015;**36**:2348-2365.

Suarez-Ulloa V, Fernandez-Tajes J, Manfrin C, Gerdol M, Venier P, Eirin-Lopez JM. Bivalve Omics: State of the Art and Potential Applications for the Biomonitoring of Harmful Marine Compounds. *Marine Drugs* 2013;**11**:4370-4389.

Autres publications identifiées

Mausz MA, Pohnert G. Phenotypic diversity of diploid and haploid *Emiliana huxleyi* cells and of cells in different growth phases revealed by comparative metabolomics. *J Plant Physiol* 2015;**172**:137-48.

Dans cet article, l'approche métabolomique est réalisée à partir de l'extraction des métabolites intracellulaires et permet de différencier les phases haploïde et diploïde de la microalgue.

Kleigrewe K, Almaliti J, Tian IY et al. Combining Mass Spectrometric Metabolic Profiling with Genomic Analysis: A Powerful Approach for Discovering Natural Products from Cyanobacteria. *Journal of Natural Products* 2015;**78**:1671-1682.

Les auteurs développent une nouvelle approche métabolomique combinant le profilage métabolique par spectrométrie de masse avec l'analyse génomique pour découvrir de nouveaux produits naturels issus de cyanobactéries

Fiore CL, Longnecker K, Soule MCK, Kujawinski EB. Release of ecologically relevant metabolites by the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* CCMP 1631. *Environmental Microbiology* 2015; **17**:3949-3963.

Cette étude présente une caractérisation intéressante des métabolites intracellulaires et extracellulaires d'une culture de cyanobactéries à travers une triple combinaison de métabolomique ciblée, non ciblée (détection LC-MS positive et négative) et d'outils de génomiques

Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt