

Thèse de Doctorat

Suzie Zita ZENDONG

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer (VENAM)

Discipline : Chimie Théorique, Physique, Analytique

Spécialité : Chimie Analytique

Unité de recherche : Laboratoire Phycotoxines, IFREMER Nantes

Université de Nantes, MMS EA2160, Faculté de Pharmacie

Soutenue le 04 Décembre 2015

Thèse N° :

Développement de méthodes de spectrométrie de masse haute résolution (SMHR) pour le criblage des phycotoxines dans les échantillons biologiques et environnementaux

JURY

Rapporteurs :	David RONDEAU , Professeur, Université de Bretagne Occidentale (Brest) Olivier THOMAS , Professeur, Université Nationale d'Irlande- Galway
Examineurs :	Jorge DIOGENE , Docteur, Institut de Recherche et de Technologies Agroalimentaires (IRTA) Espagne Richard B. COLE , Professeur, Université Pierre et Marie Curie
Invité(s) :	Céline TIXIER , Docteur, IFREMER Nantes Jean-Philippe ANTIGNAC , Docteur, LABERCA – Oniris, Nantes
Directeur de Thèse :	Philipp HESS , HDR, IFREMER Nantes
Co-directeur de Thèse :	Christine HERRENKNECHT , Professeur, Université de Nantes

A Lucie, Antoinette, Etienne, Joseph...

Mes parents,

A Hayden...

Mon fils, mon carburant.

« La différence entre le possible et l'impossible se trouve dans la détermination »

Gandhi

Remerciements

J'aimerais pour commencer remercier Messieurs David RONDEAU et Olivier THOMAS d'avoir accepté d'être rapporteurs et d'évaluer mon travail de thèse. Je tiens également à remercier Messieurs Jorge DIOGENE et Richard COLE, examinateurs de ce travail de thèse, ainsi que Mr. Jean-Philippe ANTIGNAC, Mme Céline TIXIER, Mme. Christine HERRENKNECHT et Mr Philipp HESS pour leur participation à mon jury de thèse.

Philipp HESS et Christine HERRENKNECHT, un grand merci du fond du cœur pour avoir été mes directeur et co-directrice de thèse pendant ces trois années : je n'aurai pu rêver encadrement plus idéal et je vous en suis très reconnaissante. Merci de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet de thèse.

Philipp, sans toi ce projet n'aurait pas vu le jour. Merci pour ton encadrement au quotidien et ton exigence, d'avoir partagé et transmis ton savoir, de m'avoir laissé suffisamment de liberté pour mener à bien ce travail et même d'avoir quelques fois demandé la Lune ! Tes conseils avisés, tes compétences et connaissances scientifiques, ta disponibilité de tout instant et ta gentillesse m'ont été précieux pour l'aboutissement de ce travail.

Christine, je te suis tout aussi reconnaissante d'avoir été ma co-directrice de thèse. Merci pour le temps passé à la correction des publications et de ce manuscrit. Merci aussi pour ton regard critique et pointilleux de « chromatographe », ta gentillesse et tes encouragements dans les moments difficiles.

J'aimerais aussi remercier Richard COLE, mon co-encadrant durant ce projet de thèse, pour sa disponibilité et ses corrections de mes articles. Richard, merci aussi pour tes conseils avisés et tes encouragements, d'avoir facilité mon accès à l'instrument FT-ICR de l'Université Pierre et Marie Curie, et bien sûr de bien vouloir examiner ce travail de thèse.

Pearse McCARRON, I thank you so much for your supervision, your advices and sharing your knowledge with me during those three months spent with you at National Research Council (Halifax). You added a valuable contribution to this project. Thank you also

for your priceless collaboration and critical reviews of my papers. I will never forget your warm welcome as well as the “French, English Cameroonian” jokes!

I would also like to thank all the members of the Measurement Science and Standards team: Michael QUILLIAM, Sabrina GIDDINGS, Daniel BEACH, Pat LeBLANC, Sheila CRAIN, Nancy LEWIS and especially Joseph HUI, Krista THOMAS and Ruth PEREZ CALDERON for their support and advices during those three months spent at NRC.

J’aimerai vous remercier Céline TIXIER et Jean-Philippe ANTIGNAC, pour le regard extérieur que vous avez accepté de porter sur ce travail et de m’avoir éclairée de vos conseils et de votre expertise au cours des comités de thèse. Votre regard critique et vos encouragements ont contribué au bon déroulement de ce projet.

Je remercie sincèrement tous ceux qui ont contribué à l’aboutissement de ce travail : Eric ABADIE, Rodolphe Lemée et Jérémie GOURIOU ainsi que Cécile JAUZEIN sans qui les SPATTs et les prélèvements n’auraient pu être effectués. Je vous remercie également pour votre relecture critique de mes articles. Eric merci pour ta sympathie et ton soutien moral, particulièrement dans la dernière ligne droite. J’aimerai aussi remercier Antonia MAZZEO pour son aide lors de l’extraction des SPATTs.

Samuel BERTRAND et Yann GUITTON, un grand merci pour votre disponibilité et pour m’avoir rendu les analyses statistiques uni et multi-variées par R, de même que leur interprétation moins obscures. Samuel merci pour les nombreuses corrections de mes articles.

Je tiens évidemment à remercier chaleureusement l’ensemble de l’équipe du Laboratoire Phycotoxines de l’Ifremer. Zouher Amzil, merci de m’avoir accueillie au sein du laboratoire, d’avoir permis que cette thèse se déroule dans d’excellentes conditions et merci aussi pour tes conseils. Merci à Patrick Lassus, Michèle Bardouil, Florence Mondeguer, Fabienne Hervé, Manoella Sibat-Dubois, Véronique Savar, Georges-Augustin Rovillon, Virginie Raimbault, Nathalie Jarnoux, Amandine Caruana et Véronique Séchet pour la bonne ambiance de travail au quotidien et les discussions passées à refaire le monde autour de

pauses café gourmandes, mais aussi pour vos conseils et votre soutien tout au long de ce travail de thèse.

Mano, Flo mes « massistes » préférées merci d'avoir contribué à étayer mon arc de chimiste analyticienne. Maintenant la HRMS m'a livrée une grande partie de ses secrets. Merci pour votre aide, vos conseils et votre « assistance technique » tout au long de cette thèse. Votre soutien m'a été très précieux pendant ces trois années. Mano, ma stagiaire préférée !, merci pour les séances de « brainstorming » et de « troubleshooting » sur les QToF, grâce à toi « le manège n'était pas trop bizarre, et je n'ai pas eu trop chaud », merci pour ton sourire et ta sympathie. Flo, tu as contribué à m'ouvrir les portes de l'analyse non-ciblée et de la métabolomique et je t'en remercie. Mais surtout un grand merci pour ta gentillesse et d'avoir rendu certains déplacements professionnels possibles ! Fabienne, merci pour ton écoute, ta disponibilité de tous les instants et aussi pour l'oreille attentive.

Véronique Séchet, Virginie Raimbault, Michèle Bardouil, merci de m'avoir fait découvrir la culture des microalgues, et d'avoir fourni le matériel nécessaire à mes expériences.

Bien évidemment un grand merci à tous les doctorants – passés et présents – avec qui j'ai partagé tout ou du moins un bout de chemin durant ce quotidien de thèse : Marie, Charline, Judith, Stanislas, Audrey, Francesco, Antonia, Damien, Cécile, Taous, Nour, pour les discussions scientifiques, les conseils, l'oreille attentive mais aussi les moments de détente. Un merci particulier à Damien, mon partenaire de « galère » pour gravir cet Everest qu'est la thèse, on y est arrivés, c'était beaucoup plus facile d'être deux, surtout dans la dernière ligne droite, merci. Nour, Francesco, l'aventure commence pour vous mais ne vous inquiétez pas, vous aussi vous y arriverez, comme tous ceux qui sont passés par là avant vous. Un seul mot d'ordre : Keep moving !

Je tiens à remercier chaleureusement mes précieux amis : Hanane (you led the way !), Sylvie, Carine, Karinne, Stéphanie, Aude, Tony, Gwladys, Odile, Achille. Vous m'avez tenue à flot durant ces trois années. Merci pour le soutien moral, les moments de déconnade, les baby-sittings intempestifs ou occasionnels. Votre amitié m'est inestimable. Merci d'être là mais surtout d'être vous tout simplement.

Je ne pourrais finir ces remerciements sans un mot à la ZED Team, ma Famille formidable ! Tout d'abord à mes Quatre Parents : Lucie, Antoinette, Etienne, Joseph. Merci infiniment d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir épaulée dans tous mes choix, vous êtes de supers parents. Ensuite, mes frères et sœurs : Roger, Perrine, Lynn et Kelly, que je sais présents malgré l'éloignement ; sans oublier évidemment Camille et Jonathan, les « petits derniers ». On ne choisit pas sa famille, mais je suis ravie de faire partie de celle-ci.

Enfin merci à Hayden, mon soleil et ma lumière au bout du tunnel. Merci avec ton sourire, ta bonne humeur et ton énergie de tous les instants d'avoir supporté une maman en thèse! Merci d'avoir surmonté les moments d'éloignement et d'être déjà un grand garçon du haut de tes 6 ans. Paradoxalement, grâce à toi ces trois années de thèse m'ont été plus supportables.

A tous, et à ceux que j'aurai malencontreusement oubliés,

MERCI !

SOMMAIRE

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	I
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES SIGLES ET DES ABREVIATIONS.....	XXI
INTRODUCTION GENERALE.....	1
ETAT DE L'ART	9
I. Les phycotoxines : généralités	11
I.1. Les toxines hydrophiles	12
I.1.1. Groupe de l'acide domoïque	13
I.1.2. Groupe de la saxitoxine	14
I.2. Les toxines lipophiles	15
I.2.1. Groupe de l'acide okadaïque et dinophysistoxines	15
I.2.2. Groupe des azaspiracides	17
I.2.3. Groupe des pectenotoxines.....	19
I.2.4. Groupe des yessotoxines	20
I.2.5. Groupe des brevéttoxines.....	21
I.3. Les toxines émergentes.....	23
I.3.1. Groupe des imines cycliques	23
I.3.2. Groupe de la palytoxine.....	25
I.3.3. Groupe des ciguatoxines et maïtotoxine	27
I.4. Réglementation sur les toxines	28
II. Méthodes de détection des phycotoxines lipophiles	31
II.1. Le test souris pour l'analyse des toxines lipophiles.....	32
II.2. L'analyse chimique pour les toxines lipophiles	35
II.2.1. Le couplage LC-MS.....	35
II.2.2. La chromatographie en phase liquide	36
II.2.3. La spectrométrie de masse.....	37
II.3. Les toxicités atypiques.....	48
II.4. Résumé.....	49
III. Echantillonnage passif.....	51
III.1. Les différents modèles d'échantillonneurs passifs.....	51
III.1.1. Les échantillonneurs pour molécules hydrophobes : membranes SPMD et PDMS	51
III.1.2. Les échantillonneurs pour molécules polaires : POCIS.....	52
III.1.3. Les SPATTs.....	53
III.2. Utilisation des SPATT pour capter les phycotoxines	55
III.2.1. SPATT et toxines hydrophiles.....	55
III.2.2. SPATT et toxines lipophiles	56
III.2.3. SPATT et toxines d'algues benthiques ou épiphytes	56
III.3. Résumé.....	58
IV. Application de la LC-HRMS à l'analyse environnementale	59
IV.1. L'analyse ciblée quantitative	60
IV.2. Le criblage des composés « suspects » connus	60
IV.3. Le criblage non-ciblé des inconnus.....	61
IV.4. Approche métabolomique	62
IV.4.1. Généralités.....	62
IV.4.2. Microalgues.....	66
IV.5. Résumé.....	68
OBJECTIFS de la THESE	71
CHAPITRE 1 - MISE AU POINT DE L'ECHANTILLONNAGE PASSIF	77

CONTEXTE.....	79
I. Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins ...	80
I.1. RESUME	80
I.2. ABSTRACT and KEYWORDS.....	82
I.3. INTRODUCTION	83
I.4. MATERIALS and METHODS.....	87
I.4.1. Chemicals and sorbent material	87
I.4.2. Microalgae cultures and algal extracts	88
I.4.3. Instrumentation and analytical methods	89
I.4.4. Screening of sorbent material and optimization of toxin recovery	90
I.4.5. Laboratory experiments: design, handling and deployment	92
I.4.6. Field trials at Ingril Lagoon.....	94
I.5. RESULTS.....	94
I.5.1. Microalgae extraction: solvent efficiencies	94
I.5.2. Comparison of sorbents in SPE-mode	94
I.5.3. Comparison of passive samplers at laboratory scale.....	97
I.5.4. Comparison of Oasis HLB, Strata-X and HP-20 samplers at Ingril lagoon	101
I.6. DISCUSSION and CONCLUSION	103
I.6.1. Choice of extraction solvent and appropriate SPE type resin	103
I.6.2. Comparison of passive samplers at laboratory and field scale.....	104
I.6.3. Conclusion	105
Acknowledgment	106
References.....	106
Supplementary Material.....	111
 CHAPITRE 2 – CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE POUR LE CRIBLAGE DES PHYCOTOXINES.....	117
CONTEXTE.....	119
I. High resolution mass spectrometry for quantitative analysis and untargeted screening of algal toxins in mussels and passive samplers.....	120
I.1. RESUME	120
I.2. ABSTRACT and KEYWORDS.....	121
I.3. INTRODUCTION	123
I.4. EXPERIMENTAL.....	125
I.4.1. Chemicals and reagents	125
I.4.2. Instrumentation and analytical methods	126
I.4.3. Sample preparation	128
I.4.4. Method performance characteristics	130
I.4.5. Data treatment	130
I.5. RESULTS AND DISCUSSION	132
I.5.1. Method Selection and Performance.....	132
I.5.2. Evaluation of matrix effects.....	135
I.5.3. Parameters affecting matrix effects	139
I.5.4. Low resolution vs high resolution mass spectrometry	142
I.5.5. Accuracy and detection limits.....	146
I.6. CONCLUSIONS	147
Conflict of interest.....	150
Acknowledgments.....	150
References.....	150
Supplementary Material.....	156
II. Relative Molar Response (RMR) factors of lipophilic algal toxins in mass spectrometry	167
II.1. RESUME:	167
II.2. ABSTRACT:	168
II.3. INTRODUCTION	169
II.4. EXPERIMENTAL.....	171
II.4.1. Chemicals and Reagents:	171

II.4.2.	LC-MS/MS analyses at Ifremer:	171
II.4.3.	LC-MS/MS analyses at National Research Council (NRC), Halifax:	174
II.4.4.	Sample preparation	174
II.4.5.	Quantitative and Statistical analyses	175
II.5.	RESULTS and DISCUSSION	176
II.5.1.	Impact of chromatographic conditions on RMRs	176
II.5.2.	Impact of acquisition parameters	179
II.5.3.	Impact of declustering potential and ion choice	181
II.6.	CONCLUSION	183
	Aknowlegdments.....	184
	References.....	184
	Supporting Information	186
CHAPITRE 3 - CRIBLAGE DES ECHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX ET BIOLOGIQUES:		
ANALYSE CIBLEE ET NON CIBLEE		202
CONTEXTE		204
I.	Algal toxin profiles in Nigerian coastal waters (Gulf of Guinea) using passive sampling and liquid chromatography coupled to mass spectrometry	205
I.1.	RESUME	205
I.2.	ABSTRACT and KEYWORDS.....	206
I.3.	INTRODUCTION	207
I.4.	MATERIALS AND METHODS	209
I.4.1.	Chemicals, reagents and sorbent materials.....	209
I.4.2.	Study area	209
I.4.3.	Physico-chemical parameters and water sampling for analysis of nutrients and phytoplankton identification	211
I.4.4.	Passive sampler design, handling and extraction	212
I.4.5.	Liquid chromatography - mass spectrometry analyses	213
I.5.	RESULTS AND DISCUSSION	216
I.5.1.	Physico-chemical measurements	216
I.5.2.	Identification of phytoplankton species	216
I.5.3.	Quantitative analysis of SPATT samples and toxin confirmation	218
I.5.4.	Confirmation of okadaic acid and pectenotoxin 2 by high resolution mass spectrometry coupled to liquid chromatography.....	220
I.5.5.	Untargeted screening approach for passive samplers	221
I.6.	CONCLUSION	227
	Conflict of interest.....	227
	Aknowlegdments.....	227
	References.....	227
	Supplementary material.....	233
II.	Passive sampling and high resolution mass spectrometry for chemical profiling of French coastal areas with a focus on marine biotoxins.....	243
II.1.	RESUME	243
II.2.	ABSTRACT and KEYWORDS.....	244
II.3.	INTRODUCTION	245
II.4.	MATERIALS AND METHODS.....	246
II.4.1.	Chemicals and reagents	246
II.4.2.	Study area and, passive samplers design, handling and extraction	247
II.4.3.	Liquid chromatography Mass spectrometry analyses	247
II.4.4.	QA/QC and quantitation	248
II.4.5.	Data processing for differential profiling.....	248
II.5.	RESULTS AND DISCUSSION	249
II.5.1.	Impact of the size of the SPATT and amount of resin on accumulation	249
II.5.2.	Toxin monitoring and profiles at different deployment areas	252
II.5.3.	Differential profiling for detection of spatial and temporal trends.....	254
	Aknowlegdments	258

References.....	258
Supporting Information	264
III. Determination of the concentration of dissolved lipophilic algal toxins in seawater using pre-concentration with HP-20 resin and LC-MS/MS detection.....	272
III.1. RESUME	272
III.2. ABSTRACT and KEYWORDS.....	273
III.3. INTRODUCTION	274
III.4. MATERIAL and METHODS.....	275
III.4.1. Seawater sampling in Ingril Lagoon	275
III.4.2. Extraction and LC-MS/MS analysis of resins	275
III.5. RESULTS and DISCUSSION	276
Acknowledgements	278
References.....	278
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	282
Mise au point de l'échantillonnage passif	284
LC-MS pour le criblage des phycotoxines	285
Criblage des échantillons environnementaux et biologiques : analyse ciblée et non-ciblée	287
Perspectives.....	288
VALORISATION SCIENTIFIQUE	292
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	300

LISTE DES FIGURES

Liste des Figures

.....ETAT DE L'ART.....	
Figure I-1 : L'acide domoïque	13
Figure I-2 : Les saxitoxines : structure générique et analogues.....	14
Figure I-3 : L'acide okadaïque et les dinophysistoxines : structure générique et analogues.....	16
Figure I-4 : Les azaspiracides : structure générique et analogues.....	18
Figure I-5 : Les pectenotoxines : structure générique et analogues.....	19
Figure I-6 : Les yessotoxines : structure générique et analogues.....	21
Figure I-7 : Les brevéttoxines : structures génériques et analogues.....	22
Figure I-8 : Les imines cycliques.....	24
Figure I-9 : Les pinnatoxines.....	25
Figure I-10 : La palytoxine.....	26
Figure I-11 : Les toxines de Gambierdiscus: P-CTX-1B, P-CTX4B, Gambierol et Maïtotoxine.....	27
Figure I-12 : Principe de l'ionisation par électrospray (Gates, 2014)	38
Figure I-13: Principe de l'ionisation APCI (Gates, 2014).....	40
Figure I-14: Représentation schématique d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle.....	41
Figure I-15: Représentation schématique d'une trappe d'ions linéaire (Schwartz and Senko, 2004)	43
Figure I-16 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle temps de vol (ici le QToF 6540 : Agilent).....	44
Figure I-17: Représentation de la trappe orbitale avec en rouge la trajectoire des ions.(Makarov and Muenster, 2006)	45
Figure I-18: Représentation schématique d'un spectromètre de masse utilisant l'analyseur orbitrap (ici l'Exactive: ThermoScientific)	45
Figure I-19 : Echantillonneur SPMD et dispositif de déploiement (Huckins. et al., 2002).....	52
Figure I-20: Echantillonneur POCIS (Miege et al., 2012).	53
Figure I-21 : Echantillonneurs SPATTs : sachets et disques (MacKenzie, 2010; Rundberget et al., 2009).....	54
Figure I-22 : Différents aspects du métabolome (Villas-Boas et al., 2005).....	63
Figure I-23 : Protocoles utilisables en analyse environnementale utilisant la SMHR, adapté de (Krauss et al., 2010)	68

.....CHAPITRE 1 : MISE AU POINT DE L'ECHANTILLONNAGE PASSIF.....

Figure I-1: Structures of the toxins of interest: Azaspiracids 1 and 2 (AZA-1, AZA- 2, Okadaic acid (OA), Dinophysistoxin-1 (DTX1), 13-desmethyl spirolide-C (SPX1), Pinnatoxin-G (PnTX-G), Palytoxin (PITX) and Ovatoxin-a (OvTX-a).....	86
Figure I-2: Average toxin recoveries (%) from Oasis HLB, Strata-X, BondElut C18 and HP-20 packed in the same SPE reservoir with 2-frits (Agilent). Error bars are standard deviations (n=3).	97
Figure I-3: Toxin disappearance from seawater of OA, AZA1, PnTX-G, SPX1 and OvTX-a for Oasis HLB (300 mg), Strata-X (300 mg), HP-20 (300 mg), PDMS and LDPE passive samplers.	99
Figure I-4: OA, AZA1, PnTX-G, SPX1 and OvTX-a recoveries from Oasis HLB, Strata-X, HP-20, PDMS and LDPE after 24h immersion in spiked seawater.	100
Figure I-5: Amount of toxin (average $\pm$ SD) accumulated on HP-20, Oasis HLB and Strata-X exposed for 3 days in two cylindro-conical tanks	101
Figure I-6: (A) Accumulation of SPX1, PnTX-G, OA, DTX1 and PTX2 on Oasis HLB, Strata-X and HP-20 SPATTs exposed in July at Ingril Lagoon on a weekly basis. (B) OA adsorption on Oasis HLB, Strata-X and HP-20 for 5d, 6d and 7d of exposure during three consecutive weeks.....	102

..... CHAPITRE 2 : LC-MS/MS POUR LE CRIBLAGE DES PHYCOTOXINES.....

Figure I-1: HPLC chromatogram in ESI^+ and ESI^- , of the composite multi-toxin sample (section 2.1) acquired on the Orbitrap using the Phenomenex Kinetex XB-C18 (100 x 2.1 mm; 2.6 μ m) with the optimized gradient (acetonitrile).....	133
---	-----

Figure I-2: SPATT and mussel matrix effects (% response compared to response in MeOH $\pm$ %RSD, n=3) for various toxins using three instrument systems.	138
Figure I-3: Matrix effects (% response compared to response in MeOH $\pm$ %RSD, n=3) for PTX2 in SPATT and mussel samples using ammonium ([M+NH ₄] ⁺) and sodium ([M+Na] ⁺) adducts.	140
Figure I-4: Matrix effects on Q-ToF (% response compared to response in MeOH $\pm$ %RSD, n=3) obtained with calibration solutions prepared using crude or diluted SPATT (top) and mussel (bottom) extracts.	141
Figure I-5: PTX2 (Orbitrap) and DTX1 (Q-ToF) high resolution mass spectra on the apex of the peak for SPATT and mussel extracts.	144
Figure I-6: Total compound chromatogram (TCC) of the spiked blank SPATT sample (a) and blank mussel sample (b), both deployed at Villefranche during the same week.	145
Figure II-1: Structures of investigated toxins: AZA 1-3; OA, DTX1, & -2; YTX and homo-YTX; pectenotoxins 2 and 11 (PTX2 and 11); PnTX-G; and 13-desMe-C.	170
Figure II-2: Comparison of relative molar response factors (RMRs $\pm$ SD; n=9) for homo-YTX (relative to YTX), DTX1 and 2 (relative to OA), PnTX-G (relative to 13-desMe-C), AZA2 and 3 (relative to AZA1) and PTX11 (relative to PTX2), in isocratic and gradient conditions.	177
Figure II-3: Comparison of Relative molar response factors (RMRs $\pm$ SD; n=9) for DTX1 in relation to OA, in isocratic and gradient conditions for methanol, SPATT and mussel extracts analyzed at Ifremer (Table II-3), on System 1 (API4000 QTrap).	178
Figure II-4: Comparison Relative molar response factors (RMRs $\pm$ SD; n=9) for homo-YTX (relative to YTX), DTX1 and 2 (relative to OA), PnTX-G (relative to 13-desMe-C), AZA2 and 3 (relative to AZA1) and PTX11 (relative to PTX2), in isocratic and gradient conditions. These response factors were obtained on System 2 (QToF) (in All-ion acquisition mode), for methanol, SPATT and mussel extracts.	179
Figure II-5: Relative molar response factors $\pm$ SD (n=9) for (a) PnTX-G and (b) PTX11 obtained on System 1 (API4000 QTrap), in SRM and SIM acquisition modes conditions.	180
Figure II-6: Relative molar response factors $\pm$ SD (n=9) for PnTX-G obtained on System 2 (QToF), in All-ion and target MS/MS conditions.	181
Figure II-7: Relative molar response factors $\pm$ SD (n=5) with different quantifying ions, for DTX1 and DTX2 (relative to OA) on System 3 and at declustering potentials of 20 and 60 V.	183

..... CHAPITRE 3 : CRIBLAGE DES ECHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX ET BIOLOGIQUES.....

Figure I-1: Location of sampling sites (red stars): Bar Beach and Lekki are both in Lagos State off Lagos lagoon; Port Harcourt is in Rivers State, in the vicinity of the Niger delta, and Uyo is in Akwa Ibom State towards the Eastern Limit of Nigerian waters.	211
Figure I-2: Marine dinoflagellates identified on Bar Beach (Lagos State, Nigeria, 21 February 2015): a) Dinophysis caudata (L = 100 μ m), b) Lingulodinium polyedrum (L x W: 40 x 38 μ m), c) Prorocentrum sp1 (L x W : 37 x 27 μ m) and d) Prorocentrum sp2 (L x W: 36.3 x 28.8 μ m).	217
Figure I-3: Average concentrations (a) and ratios (b) of okadaic acid (OA) and pectenotoxin 2 (PTX2) detected at each deployment site (ng/g of HP-20 resin $\pm$ RSD%, n=3).	220
Figure I-4: Average high resolution spectrum of (a) OA standard and (b) OA in a SPATT extract from Bar Beach. Spectra were obtained on System 3 (QToF 6550) in ESI using target MS/MS with collision energies of 20 V, 40 V and 60 eV.	221
Figure I-5: Score plot of the principal component analysis of all passive samplers (n=2 for 2014 and n=3 for 2015). Data were acquired by full scan HRMS on System 2. During Molecular Feature Extraction samples were blank-subtracted, ion traces extracted and combined into compounds. The three principal components plotted on the X, Y, and Z axes account for ca. 58% of the total variability in the data set. Note: BB=Bar Beach and PH=Port Harcourt.	222
Figure I-6: Score plot of the principal component analysis of passive samplers from Bar Beach taken on four separate occasions (n=2 for 2014 and n=3 for 2015). Data were acquired by full scan HRMS on system 2. The three principal components plotted on the X, Y, and Z axes account for ca. 66% of the total variability in the data set.	223
Figure I-7: Score plot of the principal component analysis of passive samples from all four sites (BB=Bar Beach, PH=Port Harcourt), all taken during week 9 of 2015 (n=3). The three principal components plotted on the X, Y, and Z axes account for ca. 63% of the total variability in the data set.	223
Figure II-1. Levels of toxins (ng $\pm$ SD; n=3) accumulated on SPATTs (3 g) deployed for 1 week in the Mediterranean Sea for (a) Ingril lagoon and (b) Villefranche.	252

<i>Figure II-2. Levels of toxins (ng $\pm$ SD; n=3) accumulated on SPATTs (3 g) deployed for 1 week in the Atlantic Ocean for (a) Vivier and (b) Scoré.</i>	<i>253</i>
<i>Figure II-3. PCA score plot of SPATT samples from different geographical locations: Ingril (0.3 g and 3 g) and, Villefranche, Scoré and Vivier (3 g and 10 g).....</i>	<i>255</i>
<i>Figure II-4. PCA scores for 3 g SPATT samples from different deployment weeks (W) in 2014. (a) Vivier; (b) Ingril; (c) Scoré and (d) Villefranche.</i>	<i>256</i>
<i>Figure III-1. Accumulation of SPX1, PnTX-G, OA, DTX1 and PTX2 on Oasis HLB, Strata-X and HP-20 SPATTs exposed in July at Ingril Lagoon on a weekly basis (expressed as [ng/g dry resin]).</i>	<i>274</i>

LISTE DES TABLEAUX

Liste des Tableaux

.....ETAT DE L'ART.....	
Tableau I-1 : Classement des principales phycotoxines marines : organisme producteur, lipophilicité, formule chimique brute, masse molaire et syndrome provoqué chez l'Homme (les intoxications paralysantes (PSP), diarrhéiques (DSP), amnésiantes (ASP), neurotoxiques (NSP).....	12
Tableau I-2: Seuils sanitaires européens actuellement en vigueur pour les phycotoxines réglementées dans les fruits de mer, les ARfDs (acute reference dose = DMENO, dose minimale avec effet nocifs observés) et seuils recommandés correspondants par l'EFSA dans la chair des coquillages	30
Tableau I-3: Caractéristiques de quelques spectromètres de masse haute résolution utilisés pour l'analyse des toxines marine lipophiles.....	46
.....CHAPITRE 1 : MISE AU POINT DE L'ECHANTILLONNAGE PASSIF.....	
Table I-1: Oasis HLB, Strata-X, HP-20 and BondElut C18 properties.	87
Table I-2: LDPE and PDMS properties.....	88
Table I-3: Average amounts (mean $\pm$ standard deviation (=SD), n=3) of toxin extracted from <i>A. ostentfeldii</i> , <i>A. spinosum</i> and <i>V. rugosum</i> using acetone, methanol and isopropanol	94
Table I-4: Toxin recoveries (%) from commercially available sorbents for the first screening experiment	95
Table I-5: Recoveries (average $\pm$ SD, n=3) obtained from Oasis HLB (30 mg) and Strata-X (200 mg) cartridges eluted with MeOH and MeOH/H ₂ O (1:1, v/v).	95
Table I-6: Recoveries (average $\pm$ SD, n=4) with an elution step of	96
..... CHAPITRE 2 : LC-MS/MS POUR LE CRIBLAGE DES PHYCOTOXINES.....	
Table I-1: Optimized transitions selected for scheduled MRM method.	126
Table I-2: Reproducibility of retention times (RT $\pm$ SD) throughout a 24 h injection sequence (n=63) on all systems using Phenomenex Kinetex XB-C18 (100 x 2.1; 2.6 μ m) and the optimized gradient.....	134
Table I-3: Recoveries from CRMs (% $\pm$ RSD; n=3): CRM-ASP-mus-d (DA), CRM-DSP-mus-c (OA, DTX1 and -2), CRM-AZA-mus-d (AZA1, -2 and -3) and CRM-FDMT-1 (13-desmeSPX-C, PTX2).	146
Table II-1: SRM and SIM acquisition parameters on the API4000 QTrap.	172
Table II-2: "All-ion" and Target MS/MS acquisition parameters and ion used for quantification.	173
Table II-3: Final molar concentrations of toxins in mixtures of toxins from the same family group.	175
Table II-4: Contribution of various adducts/water losses (in %) after Q1 scan acquisition in positive mode for OA, DTX2 and DTX1 mixture.	182
..... CHAPITRE 3 : CRIBLAGE DES ECHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX ET BIOLOGIQUES.....	
Table I-1: Sampling sites and dates for water and toxin analysis (date format: dd/mm/yy).....	210
Table I-2: Multiple Reaction Monitoring (MRM) transitions used for quantitative analysis on System 1 (30 msec dwell in ESI ⁺ and 80 msec dwell in ESI ⁻).	214
Table I-3: Surface water temperature, dissolved oxygen (DO), salinity and nutrient concentrations at sampling stations in Nigerian coastal waters 2014-15.....	216
Table I-4. Compounds tentatively identified in non-targeted analysis using high-resolution mass spectrometry (system 2).....	225
Table II-1. Ratios of the amount of toxins accumulated on 3 g over 0.3 g SPATs and, over amount of toxins accumulated on 10 g over 3 g SPATs. The expected ratio is 1.....	250
Table III-1. Concentrations of toxins in seawater of Ingril Lagoon, September 2 nd 2014 (in [ng L ⁻¹ of seawater]); S1-volume refers to the seawater concentration as determined by the first resin portion (T ₀ to 48 h), S2-volume refers to the seawater concentration as determined by the second resin portion (48 h – 96 h); n.d. = not detected.	277

LISTE DES SIGLES ET DES ABREVIATIONS

Liste des Sigles et Abréviations

ACN:	Acétonitrile
ACP:	Analyse en Composantes Principales; PCA en anglais
AD:	Acide domoïque
AFSSA:	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, aujourd'hui ANSES
AO:	Acide okadaïque
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
AP:	Alkylphénol
APCI:	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation; Ionisation chimique à pression atmosphérique
ASP:	Amnesic shellfish poisoning
AZA:	Azaspiracides
AZP:	Azaspiracid Shellfish Poisoning
BTX:	Brévétotoxine
CEE:	Communauté Economique Européenne
CG:	Chromatographie en phase gazeuse
CG-SM:	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse; GC-MS en anglais
LC:	Chromatographie en phase liquide; LC en anglais
LC-FLD:	Chromatographie en phase liquide couplée à la fluorimétrie
HPLC:	Chromatographie Liquide Haute Performance
LC-MS:	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
LC-MS/MS:	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem; LC-MS/MS en anglais
UHPLC:	Chromatographie Liquide Ultra-Haute Performance; UHPLC en anglais
LC-UV	Chromatographie en phase liquide couplée à la détection UV
CRM:	Certified Reference Material; Matériau de Référence Certifié
CTX:	Ciguatoxine
DMNP:	Dictionary of Marine Natural Products; Dictionnaire des Produits Naturels Marins
DO:	Dissolved oxygen; oxygène dissous
DSP:	Diarrhetic shellfish poisoning

DTX	Dinophysistoxine
CE:	Electrophorèse capillaire
CE-MS:	Electrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse
EFSA:	European Food Safety Authority; Autorité européenne de sécurité des aliments
EGMP:	Ethylène glycol méthacrylate phosphate
ELISA:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESI:	Ionisation par électrospray
FAB:	Fast Atom Bombardment; Ionisation par bombardement d'atomes neutres
FAO:	Food and Agriculture Organization; Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FDMT:	Freeze-Dried mussel tissue Reference Material; Matériau certifié de moules lyophilisées
FLD:	Fluorimètre
FWHM:	Full Width Half-height Maximum; largeur à mi-hauteur
GYM:	Gymnodimine
H₂O:	Eau
HAB:	Harmful Algal Bloom
HAP:	Hydrocarbures Aromatiques Polyinsaturés
HLB:	Hydrophilic Lipophilic Balance
HP:	Hépatopancréas
IFREMER	Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
IOC	Intergovernmental Oceanographic Commission; Commission océanographique intergouvernementale
IP:	Intra-péritonéale
IT	Ion trap; trappe d'ions
LoD:	Limit of Detection; limite de détection
LoQ:	Limit of Quantification; Limite de quantification
<i>m/z</i>:	Rapport masse sur charge
MALDI:	Matrix Assisted Laser Desorption; Désorption-ionisation laser assistée par matrice
MeOH:	Méthanol
MRM:	Multiple Reaction Monitoring
MTX:	Maïtotoxine

N₂:	Azote
OvTX-a:	Ovatoxine-a
PCBs	Polychlorobiphényles
PDMS:	Polydiméthylsiloxane
PITX:	Palytoxine
PnTX:	Pinnatoxine
POCIS:	Polar Organic Chemical Integrative Sampler
PP:	Protéines phosphatases
ppm:	Partie par million
PS-DVB:	Polystyrène divinylbenzène
PSP:	Paralytic shellfish poisoning
PST:	Paralytic shellfish toxin
PTX:	Pecténotoxine
QqQ:	Triple-quadrupôle
Q-ToF :	Quadrupole-time of flight; Quadripôle temps de vol
REPHY:	Réseau d'Observation et de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines
RMN:	Résonnance Magnétique Nucléaire
RMR :	Relative Molar Response ; Réponse molaire relative
RSD:	Relative Standard Déviation; écartype
RT:	Retention Time; temps de rétention
SD:	Standard Déviation; écartype
SIM :	Selected Ion Monitoring
SM:	Spectromètre/spectrométrie de masse
SMBR:	Spectrométrie de masse basse résolution; LRMS en anglais
SMHR:	Spectrométrie de masse haute résolution; HRMS en anglais
SPATT:	Solid Phase Adsorption Toxin Tracking
SPE:	Solid Phase Extraction; extraction sur phase solide
SPMD:	Semi-Permeable Membrane Devices; membranes semi-perméables
SPX:	Spirolide
SRM:	Selected Reaction Monitoring
STX:	Saxitoxine
ToF:	Time of flight; Temps-de-vol
TSQ:	Triple stage quadrupole; Triple-quadrupôle

UV: Ultra-Violet

WHO: World health Organisation; OMS: organisation Mondiale de la Santé

YTX: Yessotoxine

INTRODUCTION GENERALE

Les mers et les océans constituent depuis des millénaires une ressource nourricière importante pour l'Homme. En effet, les produits de la mer constituent un apport non négligeable de l'alimentation humaine. La production globale de pêche et d'aquaculture est en effet passée de 20 millions de tonnes à plus de 154 millions de tonnes en une soixantaine d'années (Moffitt and Cajas-Cano, 2014). Ces produits sont bénéfiques en tant que source de protéines, de minéraux et d'acides gras essentiels, mais peuvent aussi être vecteurs de substances potentiellement nocives, en l'occurrence pour l'Homme, qui se trouve au bout de la chaîne alimentaire. C'est essentiellement le cas des mollusques bivalves, de par leur capacité de bioaccumulation.

Les microalgues, composées du phytoplancton (du grec *phyto* : plante et *plagktos* : errant) et du microphytobenthos (du grec *benthos* : profondeur) sont à la base d'une grande majorité des chaînes alimentaires (Daranas et al., 2001). Ce sont des organismes unicellulaires et photosynthétiques qui vivent, soit dans la colonne d'eau (pélagiques), soit accrochés à un substrat (épiphytes ou benthiques). Parmi les quelques 5000 espèces de microalgues connues, environ 300 espèces sont nocives pour les organismes marins et, environ 80 de ces espèces seulement sont connues pour produire des toxines appelées phycotoxines (toxines de microalgues) (Sournia et al., 1991). En tant que premier maillon de la chaîne trophique, le phytoplancton est donc source de nourriture pour le zooplancton, les mollusques filtreurs dont font partie les huîtres, moules, coquilles Saint-Jacques, palourdes et les poissons *etc.* (Van Dolah, 2000). Les phycotoxines, métabolites inoffensifs pour leurs producteurs, se concentrent donc par le biais de l'alimentation dans les maillons supérieurs du réseau trophique (mollusques bivalves, poissons herbivores, gastéropodes). Ces produits, de par la présence de phycotoxines deviennent ainsi impropres à la consommation, notamment humaine, puisque l'Homme en est le consommateur final. Les intoxications dues aux phycotoxines peuvent causer des désordres gastro-intestinaux, dermatologiques, neurologiques ou respiratoires, et peuvent même conduire à des complications entraînant la mort des personnes infectées. Ainsi, en 1998 on estimait que les phycotoxines étaient à l'origine d'environ 60 000 intoxications annuelles dans le monde, avec un taux global de mortalité de 1,5% (Tibbetts, 1998). La salubrité des fruits de mer en général, et celle des bivalves filtreurs, en particulier, est donc devenue un enjeu de santé publique à l'échelle internationale.

En réponse à ces préoccupations, et dans le but de protéger les consommateurs, des seuils sanitaires spécifiques à chaque groupe de phycotoxines ont donc été promulgués, suite à la mise en place de la directive européenne 91/492/CEE (Annexe 1(EFSA, 2009b)). L'atteinte ou le dépassement de ces seuils dans les chairs de coquillages engendre la fermeture des zones conchylicoles, ou de pêches récréatives, concernées et l'interdiction de vente des mollusques bivalves. Ces fermetures, certes bénéfiques pour le consommateur, ont néanmoins un impact socio-économique non négligeable, avec des pertes financières pour la profession, mais aussi une mauvaise image des filières et produits conchylicoles auprès des consommateurs.

Pour essayer de palier à ces inconvénients, plusieurs pays, au niveau mondial, ont mis en place des programmes de surveillance. En France, l'Ifremer, à travers le REPHY (Réseau d' Observation et de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines), est l'organisme en charge de la surveillance des phycotoxines dans les zones conchylicoles. Le REPHY a pour but : i) la connaissance de la biomasse, de l'abondance et de la composition du phytoplancton marin des eaux côtières et lagunaires ; ii) la détection et le suivi des espèces phytoplanctoniques productrices de toxines susceptibles de s'accumuler dans les produits marins de consommation ou de contribuer à d'autres formes d'exposition dangereuse pour la santé humaine, ainsi que la recherche de ces toxines dans les mollusques bivalves présents dans les zones de production ou dans les gisements naturels (Ifremer, 2009). Pour répondre à ces objectifs, le REPHY doit donc assurer une surveillance des deux compartiments, eau et coquillages, par :

- **Pour l'eau** : mesures *in situ* de paramètres physico-chimiques et prélèvements d'échantillons pour l'observation du phytoplancton et pour les analyses de la chlorophylle-a et des nutriments.
- **Pour les coquillages** : prélèvements d'échantillons pour le suivi des phycotoxines.

En général, les techniques utilisées pour la surveillance du phytoplancton ont initialement été mises en place pour le phytoplancton de taille supérieure à 20 μm . Par conséquent, elles permettent difficilement la détection des micro-algues cryptiques, car elles sont trop petites ($< 20 \mu\text{m}$), ainsi que celle des microalgues benthiques (qui sont peu présentes dans la colonne d'eau). C'est pourquoi, depuis quelques années, afin de mettre en évidence la présence de ces microalgues, l'**échantillonnage passif** a été testé pour capter les phycotoxines produites par ces dernières. En 2004, des chercheurs Néo-Zélandais ont ainsi été les premiers

à saisir l'intérêt d'utiliser les échantillonneurs passifs. Ces derniers ont en effet la capacité de capter les composés présents dans l'eau de mer, ce qui est le cas, notamment, des toxines de microalgues (MacKenzie et al., 2004). Cette technique a par la suite été appliquée par d'autres équipes de recherche, dans d'autres environnements côtiers marins (Fux et al., 2009; Fux et al., 2008a; McCarthy et al., 2014; Pizarro et al., 2013; Rundberget et al., 2009).

Les **tests biologiques sur animaux** (sur souris ou sur rats) ont été les premières méthodes officielles de recherche des phycotoxines dans les produits de la pêche (Adams and Miescier, 1980; Iverson et al., 1989; Krogh, 1979; Stabell et al., 1992; Tadano et al., 1991). Cependant, ces tests souffrent d'un certain nombre d'inconvénients, notamment le manque de spécificité, des limites de détection élevées, proches des seuils réglementaires (Hess et al., 2006), la possibilité que d'autres composés présents dans l'échantillon puissent interférer et donner lieu à de faux positifs. Par ailleurs, ils alimentent aussi la controverse autour des tests sur animaux (Combes, 2003). De plus, le test souris pour la détection des toxines lipophiles est difficilement utilisable pour déterminer, de manière quantitative, les toxines présentes dans les échantillons. Compte tenu de tous ces inconvénients et de la controverse autour des tests sur animaux, des **méthodes d'analyse alternatives** ont progressivement été développées et utilisées pour détecter et quantifier les toxines de microalgues. Il s'agit, entre autres, de la chromatographie liquide couplée à différents détecteurs : ultraviolet (UV), fluorescence ou spectromètres de masse (SM) ; ainsi que du test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) basé sur les réactions anticorps-antigène, des tests de cytotoxicité, des tests sur récepteurs spécifiques et des tests d'inhibition des protéines phosphatases (PP). Parmi ces méthodes, la **chromatographie couplée à la spectrométrie de masse** a l'avantage de pouvoir détecter simultanément plusieurs familles de toxines. L'analyse chimique par chromatographie liquide, couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM ou LC-MS/MS), a ainsi été récemment introduite comme méthode de référence pour l'analyse des toxines dites lipophiles (EU-RL-MB, 2011). Cette méthode est cependant basée sur une approche ciblée, c'est-à-dire qu'elle ne permet de détecter que des molécules déjà connues ou spécifiquement recherchées.

Les développements technologiques récents, à travers les techniques de chromatographie « ultra-haute performance » (CLUHP ou UHPLC en anglais) et de la **spectrométrie de masse haute résolution** (SMHR ou HRMS en anglais), ont permis à des chercheurs travaillant dans d'autres domaines (vétérinaire, environnementale, clinique) d'aller

plus loin dans l'exploitation des analyses physico-chimiques (Beisken et al., 2015; Wolfender et al., 2015), ce qui est encore très peu le cas pour ce qui concerne les toxines naturelles.

C'est donc dans un contexte de recherche d'alternatives aux tests sur animaux, ainsi que de recherche de réponses pour sécuriser les filières conchylicoles et rassurer les consommateurs, que se place ce travail de thèse. En effet, il apparaît, en vertu des quelques limitations affichées par les méthodes sus-citées, nécessaire d'améliorer et/ou de trouver des méthodes alternatives et/ou complémentaires de surveillance du phytoplancton toxique et des coquillages contaminés.

Le prochain chapitre sera consacré à un état de l'art, développé sur plusieurs parties. La première partie fera état des généralités sur les phycotoxines. Ensuite nous aborderons les différentes méthodes utilisées (tests biologiques, biochimiques et analyse chimique) pour détecter et quantifier les phycotoxines, ainsi que les différentes techniques d'échantillonnage passif existantes. Enfin la dernière partie abordera les approches métabolomiques (ciblée et non-ciblée) pour le criblage de différents types d'échantillons (environnementaux et biologiques).

ETAT DE L'ART

I. Les phycotoxines : généralités

Les toxines marines sont des métabolites secondaires naturellement produits par les microalgues. Ces métabolites sont de ce fait métabolisables par plusieurs systèmes enzymatiques dans la nature, contrairement aux contaminants chimiques tels que les polychlorobiphényles (PCBs), dioxines *etc.* Les efflorescences algales toxiques (Harmful Algal Bloom : HAB) sont les principales causes de contamination des coquillages par les toxines marines. En effet, ces toxines sont capables de bioaccumulation dans les tissus de mollusques bivalves filtreurs (par exemple les moules, huîtres et coquilles Saint-Jacques), ce qui rend ces produits impropres à la consommation humaine. De même que pour d'autres contaminants environnementaux (dioxines, PCBs *etc.*), la majorité des groupes de toxines marines contient plusieurs analogues qui sont produits par les microalgues, ou sont des produits de métabolisation des analogues principaux dans les organismes marins. C'est la raison pour laquelle, entre les analogues naturellement produits et leurs métabolites, les biotoxines marines forment un vaste ensemble de molécules chimiques bioactives.

Les phycotoxines ont initialement été classées en fonction des symptômes causés par la consommation de coquillages contaminés. On distingue ainsi les intoxications **amnésiastes** (ASP : amnesic shellfish poisoning), **paralysantes** (PSP : paralytic shellfish poisoning), **diarrhéiques** (DSP : Diarrhetic shellfish poisoning), ou encore **neurotoxiques** (NSP : neurotoxic shellfish poisoning), ainsi que d'autres intoxications pas encore totalement caractérisées. Il existe cependant une autre classification qui a été mise en place suite à une réunion d'experts sur les biotoxines dans les mollusques bivalves et basée sur les propriétés chimiques des toxines (Tableau I-1) (FAO/IOC/WHO, 2005). C'est sur la base de cette classification, en fonction des propriétés chimiques des toxines, que seront abordées les prochaines parties sur les toxines hydrophiles et lipophiles.

Tableau I-1 : Classement des principales phycotoxines marines : organisme producteur, lipophilicité, formule chimique brute, masse molaire et syndrome provoqué chez l'Homme (les intoxications paralysantes (PSP), diarrhéiques (DSP), amnésiantes (ASP), neurotoxiques (NSP)).

Groupe de toxines	Abréviation	Organisme producteur	Lipophilicité	Formule brute	Masse molaire (g mol ⁻¹)	Syndrôme d'intoxication
Acide domoïque	AD	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	Hydrophile	C ₁₅ H ₂₁ NO ₆	311	ASP
Acide okadaïque	AO	<i>Dinophysis</i> spp., <i>Prorocentrum</i> spp.	Lipophile	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₃	804	DSP
Azaspiracide-1	AZA1	<i>Azadinium spinosum</i>	Lipophile	C ₄₇ H ₇₁ NO ₁₂	841	DSP
Brévéttoxine-b	BTX	<i>Karenia brevis</i> <i>Chattonella</i> spp.	Lipophile	C ₅₀ H ₇₀ O ₁₄	894	NSP
Ciguatoxine-P	CTX	<i>Gambierdiscus toxicus</i>	Lipophile	C ₆₀ H ₈₅ O ₁₆	1061	NSP
Gymnodimine	GYM	<i>Karenia selliformis</i>	Lipophile	C ₃₂ H ₄₅ NO ₄	507	Peu connu
Palytoxine	PTX	<i>Ostreopsis</i> spp.	Amphiphile	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₄	2677	Dermatotoxicité
Pecténotoxine-2	PTX2	<i>Dinophysis</i> spp., <i>Prorocentrum</i> spp.	Lipophile	C ₄₇ H ₇₀ O ₁₄	858	-
Pinnatoxine	PnTX	<i>Vulcanodinium rugosum</i>	Lipophile	C ₄₁ H ₆₁ NO ₉	711	Peu connu
Prorocentrolide	PCL	<i>Prorocentrum</i> spp.	Lipophile	C ₅₆ H ₈₅ NO ₁₃	979	Peu connu
Saxitoxine	STX	<i>Alexandrium</i> spp., <i>Gymnodinium catenatum</i> , <i>Pyrodinium bahamense</i>	Hydrophile	C ₁₀ H ₁₇ N ₇ O ₄	299	PSP
Spirolide	SPX	<i>Alexandrium ostenfeldii</i>	Lipophile	C ₄₁ H ₆₁ NO ₇	691	Peu connu
Yessotoxine	YTX	<i>Protoceratium reticulatum</i> , <i>Lingulodinium polyedrum</i> , <i>Gonyaulax spinifera</i>	Amphiphile	C ₅₅ H ₈₂ O ₂₁ S ₂	1140	-

I.1. Les toxines hydrophiles

Parmi les toxines hydrophiles, on dénombre d'une part celles responsables d'intoxications amnésiantes (acide domoïque et ses isomères) et d'autre part, celles responsables d'intoxications paralysantes (la saxitoxine, la tétródotoxine).

I.1.1. Groupe de l'acide domoïque

L'acide domoïque (AD) et ses analogues sont des toxines principalement produites par les algues rouges du genre *Chondria* (Daigo, 1959) et les diatomées du genre *Pseudo-Nitzschia* (Lefebvre and Robertson, 2010; Quilliam et al., 1989; Quilliam and Wright, 1989). L'AD est rapporté comme pouvant s'accumuler dans une grande variété d'organismes marins, tels que les coquillages (Blanco et al., 2002) et les baleines (Lefebvre et al., 2002). De plus, les diatomées *Pseudo-nitzschia spp.* qui produisent cette toxine sont très largement distribuées dans le monde entier (Trainer et al., 2012). Les intoxications à l'AD provoquent des symptômes gastro-intestinaux (nausées, vomissements, diarrhées ou crampes abdominales) mais aussi des symptômes neurologiques (confusion, épilepsie, perte de mémoire et même coma) (EFSA, 2009a).

L'acide domoïque est un petit acide aminé cyclique (311 Da), présentant trois fonctions acide carboxylique (Figure I-1).

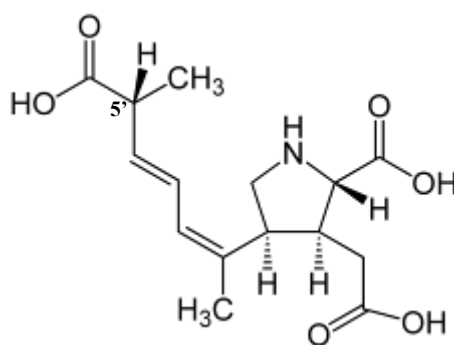


Figure I-1 : L'acide domoïque

L'AD doit son caractère hydrosoluble et sa polarité relativement élevée à ses fonctions acide carboxylique. Son élution se situe donc en début de chromatogramme, lors de l'utilisation de la chromatographie liquide en phase inverse (Quilliam et al., 2001; Quilliam et al., 1989). De nombreux isomères et analogues de l'AD ont été rapportés (Holland et al., 2005; Maeda et al., 1986; Walter et al., 1994; Zaman et al., 1997), mais seuls l'AD et son isomère C5'-diastéréoisomère ont, jusqu'à présent, révélé une toxicité non négligeable (Ramsdell in (Rossini and Hess, 2010)).

I.1.2. Groupe de la saxitoxine

La saxitoxine (STX) et ses dérivés sont des poisons neurotoxiques, pouvant être mortels pour l'homme. Ils sont principalement produits par les dinoflagellés du genre *Alexandrium* : *A. catenella*, *A. tamarense*, *A. tamiyavanichii*, *A. minutum*, *A. excavatum*, *A. fundyense* et *A. cohorticula*, mais aussi par d'autres dinoflagellés comme *Gymnodinium catenatum* et *Pyrodinium bahamense* (FAO, 2004). Les moules et huîtres sont les organismes les plus souvent contaminés. Cependant, des gastéropodes marins (l'ormeau), des crustacées et des poissons globes ont aussi été signalés comme pouvant contenir des concentrations dangereuses pour l'Homme (Rossini and Hess, 2010). Les intoxications par les toxines du groupe de la STX sont responsables de symptômes allant d'une sensation de picotement ou d'engourdissement de la bouche et des extrémités (doigts, pieds), à une paralysie respiratoire pouvant être fatale.

La STX et ses dérivés présentent un squelette tétrahydropurique (Figure I-2). De par sa structure de base, la molécule est très soluble dans l'eau. A ce jour, plus de 50 STX (Wiese et al., 2010) ont été identifiées, principalement à partir de cyanobactéries, de dinoflagellés marins et de mollusques bivalves filtreurs (Dell'Aversano et al., 2008; Dell'Aversano, 2004).

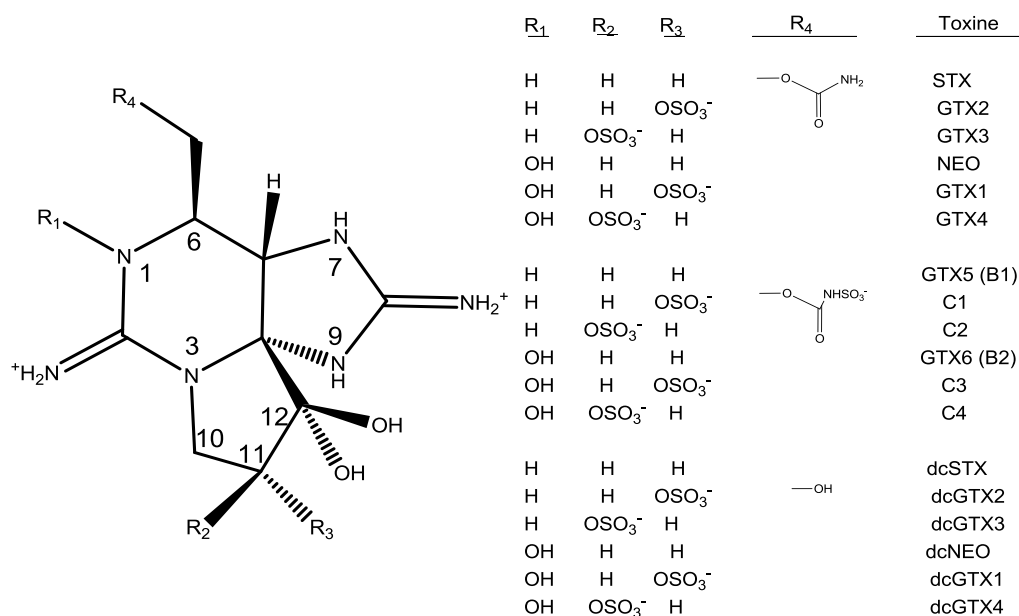


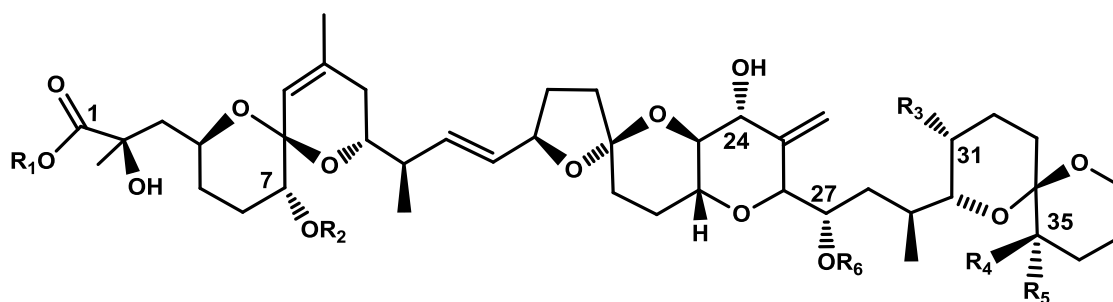
Figure I-2 : Les saxitoxines : structure générique et analogues

Compte tenu du profil complexe de ces toxines, des conversions possibles de ces composés et du manque de matériaux de référence, la plupart des pays ont maintenu le test souris (Sommer and Meyer, 1937), validé comme méthode officielle de détection des toxines par l'AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) (AOAC, 2005a). Des méthodes alternatives basées sur l'utilisation de la chromatographie liquide couplée à une détection par fluorescence (Lawrence et al., 2004; Oshima, 1995; van de Riet et al., 2011) ou d'un test biochimique sur récepteur (van Dolah et al., 2009), ont néanmoins été développées et officiellement validées (AOAC, 2005b; van Dolah et al., 2012).

I.2. Les toxines lipophiles

I.2.1. Groupe de l'acide okadaïque et dinophysistoxines

Ce groupe est composé de l'acide okadaïque (AO) et de ses analogues les dinophysistoxines (DTX) (Figure I-3). L'acide okadaïque (AO), toxine diarrhéique, a été initialement isolé de l'éponge *Halichondria okadai* (Tachibana et al., 1981). Les organismes producteurs d'AO et de DTXs ont cependant été identifiés comme étant des dinoflagellés pélagiques du genre *Dinophysis* (ex : *D. acuta* et *D. acuminata*) et benthiques du genre *Prorocentrum* (ex : *P. lima* et *P. belizeanum*). La découverte de l'AO de part et d'autre du globe, au Japon, en Europe, mais aussi aux États-Unis (Maranda and Shimizu, 1987), en Amérique du Sud (Muñoz et al., 1992), aux Philippines (Marasigan et al., 2001) et dans le golfe du Mexique (Swansson in(Rossini and Hess, 2010)), démontrent la répartition mondiale de cette toxine et donc des espèces productrices.



Toxine	R1	R2	R3	R4	R5	R6
AO	H	H	CH ₃	H	H	H
DTX1	H	H	CH ₃	CH ₃	H	H
DTX2	H	H	H	H	CH ₃	H
DTX3	H	acyle	*	*	*	H
Diol-ester	diol-ester	H/acyle	*	*	*	H
DTX4	diol-ester	H	*	*	*	H
DTX5	diol-ester	H	*	*	*	H
27-0-acyle	H	H	CH ₃	H	H	acyle

Figure I-3 : L'acide okadaïque et les dinophysistoxines : structure générique et analogues

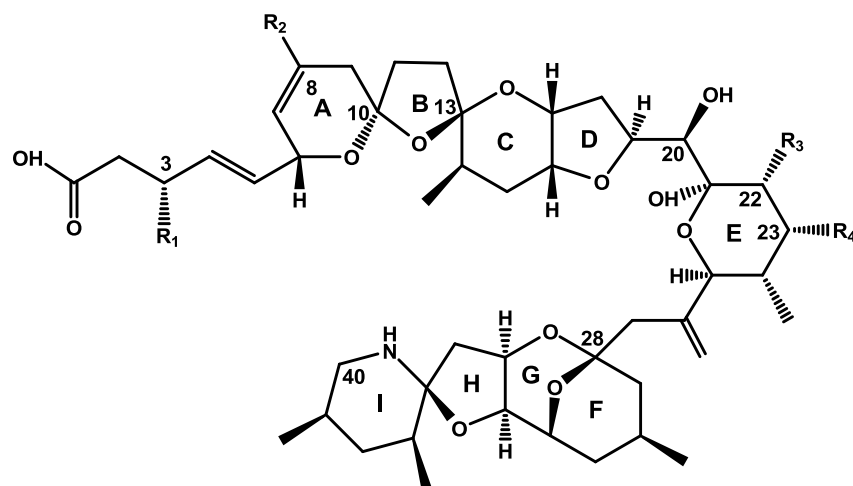
(*) : ce groupement est identique à celui du composé parent AO, DTX1, DTX2 (Larsen et al., 2007).

L'AO et les DTX sont des polyéthers lipophiles possédant un groupement acide carboxylique terminal (estérifié ou non) et un assemblage de trois anneaux tri-spiro (deux cycles reliés par un atome) (Figure I-3). Ces toxines lorsqu'elles ne sont pas estérifiées sont qualifiées de « libres ». C'est le cas de l'AO, la DTX1 et la DTX2. Les analogues estérifiés peuvent être formés au sein des microalgues ou du coquillage. Les analogues DTX4, -5, etc ont ainsi été isolés à partir de *P. lima* et de *P. belizeanum* (Hu et al., 1992; Yasumoto et al., 1989).

I.2.2. Groupe des azaspiracides

L'intoxication par les azaspiracides provoque chez l'Homme le syndrome nommé Azaspiracid Shellfish Poisoning (AZP). Les azaspiracides ont été découvertes suite à une intoxication alimentaire liée à la consommation de moules contaminées provenant d'Irlande (Satake et al., 1998b; Twiner et al., 2008). Les azaspiracides (AZA) tirent leur nom du fait qu'elles sont des polyéthers composées d'une amine cyclique appelée aza, d'un assemblage tri-spiro, et d'un acide carboxylique. Tandis que la dernière revue de Hess et al. (2014) fait état de 37 analogues, une quarantaine d'analogues des azaspiracides ont été décrits à ce jour, parmi lesquels ceux présentés dans la Figure I-4. Les azaspiracide-1 (AZA1), -2 (AZA2) et -3 (AZA3) sont les seules analogues réglementés dans les produits de la mer (Furey et al., 2010; Jauffrais et al., 2012b; Twiner et al., 2008). Cependant, des études récentes ont montré que les AZA6, -17 et -19 sont tout aussi prépondérants (Kilcoyne et al., 2015; McCarron et al., 2009) que les AZA1, -2 et -3, et participent aussi à la toxicité des échantillons. Par conséquent, elles devraient être réglementées au même titre que les AZA1, -2 et -3.

Azadinium spinosum, l'organisme producteur des azaspiracides, a été décrit en 2009 par Tillman *et al* (Tillmann et al., 2009). Cette microalgue d'une taille de 12 à 16 µm, est le plus petit des dinoflagellés producteurs de toxines connus. Les AZA identifiées sont soit produites par *A. spinosum*, soit issues de la biotransformation par les coquillages, ou encore des artéfacts de méthylation dus au stockage en solution méthanolique (Jauffrais et al., 2012a) (Figure I-4). Ces toxines ont été détectées en Europe (Irlande, RU, Norvège, France, Portugal), au Maroc, au Chili et aux Etats-Unis (James et al., 2004; Klontz et al., 2009; Lopez-Rivera et al., 2009).



Abréviation	Nom	MM	R1 (C3)	R2 (C8)	R3 (C22)	R4 (C23)	R5 (?)
AZA1	Azaspiracide	841,5	H	H	CH ₃	H	
AZA2	8-méthyle-azaspiracide	855,5	H	CH ₃	CH ₃	H	
AZA3	22-desméthyle-azaspiracide	827,5	H	H	H	H	
AZA4	22-desméthyle-3-hydroxy-azaspiracide	843,5	OH	H	H	H	
AZA5	22-desméthyle-23-hydroxy-azaspiracide	843,5	H	H	H	OH	
AZA6	22-desméthyle-8-méthyle-azaspiracide	841,5	H	CH ₃	H	H	
AZA7	3-hydroxy-azaspiracide	857,5	OH	H	CH ₃	H	
AZA8	23-hydroxy-azaspiracide	857,5	H	H	CH ₃	OH	
AZA9	22-desméthyle-3-hydroxy-8méthyle-azaspiracide	857,5	OH	CH ₃	H	H	
AZA10	22-desméthyle-23-hydroxy-8méthyle-azaspiracide	857,5	H	CH ₃	H	OH	
AZA11	3-hydroxy-8-méthyle-azaspiracide	871,5	OH	CH ₃	CH ₃	H	
AZA12	23-hydroxy-8-méthyle-azaspiracide	871,5	H	CH ₃	CH ₃	OH	
AZA13	22-desméthyle-3,23-dihydroxy-azaspiracide	859,5	OH	H	H	OH	
AZA14	3,23-dihydroxy-azaspiracide	873,5	OH	CH ₃	H	OH	
AZA15	22-desméthyle-3,23-dihydroxy-8-méthyle-azaspiracide	873,5	OH	H	CH ₃	OH	
AZA16	3,23-dihydroxy-8-méthyle-azaspiracide	887,5	OH	CH ₃	CH ₃	OH	
AZA17	carboxy-22-desméthyle-azaspiracide	871,5	H	H	H	H	COOH
AZA18	carboxy-azaspiracide	885,5	H	CH ₃	H	H	COOH
AZA19	carboxy-22-desméthyle-8méthyle-azaspiracide	885,5	H	H	CH ₃	H	COOH
AZA20	carboxy-8-méthyle-azaspiracide	899,5	H	CH ₃	CH ₃	H	COOH
AZA21	carboxy-22-desméthyle-3hydroxy-azaspiracide	887,5	OH	H	H	H	COOH
AZA22	carboxy-3-hydroxy-azaspiracide	901,5	OH	CH ₃	H	H	COOH
AZA23	carboxy-22-desméthyle-3-hydroxy-8-méthyle-azaspiracide	901,5	OH	H	CH ₃	H	COOH
AZA24	carboxy-3-hydroxy-8-méthyle-azaspiracide	915,5	OH	CH ₃	CH ₃	H	COOH

(Rehmann et al., 2008).

Figure I-4 : Les azaspiracides : structure générique et analogues

Les 4 derniers analogues (méthyle-esters) sont des artéfacts de stockage des AZA en solution méthanolique, et n'ont pas été identifiés spécifiquement comme des contaminants des

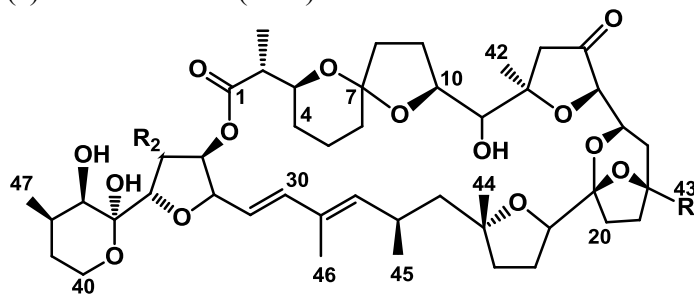
coquillages. AZA18, AZA20, AZA22, n'ont pas été observées expérimentalement mais on a postulé leur existence potentielle.

I.2.3. Groupe des pectenotoxines

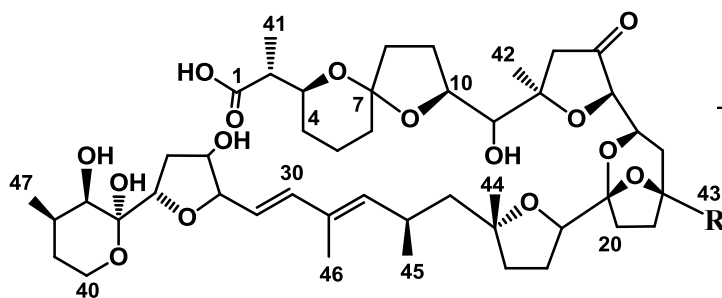
Les pectenotoxines (PTX) sont produites par des espèces du genre *Dinophysis*, l'un des principaux producteurs d'AO et de ses analogues. Pour cette raison, les PTX ont été, dans un premier temps, associées aux intoxications diarrhéiques.

Les PTX sont des polyéthers lactones lipophiles qui possèdent des poids moléculaires proches de l'AO et des AZA. Contrairement à l'AO et aux AZA, les formes actives de PTX possèdent un ester macrocyclique intramoléculaire et pas d'acide carboxylique libre (Figure I-5). En chromatographie, la PTX2 se comporte donc comme un composé neutre et très lipophile (Fux et Hess, observations non publiées dans (Rossini and Hess, 2010).

(a) Pectenotoxine (PTX)



(b) Séco-acide de PTX (PTXsa)



Toxine	R (en C43)	C7
PTX1	CH ₂ OH	7R
PTX2	CH ₃	7R
PTX3	CHO	7R
PTX4	CH ₂ OH	7S
PTX6	COOH	7R
PTX7	COOH	7S
PTX2sa	CH ₃	7R
7-epi-PTX2sa	CH ₃	7S

N.B.: Le macrocycle est ouvert pour PTX2sa et 7-épi-PTX2sa.

Figure I-5 : Les pectenotoxines : structure générique et analogues.

Dans le pétoncle japonais (*Patinopecten yessoensis*), d'où la toxine tire son nom, la PTX2 est successivement métabolisée en PTX1, PTX3 puis en PTX6 (Suzuki et al., 2005). Quels que soient ces analogues, le macrocycle est maintenu (Figure I-5), ce qui résulte en un comportement chromatographique quasi similaire à celui de la PTX2. En revanche, dans les moules (*Mytilus edulis*), la PTX2 est transformée en un séco-acide (PTX2sa), dans lequel le

macrocycle est ouvert (Figure I-5), ce qui entraîne une perte de la bioactivité de la toxine (Miles et al., 2004).

I.2.4. Groupe des yessotoxines

Les yessotoxines (YTX) sont principalement produites par le dinoflagellé *Protoceratium reticulatum* (Satake et al., 1997a). Les dinoflagellés *Lingulodinium polyedrum* (Paz et al., 2004) et *Gonyaulax spinifera* (Rhodes et al., 2006) ont aussi été identifiés comme producteurs de YTXs. Les YTXs sont capables de s'accumuler chez diverses espèces de mollusques bivalves filtreurs telles que les huîtres, les moules, les coquilles Saint-Jacques et les palourdes. À l'instar des toxines de *Dinophysis*, elles ont souvent été retrouvées coexistantes avec ces dernières et, pour cette raison, ont d'abord été regroupées avec les toxines diarrhéiques. Elles ont par la suite été retirées de ce groupe (Dominguez et al., 2010) car elles ne sont toxiques que pour les souris (Tubaro et al., 2003). Ces toxines ont été détectées dans des microalgues ou mollusques bivalves en Australie, Canada, Italie, Japon, Nouvelle-Zélande, Norvège et Royaume-Uni (FAO/IOC/WHO, 2005).

Les YTX sont des polyéthers cycliques composés de 11 cycles accolés, d'une chaîne insaturée et de deux fonctions sulfate (Figure I-6). La structure rigide de la chaîne cyclique présente un caractère apolaire qui est contrebalancé par les groupements sulfates polaires. Ces toxines ont de ce fait une lipophilicité intermédiaire (Hess and Aasen, 2007). Une centaine d'analogues de la YTX a été identifiée dans un seul isolat de *P. reticulatum* (Miles et al., 2005). Les analogues les plus abondants, et généralement retrouvés, sont la YTX, la 45-hydroxy-YTX, suivie par la carboxy-YTX.

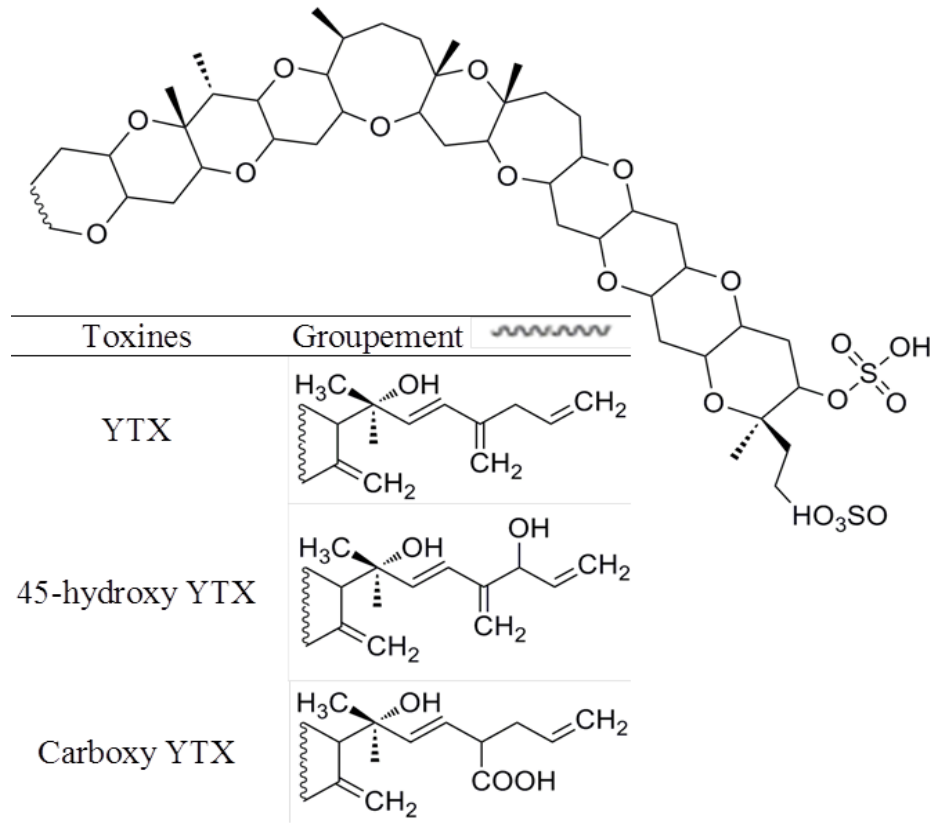


Figure I-6 : Les yessotoxines : structure générique et analogues

I.2.5. Groupe des brévétotoxines

Principalement produites par le dinoflagellé *Karenia brevis* (originellement connu sous le nom de *Gymnodinium breve* ou *Ptychodiscus breve*), les brévétotoxines appartiennent à la même famille de polyéthers que les yessotoxines. Les flagellés (de classe Raphidophyceae) du genre *Chatonella*, *Fibrocapsa* et *Heterosigma* ont aussi été identifiés récemment comme producteurs de brévétotoxines (Daneshian et al., 2013). Des efflorescences de ces espèces d'algues ont été rapportées principalement dans le Golfe du Mexique, en Floride, et plus récemment en Nouvelle Zélande (Morohashi et al., 1995), mais aucune contamination de coquillages n'a encore été décrite en Europe (Paredes et al., 2011).

Deux structures de base existent pour les brévétotoxines (BTX) (Figure I-7) : une structure de type A (groupe BTX-A) possédant 10 cycles polyéthers accolés, et une structure de type B (groupe BTX-B) possédant 11 cycles polyéthers accolés. Les analogues BTX-1, -7 et -10 font partie du groupe BTX-A, tandis que le groupe BTX-B comprend les analogues BTX -2, -3, -5, -6 et -9.

Les brevéttoxines produites par *K. brevis* sont des composés très lipophiles. Certains métabolites présents dans les coquillages ont un caractère légèrement plus hydrophile, en raison de biotransformations conduisant à des dérivés conjugués cystéiques (Plakas et al., 2004; Wang et al., 2004). Alors que l'analogue majoritaire trouvé dans l'eau de mer, lors des efflorescences de *K. brevis*, est la BTX2, la BTX1 est l'analogue le plus toxique. Néanmoins, la BTX2 est rapidement transformée en BTX3 (dihydro-BTX2) qui est plus toxique. C'est la BTX3 qui est la toxine principalement retrouvée dans les aérosols formés durant les efflorescences de *K. brevis* (Pierce et al., 2005).

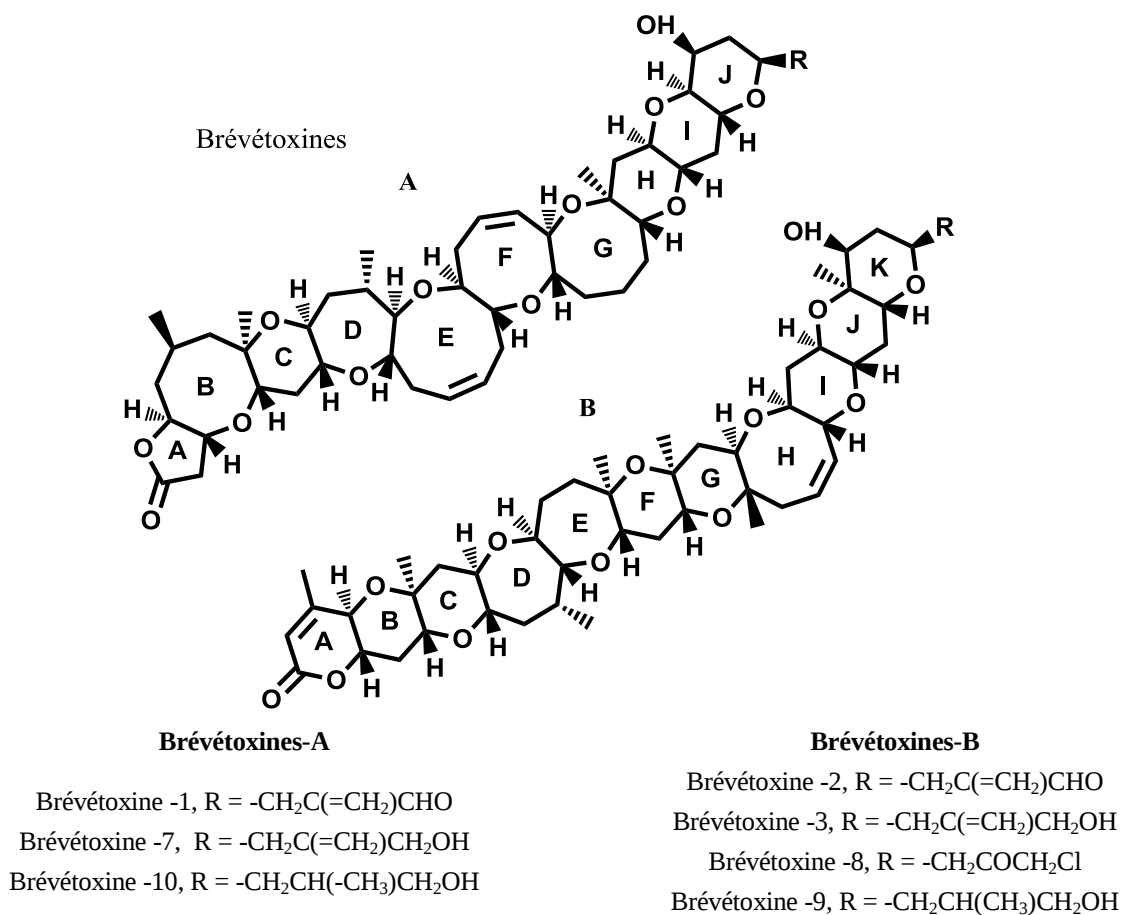


Figure I-7 : Les brevéttoxines : structures génériques et analogues.

I.3. Les toxines émergentes

Le terme de « *toxine émergente* » est régulièrement retrouvé dans la littérature quand il s'agit des biotoxines marines. Cependant, dans le domaine des toxines, aucune définition précise et consensuelle n'a encore été donnée. Les différents cas de figure dans lesquels ce terme peut être utilisé sont les suivants :

- La découverte récente d'une toxine pour laquelle les effets sur la santé humaine sont encore inconnus ou non explicitement avérés.
- L'apparition d'une toxine connue, mise en évidence dans une zone géographique où elle n'a pas encore été détectée ou décrite.
- La découverte d'un nouvel analogue d'une toxine connue pour lequel les effets sur la santé humaine sont incertains ou méconnus.

Les toxines des groupes imines cycliques, palytoxines et ciguatoxines, décrites dans les paragraphes suivants, sont classées parmi les toxines émergentes.

I.3.1. Groupe des imines cycliques

Parmi les imines cycliques on compte les gymnodimines, les spirolides, les pinnatoxines et les ptériatoxines, les acides pinnaïques, les halichlorines, les prorocentrolides et les symbio-imines (Figure I-8) (Hu et al., 1995; Lu et al., 2001; Seki et al., 1995; Takada et al., 2001; Uemura et al., 1995).

Ces composés partagent une structure de macrocycle avec une partie imine cyclique qui semble être le pharmacophore actif. En effet, l'ouverture de ces cycles entraîne la perte de l'activité biologique (ex: les spirolides (Hu et al., 1996)).

Les imines cycliques sont des « toxines à action rapide », ou Fast Acting Toxins (FAT) en anglais (Molgo et al., 2007). En effet, l'administration par voie intra-péritonéale (IP) de ces toxines à la souris entraîne sa mort rapide (quelques minutes après injection). Aucune intoxication par ces composés n'a encore été rapportée (McCarron et al., 2012; Selwood et al., 2010). Cependant, la toxicité des pinnatoxines représente un risque potentiel pour l'Homme (Uemura, 2006), même si celle des gymnodimines et spirolides reste à démontrer chez l'Homme.

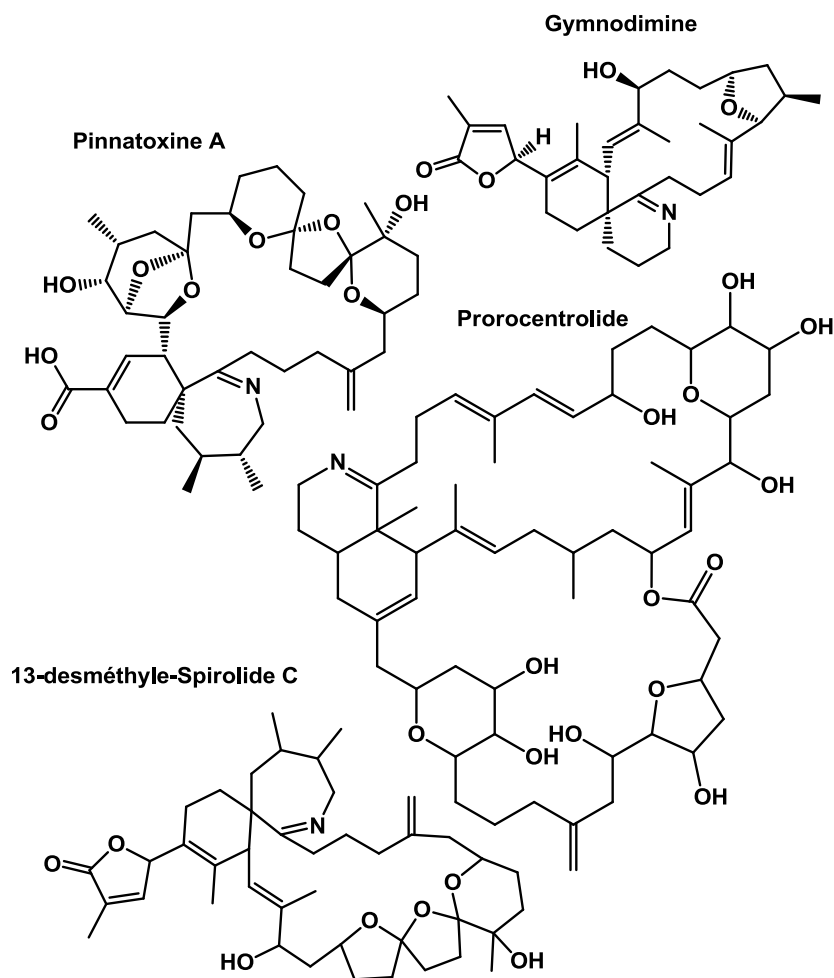


Figure I-8 : Les imines cycliques

I.3.1.a. Groupe des pinnatoxines et ptériatoxines

Les pinnatoxines (PnTX) ont été identifiées pour la première fois en Chine dans des coquillages du genre *Pinna* (Zheng et al., 1990). La pinnatoxine A (PnTX-A) ainsi que les PnTX-B, -C et -D ont été isolées à partir de viscères de *Pinna muricata* du Japon (Chou et al., 1996). Les PnTX-E, -F et -G ont été découvertes dans des huîtres provenant d'Australie et de Nouvelle-Zélande, et les PnTX-F et -G ont été proposées comme étant les métabolites algaux précurseurs de toutes les pinnatoxines connues (Selwood et al., 2010). Toutes ces toxines sont représentées en Figure I-9. En Europe, des PnTX ont été retrouvées pour la première fois en Norvège en 2011, dans des moules et de l'eau de mer (Rundberget et al., 2011). C'est grâce aux isolats de microalgues effectués par Nézan et Chomérat en Mer Méditerranée qu'a pu être décrite une nouvelle espèce et un nouveau genre de dinoflagellé benthique : *Vulcanodinium rugosum* (Nezan and Chomerat, 2011), producteur de pinnatoxines (Hess et al., 2013). Plus récemment, des PnTX-A et -G ont été identifiées dans des moules à l'est du Canada. C'est à

cette occasion que l'on a découvert pour la première fois des esters d'acides gras de la PnTX-G (McCarron et al., 2012).

Les ptériatoxines (A à C) sont supposées quant à elles, être produites à partir de la pinnatoxine-G, qui elle-même est également produite par *Vulcanodinium rugosum* (Selwood et al., 2010).

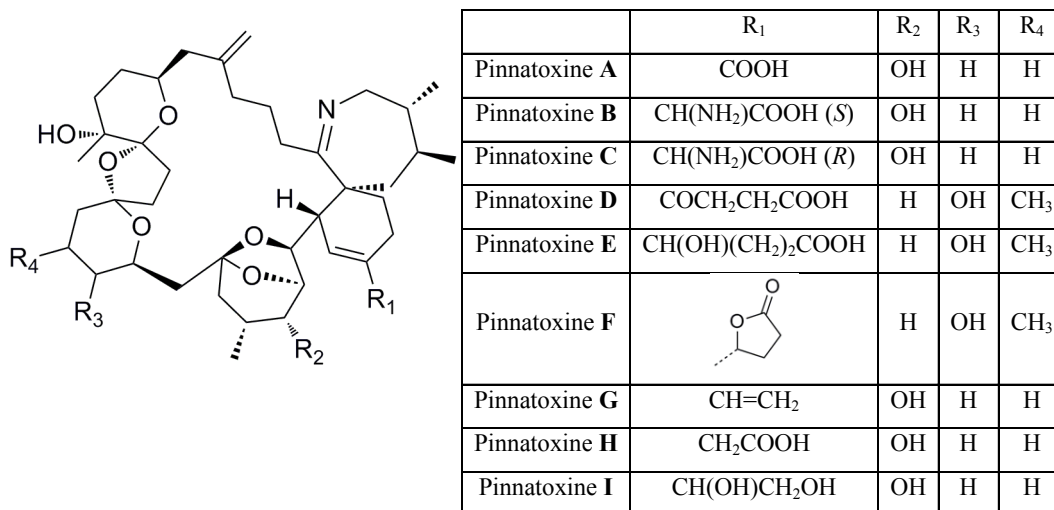


Figure I-9 : Les pinnatoxines

I.3.1.b. Groupe des spirolides, gymnodimines et prorocentrolides

Les spirolides, gymnodimines et prorocentrolides sont principalement produites par des dinoflagellés (Cembella et al., 2000; Seki et al., 1995; Torigoe et al., 1988).

Les dinoflagellés *Alexandrium ostensfeldii* et *Alexandrium peruvianum* sont les principaux producteurs de spirolides (SPX). Les gymnodimines (GYMs) sont quant à elles produites par le dinoflagellé *Karenia selliformis* et peuvent être retrouvées plusieurs mois après le bloom dans les coquillages contaminés (MacKenzie et al., 2002). Elles ont été trouvées en Nouvelle Zélande, en Tunisie et en Australie (Paredes et al., 2011). Les GYM-A, -B, -C sont les seuls analogues décrits à ce jour (Otero et al., 2011).

I.3.2. Groupe de la palytoxine

La palytoxine (PlTX), qui possède une chaîne continue de 115 atomes de carbone, est l'une des plus grandes phycotoxines de type polyéther (Figure I-10) décrite à ce jour. La molécule est caractérisée, d'une part par la présence de nombreux groupes hydroxyles et de groupes amine et amide, qui la rendent hydrophile, et d'autre part par une longue chaîne

carbonée lipophile. De ce fait, la PITX est une toxine amphiphile (dotée à la fois de propriétés hydrophile et lipophile). La structure de la PITX a été décrite pour la première fois en 1981 (Moore and Bartolini, 1981; Uemura et al., 1981).

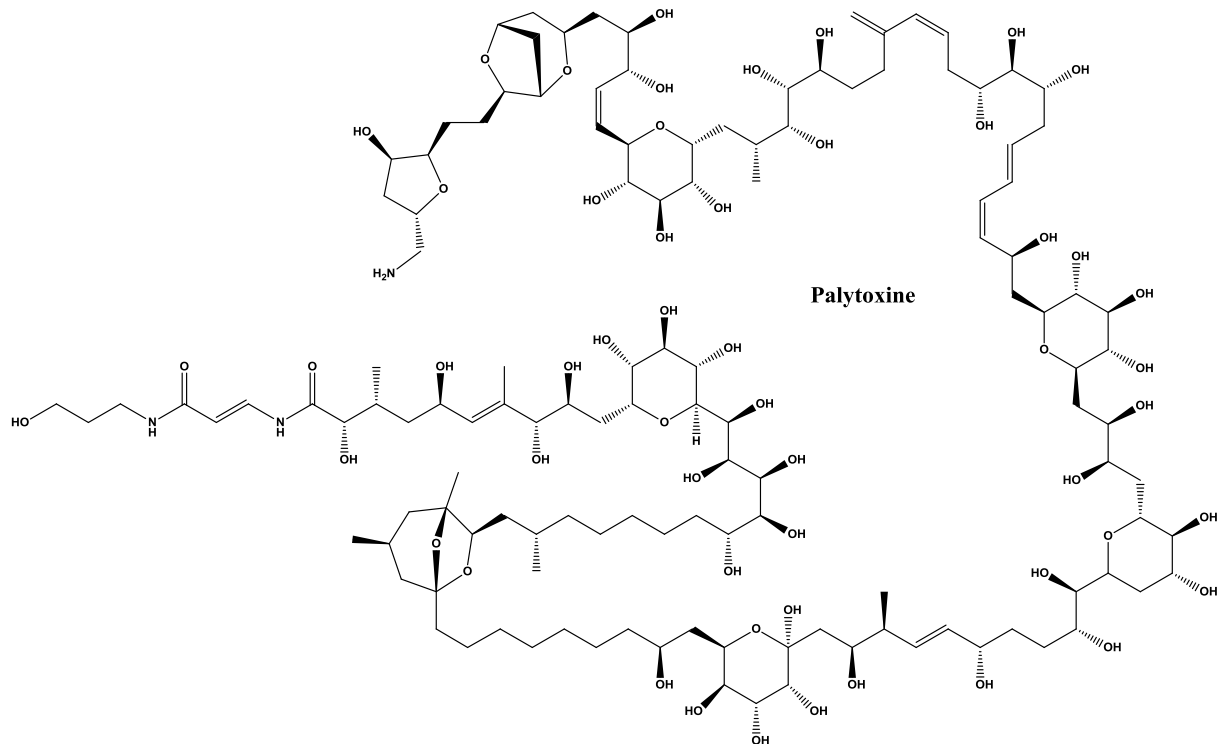


Figure I-10 : La palytoxine

Les toxines du groupe de la palytoxine (PITX) ont été initialement détectées dans des cnidaires du genre *Palythoa* : *P. toxica* et *P. tuberculosa* (Kimura et al., 1972; Moore and Scheuer, 1971). Toutefois, il s'est avéré, par la suite, que les organismes réellement producteurs des PITX étaient des dinoflagellés benthiques du genre *Ostreopsis* : *O. ovata*, *O. mascarenensis* et *O. siamensis* (Lenoir et al., 2004; Onuma et al., 1999; Penna et al., 2005).

Des intoxications par ce groupe de toxines, liées à l'exposition aux aérosols produits, mais aussi à la consommation de poissons contaminés, ont été tout d'abord rapportées dans les tropiques. Cependant, des *Ostreopsis spp.* produisant de la palytoxine et des composés analogues (ex : les ovatoxines-a, -b, -c, -d, -e dans *O. ovata*) ont également été trouvés récemment en Méditerranée occidentale (Espagne, Italie, Grèce et France), provoquant la fermeture de zones de baignade, sur des plages des côtes des pays concernés (Brissard et al., 2014). Par ailleurs, des contaminations d'oursins et de mollusques bivalves ont été rapportées en parallèle en Grèce, en Italie, en Espagne et en France (Aligizaki et al., 2008; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Amzil et al., 2012; Ciminiello et al., 2010; Ciminiello et al., 2008).

I.3.3. Groupe des ciguatoxines et maïtotoxine

Les empoisonnements ciguatériques sont liés à la consommation de poissons. Les toxines associées à ces empoisonnements comprennent plusieurs groupes de composés. Les ciguatoxines (CTX), le gambierol et la maïtotoxine (MTX) (Figure I-11) appartiennent à des groupes de composés produits par le dinoflagellé *Gambierdiscus toxicus*. Ce dinoflagellé, découvert par Yasumoto et al. (1977), a été décrit par Adachi and Fukuyo (1979). Il est responsable des intoxications alimentaires, dites ciguateriques, et causées par la consommation de chairs de poissons contaminées. D'autres dinoflagellés du genre *Gambierdiscus* produisent cependant des toxines affiliées aux CTX et MTX : les *G. australis*, *G. pacificus* et *G. polynesiensis* produisent des « CTX-like » et « MTX-like » et le *G. yasumotoi* produit des « MTX-like »).

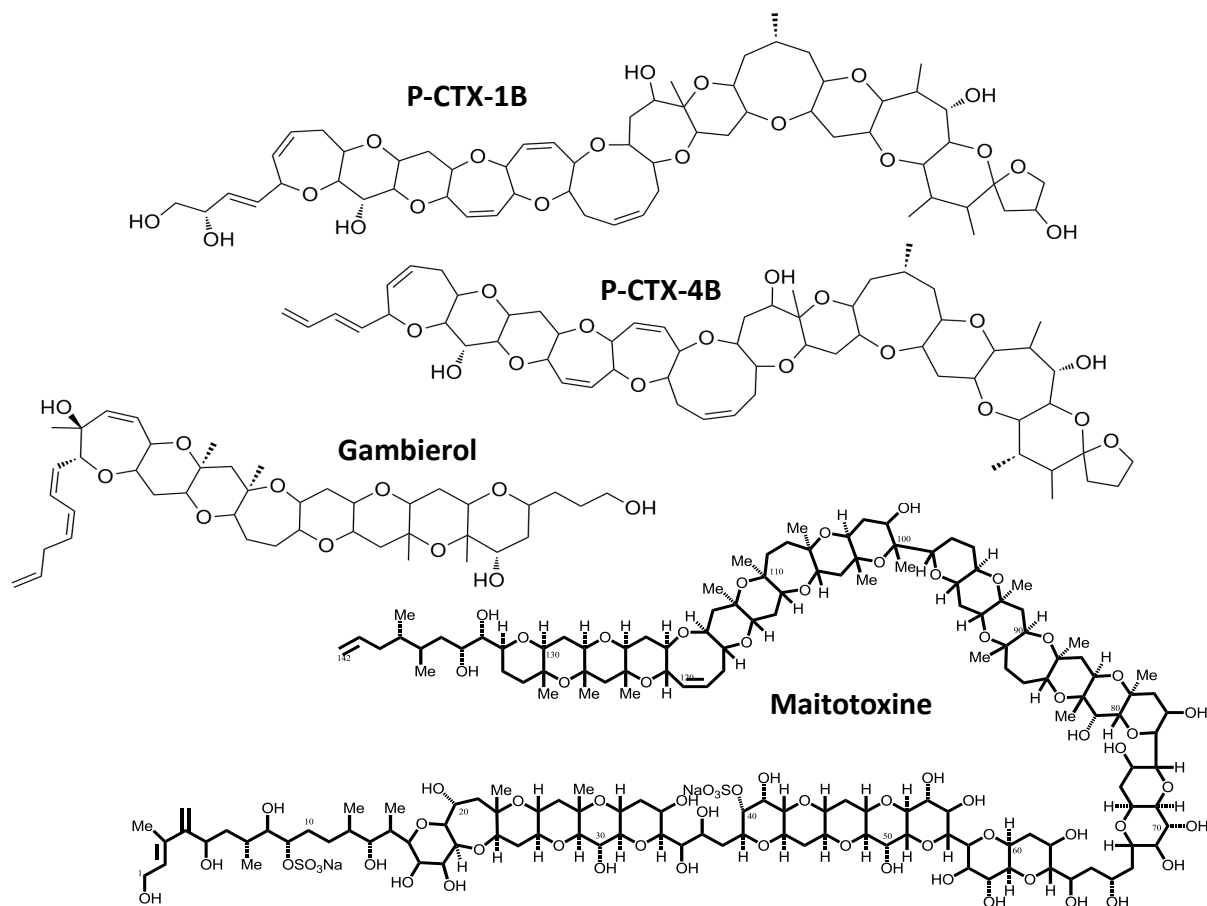


Figure I-11 : Les toxines de *Gambierdiscus*: P-CTX-1B, P-CTX4B, Gambierol et Maïtotoxine.

La MTX est un polyéther polyhydroxylé (Figure I-11) possédant deux groupements sulfate. De par son caractère amphiphile elle est soluble dans l'eau, le méthanol et le diméthylsulfoxyde. La MTX est ainsi parmi les polyéthers les plus hydrophiles, ce qui limite sa bioaccumulation dans la chaîne alimentaire. Au contraire, les gambierols et les ciguatoxines qui sont des polyéthers beaucoup plus lipophiles, seront plus facilement bioaccumulables.

Dans le Pacifique la microalgue *Gambierdiscus toxicus* produit, la P-CTX-4B (Figure I-11) précurseur de la P-CTX-1. Cette dernière a été isolée à partir de la chair de murène (Murata et al., 1990) et est la toxine majoritairement retrouvée dans les poissons piscivores contaminés du Pacifique (Lewis et al., 1991; Murata et al., 1990; Murata et al., 1989; Poli et al., 1997; Satake et al., 1998a; Satake et al., 1997b; Satake et al., 1993).

Les microalgues *G. toxicus* préférant les eaux chaudes, la présence de ciguatoxines reste à ce jour limitée aux latitudes tropicales et subtropicales (Chateau-Degat et al., 2005). Cependant, des cas de ciguatera ont été décrits récemment aux Canaries (Caillaud et al., 2010) et en Grèce (Aligizaki and Nikolaidis, 2008) suggérant que leur distribution dans le monde serait en progression.

I.4. Réglementation sur les toxines

Plusieurs pays ont établi des réglementations sur la sécurité des aliments dans lesquelles sont consignées les recommandations à adopter pour le contrôle de la contamination des coquillages par les phycotoxines. Dans la plupart des cas, l'établissement de ces règles a été réalisé suite à l'apparition d'épisodes toxiques.

En 2004, pour des raisons de sécurité sanitaire, la réglementation de l'Union Européenne (EC) N° 853/2004 a fixé les concentrations maximales en phycotoxines à ne pas dépasser dans les mollusques bivalves. A la suite de cette décision, en 2005, la Commission Regulation (EC) N°2074/2005 a indiqué les tests réglementaires utilisables pour détecter la présence de toxines marines à des concentrations proches des limites fixées dans la décision (EC) N° 853/2004. En identifiant les tests biologiques comme méthodes de référence pour détecter certaines toxines, cette réglementation a néanmoins aussi établi que des méthodes alternatives validées et donnant des résultats au moins équivalents à ceux des tests sur animaux devraient être mises en place.

En Europe, l'EFSA a été saisie en 2006 pour rassembler les données disponibles sur les biotoxines marines, et donner un avis quant à leur réglementation et les méthodes de détection à appliquer afin d'assurer la protection des consommateurs. C'est ainsi qu'ont été déterminées les concentrations dangereuses pour la santé humaine, et que les seuils réglementaires de toxines dans les mollusques bivalves ont été fixés (Tableau I-2). Ces seuils prennent en compte à la fois les consommateurs réguliers et occasionnels, et sont définis sur la base d'une consommation potentielle d'une portion de 400 g de chair de coquillage par jour (EFSA, 2008).

Tableau I-2: Seuils sanitaires européens actuellement en vigueur pour les phycotoxines réglementées dans les fruits de mer, les ARfDs (acute reference dose = DMENO, dose minimale avec effet nocifs observés) et seuils recommandés correspondants par l'EFSA dans la chair des coquillages.

Toxin group	Current EU limits in shellfish meat (A)	Exposure by eating a 400 g portion at the EU limit ^(c)	Exposure by eating a 400 g portion at the 95 th percentile of the concentrations in samples currently on the EU market	ARfD	Exposure corresponding to the ARfD by eating a 400 g portion ^(c)	Derived concentration in shellfish meat (B)	Ratio B / A
OA and analogues	160 µg OA eq./kg SM ^(a)	64 µg OA eq./person (1 µg OA eq./kg b.w.)	96 µg OA eq./person (1.6 µg OA eq./kg b.w.)	0.3 µg OA eq./kg b.w.	18 µg OA eq./person	45 µg OA eq./kg SM	0.28
AZA	160 µg AZA eq. ^(d) /kg SM	64 µg AZA1 eq./person (1 µg AZA1 eq./kg b.w.)	16 µg AZA1 eq./person (0.3 µg AZA1 eq./kg b.w.)	0.2 µg AZA1 eq./kg b.w.	12 µg AZA1 eq./person	30 µg AZA1 eq./kg SM	0.19
PTX	160 µg OA eq./kg SM ^(a)	64 µg PTX2/person (1 µg PTX2 eq./kg b.w.)	32 µg PTX2/person (0.5 µg PTX2 eq./kg b.w.)	0.8 µg PTX2 eq./kg b.w.	48 µg PTX2 eq./person	120 µg PTX2 eq./kg SM	0.75
YTX	1 mg YTX eq./kg SM	400 µg YTX eq./person (6.7 µg YTX eq./kg b.w.)	320 µg YTX eq./person (IT) (5.3 µg YTX eq./kg b.w.) 125 µg YTX eq./person (NO) (2.1 µg YTX eq./kg b.w.)	25 µg YTX eq./kg b.w.	1500 µg YTX eq./person	3.75 mg YTX eq./kg SM	3.75
STX	800 µg PSP/kg SM ^(b)	320 µg STX eq./person (5.3 µg STX eq./kg b.w.)	< 260 µg STX eq./person (< 4.3 µg STX eq./kg b.w.)	0.5 µg STX eq./kg b.w.	30 µg STX eq./person	75 µg STX eq./kg SM	0.09
DA	20 mg DA/kg SM	8 mg DA/person (130 µg DA/kg b.w.)	1 mg DA/person (17 µg DA/kg b.w.)	30 µg DA/kg b.w.	1.8 mg DA/person	4.5 mg DA/kg SM	0.23

SM: shellfish meat; eq.: equivalents; b.w.: body weight; ARfD: acute reference dose. DA is considered as the sum of DA and epi-domoic acid (epi-DA) (domoic acid C5'-diastereomer); PSP: paralytic shellfish poison; EU: European Union; IT: Italy; NO: Norway; OA: okadaic acid; PTX: pectenotoxin; YTX: yessotoxin; STX: saxitoxin; DA: domoic acid.

(a): For OA, dinophysistoxins and PTX current regulation specifies a combination, however the CONTAM Panel concluded that PTX should be considered separately.

(b): In the Commission Regulation (EC) No 853/2004 a limit value of 800 µg PSP/kg SM is given. In the EFSA opinion, the CONTAM Panel adopted this figure as being expressed as µg STX equivalents/kg SM.

(c): for a 60 kg person

(d): The CONTAM Panel assumed that AZA equivalent should refer to AZA1 equivalents

NB: Le seuil réglementaire pour les yessotoxines est passé de 1 mg à 3.75 mg d'équivalent YTX/kg chair de coquillage suite aux dernières recommandations EFSA (2009c).

II. Méthodes de détection des phycotoxines lipophiles

Comme décrit dans les parties précédentes, il existe une grande variété de phycotoxines marines qui sont classées en différentes familles selon leur mode d'action ou leur structure moléculaire. De ce fait, différentes techniques peuvent être utilisées pour l'analyse des phycotoxines : les méthodes biologiques et biochimiques d'une part, et les méthodes physico-chimiques et immunologiques d'autre part.

Les **méthodes biologiques** et biochimiques sont généralement basées sur le mode d'action des toxines. Ces méthodes mettent à profit le fait que les congénères d'une même famille de phycotoxines ont un mode d'action identique. La réponse (qualitative ou quantitative) obtenue par ces méthodes correspond donc à une toxicité globale de l'échantillon testé. On distingue ainsi :

- Les **tests biologiques** : bio-essais sur animaux (test souris, test sur rat etc.)
- Les **tests biochimiques** : tests sur récepteurs spécifiques et test d'inhibition des protéines phosphatases (PP)

Les **méthodes physico-chimiques et immunologiques** sont, quant à elles, basées sur la structure moléculaire des toxines. Ces méthodes sont développées dans le but de repérer et/ou de quantifier les phycotoxines dans les produits marins, mais aussi d'identifier ces phycotoxines. Pour cela deux approches techniques peuvent être utilisées :

- L'**approche physico-chimique**, par des méthodes analytiques qui mettent à profit les caractéristiques physiques et chimiques de la molécule. Ces techniques sont capables d'identifier et de quantifier séparément les toxines appartenant à un même groupe. Généralement, la séparation se fait par chromatographie liquide (Liquid chromatography : LC) ou électrophorèse capillaire (Capillary Electrophoresis : CE), suivies par une détection et/ou une identification des toxines grâce aux détecteurs Ultra-Violet (UV), fluorimètre (FLD), électrochimiques ou spectromètres de masse (Mass Spectrometry : MS).
- L'**approche immunologique** qui utilise la reconnaissance d'anticorps vis-à-vis de la molécule. On distingue ainsi les méthodes de radio-immunologie, le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ou encore les tests d'immunochromatographie.

Dans la suite de cette partie, seuls le bio-essai sur souris et l'analyse chimique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM) pour la détection des toxines lipophiles seront développés.

II.1. Le test souris pour l'analyse des toxines lipophiles

Le test souris (TS) a initialement été développé par Yasumoto *et al.* (Yasumoto et al., 1978). Brièvement, il consiste en l'extraction à l'acétone de chair fraîche (ou d'hépatopancréas-HP) de mollusques. L'extrait acétonique ainsi obtenu est évaporé et reconstitué dans une solution aqueuse de détergent (Tween à 1%). Un millilitre de l'extrait est par la suite injecté par voie intra-péritonéale (IP) à une souris. Ce test requiert un minimum de trois souris et, la toxicité de l'extrait est déterminée par l'observation du temps de survie des souris. Le test est jugé positif si au minimum 2 souris sur 3 meurent dans un délai de 24 heures. Ce test a initialement été choisi comme méthode de référence. C'est un test relativement rapide, car la réponse est obtenue en moins de 24 h, et il est moins onéreux que les techniques analytiques (Combes, 2003; Hess et al., 2006). Cependant, le test souris est sujet à controverse pour plusieurs raisons :

Un problème d'éthique.

Comme mentionné précédemment, la mort des souris est le critère déterminant d'une contamination des échantillons testés. Cependant, cela constitue un manquement à la loi des trois R : *reduce, refine, replace* (réduire, améliorer, remplacer) applicable aux tests sur animaux vivants (Anonymous, 1986). Cette loi a été initialement introduite par (Balls et al., 1995) pour encadrer les expérimentations animales en laboratoire et propose de réduire le nombre d'animaux utilisés et de les remplacer par des techniques expérimentales minimisant la douleur, le stress et la souffrance infligés aux animaux. Le TS pose donc un problème d'éthique, étant donné qu'il induit souvent une souffrance importante des animaux, l'utilisation d'une anesthésie étant inenvisageable (Combes, 2003).

Un manque de sensibilité et de sélectivité.

Les limites de détection avoisinent en effet les seuils réglementaires (Campbell et al., 2011). Par exemple, entre 2003 et 2008, le test souris a conduit à 10% de résultats « faux négatifs » pour des échantillons dont les concentrations en AO étaient supérieures à la limite réglementaire de 160 µg/kg (Hess, 2010).

En termes de sélectivité, le test souris permet de détecter la toxicité globale de l'échantillon, sans qu'il soit possible d'identifier de manière formelle la, ou les toxines, responsables. Par ailleurs le TS ne permet pas de distinguer entre les toxines réglementées et celles qui ne le sont pas. En l'occurrence, les imines cycliques, non réglementées en Europe, sont co-extraites avec AO, DTX et AZA. Elles peuvent de ce fait interférer avec le TS et donner lieu à une surestimation de la toxicité de l'échantillon. En outre, d'éventuels effets synergiques entre toxines sont aussi possibles (Hess et al., 2006).

Un protocole non-standardisé et non-validé.

Plusieurs protocoles adaptés à partir du protocole initialement mis en place par Yasumoto *et al.* peuvent être utilisés. En effet, les solvants d'extraction ne sont pas imposés, or la sensibilité et la sélectivité du test vis-à-vis des toxines est dépendante des solvants utilisés (EU.Commission, 2011). Par ailleurs, une ou plusieurs étapes de purification de l'extrait peuvent être appliquées pour éliminer d'éventuelles interférences. L'extraction à l'acétone est utilisée pour détecter AO, DTX, AZA, PTX et YTX ; des partages liquide/liquide avec un mélange diéthyléther/ eau ou dichlorométhane/eau peuvent être utilisés pour purifier l'extrait.

Une utilisation incertaine de témoins positifs et négatifs.

La mise en place routinière de contrôles positifs et négatifs, à intervalles réguliers, est indispensable lors de l'utilisation de bio-essais. Les témoins positifs et négatifs sont pratiqués à partir de coquillages provenant respectivement de zones contaminées ou de marchés (AFSSA, 2006). Cette définition des contrôles positifs et négatifs reste cependant insatisfaisante. En effet, la majorité des témoins positifs sont obtenus à partir de coquillages contaminés avec différentes concentrations en toxines, de manière à évaluer le processus d'extraction et d'injection intra-péritonéale. De la même manière, des contrôles négatifs devraient aussi être mis en place à partir de coquillages non contaminés ou du solvant d'injection (en l'occurrence la solution de Tween) (Combes, 2003).

Une interprétation des résultats fastidieuse.

D'une part, comme démontré par Suzuki *et al.*, (Suzuki and Watanabe, 2012), les résultats obtenus peuvent varier selon la souche de souris utilisée. En effet, la sensibilité à l'AO varierait d'une souche de souris à l'autre. Alors que la méthode japonaise préconise l'utilisation de mâles de souches ddY ou ICR de l'espèce *Mus musculus*, le laboratoire communautaire de référence préconise plutôt l'utilisation de mâles de souche CD1 de la même espèce.

D'autre part, des faux-négatifs et des faux-positifs peuvent être observés. Un faux-négatif est observé quand le résultat du TS est négatif alors que l'analyse chimique révèle la présence de toxines à une concentration supérieure au seuil sanitaire. Un faux-positif quant à lui est observé quand un résultat positif est obtenu avec le TS souris, mais que l'analyse chimique ne permet pas d'identifier la (les) toxine(s) responsable(s) de la mort des souris et/ou les toxines sont identifiées, mais à des seuils inférieurs aux seuils sanitaires.

Un protocole non-validé.

Compte tenu des éléments qui précèdent, aucun des protocoles du test souris n'a fait l'objet d'une validation par le biais d'essais inter-laboratoires (FAO/IOC/WHO, 2005; Hess et al., 2006). De plus, compte tenu du manque d'harmonisation des protocoles et de l'hétérogénéité entre les souches de souris utilisées, il subsiste donc un vrai problème quant à l'interprétation des résultats du test souris.

Malgré ces inconvénients, le TS présente cependant quelques avantages. Il permet potentiellement de détecter aussi bien des toxines connues qu'inconnues, rendant ainsi compte de la toxicité globale de l'échantillon. Par ailleurs il a jusque-là prouvé son efficacité pour protéger les consommateurs d'intoxications par des coquillages contaminés (AFSSA, 2006), et une variante pour les toxines hydrophiles a été validée selon l'AOAC (International, 1995) et reste la méthode de référence pour les toxines paralysantes (Commission Regulation (EC) 2074/2005)(Anonymous, 2005).

II.2. L'analyse chimique pour les toxines lipophiles

La nécessité de s'affranchir de l'hégémonie du test souris pour la détection des toxines marines lipophiles, pour des raisons éthiques et techniques (Campbell et al., 2011), ainsi que l'augmentation de l'apparition et de la distribution des épisodes toxiques (Hallegraeff, 2010), ont joué un rôle certain dans le développement de nouvelles alternatives pour la détection des toxines algales. Par ailleurs, la description de nouveaux groupes de toxines (palytoxines, ciguatoxines etc...), dont les propriétés physico-chimiques sont différentes des toxines testées avec le test souris, ainsi que les nouvelles avancées technologiques ont joué un rôle important dans la décision de proposer de nouvelles techniques de détection. Les méthodes analytiques telles que la LC-MS, la LC-FLD, la RMN ou la chromatographie gazeuse (Gas Chromatography : GC) couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) ont été développées et permettent la détection et/ou l'identification structurale des toxines. L'analyse des toxines par LC-FLD et GC-MS est rarement un choix approprié. En effet, la LC-FLD permet difficilement la quantification simultanée des toxines et de leurs analogues, compte tenu des variations en intensités de fluorescence. Par ailleurs, compte tenu de la non-volatilité des toxines et des composés présents dans la matrice, la CG-SM est aussi difficilement applicable. Enfin, les toxines ne possédant pas de groupements chromophores ne pourront pas être analysées LC-UV. En conséquence, l'analyse chimique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse a progressivement remplacé le test souris dans plusieurs pays. Cette méthode a par la suite été adoptée comme méthode de référence pour l'analyse des toxines lipophiles par l'Union Européenne (EU.Commission, 2011).

II.2.1. Le couplage LC-MS

Le couplage LC-MS est un outil analytique qui permet l'analyse simultanée de plusieurs composés présents dans un échantillon donné. Cette technique, utilisée depuis quelques années déjà pour la détection de toxines de microalgues, a connu quelques améliorations avec comme point culminant la validation de la méthode permettant l'analyse des toxines lipophiles (Christian and Luckas, 2008; McNabb et al., 2005; Van den Top et al., 2011; Villar-Gonzalez et al., 2011). Comme mentionné précédemment, l'analyse par LC-MS est devenue très récemment la méthode de référence pour l'analyse de l'AO et de ses dérivés, des azaspiracides, des yessotoxines et des pectenotoxines dans plusieurs pays européens (EU.Commission, 2011). Les publications récentes utilisant la spectrométrie de masse couplée

à la LC ont, par la suite, eu pour but le développement de méthodes multi-toxines permettant l'augmentation du nombre de toxines détectées, mais aussi l'ajout de nouveaux groupes de toxines et l'amélioration des méthodes préexistantes (Blay et al., 2011; Brana-Magdalena et al., 2014; Domenech et al., 2014; Garcia-Altares et al., 2013; Orellana et al., 2014; Wu et al., 2014).

II.2.2. La chromatographie en phase liquide

En chromatographie en phase liquide, les phases stationnaires les plus communément utilisées pour séparer les toxines sont à polarité de phase inversée, et sont le plus souvent composées de silice greffée avec des groupements alkyle en C₁₈ (McNabb et al., 2005; Wu et al., 2014) ou en C₈ (Fux et al., 2009; Garcia-Altares et al., 2014; Stobo et al., 2005). Ces colonnes ont pour avantages principaux leur stabilité, leur faible temps d'équilibrage, et leur compatibilité avec des phases mobiles variées. Les principales interactions mises en jeu entre les analytes et la phase stationnaire constituée de silice greffée alkyle sont du type liaisons de Van Der Waals, compte tenu de la présence de groupements alkyles, auxquelles s'ajoutent des liaisons hydrogènes, de par la présence de groupements silanols « libres » et de cations métalliques présents sur la silice (il faut noter que ces dernières interactions, de nature polaire, ne sont pas forcément recherchées avec ce type de phase stationnaire). Par ailleurs la « résistance stérique à l'insertion des molécules entre les greffons » et les interactions électrostatiques entre des composés basiques et les silanols dissociés de la silice permettent d'expliquer des différences de sélectivité entre des phases stationnaires de nature quasi-équivalente. Compte tenu de la nature apolaire de la phase stationnaire, ces phases sont adaptées pour l'analyse des toxines lipophiles et les molécules seront donc éluées dans l'ordre inverse de leur polarité. Les changements récents dans la réglementation ayant focalisé l'attention des chercheurs sur les toxines lipophiles (EU.Commission, 2011), plusieurs groupes de recherche ont travaillé sur les conditions chromatographiques influençant leur détection par LC-MS.

La séparation des toxines lipophiles en chromatographie en phase inverse peut être obtenue sous différentes conditions de pH, tampons et phases mobiles. Les conditions les plus utilisées sont, d'une part les conditions utilisant des phases mobiles acides initialement proposées par Quilliam et al. (2001) puis améliorées plus tard par McNabb et al. (2005), et d'autre part celles utilisant des phases mobiles basiques proposées par Gerssen et al. (2009b).

Des phases mobiles à pH voisin de la neutralité ont aussi été proposées mais sont beaucoup moins utilisées (Garcia-Altare et al., 2013; Gerssen et al., 2009b; McCarron et al., 2011; Stobo et al., 2005). Ces deux approches analytiques (conditions acides et basiques) ont plus tard été validées lors d'essais inter-laboratoires (EU-RL-MB, 2011; These et al., 2011; Van den Top et al., 2011).

II.2.3. La spectrométrie de masse

Le spectromètre de masse est un détecteur incontournable pour l'analyse des phycotoxines, compte tenu de sa spécificité, de sa sensibilité et de sa rapidité. Comme son nom l'indique, la détection en spectrométrie de masse repose sur la mesure du rapport masse/charge (m/z) des ions générés à partir d'une molécule: où m est la masse de l'ion et z le nombre de charges portées par ce dernier. La première étape en spectrométrie de masse consiste en la formation d'ions gazeux à partir des molécules à analyser. Ces ions sont ensuite transférés dans un analyseur, pour être séparés selon leur rapport m/z , puis seront finalement détectés dans un détecteur.

Les composés sont ionisés après passage dans la source d'ionisation. Parmi les techniques d'ionisation utilisables pour les toxines on dénombre : l'ionisation par *electrospray* (Electrospray Ionisation : ESI), *l'ionisation chimique à pression atmosphérique* (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation : APCI), *la photo-ionisation à pression atmosphérique* (Atmospheric Pressure Photo-Ionisation : APPI) (Pardo et al., 2007), la *désorption-ionisation laser assistée par matrice* (Matrix Assisted Laser Desorption : MALDI) et *l'ionisation par bombardement d'atomes neutres* (Fast Atom Bombardment : FAB) (Vilarino et al., 2013). Seuls les deux premiers modes d'ionisation seront décrits par la suite, car ils représentent les principaux modes d'ionisation pour l'analyse des toxines de micro-algues par LC-MS.

II.2.3.a. L'ionisation par electrospray : ESI

Initialement développée pour l'analyse des protéines par Fenn, en 1984, l'utilisation de l'électrospray s'est toutefois rapidement étendue à l'analyse de petites molécules ($m/z > 1000$ Da). A pression atmosphérique, un fort champ électrique est appliqué à un liquide traversant un capillaire (débits de l'ordre de 0,2 à 0,6 mL/min), ce qui permet l'ionisation. Le champ électrique entre le capillaire et une contre-électrode permet la formation d'ions chargés

positivement ou négativement selon la polarité de la tension appliquée. Un gaz de nébulisation favorise la formation d'un spray de gouttelettes multichargées : cône de Taylor, contenant les analytes d'intérêt et le solvant. Le gaz de désolvatation permet l'évaporation du solvant, provoquant une augmentation de la densité de charge à la surface des gouttelettes produites. Lorsque cette densité de charge atteint une certaine limite (la limite de Rayleigh), les forces de répulsion entre les charges deviennent plus fortes que les forces de cohésion du liquide, provoquant une explosion coulombienne. Ce phénomène d'évaporation-fission se répète jusqu'au transfert des substances ionisées en phase gazeuse. Les ions sont ensuite transmis et focalisés par un système optique vers l'analyseur de masse (Figure I-12).

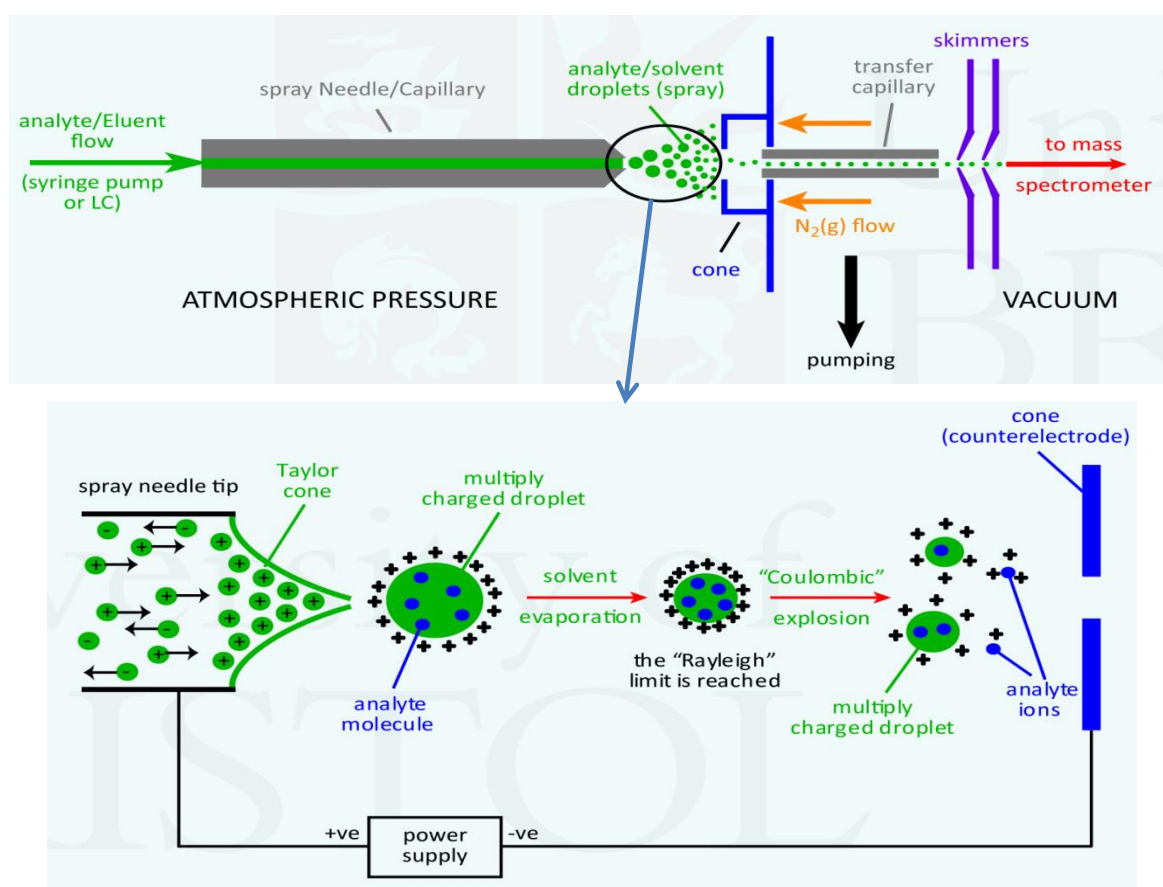


Figure I-12 : Principe de l'ionisation par électrospray (Gates, 2014)

L'électrospray permet donc l'ionisation et le transfert en phase gazeuse des espèces neutres, ou chargées, présentes dans l'échantillon. Les ions sont formés, soit par oxydation/réduction à partir de réactions à l'intérieur des gouttelettes, soit à partir de transferts de protons en phase gazeuse entre les ions libérés des gouttelettes (Henriksen et al., 2005). Cela conduit *in fine* à la formation d'ions $[M+H]^+$ en mode positif et $[M-H]^-$ en mode

négatif dans le cas de l'analyse de petites molécules, mais aussi à la formation d'espèces multichargées ($[M+nH]^{n+}$ ou $[M-nH]^{n-}$) dans le cas de macromolécules. La formation d'adduits (exemple : adduits sodium $[M+Na]^+$, potassium $[M+K]^+$, ammonium $[M+NH_4]^+$ en mode positif) est aussi régulièrement observée et peut aider à l'ionisation de certains composés manquant de sites ionisables (Cech and Enke, 2001). C'est en l'occurrence le cas de la pectenotoxine 2 (PTX2) pour laquelle les adduits observables sont l'adduit ammonium en ESI^+ et l'adduit formiate en ESI^- (Gerssen et al., 2008; Suzuki et al., 1998).

II.2.3.b. L'ionisation chimique à pression atmosphérique: APCI

L'ionisation par APCI met en jeu des réactions ion-molécule en phase gazeuse à pression atmosphérique. Contrairement à l'ionisation ESI, le mécanisme d'ionisation s'effectue via une décharge corona (décharge électrique lumineuse de 2 à 3 μA) dans l'enceinte de la source. Brièvement, le flux liquide issu de la chaîne HPLC est converti en un fin aérosol à l'aide d'un jet d'air ou d'azote (N_2) à haute vitesse : le gaz de nébulisation. Le flux gazeux entraîne ensuite les gouttelettes vers la chambre de désolvatation/vaporisation (chauffée, à des températures comprises entre 350 et 500°C), puis dans la région de réaction de la source qui se trouve à pression atmosphérique et où aura lieu l'ionisation. Selon le gaz de nébulisation utilisé différentes réactions vont avoir lieu. D'une façon générale, la phase mobile vaporisée joue le rôle de gaz ionisant, les ions réactifs étant produits à partir de l'effet de la décharge corona sur le solvant nébulisé. Cette décharge corona permet la formation de radicaux primaires (tels que N_2^{*+} ou N_4^{*+}). Ces radicaux primaires vont ensuite réagir avec les molécules du solvant vaporisé pour former des ions secondaires du gaz réactif. Finalement, la collision entre ce plasma d'ions et les molécules d'intérêt va conduire à leur ionisation (De.Hoffmann and Stroobant, 1999). La Figure I-13 schématise le processus complet mis en jeu. Ce type d'ionisation est principalement employé pour des composés polaires et ioniques possédant un poids moléculaire inférieur à 1500 Da. Les ions formés sont généralement similaires à ceux obtenus en ESI.

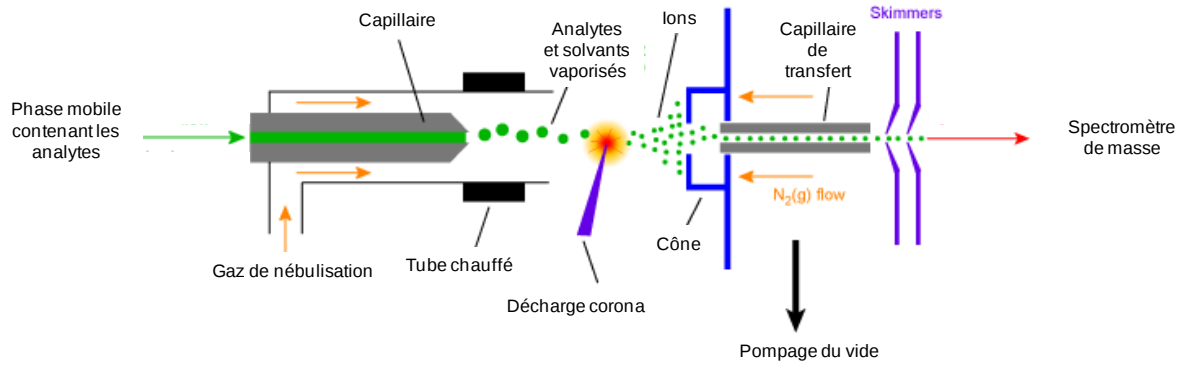


Figure I-13: Principe de l'ionisation APCI (Gates, 2014)

L'ESI et l'APCI sont deux techniques d'ionisation complémentaires. Généralement, les composés acides, basiques ou ioniques sont analysés en ESI tandis que l'APCI est plus adaptée aux composés peu polaires et non thermostables. L'electrospray est néanmoins la technique d'ionisation la plus communément utilisée, car plus douce pour les phycotoxines.

Après ionisation, les ions formés sont transférés vers l'analyseur de masse qui va les séparer, selon leur valeur de m/z , avant leur détection. Les caractéristiques d'un analyseur vont dépendre de :

- sa **gamme de masse** : qui détermine les valeurs limites du rapport m/z
- sa **précision** dans la mesure de la masse : elle détermine la justesse des rapports m/z mesurés, c'est-à-dire la concordance entre la masse mesurée et la masse théorique de l'ion (en ppm : partie par million)
- sa **résolution (R)**, c'est à dire sa capacité à différencier des ions de m/z voisins. Elle se détermine en effectuant le rapport de la masse m sur la largeur à mi-hauteur du maximum δm (FWHM : Full Width Half-height Maximum),
- sa **vitesse de balayage** : le temps mis par le spectromètre pour analyser l'ensemble de la gamme de masse (exprimée en $u.s^{-1}$ ou $u.ms^{-1}$)
- sa **transmission** : le rapport entre le nombre d'ions arrivant au détecteur et le nombre d'ions introduits dans l'analyseur

Les analyseurs utilisés pour les toxines marines incluent le triple-quadrupôle (QqQ ou TSQ : triple stage quadrupole), la trappe d'ions (IT : ion trap), le temps-de-vol (ToF : time of flight), la trappe orbitale (Orbitrap™) et des analyseurs hybrides de type quadrupôle-temps de vol (Q-ToF : quadrupole-time of flight) ou quadrupôle-trappe d'ions.

II.2.3.c. L'analyseur quadripolaire et le triple-quadripôle (OqO)

Dans ce type d'analyseur, les espèces ionisées générées dans la source et arrivant dans le quadripôle sont soumises à un champ électrique oscillant. Ce dernier résulte de l'application de tensions alternatives et continues sur quatre barres métalliques (de section circulaire ou hyperbolique), disposées en vis-à-vis deux à deux. Sous l'effet du champ électrique, la trajectoire sinusoïdale prise par les ions dépendra, d'une part, de la valeur des tensions entre les barres et, d'autre part, du rapport m/z des ions. Le choix des valeurs de tension va donc permettre de sélectionner les ions d'un rapport m/z donné qui seront transmis jusqu'au détecteur, et d'écarter les ions de rapport m/z non sélectionné. Ce type d'analyseur couvre généralement une gamme de masse allant jusqu'à 4000 Da, avec une résolution unitaire (séparation de M et $M+1$). Le quadripôle est donc un analyseur de masse à basse résolution, c'est-à-dire qu'il permet de mesurer la masse nominale des composés.

Trois quadripôles peuvent être montés en série pour former un triple-quadripôle (Figure I-14). Dans le premier (Q1) et le dernier quadripôle (Q3) les ions sélectionnés sont filtrés en fonction de leur rapport m/z . Le second quadripôle (Q2) sert, quant à lui, généralement de cellule de collision, dans laquelle la fragmentation s'effectue par l'introduction d'un gaz inerte qui entre en collision avec les ions. L'énergie est ainsi transférée à l'ion, en convertissant une partie de l'énergie cinétique en énergie interne et permettant ainsi sa fragmentation.

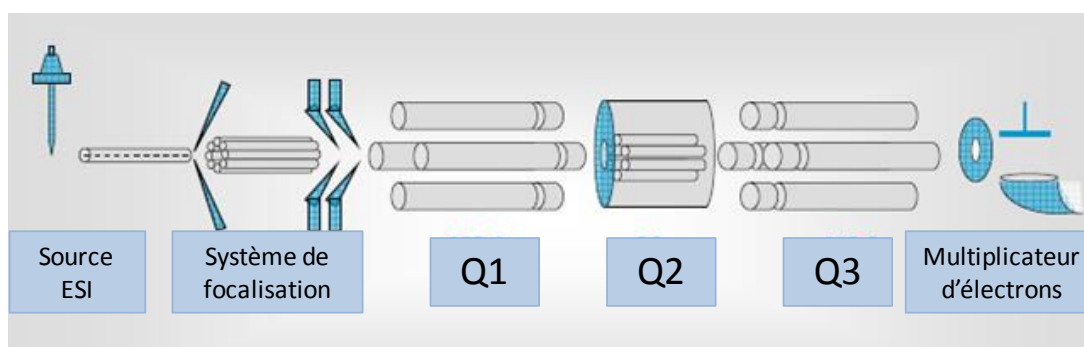


Figure I-14: Représentation schématique d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle

Le triple quadripôle permet différents modes d'acquisition :

- Le mode « **Product ion scan** » ou balayage des ions produits : l'ion précurseur est sélectionné dans le Q1, fragmenté dans le Q2 et les ions produits sont détectés en Q3.
- Le mode « **Precursor ion scan** » ou balayage des ions précurseurs. Un balayage en Q1 permet de détecter tous les ions précurseurs qui en se fragmentant aboutissent à un ion produit particulier qui est sélectionné en Q3.
- Le mode « **Neutral loss** » ou balayage de neutre : un balayage simultané en Q1 et Q3 avec une différence de masse donnée permet de rechercher les composés qui, en se fragmentant, perdent des groupements chimiques spécifiques sous forme de fragments neutres, comme par exemple H₂O pour les alcools.
- Le mode « **SRM ou MRM : Selected ou Multiple Reaction Monitoring** » ou suivi de réactions multiples : un ion précurseur donné est sélectionné dans le Q1, fragmenté dans le Q2, puis on sélectionne un ou plusieurs ions fragments en Q3. Cette réaction de filiation entre les ions est communément nommée transition.
- Le mode « **SIM : Selected Ion Monitoring** » ou suivi d'un ion : un ion de rapport m/z donné est suivi tout au long de l'acquisition. Ce mode d'acquisition n'est pas uniquement spécifique de l'analyseur de type triple quadripôle et peut aussi être effectué avec un analyseur quadripolaire

II.2.3.d. La trappe d'ions linéaire (LIT)

La structure d'une trappe d'ions linéaire ressemble à celle d'un quadripôle fermé par des électrodes d'entrée et de sortie. Une tension continue de même signe (positif ou négatif) est appliquée au niveau des électrodes et permet de piéger les ions entre les barres du quadripôle. Plus la tension appliquée est importante et plus les ions seront comprimés au centre du piège. Suite à l'application d'une tension sur les barres du quadripôle, les ions réalisent donc des va-et-vient suivant l'axe z entre les électrodes terminales et, simultanément, oscillent dans le plan xy. L'éjection des ions se fait, par la suite, soit de manière axiale, selon l'axe z, soit de manière radiale, au travers des fentes creusées dans deux barres opposées du quadripôle, sur lesquelles est appliquée une tension alternative adaptée (Figure I-15). L'éjection des ions selon l'axe z permet le couplage de la trappe d'ion linéaire avec d'autres types d'analyseurs. C'est le cas dans les analyseurs hybrides de types quadripôle-trappe d'ion

(Q-Trap) par exemple. Les appareils utilisant le mode d'éjection radiale autorisent quant à eux les expériences de fragmentation à n étapes comme la MS^n .

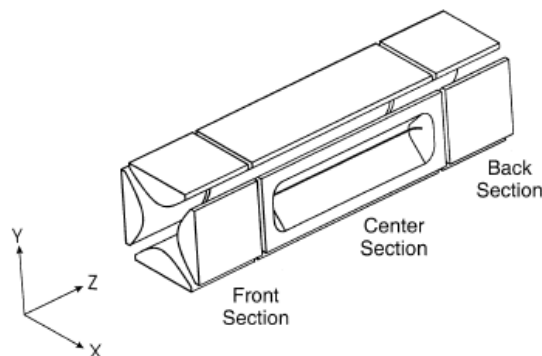


Figure I-15: Représentation schématique d'une trappe d'ions linéaire (Schwartz and Senko, 2004)

Les appareils dotés d'analyseurs de type triple quadripôle ou d'hybrides quadripôle-trappe d'ions permettent l'acquisition en mode SRM décrite précédemment. Ce mode d'acquisition est le plus utilisé pour l'analyse quantitative des toxines lipophiles, car il permet d'atteindre des limites de détection et de quantification très faibles. Par ailleurs, pour chacune des molécules recherchées, un minimum de deux signaux diagnostiques (transitions MRM), caractéristiques des différentes molécules analysées, sont en général suivis, assurant un niveau de confiance suffisant quant à l'identification non ambiguë des analytes.

II.2.3.e. Le quadripôle-temps de vol (Q-ToF)

Ce type d'analyseur hybride combine les spécificités du triple quadripôle (précédemment décrit) à celui du temps de vol (Figure I-16). L'analyseur à temps de vol sépare les ions en fonction de leur vitesse de déplacement dans une région dépourvue de champ : le tube de vol. Les ions sont accélérés par un champ électrique donné, et acquièrent ainsi une énergie cinétique qui sera la même pour les ions de même charge électrique. La vitesse des ions et, de ce fait, le temps mis par une particule chargée pour atteindre le détecteur, dépendra du rapport m/z . Les particules avec les masses les plus faibles seront celles accélérées aux vitesses les plus grandes.

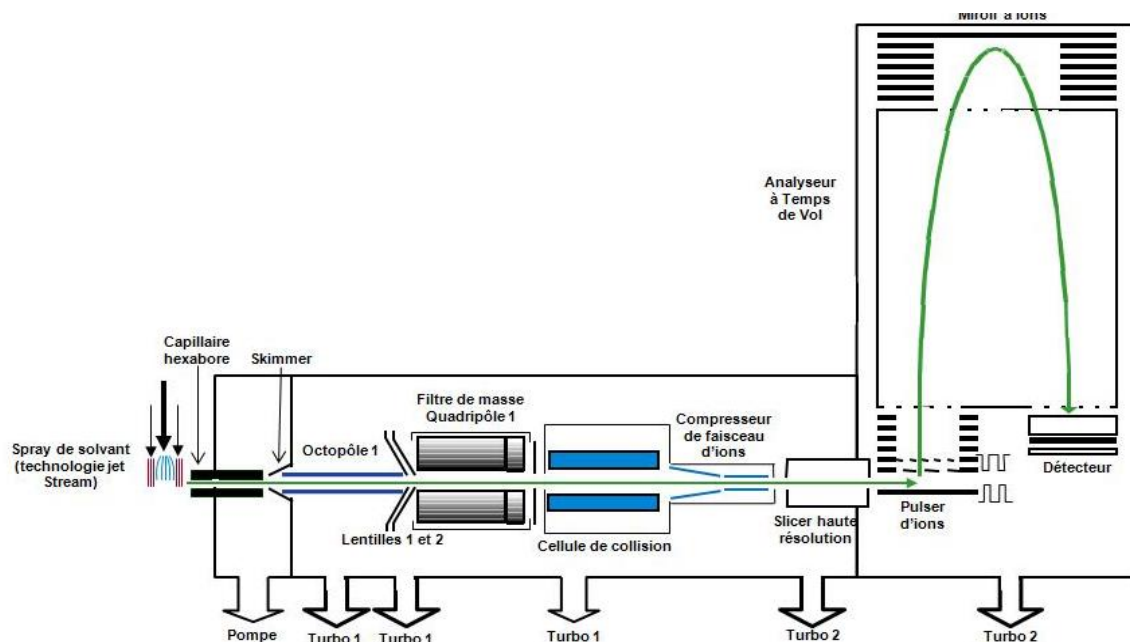


Figure I-16 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle temps de vol (ici le QToF 6540 : Agilent)

II.2.3.f. La trappe orbitale (Orbitrap™)

Commercialisé pour la première fois en 2006, l'Orbitrap™ est constitué de deux électrodes dont la première, extérieure, a la forme d'un tonneau séparé en deux parties égales par un espace étroit. La seconde, centrale, possède quant à elle une forme de fuseau. Les ions possédant une énergie cinétique de quelques keV sont injectés tangentielllement dans l'Orbitrap™ par l'orifice de l'électrode extérieure. Sous l'effet de tensions continues, et de la géométrie de la source, ces ions gravitent autour de l'électrode centrale en effectuant des oscillations autour de l'axe z (Figure I-17).

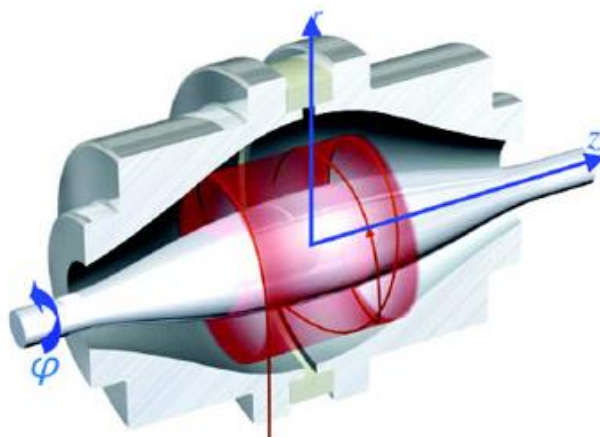


Figure I-17: Représentation de la trappe orbitale avec en rouge la trajectoire des ions. (Makarov and Muenster, 2006)

Les ions oscillent à une fréquence inversement proportionnelle à leur rapport masse sur charge (m/z), et génèrent un courant électrique qui sera amplifié et converti en signal grâce à une transformée de Fourier. La technologie Orbitrap™ est celle utilisée dans le spectromètre de masse Exactive (ThermoScientific) (Figure I-18) qui sera utilisé par la suite dans notre étude (chapitre 2).

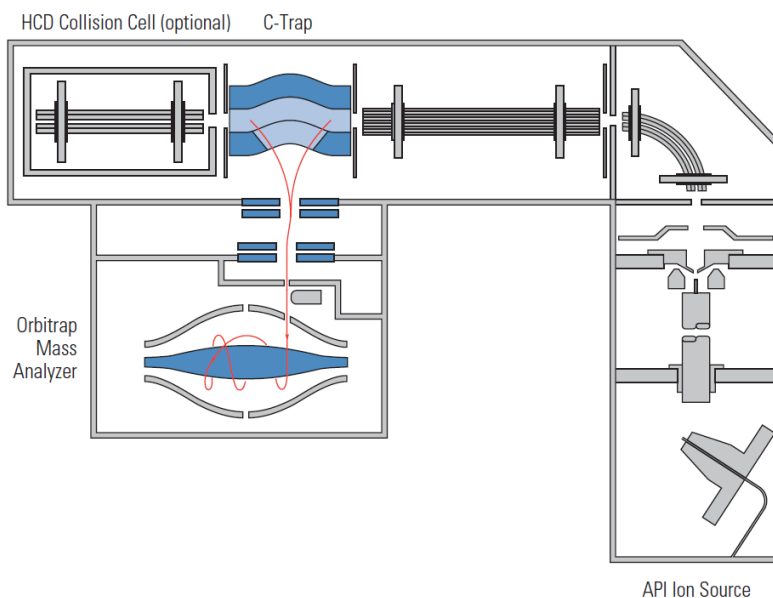


Figure I-18: Représentation schématique d'un spectromètre de masse utilisant l'analyseur orbitrap (ici l'Exactive: ThermoScientific)

Les deux derniers analyseurs décrits (ToF et Orbitrap) peuvent être utilisés comme éléments constitutifs de spectromètres de masse dits à haute-résolution (SMHR ou high

resolution mass spectrometer : HRMS). En effet, contrairement aux spectromètres de masse à basse-résolution (SMBR ou low resolution mass spectrometer : LRMS) pour lesquels la résolution R est inférieure à 5000, les SMHR ont des résolutions pouvant aller jusqu'à 150000. Par ailleurs, ces appareils à haute résolution offrent des options supplémentaires en termes de mode d'acquisition. C'est le cas du mode « *All-ions fragmentation : AIF* » ou fragmentation de tous les ions. Dans ce mode d'acquisition, contrairement au mode SRM où seuls les ions sélectionnés sont fragmentés, tous les ions précurseurs sont fragmentés (Geiger et al., 2010; Law and Lim, 2013). On obtient ainsi, en plus du spectre full-scan, un pseudo-spectre MS/MS, mais avec une meilleure précision en masse que celle qu'on peut obtenir en mode SRM.

Le tableau I-3 compare quelques spectromètres de masse haute résolution qui ont été utilisés pour l'analyse des toxines marine lipophiles (Blay et al., 2011; Garcia-Altares et al., 2014; Jauffrais et al., 2012a).

Tableau I-3: Caractéristiques de quelques spectromètres de masse haute résolution utilisés pour l'analyse des toxines marine lipophiles

	LTQ-Orbitrap	Exactive	Q-ToF 6540	Q-ToF 6550
Fournisseur	Thermoscientific	Thermoscientifique	Agilent	Agilent
Gamme de masse	m/z 50 - 2000, m/z 200 - 4000	m/z 50 - 4000	m/z 20 - 10000	m/z 20 - 10000
Résolution(FWHM)	100000 m/z 400	100000 m/z 200	40000 m/z 1000	40000 m/z 1000
Précision de masse	< 5ppm	< 5ppm	< 3ppm	< 1 ppm
Sensibilité	femtogramme	femtogramme	femtogramme	femtogramme
Vitesse de balayage	Selon la gamme de masse de travail	10 spectres/seconde	20 spectres/seconde	50 spectres/seconde
Acquisition	Full scan et MS ⁿ (n=1 à 10)	Full scan, "All ions", target MS/MS (MS ²)	Full scan, "All ions", target MS/MS (MS ²)	Full scan, "All ions", target MS/MS (MS ²)

La HRMS est donc un outil additionnel intéressant pour l'étude des toxines marines car elle permet :

- le criblage d'un nombre important d'ions précurseurs, en mode full scan
- une grande sélectivité, grâce à son pouvoir résolutif élevé et à sa précision en masse
- l'obtention d'informations utiles pour l'identification de composés présents en faibles concentrations (profils isotopiques, spectres de fragmentation)
- la possibilité d'une analyse et d'un retraitement rétrospectifs des données pour la recherche « d'inconnus »

Nombreuses sont les études ayant utilisé avec succès la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse basse résolution pour l'analyse et la quantification de toxines lipophiles (Christian and Luckas, 2008; Fux et al., 2007; McCarron et al., 2014; Quilliam, 2001; These et al., 2009; Wu et al., 2014). L'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution pour l'analyse des toxines lipophiles est quant à elle beaucoup plus récente (Blay et al., 2011; Brana-Magdalena et al., 2014; Domenech et al., 2014; Orellana et al., 2014). Pour les toxines lipophiles, les méthodes d'analyses basées sur la CL-SM semblent être les plus appropriées pour remplacer le test souris. En effet, ces techniques ne posent pas de problème éthique, sont plus spécifiques (identification de chaque toxine) et sensibles que le test souris (EFSA, 2009b). Par ailleurs, elles ne nécessitent qu'une faible quantité d'échantillon (quelques microlitres) et peuvent être utilisées pour l'analyse routinière d'un grand nombre d'échantillons.

L'utilisation des méthodes LC-MS représente cependant un investissement important, compte tenu du coût des appareils et de la nécessité d'employer un personnel qualifié. Par ailleurs, les méthodes doivent être validées, afin de garantir la justesse et la précision des résultats. Les effets matrices, liés à la complexité des échantillons analysés et donc à la présence de composés perturbant l'ionisation des composés d'intérêt, représentent un des inconvénients des méthodes LC-MS, en particulier en ionisation electrospray (Gosetti et al., 2010; King et al., 2000). Diverses méthodologies peuvent, et ont été, mises en place pour s'affranchir des effets matrices lors de l'analyse des toxines. Cela inclut la purification des échantillons, par extraction sur phase solide (SPE : solid phase extraction) (Gerssen et al., 2009a), l'utilisation de courbes d'étalonnage de standards dans la matrice (Fux et al., 2008b; Kilcoyne and Fux, 2010), la réduction du volume injecté (McCarron et al., 2014). Comme

autre alternative pour s'affranchir des effets matrices, on peut aussi citer l'utilisation de standards internes (King et al., 2000). Une autre limitation des méthodes LC-MS pour l'analyse des toxines est le manque de disponibilité de standards et de matériaux de référence certifiés. A l'heure actuelle pour chaque groupe de toxines, seule une minorité de standards certifiés est disponible. Pour pallier à ce manque, une solution temporaire est l'estimation de la concentration des analogues d'un groupe de toxines à partir du standard certifié d'un autre analogue (EU-RL-MB, 2011). Cette approche, qui n'est pas idéale, est cependant acceptée si les facteurs de réponse relatifs (rapport entre les réponses de deux composés) des analogues sont connus. La disponibilité de standards de toxines serait donc d'une grande aide pour l'amélioration des données analytiques. Enfin, les méthodes par LC-MS permettent de déterminer la concentration en toxines dans les échantillons mais, contrairement au test souris, ne permettent pas une estimation directe de la toxicité de l'échantillon.

II.3. Les toxicités atypiques

En 2005, dans le Bassin d'Arcachon, des tests de toxicité aigüe sur souris, réalisés à partir d'échantillons de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, ont été jugés positifs et ont donné lieu à une interdiction de la vente de ces huitres. La mort des souris a été initialement corrélée à la présence de dinoflagellés toxiques (du genre *Dinophysis*) dans l'eau, et d'AO dans les hépatopancréas d'huîtres. Cependant, ces épisodes toxiques ont par la suite été caractérisés d'épisodes de « toxicité atypique », ou de « toxicité d'origine inconnue ». La toxicité atypique a ensuite été décrite comme « un épisode de contamination des coquillages, révélé à travers une réponse toxique chez la souris en injection intra-péritonéale, dont l'origine ne peut pas être expliquée par la présence de toxines connues habituellement recherchées ». Ce premier épisode toxique s'est répété dans les années suivantes dans le Bassin d'Arcachon (Ledreux et al., 2012). En effet, plusieurs bio-essais positifs n'étaient pas concordants avec les observations de phytoplancton toxique ou les résultats obtenus par l'analyse chimique par LC-MS, avec des concentrations en toxines inférieures aux seuils réglementaires (Belin et al., 2009; Roussary et al., 2015).

De la même manière, d'autres épisodes de toxicité atypique d'origine pas nécessairement identique, ont également été recensés en France, en Méditerranée (Hess et al., 2013), mais aussi en Espagne (Chapela et al., 2008), en Irlande ou en Norvège (Hess et al., 2009) et même

en Tunisie (Marrouchi et al., 2013). Ces épisodes de toxicité atypique peuvent être dus à des toxines émergentes (telles que décrites précédemment). Ces phénomènes de toxicité atypique attirent l'attention sur le fait que, malgré que la FAO/IOC/WHO ait recommandé les méthodes analytiques pour certaines toxines, il reste néanmoins un vide potentiel pour ce qui est de l'analyse des toxines émergentes. Par exemple, très récemment, un premier cas d'intoxication par la tétrodotoxine, toxine non réglementée en Espagne, a été observé en Espagne (Vlamiš et al., 2015). Compte tenu de la perspective de remplacer le test souris par des méthodes de chimie analytique, il serait donc judicieux d'inclure les toxines identifiées comme émergentes dans la réglementation. Cependant, il est difficile de prévoir d'avance quelles toxines émergeront en tant que risque pour la santé humaine dans une région donnée.

II.4. Résumé

Différentes techniques peuvent être utilisées pour l'analyse des toxines lipophiles. Parmi elles, on distingue les tests biologiques sur animaux, dont le test souris pour les toxines lipophiles (TS), et les méthodes d'analyse physico-chimique, par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Le *test souris pour les toxines lipophiles*, utilisé depuis plusieurs décennies, permet de détecter la toxicité globale d'un échantillon. Il n'est cependant pas possible d'identifier de manière formelle la ou les toxines responsables de la mort des souris, car ce test n'est pas spécifique. De plus, ce test manque de sensibilité, compte tenu de ses limites de détection, avoisinant les seuils réglementaires, et pose un problème d'éthique, compte tenu de la souffrance infligée aux animaux utilisés. Ces inconvénients font partie des raisons ayant conduit à l'adoption, en 2011, de l'analyse chimique par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) comme méthode de référence pour les toxines lipophiles. Le test souris pour l'analyse des toxines paralysantes reste néanmoins la méthode de référence, car il est rapide, semi-quantitatif, validé et sujet à peu d'interférences.

En comparaison au test souris, l'analyse par *chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse* (LC-MS) est plus spécifique (identification de chaque toxine), plus sensible et ne pose pas de problèmes d'éthique. Les appareils de spectrométrie de masse peuvent utiliser des techniques d'ionisation ou de détection différentes. La technique d'ionisation la plus couramment utilisée lors de l'analyse de toxines lipophiles est cependant

l'ionisation par électrospray. Les spectromètres de masses couramment utilisés pour l'analyse des toxines sont des spectromètres basse résolution de type triple quadripôle. Plusieurs méthodes d'analyse des toxines lipophiles par LC-MS basse résolution ont été validées, à la suite d'essais inter-laboratoires. Bien que des nouveaux développements technologiques soient apparus dans le domaine de la spectrométrie de masse, l'utilisation de la haute résolution reste, quant à elle, plus récente et représente un investissement important compte tenu du coût des appareils.

Les méthodes par LC-MS permettent certes de déterminer la concentration en toxines dans des échantillons mais, contrairement au test souris, ne permettent pas une estimation directe de la toxicité de l'échantillon. C'est la raison pour laquelle depuis que ces techniques sont utilisées, en parallèle au test souris, des toxicités atypiques ont été observées. Ces toxicités ont été caractérisées d'atypiques à cause de la discordance entre les résultats obtenus par le test souris et par l'analyse LC-MS. En effet, sur un même échantillon, le test souris, conçu pour la détection des toxines lipophiles, peut donner des résultats positifs (mort d'au moins 2 souris sur 3) alors que l'analyse par LC-MS ne détecte aucune toxine connue ou, détecte des toxines mais à des niveaux inférieurs aux seuils réglementaires.

Dans un contexte de changement climatique, couplé à un accroissement du transport des eaux de ballast par les bateaux, ainsi que des mollusques bivalves vivants d'un parc de culture à un autre, il s'avère donc nécessaire de s'intéresser aux toxicités atypiques. Dans cette optique, il convient d'étudier la faisabilité d'approches méthodologiques complémentaires, se basant sur l'échantillonnage passif (présenté dans la section suivante), éventuellement couplé à la spectrométrie de masse haute résolution (dernière section de l'état de l'art), pour détecter d'éventuelles toxines émergentes dans les écosystèmes côtiers français.

III. Echantillonnage passif

L'échantillonnage passif a été défini en 2002 comme étant : « toute technique d'échantillonnage basée sur la libre circulation des molécules du milieu échantillonné vers le milieu de collecte. Cette libre circulation est le résultat d'une différence de potentiel chimique entre les deux milieux » (Gorecki and Namiesnik, 2002). Selon les domaines d'application et les molécules ciblées, il existe différents échantillonneurs. Nous ne développerons dans cette partie que ceux appliqués aux analyses environnementales, et plus particulièrement en milieu aquatique.

III.1. Les différents modèles d'échantillonneurs passifs

Il existe différents types d'échantillonneurs passifs, selon les propriétés physico-chimiques des molécules à capter. Parmi les modèles commerciaux généralement utilisés pour capter les molécules organiques hydrophobes, on peut citer : les membranes SPMD (Semi-Permeable Membrane Devices) et PDMS (polydiméthylsiloxane). Les échantillonneurs de types POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) sont, quant à eux, utilisés pour capter les molécules organiques plutôt polaires. Enfin, les échantillonneurs de type SPATT (Solid Phase Adsorption Toxin Tracking), plus récents, sont majoritairement utilisés pour capter les toxines de microalgues. Les membranes SPMD et PDMS, ainsi que les POCIS, sont principalement utilisés pour capter les contaminants chimiques environnementaux.

III.1.1. Les échantillonneurs pour molécules hydrophobes :

membranes SPMD et PDMS

Les échantillonneurs passifs SPMD (Figure I-19), constitués de membranes semi-perméables, ont montré leur capacité à accumuler les contaminants organiques lipophiles présents dans la colonne d'eau. Ils sont constitués d'une membrane en polyéthylène de faible densité (LDPE : Low Density PolyEthylene membrane) qui renferme de la trioléine (1 mL), lipide apolaire de haut poids moléculaire que l'on retrouve dans plusieurs organismes aquatiques et qui est utilisé ici pour capter les composés d'intérêt.

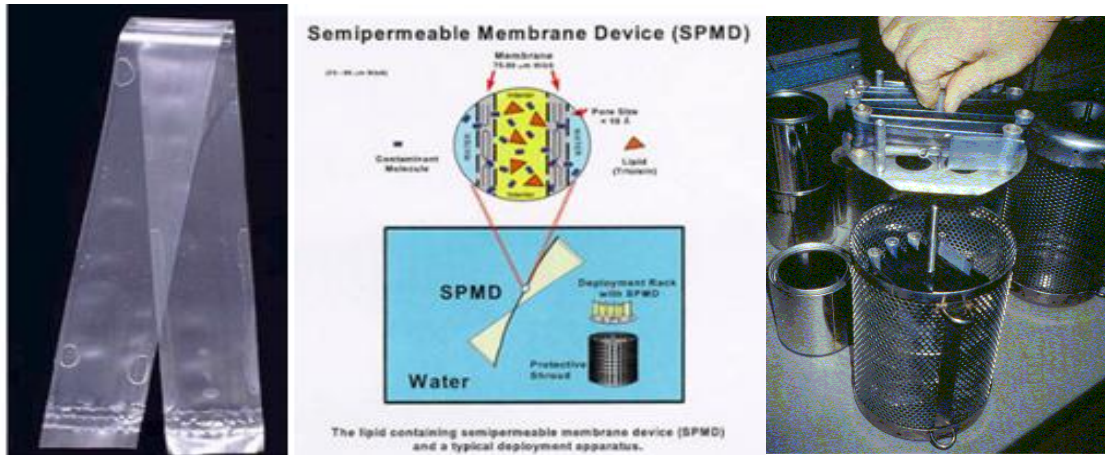


Figure I-19 : Echantillonneur SPMD et dispositif de déploiement (Huckins. et al., 2002).

La membrane en polyéthylène a le même comportement qu'une membrane biologique car elle permet la diffusion sélective de contaminants hydrophobes (Huckins et al., 1993; Huckins et al., 1990).

Les membranes en polydiméthylsiloxanes (PDMS), ou silicones, peuvent, de la même manière que les membranes LDPE, être utilisées pour l'échantillonnage passif comme l'ont montré Shea et al. (2006). En effet, la comparaison de la capacité des membranes LDPE et PDMS à adsorber de manière passive les brevétotoxines a montré que les PDMS fixent de manière prépondérante les brevetotoxines de haut poids moléculaires (~900 Da) par comparaison avec les membranes LDPE. Par ailleurs, elles sont plus adaptées aux expositions de longues durées (comme c'est le cas pour l'échantillonnage passif) car elles peuvent être exposées sur une durée pouvant aller jusqu'à deux semaines et saturent moins vite que les membranes LDPE. De plus, la trioléine utilisée dans l'échantillonneur SPMD est trop sélective, ce qui rend difficile son utilisation pour capter des phycotoxines de propriétés physico-chimiques différentes.

III.1.2. Les échantillonneurs pour molécules polaires : POCIS

Un autre modèle d'échantillonnage passif est le modèle POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler), conçu pour extraire et concentrer les contaminants organiques polaires (Alvarez et al., 2004; Harman et al., 2009; Kaserzon et al., 2012). Il est constitué d'une membrane microporeuse en polyéthersulfone, enveloppant différents absorbants ou mélanges d'adsorbants (Figure I-20).

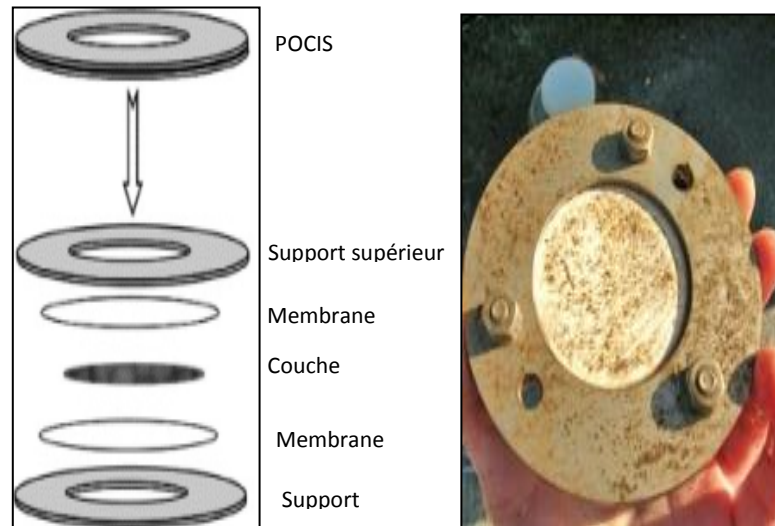


Figure I-20: Echantillonneur POCIS (Miege et al., 2012).

De manière générale, l'échantillonneur POCIS, contenant un mélange triphasique composé d'un mélange de résine modifiée de polystyrène-divinylbenzène (Isolute ENV⁺) et d'un adsorbant carboné (Ambersorb 1500) déposé sur un copolymère d'exclusion stérique, du styrène divinyl benzène (S-X3 Bio-Beads) est utilisé pour capter les pesticides (Harman et al., 2009). En revanche, l'échantillonneur le plus couramment utilisé pour les composés pharmaceutiques est lui basé sur l'utilisation d'un adsorbant de polarité mixte, l'Oasis HLB (Alvarez et al., 2004). Ce dernier a été un des premiers adsorbants utilisés dans les échantillonneurs POCIS et plusieurs études ont montré sa capacité à déterminer, de manière quantitative, les concentrations de résidus de produits pharmaceutiques dans les environnements aquatiques (Comerton et al., 2009; Miege et al., 2012). A ce jour, aucune étude n'a encore été réalisée sur des échantillonneurs POCIS pour le captage de toxines d'algues présentes dans l'environnement. Cependant, des échantillonneurs POCIS ont été développés et utilisés pour détecter des microcystines produites par des cyanobactéries d'eau douce (Kohoutek et al., 2008).

III.1.3. Les SPATTs

Le principe utilisé dans les capteurs SPATT est similaire à celui des techniques décrites précédemment pour capter les contaminants environnementaux. La technique SPATT est néanmoins plus récente. En effet, les scientifiques Néo-zélandais MacKenzie et al. (2004) ont

été les premiers à comprendre l'intérêt de pouvoir détecter les toxines dissoutes dans l'eau de mer lors de phénomènes d'efflorescence, et à créer une technique basée sur l'adsorption passive des toxines sur une résine synthétique. Ils ont nommé cette technique SPATT (Solid Phase Adsorption Toxin Tracking). Les SPATTs peuvent se présenter sous forme de sachets ou de disques contenant une phase absorbante (Figure I-21).

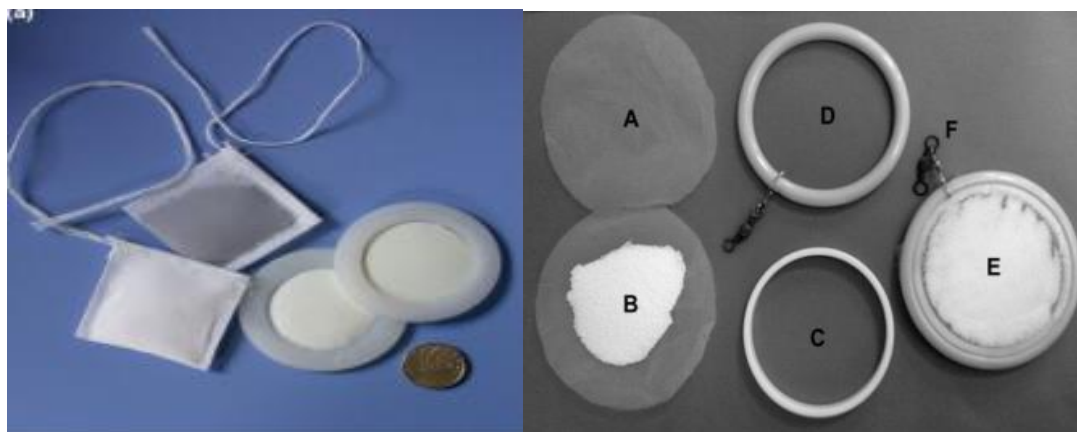


Figure I-21 : Échantillonneurs SPATTs : sachets et disques (MacKenzie, 2010; Rundberget et al., 2009)

Plusieurs adsorbants ont été utilisés pour l'échantillonnage passif dans le monde pour l'adsorption de toxines de microalgues ou de cyanobactéries. C'est le cas des résines de type HP-20 ou SEPABEADS (Fux et al., 2008a; Li et al., 2011; Pizarro et al., 2013; Zhao et al., 2013). Dans les échantillonneurs SPMD, la trioléine est utilisée comme agent sélectif d'une catégorie de molécules (apolaires principalement). Cependant elle est trop sélective, ce qui réduit sa capacité à capter des phycotoxines de propriétés différentes. Ce n'est pas le cas des échantillonneurs SPATT, pour lesquels différents adsorbants peuvent être utilisés, selon le groupe de phycotoxines ciblé. De ce fait, plusieurs composés de polarité et d'hydrophobicité différentes peuvent être adsorbés sur des échantillonneurs SPATT (MacKenzie et al., 2004). Par ailleurs, un autre avantage des SPATTs est que la maille utilisée pour la fabrication des SPATTs ne freine pas le transfert des molécules vers l'adsorbant, à l'inverse de la membrane semi-perméable des modèles SPMD ou POCIS, qui elle peut retenir ou freiner la migration des toxines.

III.2. Utilisation des SPATT pour capter les phycotoxines

III.2.1. SPATT et toxines hydrophiles

La plupart des études publiées rapportent l'utilisation d'échantillonneurs SPATT dans des essais laboratoires et/ou terrain pour la détection de toxines lipophiles dans l'eau. En revanche, les études portant sur la détection de toxines plus polaires telles que les STXs et autres toxines paralysantes (PSTs), ou sur la neurotoxine AD (acide domoïque) sont rares, bien que les dinoflagellés du genre *Alexandrium*, producteurs de PSTs (Lefebvre et al., 2008), et les diatomées du genre *Pseudo-Nitzschia* soient connus pour libérer, lors d'efflorescences, des toxines solubles dans le milieu marin.

En 2008, (Turrell et al., 2008) rapportent l'utilisation de polymères à empreinte moléculaire pour extraire les toxines paralysantes (STX et neoSTX) de l'eau de mer dans des expériences en laboratoire. Les meilleurs résultats d'absorption de PSP ont été obtenus avec le polymère à base d'éthylène glycol méthacrylate phosphate (EGMP, avec des rendements d'extraction de 97% et 92% pour neoSTX et STX respectivement. Malgré les promesses suscitées par cette étude, la faisabilité de ce type de protocole dans l'environnement marin reste à démontrer et requiert des compétences très spécifiques.

Dans le cadre du projet SPIES-DETOX (Solid Phase In Situ Ecosystem Sampler), la résine hydrophobe SEPABEADS SP700, initialement utilisée dans les échantillonneurs SPATT pour l'accumulation de toxines lipophiles, a été testée pour l'adsorption de l'acide domoïque dans des conditions de laboratoire (Lacaze, 2012). Malgré de très bons rendements d'adsorption de l'AD (90% de l'AD dopé après sept jours d'exposition), seuls 5% de l'acide domoïque ont pu être récupérés de la résine. Le protocole utilisé, une fois appliqué sur le terrain, a cependant montré sa capacité à détecter des variations de concentrations en AD libéré par le phytoplancton pendant des épisodes d'efflorescence. En effet, les résultats obtenus avec les SPATT déployés concordaient avec ceux des moules analysées, avec un profil de contamination identique.

Plus récemment, l'utilisation de SPATT pour la détection de l'AD dans l'eau de mer a été évaluée, à la fois en laboratoire et sur le terrain (déploiement sur la côte de Monterey Bay, Californie, USA) (Lane et al., 2010). Les résines DIAON HP20, SEPABEADS SP700, SP207 et SP207SS ont été testées en laboratoire, montrant qu'il est plus aisé de récupérer l'AD à partir de la résine HP-20 que des résines de type SEPABEADS. La résine HP-20 a donc été conservée pour les essais en mer, en parallèle avec des prélèvements de moules et d'échantillons d'eau de mer. Ces essais ont montré que les concentrations en PSP relevées

dans les SPATT contenant la résine HP-20, extraits et analysés par test ELISA reflétaient la présence d'*Alexandrium catenella* et les niveaux de toxines retrouvés dans les moules. Au cours de ces études la résine HP-20 a montré des caractéristiques similaires à celles des moules c.à.d. une accumulation relativement lente (19% en 7 jours) de l'AD et une désorption relativement rapide. Cette résine s'avère donc utile pour capter à la fois pour les toxines lipophiles et hydrophiles. Cependant, les essais en laboratoire montrent la présence de l'AD dans les eaux de rinçage du SPATT, obligeant à considérer l'étape de rinçage comme une étape d'extraction (et donc à analyser l'eau de rinçage) pour ne pas sous-estimer les taux d'AD captés.

III.2.2. SPATT et toxines lipophiles

Dans les travaux de Fux et al. (2008a), les résines HP-20, SP 850, SP 825L, XAD-4 et L-493 ont été utilisées dans des échantillonneurs passifs afin d'évaluer leur applicabilité pour capter des toxines lipophiles. Ces résines ont été exposées à des cultures de *P. lima* (microalgue benthique) pendant des durées allant de 12 h à 72 h. Les résines HP-20, SP-850, et SP-825 ont montré un profil d'absorption similaire pour AO. Compte tenu d'une taille de pores plus grande, la cinétique d'absorption des toxines sur la résine HP-20 s'est avérée plus lente que sur les autres résines. Le volume interne par lequel les toxines doivent passer étant plus élevé, le temps pour atteindre l'état d'équilibre est plus long. Cependant, sur une durée d'exposition de 72 h, la quantité de toxines absorbées sur HP-20 reste supérieure à celle absorbée par les autres résines. C'est donc la résine HP-20 qui a été utilisée pour les études terrain. Les résultats obtenus ont montré que les profils de désorption à partir de SPATT déployés en mer étaient comparables à ceux obtenus pour les SPATT immergés dans un milieu de culture de *P. lima* en laboratoire. La résine HP20 a par la suite été utilisée dans la majorité des études ayant pour but de capter les phycotoxines lipophiles (Li et al., 2010; McCarthy et al., 2014; Pizarro et al., 2013; Pizarro et al., 2008).

III.2.3. SPATT et toxines d'algues benthiques ou épiphytes

Contrairement aux microalgues pélagiques qui se développent dans la colonne d'eau, les microalgues benthiques et épiphytes se développent accrochées à un support (sédiment, filières de moules ou macroalgues). Ainsi, elles sont moins accessibles à l'échantillonnage par prélèvement de la colonne d'eau par exemple. Un des moyens de détecter la présence de ces

microalgues est donc de pouvoir capter les toxines qu'elles produisent et qui sont libérées dans l'eau de mer. Parmi les microalgues dites benthiques ou épiphytes on dénombre entre autre *Vulcanodinium rugosum* (*V. rugosom*) (Nezan and Chomerat, 2011), *Prorocentrum lima* (*P. lima*) (Faust, 1990), *Gambierdiscus* et *Ostreopsis ovata* (*O. ovata*) (Besada et al., 1982).

L'immersion d'échantillonneurs passifs, à base de résine HP-20, dans des cultures de *Gambierdiscus* a permis de capter les ciguatoxines (CTXs) et les maïtotoxines (MTXs) (Caillaud et al., 2011) produites par cet organisme. Dans des conditions de laboratoire, avec une eau de mer dopée à 100 ng de CTX1B par litre, les rendements d'extraction obtenus à partir de SPATTs avoisinaient les 91%, contre 66% pour la MTX. L'efficacité de cette résine dans des conditions environnementales reste en revanche à démontrer. Dans l'étude de MacKenzie et al. (2011), dont le but était de capter les toxines produites par les dinoflagellés benthiques, des SPATT ont été déployés en Nouvelle Zélande dans un environnement de type mangrove. En parallèle, des échantillons d'huîtres ont été récoltés aux alentours des zones de déploiement des SPATT, de même que des échantillons de zostères et d'eau. Des pinnatoxines E et F (PnTX-E, F), de l'acide okadaïque (OA) et des traces d'autres toxines (13-desmethyl-spirolide-C, PnTX-A, G, D, PTX2, DTX1) ont été détectés dans tous les SPATTs déployés. L'AO étant le composé majoritairement détecté, suivi de la PnTX-E. Les zostères récoltés et analysés ont permis d'estimer des populations de *P. lima* et *V. rugosum* à 4600 et 5700 cellules/cm² de feuille respectivement. Des populations de dinoflagellés (*P. lima* et autres *Prorocentrum*) ont par ailleurs été retrouvées en grande quantité dans les échantillons d'eau récoltés, *P. lima* étant moins présent que les autres organismes. Cette étude a été l'une des premières études terrain montrant la possibilité de capter les phycotoxines produites par des microalgues benthiques, même si elles sont présentes en faible abondance dans la colonne d'eau, tous les échantillons analysés ayant montré une prévalence de PnTX-E et F. La même année, en Norvège, une étude similaire a confirmé la possibilité des capter des toxines de microalgues benthiques grâce au déploiement de SPATTs (Rundberget et al., 2011). Les échantillonneurs passifs déployés ont permis la détection de PnTX-G et d'autres imines cycliques (13-desmethylspirolide C et 13,19-desmethyl-spirolide-C) produites par *Alexandrium ostenfeldii*.

III.3. Résumé

En résumé, plusieurs dispositifs d'échantillonnage passif existent à l'heure actuelle. Les **membranes LDPE et PDMS** sont généralement utilisées pour le captage et l'accumulation de contaminants peu polaires et apolaires, tels que les hydrocarbures aromatiques polyinsaturés (HAP), les alkyl phénols (AP) et les polychlorobiphényles (PCBs), dans l'eau. Une seule application de ces membranes pour l'échantillonnage passif de phycotoxines (en l'occurrence les brevéttoxines) est connue à ce jour. Les **POCIS**, quant à eux, sont utilisés pour capter les contaminants environnementaux de type pesticides et résidus médicamenteux. Aucune application utilisant les POCIS pour l'échantillonnage passif des toxines marines n'est parue dans la littérature à ce jour. Par contre, ils ont déjà été utilisés pour l'échantillonnage de microcystines qui sont des toxines produites par des cyanobactéries d'eau douce. A l'heure actuelle, les **SPATTs** sont les échantillonneurs passifs les plus utilisés pour le captage des phycotoxines. La comparaison des performances de SPATTs contenant différentes résines (HP-20, SP 850, 700, 207, etc.) pour leur capacité à capter les toxines de microalgues a fait l'objet de plusieurs études démontrant leur capacité à capter les toxines de microalgues, la résine HP-20 semblant la plus performante. Les microalgues benthiques et épiphytes vivent au fond de l'eau, accrochées à un support (sédiments ou macroalgues), ce qui soulève la question de la présence potentielle de leurs toxines dans la colonne d'eau. Contrairement aux toxines de microalgues pélagiques, peu d'études terrain (MacKenzie et al., 2011; Rundberget et al., 2011) ont montré la possibilité de capter les toxines produites par des microalgues benthiques et/ou épiphytes, comme *V. rugosum* et *P. lima* (microalgues benthiques et épiphytes). Cependant, les études de MacKenzie et Rundberget permettent d'envisager la possibilité de capter des toxines d'autres microalgues benthiques telles que *O. ovata* ou *Gambierdiscus*. Pour finir, la phase Oasis HLB couramment utilisée dans les capteurs POCIS devrait être testée pour capter les phycotoxines.

IV. Application de la LC-HRMS à l'analyse environnementale

La tendance actuelle en chimie analytique est le développement de méthodes LC-MS permettant l'analyse simultanée de plusieurs composés en une seule injection, tout en réduisant les coûts et le temps d'analyse. Les concentrations de contaminants organiques et de toxines retrouvées dans l'environnement pouvant être très faibles, de même la complexité des matrices analysées (présence de plusieurs composés connus et inconnus), rendent nécessaire l'utilisation de méthodes d'analyses très sensibles et sélectives. La plupart des méthodes développées en analyse environnementale utilisent la LC-MS/MS, et plus particulièrement les analyseurs de type triple quadripôles (Hernandez et al., 2014; Petrovic et al., 2010) ou quadripôle-trappe ionique. Malgré leur sensibilité et sélectivité, les méthodes LC-MS/MS deviennent rapidement limitées dans le cadre de méthodes d'analyse d'un grand nombre de molécules de propriétés variées. En effet, en mode SRM, le temps d'acquisition de chaque transition restreint le nombre de composés pouvant être analysés en une injection. Avec les dernières générations de triple quadripôle, le nombre de transitions pouvant être suivies pendant une acquisition a sensiblement augmenté. Cette augmentation n'est cependant pas encore suffisante pour permettre l'analyse de milliers de composés potentiellement présents dans les échantillons avec ce type d'analyseur. De plus, ces analyseurs, dont la résolution en masse est unitaire, sont peu sensibles en mode « full-scan » (cas de triples quadripôles), ce qui limite leur capacité de détection de composés inconnus (Krauss et al., 2010).

Depuis quelques années, des développements importants dans le domaine des analyseurs dits à haute-résolution ont permis d'améliorer les méthodes analytiques appliquées à l'analyse environnementale. Les spectromètres HRMS permettent l'obtention des données de grande qualité, car ils permettent l'acquisition des spectres de masse avec un pouvoir résolutif et une précision en masse élevée. Compte tenu de leur capacité de réaliser des acquisitions en mode full-scan, il est donc théoriquement possible de détecter tous les composés ionisables d'un échantillon. De plus, les instruments hybrides tels que le quadripôle- temps de vol (Q-ToF) et la trappe linéaire-orbitrap (LTQ-Orbitrap) offrent des informations supplémentaires en termes de confirmation et/ou d'élucidation structurale (Hernandez et al., 2012), de part la possibilité de coupler des fragmentations d'ions à l'acquisition avec une précision en masse très élevée.

L'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution pour l'analyse environnementale peut se faire selon différentes approches analytiques : l'analyse ciblée quantitative, le criblage des composés « suspects » et le criblage non-ciblé des composés inconnus (Krauss et al., 2010).

IV.1. L'analyse ciblée quantitative

L'identification et la quantification des polluants et des toxines, présents en faibles concentrations dans des échantillons environnementaux, requiert des méthodes à la fois hautement sensibles et sélectives vis-à-vis des analytes cibles, et discriminantes par rapport aux composés présents dans la matrice. L'analyse ciblée par HRMS offre des solutions à certaines limitations rencontrées avec les spectromètres de masse basse résolution. En effet, la manière la plus rapide pour effectuer un criblage qualitatif et quantitatif d'un grand nombre de composés est l'utilisation de bases de données contenant les analytes d'intérêt (Krauss et al., 2010). Dans cette approche, la masse théorique exacte des analytes est extraite des données du spectre full-scan. Cela va permettre de reconstruire un chromatogramme de l'ion extrait sur la base de la masse exacte précise, montrant l'analyte présent dans l'échantillon sous forme d'un pic chromatographique. La précision en masse est une donnée critique pour l'identification des molécules cibles à partir des bases de données. Généralement, une tolérance d'erreur de mesure de masse inférieure à 5 ppm est rapportée dans plusieurs études utilisant les nouveaux appareils HRMS disponibles (Hernandez et al., 2014). La confirmation de l'identité des composés dans cette approche peut alors être réalisée grâce à l'utilisation de standards. Les temps de rétention, profils de fragmentation et profils isotopiques de ces derniers, sont des critères additionnels de confirmation/validation de l'identité des composés cibles dans les échantillons. Dans le domaine environnemental plusieurs études ont utilisé cette approche pour l'analyse ciblée de composés pharmaceutiques (Ferrer and Thurman, 2012; Marchese et al., 2003; Martinez Bueno et al., 2007), micropolluants (Wode et al., 2012). Mais les études dans le domaine des toxines de microalgues sont plus rares et plus récentes (Blay et al., 2011; Domenech et al., 2014; Orellana et al., 2014).

IV.2. Le criblage des composés « suspects » connus

Le terme « suspects » ici ne désigne pas nécessairement des composés nouveaux mais peut être utilisé pour des composés qui n'étaient pas initialement recherchés lors de l'analyse. Il peut s'agir de composés connus comme pouvant potentiellement être présents dans les échantillons (produits de dégradation et/ou de métabolisation par exemple). Contrairement à l'analyse ciblée quantitative, le criblage de composés « suspects » n'est pas tributaire de l'utilisation de standards pour la quantification et la confirmation. Proportionnellement au nombre important de contaminants et de toxines algales pouvant potentiellement être présents

dans l'environnement, une minorité de standards est disponible à l'heure actuelle. Cependant, des informations spécifiques à chaque molécule existent, telles que la formule moléculaire et la formule développée. Ces informations peuvent être utilisées lors des processus de confirmation de l'identité des « suspects ». La formule moléculaire permet dans un premier temps de calculer le rapport m/z exact de l'ion moléculaire recherché. Ce dernier est par la suite extrait du spectre haute-résolution sous forme de chromatogramme. En ionisation electrospray, les ions majoritairement formés (à quelques exceptions près pour certaines molécules formant des adduits) sont le $[M+H]^+$ ou le $[M-H]^-$, ce qui facilite les tentatives d'identification (Krauss et al., 2010). Les fragments ou ions isotopiques caractéristiques sont par la suite évalués en comparant les spectres expérimentaux SM ou SM/SM, ou le fragment majoritaire avec ceux reportés dans la littérature (MassBank, Metlin *etc.*) (Diaz et al., 2012) ou en se rapportant à la théorie. Idéalement, la disponibilité du standard permettra *a-posteriori* une identification formelle (grâce aux profils isotopiques, temps de rétention et spectres de fragmentation). Cette approche de criblage des suspects peut aussi se faire grâce aux bases de données « maison » contenant une liste de composés spécifiques de chaque domaine d'étude (pesticides, composés pharmaceutiques, toxines marines, perturbateurs endocriniens *etc.*).

IV.3. Le criblage non-ciblé des inconnus

La possibilité d'acquérir des spectres full scan avec une bonne précision de masse en SMHR, permet d'envisager un criblage non-ciblé de composés présents dans les échantillons environnementaux. Contrairement au criblage des « suspects », le criblage non-ciblé des inconnus se fait sans aucun *a-priori* sur les composés à détecter. L'analyse non-ciblée d'échantillons environnementaux *via* la SMHR est un travail de longue haleine et l'identification formelle repose grandement sur la disponibilité de bases de données pour pouvoir trouver de potentiels candidats (« hits ») pour les composés inconnus (Ibanez et al., 2005). Les protocoles d'analyse non-ciblée comprennent généralement trois étapes (Krauss et al., 2010) :

- La détection automatisée des pics, après application d'un filtre selon la masse exacte, sur les données chromatographiques
- L'attribution d'une formule élémentaire à chaque masse exacte d'intérêt

- La recherche dans les bases de données de molécules ou de structure plausibles pour les formules élémentaires déterminées

Pour la détection automatisée des composés plusieurs logiciels utilisant des algorithmes différents sont disponibles et généralement fournis par les concepteurs de spectromètres de masse. La recherche de structures potentielles pour les formules élémentaires assignées, dans des bases contenant un grand nombre de données, fournit de nombreuses propositions (hits) qui doivent *à-posteriori* être confirmées par les données MS/MS. Cependant, les bases de données MS/MS disponibles ne contiennent généralement que des composés pour lesquels les standards sont disponibles, ce qui est insuffisant pour permettre une réelle analyse non-ciblée. Par ailleurs la comparabilité des spectres obtenus entre instruments, spécialement en ESI, pose un problème additionnel.

La HRMS permet donc de générer des candidats potentiels pour les molécules « suspectes » et inconnues, présentes en faibles concentrations dans les échantillons environnementaux. Cependant une identification non ambiguë des composés présents nécessite l'utilisation de techniques complémentaires d'élucidation structurale telle que la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Godejohann et al., 2009).

Pour permettre une analyse non-ciblée d'échantillons environnementaux contenant des milliers de pics dans un temps raisonnable, il est nécessaire d'utiliser des logiciels de retraitement performants permettant un retraitement en série et une recherche dans les bases de données automatisés. De nos jours, ce genre de logiciels intégrés dans les protocoles de retraitement est généralement disponible dans le domaine de la métabolomique, domaine qui est encore peu appliqué aux échantillons environnementaux.

IV.4. Approche métabolomique

IV.4.1. Généralités

Le terme *métabolome* désigne l'ensemble des métabolites présents dans un milieu biologique. Dans un contexte post-génomique, la métabolomique apparaît comme complémentaire aux approches de type génomique et protéomique pour l'élucidation des fonctions des gènes (Madalinski et al., 2008). Les métabolites sont caractérisés par une immense diversité, tant du point de vue structural, que des propriétés physicochimiques. C'est la raison pour laquelle il est virtuellement impossible de couvrir tout le métabolome par une méthode analytique unique.

De manière générale deux principales stratégies peuvent être utilisées pour étudier le métabolome (Figure I-22) : l'analyse ciblée et le profilage métabolique. L'**approche ciblée** consiste en l'analyse quantitative d'une classe de molécules caractéristiques d'une voie métabolique donnée ou d'intersections entre différentes voies métaboliques. Cette approche est très utile pour l'étude des effets primaires liés à une modification génétique, par exemple, et doit impérativement comprendre une étape d'identification et de quantification des métabolites dans l'échantillon. Le **profilage métabolique**, quant à lui, suppose l'analyse rapide, souvent qualitative, d'un grand nombre de métabolites différents, avec pour but d'identifier un profil métabolique spécifique caractérisant un échantillon ou un organisme donné. Dans cette approche on distingue le **fingerprinting**, d'une part, et le **footprinting**, d'autre part (Villas-Boas et al., 2005).

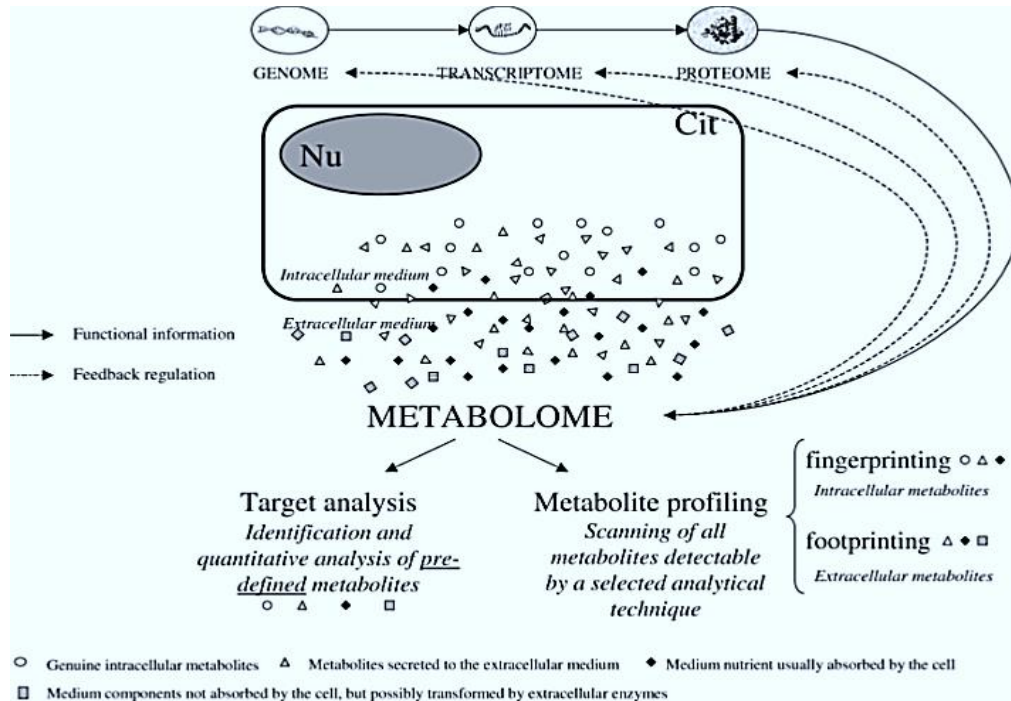


Figure I-22 : Différents aspects du métabolome (Villas-Boas et al., 2005)

L'empreinte métabolique de type **fingerprint** est le profil des métabolites intracellulaires. Elle est plus laborieuse à obtenir car la mesure de tous les métabolites intracellulaires nécessite des méthodes rapides d'arrêt de métabolisme (« quenching ») et une étape d'extraction et de séparation des métabolites d'intérêt de ceux du milieu de culture. L'empreinte métabolique de type **footprint** est une approche plus récente (Allen et al., 2003), techniquement similaire au fingerprinting mais focalisée sur le profil des métabolites extracellulaires présents dans le milieu de culture (c.-à-d. résultant de l'utilisation des

nutriments, des réactions biochimiques extracellulaires et des sécrétions de produits métaboliques par une population de cellules dans l'environnement dans lequel elles se multiplient). Cette empreinte est très spécifique des conditions environnementales et de la génétique des cellules et peut ainsi permettre de distinguer les différents états métaboliques des cellules, de différencier différentes espèces microbiennes et même différentes souches ou mutants de la même espèce (Sue et al., 2011).

En analyse métabolomique, après l'échantillonnage, les méthodes de préparation d'échantillon sont d'une grande importance. Elles se déclinent en une étape d'**arrêt du métabolisme** (quenching) suivie de l'**extraction des métabolites** et de leur **concentration**.

IV.4.1.a. Échantillonnage

Le prérequis pour une analyse métabolomique reflétant la réalité et permettant des conclusions sur le plan physiologique est une méthode d'échantillonnage rapide et reproductible. En mode fingerprint, une séparation sélective des métabolites intracellulaires et extracellulaires suppose la séparation des cellules du milieu de culture, de même qu'une élimination totale des métabolites extracellulaires et des résidus du milieu de culture en contact avec les cellules. La filtration rapide, la centrifugation et la méthode de quenching direct sont les méthodes d'échantillonnage communément décrites dans le domaine de la métabolomique cellulaire (Meyer et al., 2010). Etant donné que l'échantillonnage et la séparation doivent être rapides, la centrifugation, méthode plus longue à réaliser, semble moins avantageuse que l'utilisation de la filtration rapide.

IV.4.1.b. Quenching : arrêt du métabolisme

Un des principaux challenges, lors de développements analytiques pour quantifier les métabolites, est d'éviter des modifications non souhaitées de métabolites durant l'échantillonnage. De ce fait, stopper l'activité métabolique le plus vite possible, sans altérer la signature métabolique interne, est d'une grande importance. L'inactivation rapide du métabolisme est généralement obtenue par des changements rapides en température ou en pH. Les protocoles utilisés ne doivent pas entraîner une rupture de la paroi cellulaire, au risque de perdre une partie des métabolites. Selon les objectifs fixés on distingue deux stratégies:

- l'extraction et le quenching sont combinés en une seule et même étape, généralement quand les métabolites intra et extracellulaires sont analysés en même temps.

- le quenching est suivi d'une séparation de la biomasse du milieu extracellulaire et après une étape de lavage, les métabolites intracellulaires sont extraits.

Les méthodes de quenching les plus employées pour l'analyse métabolomique de cellules microbiennes incluent l'utilisation de solvants froids ou chauds (méthanol ou éthanol froids), l'azote liquide et des traitements acides (acide perchlorique) ou basiques. Même si le transfert direct de l'échantillon dans une solution de quenching est la méthode la plus rapide, elle peut avoir l'inconvénient de causer une perte des métabolites durant le processus (Bolten et al., 2007). De manière générale, la méthode de quenching utilisée doit être adaptée à l'organisme étudié. Les levures peuvent être considérées comme proches de *Chlamydomonas reinhardtii* (microalgue d'eau douce) en ce qui concerne la préparation d'échantillon car les deux sont des organismes eucaryotes avec des parois cellulaires solides, contrairement aux bactéries dont les parois cellulaires sont connues pour être facilement rompues par des méthodes physicochimiques. Le méthanol froid étant la méthode préférentiellement utilisée pour arrêter le métabolisme chez les levures, elle serait donc adaptée pour les microalgues. Néanmoins, même les méthodes les plus douces peuvent conduire à une perte en métabolites, suite à la fragilisation de la membrane cellulaire, rendant nécessaire l'utilisation de concentrations minimales en méthanol et des temps de centrifugation limités, de même que des méthodes alternatives telles que la filtration rapide (pour les bactéries).

IV.4.1.c. Extraction / concentration

Le choix du solvant d'extraction est très important car ce dernier ne doit pas dégrader chimiquement ou physiquement les métabolites, tout en extrayant le plus grand nombre de métabolites possible. Il n'existe aucun protocole d'extraction permettant l'extraction de tous les métabolites. Les métabolites intracellulaires sont généralement extraits à l'aide de solvants organiques polaires (méthanol, éthanol) ou apolaires (acétate d'éthyle, chloroforme, acétone) (Villas-Boas et al., 2005). Il est aussi possible de modifier la température du solvant utilisé pour améliorer l'extraction ou effectuer le quenching en même temps que l'extraction.

IV.4.1.d. Techniques analytiques

Du fait de la grande diversité structurale et physicochimique des métabolites, il est impossible, avec une seule méthode analytique, de couvrir tout l'ensemble du métabolome d'un organisme. De ce fait, plusieurs méthodes d'analyse métabolomique sont reportées dans la littérature : la spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier, la RMN et les techniques

de spectrométries de masse en injection directe ou couplées à de la chromatographie en phase gazeuse ou liquide (LC-MS ou GC-MS) ou à l'électrophorèse capillaire (CE-MS). De toutes ces techniques, la RMN et la spectrométrie de masse peuvent fournir, en plus des données chimiométriques, une information sur la structure des métabolites, comme décrit précédemment.

La GC-MS convient pour l'analyse de composés volatils et thermostables. Néanmoins relativement peu de métabolites satisfont à cette condition. Cependant la haute résolution et la reproductibilité de la séparation chromatographique qu'offrent les colonnes capillaires font de la CG/SM un bon outil pour l'analyse de mélanges complexes de métabolites.

La LC-MS peut être utilisée pour des analyses métabolomiques ciblées ou non ciblées et est plus appropriée que la LC-MS pour l'étude de métabolites très polaires qui sont peu volatils. Les chromatographies en phase normale et en phase inverse sont toutes deux utilisées en métabolomique, le mode phase inverse, utilisant des colonnes C₈ ou C₁₈, restant le plus répandu. La phase normale, quant à elle, permet d'avoir une vue complémentaire du métabolome. En termes d'ionisation, l'ionisation par électrospray (ESI) est idéale pour les composés polaires et semi-polaires alors que l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) convient plutôt pour les molécules les moins polaires (Lei et al., 2011). En ionisation par électrospray, l'information obtenue en mode ESI⁺ est souvent plus importante qu'en ESI⁻, probablement grâce à une plus grande efficacité d'ionisation par protonation (facilitée par l'addition d'un acide à la phase mobile), comparé à la déprotonation (favorisée par ajout de sel d'ammonium dans la phase mobile).

IV.4.2. Microalgues

Pendant de longues années, le profilage chimique des extraits d'algues marines s'est limité à l'identification et à la quantification de classes de composés intéressants d'un point de vue d'utilisation économique ou éco-physiologique de ces organismes. Les extraits aqueux étaient analysés particulièrement pour mesurer les composés issus du métabolisme du carbone tel que les sucres, polyalcools, polysaccharides de membranes cellulaires, par des techniques CG/SM, CLHP ou RMN (Goulitquer et al., 2012). Il n'existe qu'un nombre limité d'études récentes sur l'analyse métabolomique des microalgues basées sur des approches en spectrométrie de masse, et la plupart de ces études concernent les diatomées et ont été effectuées en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Le mode fingerprinting a été utilisé dans plusieurs études pour l'analyse du métabolome de différentes diatomées. Cette approche a été utilisée par Kluender et al. (2008) pour évaluer les effets phytotoxiques de la prométryne (herbicide) sur l'algue verte d'eau douce *Scenedesmus vacuolatus*. Ces auteurs ont montré que le profil métabolique de culture « contrôle » de *S. vacuolatus*, évalué sur sept temps différents, tout au long d'une courbe de croissance, sur 14 h, dépendait de l'état de croissance et des différences entre la culture dite de référence et celle exposée à l'herbicide. Par ailleurs, ils ont pu identifier 28 composés discriminants (interrogation de la base de données NIST). Le profilage métabolique de la diatomée benthique *Cocconeis scutellum* par GC-MS a été effectué sur des échantillons lyophilisés ayant été soumis à un quenching à l'acétone, puis extraits au diéthyldéther, suivi du butanol, permettant ainsi de séparer les extraits acétone en deux fractions, polaire et apolaire (Nappo et al., 2008). L'analyse des deux fractions, éther et butanol, a permis de détecter plus de 150 métabolites parmi lesquels 100 furent identifiés, montrant que les extraits analysés étaient dominés par la présence d'acides gras. Dans l'étude de (Vidoudez and Pohnert, 2011), le métabolome de la diatomée *Skeletonema marinoi* a été comparé dans des phases de croissance différentes. L'utilisation du protocole validé a permis, après analyse statistique (analyse en composantes principales : ACP), de montrer une différence de composition en métabolites intracellulaires entre les phases exponentielle, stationnaire et de sénescence. Sur les 191 métabolites détectés, 85 ont été jugés discriminants, en fonction de leur groupe d'appartenance (exponentielle, stationnaire, sénescence) et 29 ont été identifiés. Le même type d'analyse a été réalisé dans le cadre d'une approche footprint par Sue et al. (2011) pour suivre la contamination microbienne dans le processus de fermentation utilisant la diatomée *Nitzschia laevis*. Dans cette étude, l'analyse des métabolites extracellulaires a permis de détecter les différences entre le profil métabolique de cultures de diatomées en batch axénique et non-axénique, après l'introduction d'une contamination microbienne. Grâce au suivi des cultures, pendant les différentes étapes de croissance, un modèle de classification permettant de discriminer les échantillons contaminés des échantillons axéniques, avec une précision de 100% (0 faux positifs sur 60), a pu être construit, sur la base d'ions discriminants identifiés par analyse statistique des données recueillies.

Dans un milieu naturel, les métabolites algaux vont être disponibles dans la limite de leur stabilité dans ce milieu, dans notre cas le milieu marin. Il a été montré que les échantillonneurs passifs peuvent capter des métabolites algaux sans que ces derniers ne subissent des transformations enzymatiques, telles que celles pouvant se produire durant leur

accumulation dans la chaîne trophique (Pizarro et al., 2013). Les composés peuvent, néanmoins, subir d'autres transformations physico-chimiques telles que la dégradation par les UV, l'oxydation et d'autres réactions catalysées en milieu aqueux, en l'absence d'agents de quenching. Bien que dans le cadre de cette thèse nous ne nous sommes pas intéressés à la métabolomique en tant que tel (en termes de compréhension du fonctionnement biologique des espèces), il est important de comprendre ces concepts pour mieux appréhender les approches de suivi des métabolites algaux, développées par la suite.

IV.5. Résumé

L'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution, pour l'analyse environnementale, peut se faire selon différentes approches analytiques : *l'analyse ciblée quantitative*, le *criblage des composés « suspects »* et le *criblage non-ciblé des composés inconnus*. La figure I-23 résume ces trois approches, précédemment décrites.

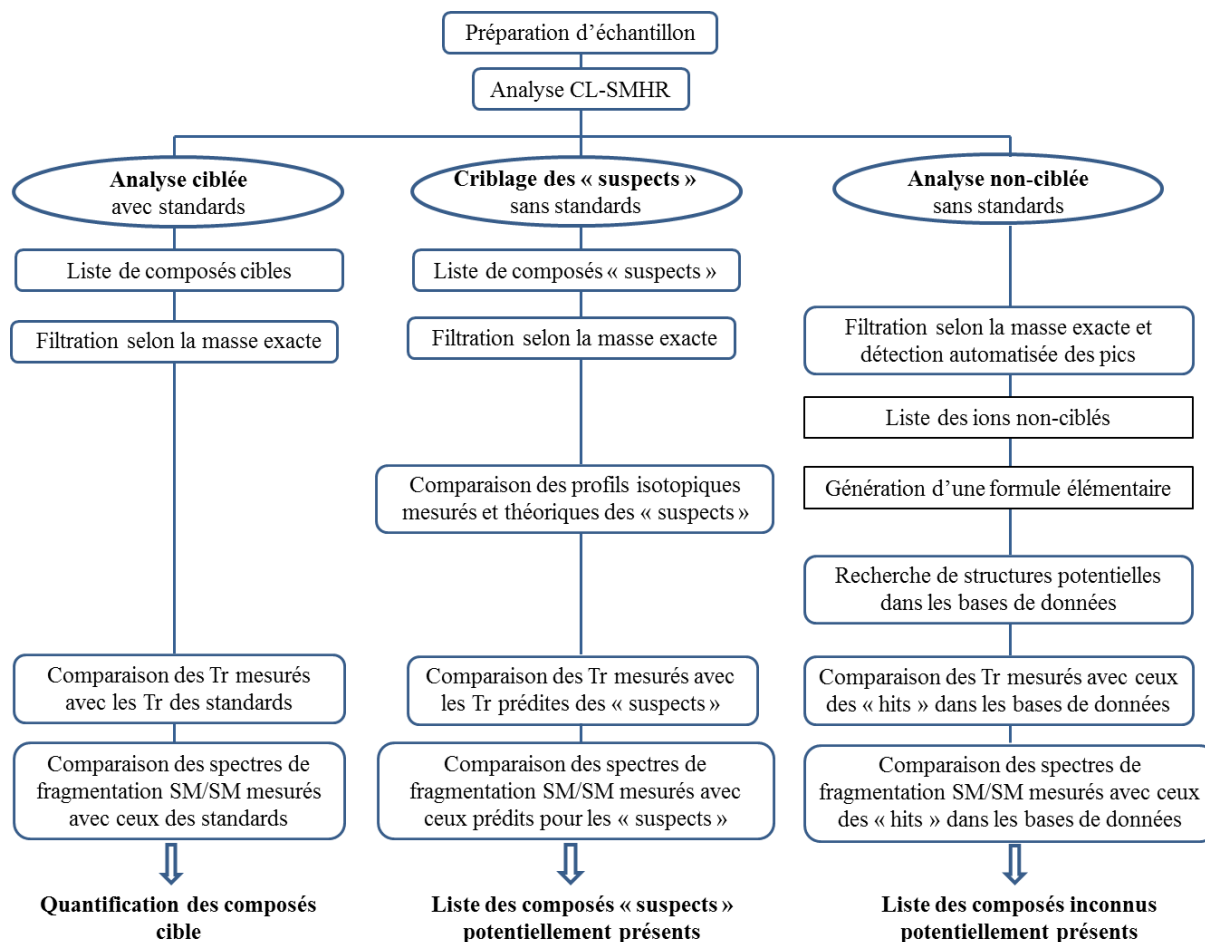


Figure I-23 : Protocoles utilisables en analyse environnementale utilisant la SMHR, adapté de (Krauss et al., 2010)

Contrairement à l'analyse ciblée quantitative, le criblage de composés « suspects » et l'analyse non-ciblée ne nécessitent pas la disponibilité de standards. Dans le cadre de l'approche du criblage des « suspects », les informations spécifiques à chaque molécule, telles que la formule moléculaire et la structure chimique, sont utilisées pour la confirmation de l'identité des suspects. L'analyse ciblée répond au principe de « on ne trouve que ce que l'on recherche », c'est-à-dire on acquiert uniquement en fragmentant des composés ciblés et en confirmant par comparaison des spectres obtenus avec ceux des étalons. En revanche, le criblage des « suspects » s'intéresse à des composés connus comme pouvant potentiellement être présents dans des échantillons et pour lesquels on n'a pas d'étalons. Dans ce cas, l'acquisition se fait avec, ou sans, fragmentation de tous les composés. Enfin, l'analyse non-ciblée s'intéresse, quant à elle, à tous les composés présents dans les échantillons (avec ou sans fragmentation et typiquement avec peu d'étalons). Evidemment, une seule méthode d'analyse ne pourra jamais atteindre cet objectif, tous les composés n'étant pas ionisables dans les mêmes conditions.

Dans l'analyse métabolomique, les trois différentes approches analytiques décrites ci-dessus peuvent être utilisées. Dans le milieu marin, le profilage de composés algaux peut, en principe, être assimilé à une prise de deux types d'empreintes : l'empreinte de type *footprint* et, par relargage durant la mort cellulaire, l'empreinte de type *fingerprint*. En effet, dans un environnement, à un moment donné, on retrouve typiquement des composés du métabolisme intra- (endométabolome) et extra-cellulaire (exo-métabolome) (Pizarro et al., 2013, Lane et al., 2010, Villas-Boas. et al., 2005).

OBJECTIFS de la THESE

La problématique générale de cette thèse est le criblage d'un grand nombre de toxines et de leurs métabolites dans des échantillons environnementaux (moules, microalgues, *etc.*). Ce criblage peut se faire à l'aide de la spectrométrie de masse (basse ou haute résolution), notamment grâce à l'utilisation de bases de données de toxines. Néanmoins, le degré de complexité de l'échantillon peut avoir un impact sur les résultats obtenus, particulièrement en spectrométrie de masse haute résolution et dans le cadre d'une approche non-ciblée. Les trois grands objectifs de cette thèse ont donc été de :

- Mettre en place et utiliser l'**échantillonnage passif** comme outil complémentaire des méthodes traditionnelles de surveillance et de vigilance sur les produits de la mer. L'échantillonnage passif serait d'un intérêt certain pour mettre en évidence la présence de toxines produites par les microalgues dites cryptiques. Il s'agit en l'occurrence des microalgues benthiques ou épiphytes, ainsi que celles trop petites ($< 20 \mu\text{m}$) pour pouvoir être détectées et identifiées par les techniques usuelles des réseaux de surveillance, originellement mises en place pour les microalgues de taille supérieure à $20 \mu\text{m}$.
- Utiliser l'**analyse ciblée** pour le criblage de toxines connues dans des échantillons environnementaux (moules et capteurs passifs). Il s'agit d'utiliser la CL-SM/SM basse et haute résolution, pour élargir le champ des toxines connues que l'on peut détecter simultanément avec une méthode d'analyse unique. Les performances des deux approches, utilisant la spectrométrie de masse basse et haute résolution appliquées aux échantillons de moules et aux capteurs passifs, seront évaluées en termes d'effet matrice, de limites de détection et de limites de quantification. Les résultats obtenus permettront, d'une part, de déterminer si l'échantillonneur passif pourrait être considéré comme une matrice moins complexe que la matrice moule et, d'autre part, de statuer sur la nécessité et les apports de la spectrométrie de masse haute résolution.
- Utiliser la **spectrométrie de masse haute résolution en approche non-ciblée** pour le criblage de toxines émergentes, ou encore inconnues, dans des échantillons réels (échantillonneurs passifs et moules). Cela se fera, notamment, par l'interrogation de bases de données existantes. Le degré de complexité de l'échantillon pouvant avoir un impact sur les résultats obtenus, particulièrement en spectrométrie de masse haute

résolution, nous pourrions ainsi statuer sur la nécessité d'avoir une matrice moins complexe (l'échantillonneur passif en comparaison à la moule), lors de l'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution, pour l'identification de composés inconnus.

Le chapitre 1 sera entièrement consacré à la mise au point et à la mise en place de l'échantillonnage passif, d'abord à l'échelle du laboratoire, puis en application directe sur le terrain, pour évaluer la pertinence de cette approche.

Le chapitre 2 comporte deux parties traitant de l'utilisation des techniques de spectrométrie de masse appliquées à l'analyse des phycotoxines.

La **première partie** détaillera la mise au point et l'utilisation d'une méthode d'analyse en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, pour la quantification et l'analyse non-ciblée de toxines algales, dans les moules et les échantillonneurs passifs. Par ailleurs, elle se focalisera sur la comparaison des performances des différentes techniques de détection (spectrométrie de masse haute et basse résolution) potentiellement utilisables, mais aussi sur l'impact des effets matrices, générés par les moules et les échantillonneurs passifs, sur les résultats de la quantification des phycotoxines d'intérêt.

La **deuxième partie** quant à elle évaluera les facteurs de réponse associés aux toxines de la même famille. Cette évaluation a été réalisée à la fois en spectrométrie de masse basse et haute résolution.

Le chapitre 3, dernier chapitre de ce manuscrit, discutera des méthodologies mises en place et des résultats obtenus lors du criblage d'échantillons réels, environnementaux et biologiques. Cette étude a notamment porté sur des échantillonneurs passifs provenant d'études terrain menées au cours de cette thèse. Les approches d'analyse ciblée, mais aussi non-ciblée, dans la recherche de toxines, ainsi que d'autres composés marins présents dans l'eau, seront ainsi abordées. Par ailleurs, compte tenu du peu d'informations disponibles, l'évaluation de la concentration en toxines dissoutes dans l'eau sera aussi discutée.

CHAPITRE 1 - MISE AU POINT DE L'ECHANTILLONNAGE PASSIF

CONTEXTE

Les toxines marines posent un problème de sécurité sanitaire, étant donné qu'elles peuvent s'accumuler dans les mollusques bivalves, résultant en une intoxication humaine, lors de leur consommation. La protection des consommateurs est principalement assurée grâce aux programmes de surveillance du phytoplancton et des mollusques bivalves. Cependant, l'échantillonnage passif a été développé, depuis quelques années, comme outil supplémentaire pour détecter les phycotoxines dissoutes dans l'eau de mer. En effet, l'échantillonnage passif peut s'avérer particulièrement utile pour détecter les toxines de microalgues difficilement identifiables (car trop petites comme *Azadinium spp.* qui est $< 20 \mu\text{m}$) ou benthiques. Par ailleurs, plusieurs études réalisées en Nouvelle Zélande et en Norvège (MacKenzie et al., 2004; Rundberget et al., 2011) ont montré la possibilité de capter des toxines de microalgues benthiques, grâce à l'échantillonnage passif. Enfin, aucune étude utilisant l'échantillonnage passif n'a encore été menée en France à l'heure actuelle.

Afin de mettre en place l'échantillonnage passif des phycotoxines lipophiles, des essais préliminaires en laboratoire ont été nécessaires. La première étape a consisté à déterminer le solvant le plus approprié pour extraire les toxines à partir des microalgues disponibles au laboratoire. Alors que l'acétone est généralement le solvant utilisé pour extraire les toxines lipophiles des mollusques bivalves, dans le but de réaliser le test souris, le méthanol et les mélanges méthanol/eau sont plutôt utilisés quand il s'agit d'analyser les toxines lipophiles par LC-MS/MS (Hess et al., 2005; McNabb et al., 2005). Cependant, l'utilisation de méthanol a été rapportée comme pouvant causer des artefacts de méthylation, notamment pour les azaspiracides (Jauffrais et al., 2012a), rendant nécessaire la comparaison de plusieurs solvants d'extraction.

La seconde étape a porté sur le choix du (ou des) capteur(s) passif(s) le(s) plus approprié(s) pour le suivi des phycotoxines dans la colonne d'eau. Dans des études antérieures, les adsorbants testés, pour réaliser l'échantillonnage passif de phycotoxines présentes dans la colonne d'eau de mer, étaient généralement composés de résine HP-20 ou de résines de type SEPABEADS. Les phycotoxines sont des composés possédant des propriétés physico-chimiques très différentes. Le choix des matériaux utilisés pour la fabrication des échantillonneurs passifs, et notamment celui de l'adsorbant utilisé, est donc crucial si l'on veut capter des molécules de polarités différentes. C'est pourquoi la phase Strata-X, utilisée pour l'extraction sur phase solide, ainsi que d'autres systèmes d'échantillonnage passif, pas

encore ou très peu utilisés pour capter les phycotoxines, ont été testés. C'est le cas notamment des systèmes d'échantillonnage passif de type POCIS, contenant souvent des résines pouvant capter des molécules de polarités variées (exemple : OASIS HLB) et des membranes LDPE et/ou PDMS, utilisées principalement pour capter les contaminants chimiques environnementaux. Différents systèmes d'échantillonnage passif ont donc été testés en laboratoire, en parallèle avec la résine HP-20, déjà utilisée dans des études portant sur l'échantillonnage passif de toxines, de manière à choisir les systèmes et phases les plus appropriés pour une étude terrain.

Ce chapitre porte sur la mise en place de l'échantillonnage passif. Cette étude a été réalisée en trois étapes principales:

- **La mise au point de l'extraction de toxines** à partir de différentes microalgues, et notamment, le choix du solvant d'extraction. Le méthanol, l'isopropanol et l'acétone ont ainsi été testés pour évaluer leur efficacité d'extraction.
- **Le choix des phases adsorbantes et des dispositifs de captage des toxines** : test de différents adsorbants en mode SPE et en mode échantillonnage passif et comparaison de leurs comportements sur le court-terme (24 à 48 heures) et le long terme (7 à 15 jours).
- **L'évaluation sur le terrain** des adsorbants choisis : déploiement en mer à l'étang d'Ingril.

I. Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins

Article publié: Z. Zendong, C. Herrenknecht, E. Abadie, C. Brissard, C. Tixier, F. Mondeguer, V. Sechet, Z. Amzil, P. Hess. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 91 (2014) 57-68.

I.1. RESUME

Les toxines marines, métabolites de microalgues, peuvent s'accumuler dans les poissons et coquillages et rendre ces produits impropres à la consommation humaine. La présence de ces toxines dans l'eau de mer peut être suivie par échantillonnage passif.

La première étape de cette étude a consisté à choisir le solvant qui présente la meilleure efficacité à extraire des toxines de polarité différentes, à partir de culots de microalgues. L'acétone, le méthanol et l'isopropanol ont ainsi été évalués. L'isopropanol ayant permis d'obtenir des rendements d'extraction légèrement supérieurs aux autres solvants a par la suite été choisi comme solvant d'extraction. De plus, contrairement au méthanol, les extraits isopropanoliques ne présentaient pas d'artéfacts de méthylation. Pour évaluer la capacité de différents adsorbants à capter les toxines pouvant être présentes dans les extraits de microalgues obtenus, les résines Oasis HLB, Strata-X, BondElute C18 et HP-20 ont, dans un premier temps, été comparées en mode SPE. Cette étude préliminaire a ainsi permis de choisir les phases Oasis HLB, Strata-X et HP-20 comme adsorbants pour la suite de notre étude. Chacune de ces trois résines a, par la suite, été exposée, en mode échantillonnage passif, pendant 24 h, dans de l'eau de mer dopée avec des concentrations connues en acide okadaïque (AO), pinnatoxine-G (PnTX-G), 13-desmethyl spirolide-C (SPX1) et palytoxines (PlTXs), ces toxines étant apportés par des dopages à l'aides des extraits isopropanoliques de microalgues obtenus. Par ailleurs des membranes en polyéthylène de faible densité (LDPE) et polydiméthyl-siloxane (PDMS) ont été testées en parallèle comme échantillonneurs passifs. Les rendements d'extraction obtenus avec ces membranes étaient significativement inférieurs à ceux obtenus avec les résines polymériques. Indépendamment des toxines étudiées, la vitesse d'adsorption des toxines sur la résine HP-20 s'est avérée plus lente, par comparaison aux résines Oasis HLB et Strata-X. Par ailleurs, les résines Strata-X et HP-20 ont permis d'obtenir les meilleurs rendements de récupération après 24 h d'exposition. Enfin, quelle que soit la résine testée, les rendements de récupération les plus élevés ont été observés pour les imines cycliques et l'AO, suivis par les AZAs, les plus faibles rendements ayant été obtenus pour les toxines de la famille des PlTXs.

Des essais dans des bacs à recirculation d'eau contenant des moules exposées à *Vulcanodinium rugosum* ou *Prorocentrum lima* ont permis une évaluation plus poussée des performances des échantillonneurs passifs. Dans ces expériences mettant en compétition différents adsorbants, la résine Strata-X a accumulé plus rapidement et à des taux plus élevés les différentes toxines, par comparaison avec les phases Oasis HLB et HP-20. Ces trois adsorbants ont, par la suite, été déployés en Méditerranée dans l'Etang d'Ingril, pour évaluer leur performance sur le terrain. Les résultats obtenus ont montré la présence de PnTX-G dans la colonne d'eau, les quantités de PnTX-G accumulées par les résines HP-20 et Oasis HLB étant supérieures à celles accumulées par la résine Strata-X.

En conclusion, cette étude a permis d'étendre la gamme des adsorbants pouvant être utilisés pour l'échantillonnage passif des toxines marines. Plus spécifiquement, des adsorbants habituellement utilisés pour capter des résidus vétérinaires, des composés poly-halogénés, des composés pharmaceutiques et des pesticides présents dans l'environnement, ont été testés dans notre étude. Cela a permis de démontrer, pour la première fois, l'utilité d'employer les résines polymériques Oasis HLB et Strata-X dans des expériences terrain et en laboratoire, pour capter des toxines de microalgues.

I.2. ABSTRACT and KEYWORDS

Marine biotoxins are algal metabolites that can accumulate in fish or shellfish and render these foodstuffs unfit for human consumption. These toxins, released into seawater during algal occurrences, can be monitored through passive sampling.

Acetone, methanol and isopropanol were evaluated for their efficiency in extracting toxins from algal biomass. Isopropanol was chosen for further experiments thanks to a slightly higher recovery and no artifact formation. Comparison of Oasis HLB, Strata-X, BondElut C18 and HP-20 sorbent materials in SPE-mode led to the choice of Oasis HLB, HP-20 and Strata-X. These three sorbents were separately exposed as passive samplers for 24 h to seawater spiked with algal extracts containing known amounts of okadaic acid (OA), azaspiracids (AZAs), pinnatoxin-G (PnTX-G), 13-desmethyl spirolide-C (SPX1) and palytoxins (PlTXs). Low density polyethylene (LDPE) and silicone rubber (PDMS) strips were tested in parallel on similar mixtures of spiked natural seawater for 24h. These strips gave significantly lower recoveries than the polymeric sorbents. Irrespective of the toxin group, the adsorption rate of toxins on HP-20 was slower than on Oasis HLB and Strata-X. However, HP-20 and Strata-X gave somewhat higher recoveries after 24h exposure. Irrespective of the sorbent tested, recoveries were generally highest for cyclic imines and OA group toxins, slightly lower for AZAs, and the lowest for palytoxins.

Trials in re-circulated closed tanks with mussels exposed to *Vulcanodinium rugosum* or *Prorocentrum lima* allowed for further evaluation of passive samplers. In these experiments with different sorbent materials competing for toxins in the same container, Strata-X accumulated toxins faster than Oasis HLB, and HP-20, and to higher levels. The deployment of these three sorbents at Ingril French Mediterranean lagoon to detect PnTX-G in the water

column showed accumulation of higher levels on HP-20 and Oasis HLB compared to Strata-X.

This study has significantly extended the range of sorbents for passive sampling of marine toxins. In particular, sorbents were included that had previously been evaluated for polyhalogenated contaminants, pharmaceuticals, phytochemicals or veterinary residues. Moreover, this study has for the first time demonstrated the usefulness of the polymeric Oasis HLB and Strata-X sorbents in laboratory and field studies for various microalgal toxins.

Keywords: Passive sampling; marine toxins; Oasis HLB; Strata-X; LDPE; PDMS; SPATT

I.3. INTRODUCTION

Marine toxins are an important international issue for public health and the fish and shellfish industry. Indeed, toxins produced by a number of naturally occurring planktonic and benthic/epiphytic microalgae can accumulate in seafood and render them improper for human consumption. To protect consumers from intoxication, many countries, essentially those with important shellfish industries, have set up monitoring programs. Traditional monitoring through phytoplankton monitoring and shellfish testing has proven to be an effective warning method. However, phytoplankton samples can only describe a 'snapshot' of the microalgal community at a single point in space and time [1], and some microalgal species are too small (< 20 µm) or benthic/epiphytic. Such algae are hard to identify or detect as identification is difficult for organisms below 20 µm in size and benthic/epiphytic algae require specific, additional sampling protocols [2]. For these reasons, Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) has been introduced as a passive sampling technique to detect and accumulate toxins released into the water during algal blooms [3]. Another advantage of the SPATT technique is the fact that the targeted toxins do not undergo biotransformation unlike in shellfish [4]. Thus, the identification of microalgae through toxin profiles in passive samplers is simplified.

Many different sorbents have been used for passive sampling all over the world, from HP-20 to SEPABEADS type resins [5-8], for the accumulation of microalgal or cyanobacterial toxins of different polarities [7, 9, 10]. In the environment, passive sampling has proven to be useful to detect toxins released into seawater by benthic or very small pelagic microalgae like Pinnatoxins (PnTXs) [11] or Azaspiracids (AZAs) [12], using HP-20

sorbent. This sorbent was also efficient in accumulating ciguatoxin and maitotoxin in *Gambierdiscus pacificus* cultures [13].

Besides SPATT designed for toxin monitoring, various passive samplers were developed for the monitoring of polar or hydrophobic organic contaminants (HOCs), such as Polar Organic Chemical Sampler (POCIS), or Low Density PolyEthylene (LDPE) and Polydimethylsiloxane (PDMS) strips. There are two different POCIS configurations: the pharmaceutical POCIS and the pesticide POCIS. In the first one the membrane encloses Oasis HLB sorbent, while in the second the sorbent is a triphasic mixture of Isolute ENV⁺ polystyrene divinylbenzene and Ambersorb1500 carbon dispersed on S-X3 Biobeads [14, 15]. POCIS devices are often used in aquatic environments to monitor polar organic chemicals [14-16]. For hydrophobic compounds, the first passive sampling device developed was the Semipermeable membrane device (SPMD) which is made of a layflat low density polyethylene (LDPE) membrane tube that contains a liquid film of triolein [17]. However, the use of SMPD can lead to various difficulties related to possible tearing of the membrane (loss of triolein) or the separation of triolein from HOCs. Moreover, a disadvantage of triolein is that it is too specific to be generically used for the monitoring of compounds of different polarities [9]. Next to SMPD, single-phase polymeric sheets and films like LDPE [18, 19] or silicone rubber (PDMS) [20, 21] have also been used for the accumulation of lipophilic compounds.

This study aims to evaluate the ability of Oasis[®] HLB, Strata-X[™], BondElut[™] C18, LDPE and PDMS as passive samplers to accumulate marine toxins. Although passive sampling has been successfully used several times to monitor microalgal toxins using different bulk polymeric sorbents, Oasis HLB has, to our knowledge, never been evaluated as a passive sampling sorbent for phycotoxins, and Strata-X has been evaluated only once as a passive sampler for the accumulation of cyanotoxins [22]. In this study we also evaluated the use of LDPE and silicone membrane strips for the accumulation of lipophilic toxins other than brevetoxins (BTXs) [20]. This is also the first attempt to test samplers containing a low amount of sorbent (300 mg, ten times less than the amount typically used). Furthermore, in addition to lipophilic azaspiracids (AZAs), 13-desmethyl spirolide-C (SPX1), okadaic acid (OA), dinophysistoxin-1 (DTX1) and PnTX-G (Figure I-1), we have also tested our passive samplers for their ability to accumulate the amphiphilic palytoxins (PITXs).

Different types of sorbents were investigated through various protocols: i) screening and optimisation of sorbents in SPE-mode, and choice of the sorbents appropriate for passive sampling; ii) passive samplers immersed in spiked seawater; iii) passive samplers in

experimental tanks and iv) passive samplers in the field. Throughout the different protocols, sorbents and samplers were compared according to the amount of toxins they had accumulated.

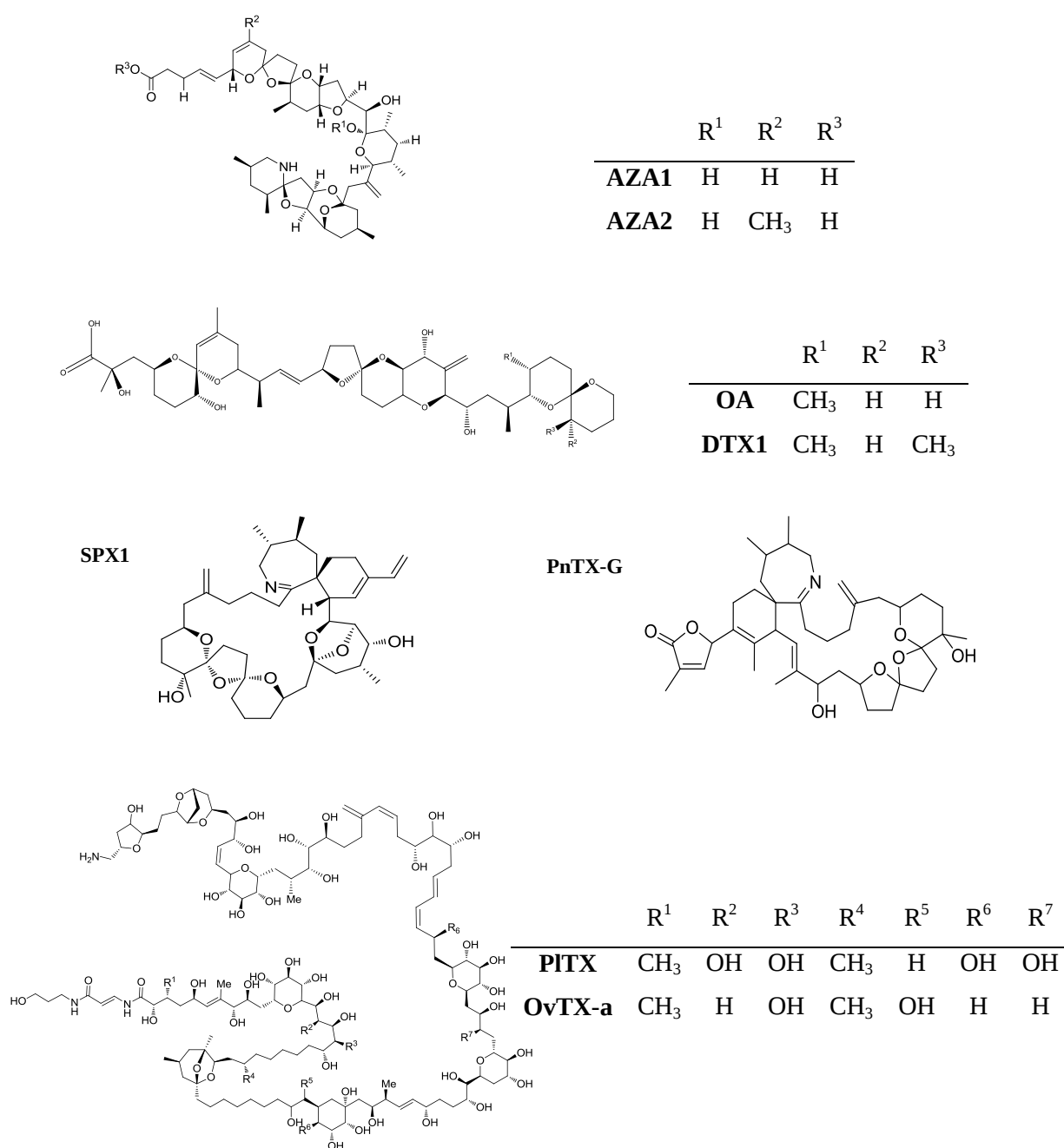


Figure I-1: Structures of the toxins of interest: Azaspiracids 1 and 2 (AZA-1, AZA- 2, Okadaic acid (OA), Dinophysistoxin-1 (DTX1), 13-desmethyl spirolide-C (SPX1), Pinnatoxin-G (PnTX-G), Palytoxin (PlTX) and Ovatoxin-a (OvTX-a)

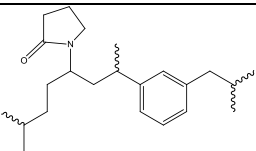
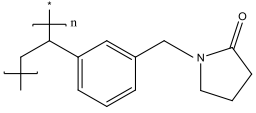
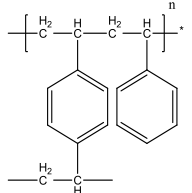
I.4. MATERIALS and METHODS

I.4.1. Chemicals and sorbent material

Certified standard solutions of OA, 13-DesMe-C (SPX1), AZA-1, 2 and 3, and PnTX-G were obtained from the National Research Council in Halifax, Canada. Purified Palytoxin (PITX) standard was from Wako (Japan). Methanol, acetonitrile, butanol, isopropanol, hexane, ethyl acetate and acetone were obtained as HPLC grade solvents from AtlanticLabo (Bordeaux, France) and Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Acetic acid eluent for LC-MS and ammonium hydroxide (28–30%) were also acquired from Sigma-Aldrich. Milli-Q water was produced in-house to 18MΩ/cm quality, using a Milli-Q integral 3 system (Millipore). For analyses with the high resolution mass spectrometry instrument, acetonitrile and water of very high purity grade were obtained from Fischer Scientific (Illkirch, France).

Diaion[®] HP-20 polymeric resin was purchased as bulk resin from Sigma-Aldrich. Strata-X[™] (200 mg, 500 mg cartridges and bulk) and Oasis[®] HLB (30 mg, 200 mg and bulk) were supplied by Phenomenex (Le Pecq, France) and Waters (Saint Quentin Yvelines, France), respectively. Reverse phase BondElut[™] C18 cartridges (500 mg) and 3 mL capacity 2 frits-Reservoirs were from Agilent Technologies. AlteSil[™] translucent silicone rubber sheets (PDMS) of 500 µm thickness were purchased from Altec Products Limited (Cornwall, UK). LDPE strips (70 µm) were prepared from additive-free LDPE lay-flat tubing purchased from Brentwood Plastics (MO, USA).

Table I-1: Oasis HLB, Strata-X, HP-20 and BondElut C18 properties.

Sorbent	Structure	Surface area (m ² /g)	Pore volume (cm ³ /g)	Average pore radius (Å)	Particle size (µm)
<i>Oasis HLB</i>		767	1.21	81	50 - 65
<i>Strata-X</i>		799	1.24	90	28 - 34
<i>HP-20</i>		500	1.3	200	397 - 840

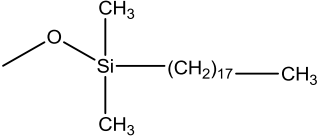
Sorbent	Structure	Surface area (m ² /g)	Pore volume (cm ³ /g)	Average pore radius (Å)	Particle size (µm)
BondElut C18		500	-	60	40 and 120 and irregular

Table I-2: LDPE and PDMS properties

Sorbent	LDPE	PDMS
Supplier	Brentwood Plastics	Altec Products
Thickness (µm)	70	500

I.4.2. Microalgae cultures and algal extracts

I.4.2.a. Microalgae cultures

Algae paste from *Azadinium spinosum* and *Alexandrium ostenfeldii* were available from previous studies [23, 24]. *Prorocentrum lima*, *Vulcanodinium rugosum* and *Ostreopsis ovata* were cultured at the laboratory. *V. rugosum* (IFR-VRU-01I strain) was cultured using L1 medium without silicate, prepared with filtered (0.2 µm) Mediterranean sea water. The culture was in batch mode (200 mL), with a photon flux density of 292 µmol/m²/s. Temperature was set at 22°C. *P. lima* (PL4V and PL2V strains) was cultured using F/2 medium, prepared with filtered (0.2 µm) Atlantic sea water. The culture was in batch mode (300 mL), with a photon flux density of 181 µmol/m²/s. Temperature was set at 16°C. *O. ovata* strains, isolated in the bay of Villefranche-sur-Mer (France), were cultured using L1 medium without silicate, prepared with filtered (0.2 mm) Mediterranean seawater. Soil extract (2 mL/L of medium) [25] was added to the medium. The culture was in batch mode (200 mL), with a photon flux density of 370 µmol/m²/s. Temperature was set at 22°C. All microalgae were cultured with a photoperiod of 16 h of light and 8 h of dark, and cells were collected during stationary phase by 20 min centrifugation at 3500 g and 4°C.

I.4.2.b. Algal extracts

For all spiking experiments, algal extracts were used rather than certified toxin standards. *Ostreopsis ovata* extracts were obtained according to a previously published procedure [26], with the following modifications: sonication times were increased to 1 h with

pulse mode (on ice) to ensure all cells were broken and three consecutive extractions were carried out, with 5 mL MeOH/H₂O (1:1, v/v) for each extraction step. The extracts were combined and evaporated to dryness under nitrogen stream before reconstitution in 5 mL of methanol/water (1:1, v/v). A protocol adapted from Jauffrais *et al.* [23, 27] was used to obtain algal extracts for all other microalgae. Up to 1 g of algal paste was bath-sonicated and serially extracted using 3 x 5 mL of extraction solvent (organic solvent: water, 9:1, v/v). The combined supernatants were then gently evaporated to dryness under nitrogen at 45°C, and the residues reconstituted with 5 mL of methanol. Triplicate extractions with acetone, isopropanol or methanol as organic solvents, were investigated on *Vulcanodinium rugosum*, *Alexandrium ostenfeldii* and *Azadinium spinosum* to choose the most suitable solvent for maximum toxin recovery. Algal pellets (around 100mg) were accurately weighed before extraction and toxin concentrations were expressed as a function of algal mass (wet weight).

I.4.3. Instrumentation and analytical methods

Analyses were performed using a UHPLC system (1290 Infinity, Agilent Technologies) coupled to a 6540 UHD Accurate-Mass Q-ToF (Agilent Technologies) equipped with a dual ESI source. Chromatographic separation was achieved on a Phenomenex Kinetex C18 (150 x 2.1 mm, 1.8 µm) column, maintained at 40°C and with a flow rate of 500 µL/min. The binary mobile phase consisted of water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1% acetic acid. The total run time of one chromatographic run was 21 min. The elution gradient started with 5% of B held constant for 2.4 min, then 100% B was reached within 11.6 min. After a hold time of 2.5 min at 100% B, 5% B was reached within 50 s, followed by 4 min re-equilibration of the column at 5% B. To avoid cross contamination of samples, the needle was washed for 10 s in the flush port with MeOH 90% before each injection.

The instrument was operated in positive mode and full-scan analysis was performed over *m/z* 65 to 1700 range and with an acquisition range of 2 spectra/s. Capillary voltage was 2000 V and fragmentor voltage 200 V. The temperature of the Jet Stream Technologies™ source was set at 200°C with drying gas at 5 L/min and sheath gas at 12 L/min at 355°C. The resolution achieved was generally between 25,000 and 40,000 depending on mass. In full-scan mode, the instrument had a mass error of 1 ppm, which can increase to less than 5 ppm for very small molecules or low abundance.

The exact mass-to-charge ratios (m/z) used for toxin analyses on the Q-ToF instrument were as follows: SPX1 692.4521; PnTX-G 694.4678; AZA1 842.5049; AZA2 856.5206; OA 805.4733; DTX1 819.4889; PlTX 906.4858; OvTX-a (896.1573); PTX2 (881.4658).

Instrument limit of detection was 4.5 ng/mL for OA, 0.35 ng/mL for AZA1, 0.27 ng/mL for SPX1, 0.34 ng/mL for PnTX-G and 100 ng/mL for PlTX.

Statistical evaluations were carried out using SigmaPlot 12.5. The significance test used to discriminate between the accumulation capabilities of the sorbents was the t-test.

I.4.4. Screening of sorbent material and optimization of toxin recovery

A wide range of cartridges and sorbents from different manufacturers are available to extract compounds with various chemical properties. To choose sorbents suitable for passive sampling, Oasis HLB, Strata-X, BondElut C18 and HP-20 were evaluated. The properties of these sorbents are listed in Table I-1. Algal extracts (2.3.2) were quantified to determine the exact amount of toxin and used to prepare spiking solutions. Comparison was based on toxin recoveries obtained for each sorbent.

I.4.4.a. Screening of the sorbent materials.

Commercially available Oasis HLB (30 mg), Strata-X (200 mg), BondElut C18 (200 mg) and HP-20 (200 mg) SPE cartridges were investigated. Spiked seawater (1 mL) was loaded onto cartridges previously preconditioned with MeOH followed by Milli-Q water. The spiked seawater contained microalgal extracts with quantified toxin amounts as follows: 2.2 ng of SPX1, 11.5 ng of AZA1, 15.5 ng of PnTX-G, 104 ng of OA and 3639 ng of OvTX-a. Each cartridge was then washed with adapted volumes of 5% MeOH (500 μ L to 2 mL depending on the amount of sorbent), and eluted with 100% MeOH (2 to 3 mL). The MeOH was evaporated to dryness under a nitrogen stream at 45°C. Finally, the dry residue was then reconstituted in 500 μ L of MeOH, or in 500 μ L of a mixture of MeOH/H₂O (1:1, v/v) for OvTX-a, before analysis.

I.4.4.b. Choice of eluent to improve OvTX-a recoveries

Two different solvents were tested in triplicate as elution solvents on Oasis HLB (30 mg) and Strata-X (200 mg) cartridges: MeOH and MeOH/H₂O (1:1, v/v). Both cartridges

were first conditioned with methanol then Milli-Q water. Spiked seawater (1 mL) was loaded onto each cartridge. The seawater had been spiked with microalgal extracts to yield the following final amounts in the spiked seawater: 2.2 ng of SPX-1, 12 ng of AZA-1, 15 ng of PnTX-G, 105 ng of OA and 161 ng of OvTX-a. After a washing step with 5% methanol (500 μ L for HLB and 2 mL for Strata-X), cartridges were eluted with 6 mL of each solvent to be investigated. Eluents were evaporated to dryness under nitrogen stream at 45°C. The dry residue was reconstituted in 250 μ L of MeOH/H₂O (1:1, v/v) and transferred into HPLC vials before analysis.

1.4.4.c. Evaluation of toxin adsorption on SPE cartridges

Cartridges (Oasis HLB, Strata-X, BondElut C18) were carefully emptied and only the bottom frit was left. The cartridges were thoroughly cleaned with MeOH and Milli-Q water to ensure all residual adsorbent was removed. Reservoirs of 3 mL capacity and with 2 frits (Agilent) were also tested (Supplementary material S3). Samples (1 mL seawater) containing 2.2 up to 161 ng of toxins (OA, AZA1, PnTX-G, SPX1, OvTX-a) were loaded onto the emptied and pre-cleaned cartridges. Washing was done with 1 mL MeOH (5%) and elution with 2 x 1 mL MeOH. Load, wash and elution were all recovered and directly analysed.

1.4.4.d. Optimization of load volumes on Oasis HLB (30 mg) SPE cartridges.

Load volumes of 5 mL, 15 mL and 25 mL were tested on HLB 30 mg cartridges with samples containing from 2.2 ng up to 160.7 ng of various toxins (OA, AZA1, PnTX-G, SPX1, OvTX-a). Before loading, the cartridges were first conditioned with 1 mL MeOH followed by 1 mL Milli-Q water. Then they were washed with 500 μ L MeOH (5%) and eluted with 6 mL MeOH. Elution fractions were evaporated to dryness under nitrogen stream at 45°C and reconstituted in 250 μ L of MeOH/H₂O (1:1, v/v) before analysis.

1.4.4.e. Evaluation of Oasis HLB, Strata-X, BondElut C18 and HP-20 (200 mg) inside Agilent Reservoirs

Each adsorbent (200 mg) was packed inside Agilent reservoirs with 2 frits. Spiked seawater (2 mL) was loaded onto cartridges previously preconditioned with MeOH followed by Milli-Q water. The spiked seawater contained extracts with quantified toxin amounts as follows: 14 ng of SPX1, 19 ng of AZA1, 18 ng of PnTX-G, 238 ng of OA and 359 ng of OvTX- a. Each cartridge was then washed with adapted volumes of 5% MeOH (2 mL to 3.5 mL depending on sorbent type), and eluted with 100% MeOH (10 mL). The MeOH was

evaporated to dryness under a nitrogen stream at 45°C. Finally, the dry residue was then reconstituted in 250 µL of a mixture of MeOH/H₂O (1:1, v/v) before analysis.

I.4.5. Laboratory experiments: design, handling and deployment

HP-20, Strata-X and Oasis HLB SPATT bags and discs were essentially identical to those from Mackenzie *et al.* [3] and Rundberget *et al.* [28], respectively. Lower amounts of resin were used (100 mg to 300 mg weight as delivered), and a 30 µm nylon mesh (Mougel, France) was used with regards to the small particle size of Strata-X and Oasis HLB sorbents (Table 1). Before exposure, SPATT bags and discs were soaked overnight in methanol. They were then gently washed with Milli-Q water to remove methanol residues, and soaked again during 2 hours in Milli-Q water. After conditioning, care was taken to keep the SPATTs in Milli-Q water at 4-6 °C, for not more than 2 days before use.

LDPE and PDMS membranes were cut into 2.8 x 5 cm strips (14 cm² surface area). Conditioning method of LDPE strip was adapted from Shea *et al.* [20], with an extra pre-extraction step with methanol during 4 hours. PDMS strips were thoroughly pre-extracted with ethyl acetate during 48 hours in a Soxhlet apparatus [21]. Both membrane strips were then allowed to dry, weighed and transferred separately into clean glassware and kept at -20 °C before use.

I.4.5.a. Extraction protocol for Oasis HLB, Strata-X and HP-20 passive samplers

After 24 h exposure, polymeric resins were extracted using a modified version of the extraction protocol developed by Fux *et al.* [6]. Briefly, the SPATTs bags and discs were rinsed twice in 500 mL Milli-Q water and the remaining surface water removed by blotting with paper. The resin was transferred into polypropylene reservoirs of 3 mL capacity with 2 frits (Agilent) placed on a manifold. Vacuum was applied to get rid of remaining water and the resin was eluted with 15 mL methanol drop wise. The extracts were evaporated to dryness under a nitrogen stream at 45°C. The dry residue was finally reconstituted with 500 µL of MeOH/H₂O (1:1, v/v), filtered on Nanosep MF centrifugal filters 0.2µm (Pall) and transferred into LC vials for analysis.

I.4.5.b. Extraction protocol for LDPE and PDMS sheets

At time 0 and after 1h, 7h, 24h and 72h of exposure, LDPE and PDMS strips were removed from the seawater, left to dry and then sequentially extracted twice with methanol. The fractions were gathered and evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 45°C and the dry residue was reconstituted in 500 µL of MeOH/H₂O (1:1, v/v).

I.4.5.c. SPATTs, LDPE and PDMS sheets deployed in spiked seawater

Algal extracts from *A. spinosum*, *A. ostensfeldii*, *V. rugosum*, *P. lima* and *O. ovata* were used to spike seawater. The total content of methanol in seawater was approximately 0.2 % to ensure no modification of partition mechanisms. Spiking concentrations for each toxin were as follows: 22.4 ng/mL for OA, 1.36 ng/mL for SPX1, 1.76 ng/mL for AZA1, 1.70 ng/mL for PnTX-G and 33.7 ng/mL for OvTX-a.

Conditioned SPATT bags containing 100 mg, 200 mg or 300 mg of adsorbent (Oasis HLB, HP-20 or Strata-X) were individually placed in spiked seawater inside a closed Erlenmeyer flask. During the experiment beakers and Erlenmeyer flasks were agitated at ca. 90 rpm.

Each membrane strip was installed on a holding frame and placed inside a closed beaker containing spiked seawater solution. In order to avoid any cross contamination of membrane strips with unwanted molecules, glassware had carefully been cleaned and heated for 6 h at 400°C before use.

To monitor toxin accumulation using passive samplers, 1 mL (for SPATT experiment) and 3 mL (for LDPE/PDMS sheet experiment) of seawater were extracted on Oasis HLB SPE cartridges with the previously optimised protocol (2.5). Samples (1 mL to 3 mL) of seawater were withdrawn at times 0 h, 1 h, 7 h, and 24 h for SPATTs and up to 72 h for membrane strips.

I.4.5.d. SPATT exposure in cylindro-conical tanks: seawater containing mussels and microalgae

Mussels (*Mytilus galloprovincialis*, obtained from Galicia, Spain, and *Mytilus edulis* from Pen Bé, France) were allowed a 3-day period of adaptation in separate 128 L seawater tanks, maintained in the laboratory at 18°C. *Mytilus galloprovincialis* mussels (9 kg) were fed with a culture of *V. rugosum*, while *Mytilus edulis* mussels (8 kg) were fed with a culture of *P. lima*. Both cultures had previously been concentrated by filtering them over a 100 µm nylon mesh to remove culture media and mucus. In each cylindro-conical tank, conditioned SPATT

discs (300 mg) of Oasis HLB, Strata-X and HP-20 were immersed simultaneously in triplicate and extracted after 3-day exposure.

I.4.6. Field trials at Ingril Lagoon

Ingril is a French Mediterranean lagoon, where the presence of the dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* has already been reported [29, 30]. Conditioned SPATT discs containing 300 mg Oasis HLB, Strata-X or HP-20 were deployed on three consecutive weeks at South Ingril Lagoon during July 2013. Three SPATT discs of each type of sorbent were deployed at approximately 50 cm depth. The samplers were deployed inside cages typically used for POCIS™ deployment. After deployment, the samplers were kept at -20°C until extraction.

I.5. RESULTS

I.5.1. Microalgae extraction: solvent efficiencies

A. ostenfeldii, *A. spinosum* and *V. rugosum* algal pellets were extracted in triplicate and the amount of toxin extracted was calculated based on SPX1, AZA1 and PnTX-G calibration curves. Toxin concentration was reported to the mass (g) of algal pellet used for each extraction. Isopropanol was more efficient than methanol or acetone for the extraction of SPX1, PnTX-G and AZA1 (Table I-3). Overall, for each toxin, isopropanol extracted 4% more toxin than methanol and 7% more toxin than acetone.

Table I-3: Average amounts (mean $\pm$ standard deviation (=SD), n=3) of toxin extracted from *A. ostenfeldii*, *A. spinosum* and *V. rugosum* using acetone, methanol and isopropanol

		Acetone	Methanol	Isopropanol
<i>Toxin concentration (ng/g algae pellet)</i>	<i>SPX-1</i>	5207 $\pm$ 136	5422 $\pm$ 183	5788 $\pm$ 137
	<i>AZA-1</i>	23269 $\pm$ 245	24220 $\pm$ 1234	24651 $\pm$ 1090
	<i>PnTX-G</i>	26008 $\pm$ 1306	26680 $\pm$ 243	27732 $\pm$ 1143

I.5.2. Comparison of sorbents in SPE-mode

For the first experiment with commercially available Oasis HLB (30 mg), Strata-X (200 mg), BondElut C18 (500 mg) and home packed HP-20 (200 mg) SPE cartridges,

recoveries of toxins were generally above 50% except for OvTX-a. Indeed, no OvTX-a was recovered from BondElut C18 and HP-20, and only 13% was recovered from Oasis HLB and 25% from Strata-X (Table I-4).

Table I-4: Toxin recoveries (%) from commercially available sorbents for the first screening experiment

	OASIS HLB (30 mg)	STRATA-X (200 mg)	BONDELUT C18 (500 mg)	HP-20 (200 mg)
SPX-1	88	85	83	59
PnTX-G	100	92	48	51
OA	111	100	95	83
DTX-1	119	103	95	86
AZA-1	67	66	46	48
AZA-2	57	60	34	44
OvTX-a	13	25	n.d	n.d

I.5.2.a. Choice of eluent to improve OvTX-a recoveries

Average recoveries of toxins (three replicates) from Oasis HLB and Strata-X cartridges using MeOH and MeOH/H₂O (1:1, v/v) indicated that no toxin was recovered from Strata-X using the latter solvent (Table I-5). Only OA (15%) could be recovered from Oasis HLB when MeOH/H₂O (1:1, v/v) was used and best recoveries were obtained with MeOH. For pure MeOH, recoveries from Oasis HLB ranged from 20% (OvTX-a) to 97% (for OA) and those from Strata-X ranged from 9% (OvTX-a) to 85% (OA). AZA-1 and 2 had low recoveries compared to the other toxins, except for OvTX-a, the recovery of which was even lower.

Table I-5: Recoveries (average $\pm$ SD, n=3) obtained from Oasis HLB (30 mg) and Strata-X (200 mg) cartridges eluted with MeOH and MeOH/H₂O (1:1, v/v).

Recoveries (%)		SPX-1	PnTX-G	OA	DTX-1	AZA-1	AZA-2	OvTX-a
MeOH	HLB	80 $\pm$ 4	76 $\pm$ 1	97 $\pm$ 3	90 $\pm$ 2	57 $\pm$ 3	50 $\pm$ 3	20 $\pm$ 1
	Strata-X	72 $\pm$ 3	70 $\pm$ 2	85 $\pm$ 2	79 $\pm$ 2	66 $\pm$ 4	59 $\pm$ 4	9 $\pm$ 4
MeOH/H₂O (1:1, v/v)	HLB	n.d	n.d	15 $\pm$ 2	n.d	n.d	n.d	n.d
	Strata-X	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

n.d: not detected

1.5.2.b. Assessment of optimum load volume

Increasing sample volumes were loaded onto Oasis HLB (30 mg) cartridges to determine maximum load capacity. For all toxins, recoveries slightly increased from 5 mL to 15 mL load but declined with 25 mL load (Table I-6). The load itself was also analysed for 5 and 15 mL volumes after passage through the cartridge and no toxins had been detected for these load volumes. Yields ranged from 45% (AZA2) to 102% (DTX1). For OvTX-a, recoveries were significantly lower than for other toxins (around 10%) and quite similar regardless of the volume of sample loaded.

Table I-6: Recoveries (average $\pm$ SD, n=4) with an elution step of 6 mL MeOH for increasing sample volume (5 – 25 mL) onto Oasis HLB (30 mg) cartridges.

Load volumes	SPX1	PnTX-G	OA	DTX1	AZA1	AZA2	OvTX-a
5 mL	72 $\pm$ 2	79 $\pm$ 3	82 $\pm$ 2	96 $\pm$ 3	54 $\pm$ 2	45 $\pm$ 2	14 $\pm$ 2
15 mL	74 $\pm$ 2	80 $\pm$ 1	86 $\pm$ 4	102 $\pm$ 3	60 $\pm$ 2	48 $\pm$ 2	13 $\pm$ 5
25 mL	61 $\pm$ 3	68 $\pm$ 3	71 $\pm$ 2	81 $\pm$ 5	48 $\pm$ 1	37 $\pm$ 1	9 $\pm$ 2

1.5.2.c. Evaluation of Oasis HLB, Strata-X, BondElut C18 and HP-20 inside 2-frits-reservoir (Agilent)

To make sure toxin adsorption on cartridge reservoirs would not jeopardize the comparison between Oasis HLB, Strata-X, BondElut C18 and HP-20 sorbents, the same cartridge reservoir (Agilent) and the same amount of sorbent (200 mg) were used for all sorbents. Recoveries equal to or higher than 90% were obtained for OA, DTX1 and PnTX-G on BondElut C18, Oasis HLB and Strata-X (Figure I-2). For AZA1 and SPX1, recoveries ranged from 55 to 80%. Compared to the other toxins, OvTX-a (35%) and AZA-2 (55%) recoveries were somewhat lower on all cartridges, especially for OvTX-a. BondElut C18 results were comparable to those of Oasis HLB or Strata-X, except for OvTX-a for which Oasis HLB recoveries were significantly lower ($P = 0.006$). It is noteworthy that HP-20 gave the lowest recoveries for PnTX-G, OA and DTX-1, with statistically significant differences from the other sorbents ($P < 0.001$). The recoveries of SPX1 and AZA-1 and 2 from HP-20 were also lower compared to the other resins, but the difference observed was not statistically significant ($P > 0.06$).

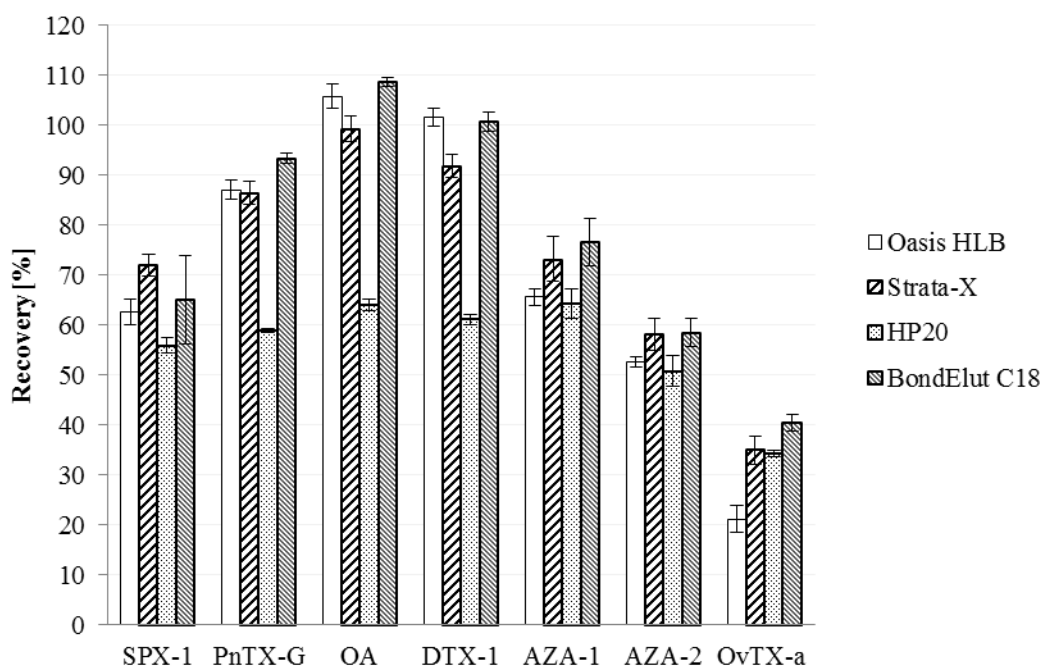


Figure I-2: Average toxin recoveries (%) from Oasis HLB, Strata-X, BondElut C18 and HP-20 packed in the same SPE reservoir with 2-frits (Agilent). Error bars are standard deviations ($n=3$).

I.5.3. Comparison of passive samplers at laboratory scale

I.5.3.a. Spiked seawater

Monitoring of toxin disappearance from spiked seawater exposed to Oasis HLB, Strata-X, HP-20, LDPE and PDMS strips

Oasis HLB, Strata-X, HP-20, LDPE and PDMS passive samplers have been exposed to spiked seawater during 24h. It is important to note that spiking concentrations were voluntarily very high (five times each toxin LOD/mL) to ensure decrease of toxin in the water could be followed. Toxin content in seawater was monitored over the 24 h of exposure (Figure I-3). For the polymeric sorbents, first there was a rapid decrease until time 7h, and then the concentration continued to slowly decrease from 7h to 24h. For each toxin, similar decrease was observed for Oasis HLB, Strata-X and PDMS, with the exception of OvTX-a. For HP-20, the decrease was more linear than for the other samplers. Comparing these four passive samplers, it was obvious that during the first 7 hours of exposure, and from top to down, Strata-X seemed to accumulate faster than Oasis HLB, HP-20 and PDMS. Despite the somewhat slower decrease with HP-20, the amount of toxin remaining in the seawater after 24 h was similar for Strata-X, HP-20 and Oasis HLB (i.e 0% for OvTX-a and between 10 and

30% for the other toxins). This amount was also comparable in the case of PDMS for PnTX-G, but significantly higher for the other toxins. Of all the samplers, LDPE seemed to be the least effective. Indeed, only AZA1 and OvTX-a appeared to be removed from the seawater by this sampler.

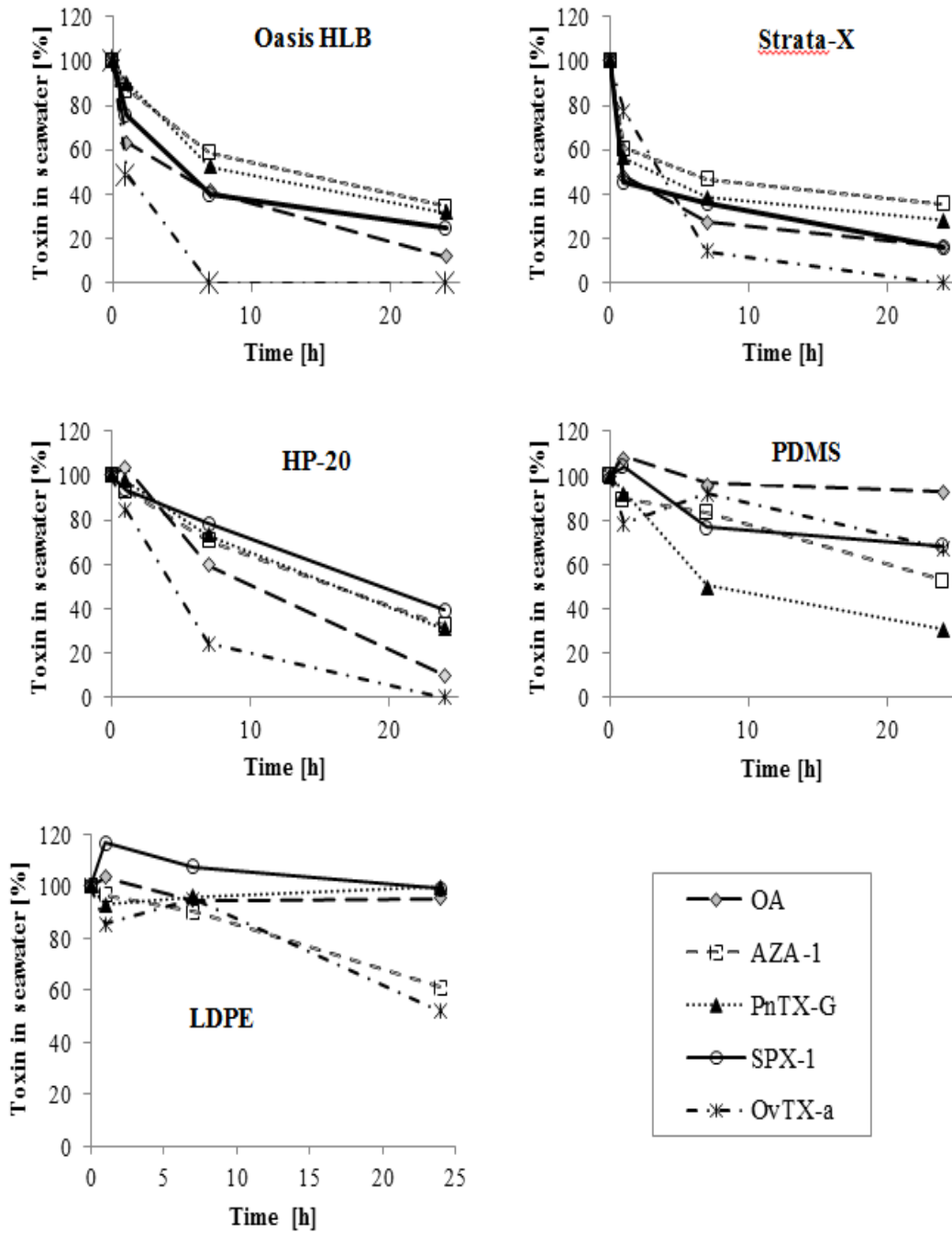


Figure I-3: Toxin disappearance from seawater of OA, AZA1, PnTX-G, SPX1 and OvTX-a for Oasis HLB (300 mg), Strata-X (300 mg), HP-20 (300 mg), PDMS and LDPE passive samplers.

Toxin recovery on each sampler after 24h exposure

After 24h exposure to spiked seawater, passive samplers were extracted to determine the amount of toxin accumulated by each sampler. Recoveries from LDPE were negligible for all toxins (Figure I-4). For AZA1, PnTX-G and SPX1, HP-20 was the most suitable sampler. OA and OvTX-a recoveries were slightly better on Strata-X resin. Of the three resin-type passive samplers, Oasis HLB was the one that gave the lowest but acceptable recoveries. Although recovery using PDMS was generally significantly lower compared to the resin phases, PnTX-G was significantly better recovered by PDMS membrane strips than by Strata-X and Oasis HLB. In summary, Oasis HLB, Strata-X and HP-20 were all able to accumulate OA, AZA1, PnTX-G, SPX1 and OvTX-a, with different efficiencies. PDMS membrane strips showed a good accumulation of PnTX-G, and were also able to accumulate AZA1 and SPX1 but with unsatisfactory yields. LDPE was the poorest passive sampler of all those investigated. All toxins and samplers considered, HP-20 consistently produced recoveries above 50%, apart from OvTX-a which had poor recoveries on all phases except on Strata-X.

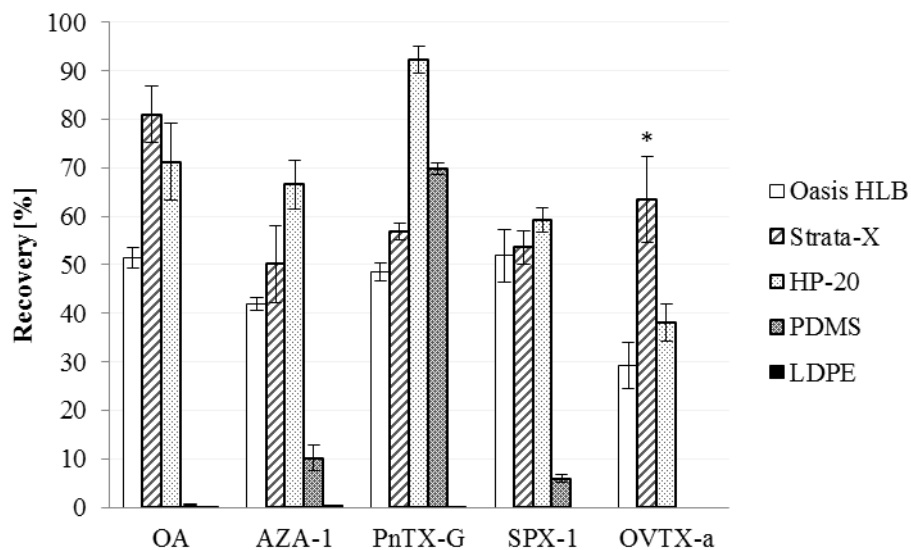


Figure I-4: OA, AZA1, PnTX-G, SPX1 and OvTX-a recoveries from Oasis HLB, Strata-X, HP-20, PDMS and LDPE after 24h immersion in spiked seawater.

Values for Oasis HLB, Strata-X and HP-20 are mean values from three SPATT bags containing 100 mg, 200 mg or 300 mg of resin. Error bars represent standard deviations (n=3). * Strata-X (n = 2) significantly higher than Oasis HLB ($P < 0.001$, n = 3) and HP-20 ($P = 0.043$, n = 3).

1.5.3.b. Tank trials

Oasis HLB, Strata-X and HP-20 SPATTs (300 mg) were simultaneously exposed inside tanks containing mussels and *P. lima* or *V. rugosum* microalgal cultures. As a consequence, those SPATTs were in competition. Strata-X and Oasis HLB exceptionally accumulated more toxins than the HP-20 sampler (Figure I-5). The amount of PnTX-G, OA and DTX-1 was slightly higher on Strata-X than on Oasis HLB, however, this difference was not statistically significant ($P = 0.462$).

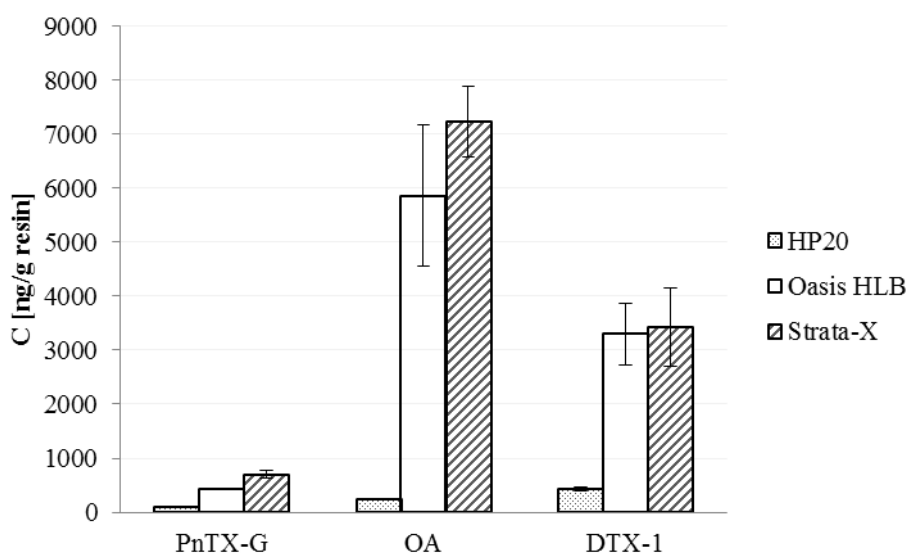


Figure I-5: Amount of toxin (average $\pm$ SD) accumulated on HP-20, Oasis HLB and Strata-X exposed for 3 days in two cylindro-conical tanks (tank 1: *M. edulis* fed with *V. rugosum*; tank 2: *M. galloprovincialis* fed with *P. lima*).

1.5.4. Comparison of Oasis HLB, Strata-X and HP-20 samplers at Ingril lagoon

For assessment of the passive samplers in the field, Oasis HLB, Strata-X and HP-20 SPATTs were deployed in July at Ingril Lagoon on a weekly basis. All three samplers were able to accumulate five toxins in this lagoon: SPX1, PnTX-G, OA, DTX1 and PTX2 (Figure I-6A). The three samplers also had similar accumulation patterns for these five toxins, with SPX1 present at trace levels while PnTX-G, OA and DTX1 were present at higher concentrations than PTX2. Furthermore, there was no significant difference between Oasis HLB, HP-20 and Strata-X for accumulated SPX1 levels. HP-20 appeared to be more efficient for OA and DTX1, followed by Oasis HLB. Oasis HLB accumulated PnTX-G at levels equal

to those on HP-20. Unexpectedly, Strata-X was the sampler that gave the lowest PnTX-G and OA amounts. The time of exposure had a slight effect on the amounts of OA accumulated. Also, adsorption of OA on Oasis HLB and Strata-X decreased with increasing time of exposure (Figure I-6B). As a result, the gap between OA levels on HP-20 compared to Strata-X and Oasis HLB, statistically significantly increased ($P < 0.05$) with longer exposure times.

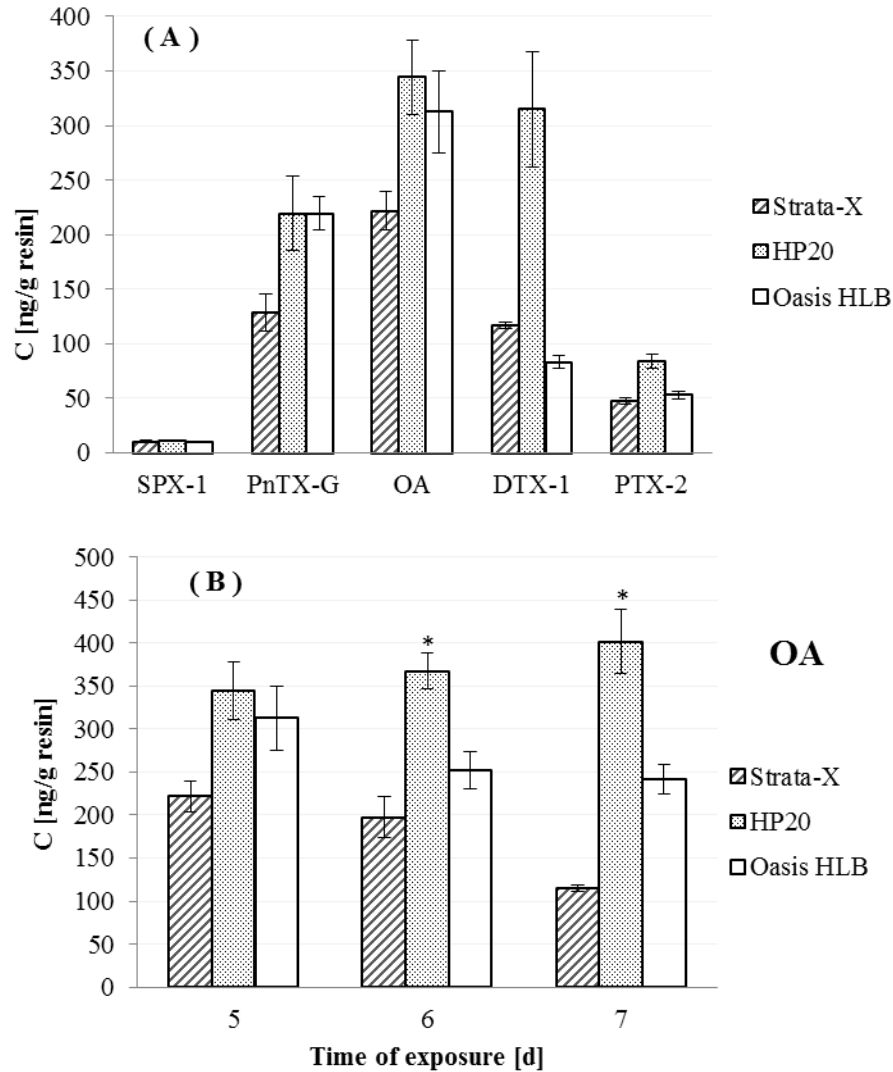


Figure I-6: (A) Accumulation of SPX1, PnTX-G, OA, DTX1 and PTX2 on Oasis HLB, Strata-X and HP-20 SPATTs exposed in July at Ingril Lagoon on a weekly basis. (B) OA adsorption on Oasis HLB, Strata-X and HP-20 for 5d, 6d and 7d of exposure during three consecutive weeks. Error bars represent standard deviations (n=3). * Statistically significantly different ($P < 0.05$).

I.6. DISCUSSION and CONCLUSION

Microalgal extracts were used for all our spiking experiments at the laboratory. To investigate the solvent that yielded better toxin recoveries, methanol, isopropanol and acetone were tested. Methanol, acetone and acetonitrile had already been evaluated for *A. spinosum* extraction [27], and *V. rugosum* and *A. ostenfeldii* are commonly extracted using methanol [31-33]. Only isopropanol had not yet been tested as an extraction solvent for these microalgae. After estimation of toxin recoveries, isopropanol was chosen because it enabled extraction of higher amounts of compounds of interest and did not yield methylester artifacts as previously reported [27].

I.6.1. Choice of extraction solvent and appropriate SPE type resin

HP-20 is a commonly used sorbent for passive sampling of toxins. The other three resins investigated (Oasis HLB, Strata-X and BondElut C18) are common SPE sorbents used to remove matrix effects [34, 35] or to purify toxins before structural elucidation [36]. On BondElut C18 cartridges, retention of the toxins may be based on hydrophobic interactions. On the other hand, with the polymeric sorbents, the retention of toxins depend on either hydrophobic or dipole-dipole, hydrogen bonding and π - π interactions.

For the first SPE screening experiment with different resins, recoveries for OvTX-a were the lowest and no toxin was found in the loading and washing solvents, suggesting the elution solvent was either inappropriate or the eluent volume used was not sufficient. Therefore, optimisation was carried out to improve these recoveries. Two different extraction solvents were investigated on Oasis HLB and Strata-X SPE cartridges which were more efficient after the first trial. Best OvTX-a recoveries were obtained with methanol, while MeOH/H₂O (1:1, v/v) was not suitable to recover OvTX-a. Indeed, in studies by Uchida *et al.* [36] and Selwood *et al.* [37] using Oasis HLB and Strata-X, PITXs were eluted with acidified organic solvents. This could explain why we were not able to recover OvTX-a under basic conditions. However, we did not tested acidic conditions since another toxin group i.e. AZAs had been shown to be easily degraded during evaporation of acidic eluents [38]. Maximum capacity on 30 mg Oasis HLB cartridges was around 15 mL loading volume, and recoveries decreased with higher sample load volume.

As evaluation of toxin adsorption on cartridges had shown that toxins adsorbed less on the Agilent reservoirs with 2-frits (Supplementary material, S3), all the sorbents were tested

inside this reservoir in a second experiment. HP-20 gave the lowest recoveries for most of the toxins compared to Oasis HLB, Strata-X and BondElut C18 (Figure. I-2). This was in agreement with other studies that had demonstrated a low accumulation rate for HP-20, compared to polymeric resins other than Oasis HLB and Strata-X [5, 12]. Thus, HP-20 was not appropriate for use in SPE-mode. BondElut gave higher recoveries than Oasis HLB and Strata-X but this sorbent was not retained because it was impractical for field use. Indeed, unlike polymeric sorbents which are readily wettable, BondElut C18 can never be allowed to dry once conditioned. The different resins we have tested are commercialised for their differences in retention mechanisms and thus we could have expected significant differences in the recoveries of the adsorbed toxins. However, apart from HP-20, all polymeric resins and even the lipophilic BondElut C18 performed quite similarly (Figure. I-2). Indeed, all toxins tested are compounds with both polar and apolar features. Moreover, as the targeted toxins have various physico-chemical properties, simultaneous optimisation of recoveries for all the toxin groups was hard to achieve as previously noted by Gerssen *et al.*[39].

I.6.2. Comparison of passive samplers at laboratory and field scale

As already mentioned, Oasis HLB, and Strata-X had already been tested in SPE mode to remove mussels matrix effects, but never as passive samplers for phycotoxins. These sorbents, as well as HP-20, were investigated as passive samplers in spiked seawater, experimental tanks and in the environment. LDPE and PDMS membrane strips were additionally tested as passive samplers in spiked seawater. Monitoring of toxin decrease in spiked seawater during 24h of samplers exposure confirmed the slow accumulation rate of HP-20 compared to Oasis HLB and Strata-X polymeric resins (Fig. 3; Supplementary material S3). Similar decrease in toxin levels in the seawater was observed with Oasis HLB, Strata-X and HP-20, except for OvTX-a. This difference could be explained by the amphiphilic property of OvTX-a as well as its large molecular size. Also, apparently almost all of OvTX-a had been adsorbed only after 7h exposure. Accumulation of toxins on LDPE and PDMS was lower than on Oasis HLB, Strata-X and HP-20. This may be due to the physical difference between the sorbents, thus, difference in sorption mechanisms. Furthermore, PDMS appears to be slightly more efficient for toxin sampling than LDPE. The diffusivity of large molecular size compounds like phycotoxins could be lower in LDPE than in PDMS [40]. As reported by Allan *et al.* [18] silicone (PDMS) also appears to be less effective than LDPE in sorption and is suitable for the sampling of a large range of compounds of interest. Surprisingly, adsorption

of PnTX-G seemed to be easier on PDMS than the adsorption of SPX1, despite their structural similarities. An explanation for this difference could not be found. Levels of toxins accumulated on LDPE and PDMS were significantly lower than on Oasis HLB, Strata-X or HP-20, except for PnTX-G. HP-20 showed higher recoveries than every other sampler in the field, confirming observations about its higher sorption capacity than other polymeric resins [1]. The simultaneous exposure of Oasis HLB Strata-X and HP-20 inside the experimental tanks (Figure. I-5) led to results different to those from the field trials and from the SPATTs exposed separately to spiked seawater. Indeed, levels of OA, DTX1 and PnTX-G accumulated were higher on Strata-X and Oasis HLB than on HP-20. This was probably a result of the competition between the samplers, which was detrimental to HP-20 because of its low accumulation speed.

The amount of resin used for the passive sampling experiment was approximately ten times lower than the amount commonly reported in the literature (3 g). Nevertheless, the SPATT deployed showed good accumulation efficiency. Indeed levels of OA per gram of sorbent were comparable to, or even higher, than those from SPATT deployed in similar semi-closed environments on the South Coast of Norway [28] or in New Zealand [3, 41]. As found by Mackenzie *et al.* [11], our field experiments have also demonstrated the ability of passive sampling to accumulate and thus enable detection of toxins from benthic or epiphytic microalgae in environmental conditions. Accumulation of SPX1 and PnTX-G in our study indicated the presence of *A. ostensfeldii* and *V. rugosum*, respectively. On the other hand, the presence of OA, DTX1 and PTX2 (Fig. 6A) in the SPATTs deployed suggested that both *Dinophysis species* and *P. lima* were present in the water during the field trial at Ingril Lagoon.

I.6.3. Conclusion

As recommended by Lacaze [9], we have attempted to extend the range of sorbents suitable for passive sampling. This is the first report of Strata-X, Oasis HLB, LDPE and silicone (PDMS) investigation as passive samplers for lipophilic phycotoxins other than Brevetoxins (BTXs). In addition, investigation of polymeric sorbents had shown that passive sampling of OvTX-a was possible. However, more development is needed to improve toxin recoveries of this toxin from polymeric resin after exposure. This study has also confirmed the possibility of detecting toxins from benthic microalgae in the environment. Moreover, this is the first time passive sampling has efficiently been used in France and has pointed towards the

presence of different microalgae species including *P. lima*. As the sorbents we have investigated have shown different efficiencies and accumulation speed, we can conclude that Strata-X and Oasis HLB, which are fast accumulators, are probably better for daily or on-board evaluation of toxin presence. HP-20 however should be more appropriate for long exposure periods (> 5 days). Furthermore, the feasibility of down-scaling the amount of sorbent used in the passive sampling and thus decreasing the amounts of extraction solvents for a more economical and environmental friendly technique has been demonstrated for semi-enclosed coastal areas.

Aknowledgment

This study was carried out under the Coselmar project supported by Ifremer and Nantes University and funded by the Regional Council of the “Pays de la Loire”. We thank Agilent for their collaboration through the loan of the Agilent QToF mass spectrometer instrument. The authors would like to thank all the members of the laboratory Phycotoxins at the Atlantic Centre of Ifremer for their help and advice during this study.

References

- [1] J.Q. Lane, C.M. Roddam, G.W. Langlois, R.M. Kudela, Application of Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) for field detection of the hydrophilic phycotoxins domoic acid and saxitoxin in coastal California, *Limnology and Oceanography-Methods*, 8 (2010) 645-660.
- [2] L.A. MacKenzie, In situ passive solid-phase adsorption of micro-algal biotoxins as a monitoring tool, *Current opinion in biotechnology*, 21 (2010) 326-331.
- [3] L. MacKenzie, V. Beuzenberg, P. Holland, P. McNabb, A. Selwood, Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): a new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 44 (2004) 901-918.
- [4] T. Jauffrais, J. Kilcoyne, C. Herrenknecht, P. Truquet, V. Sechet, C.O. Miles, P. Hess, Dissolved azaspiracids are absorbed and metabolized by blue mussels (*Mytilus edulis*), *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 65 (2013) 81-89.
- [5] A. Li, F. Ma, X. Song, R. Yu, Dynamic adsorption of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in passive sampling relates to pore size distribution of aromatic adsorbent, *Journal of chromatography. A*, 1218 (2011) 1437-1442.

- [6] E. Fux, C. Marcaillou, F. Mondeguer, R. Bire, P. Hess, Field and mesocosm trials on passive sampling for the study of adsorption and desorption behaviour of lipophilic toxins with a focus on OA and DTX1, *Harmful Algae*, 7 (2008) 574-583.
- [7] H. Zhao, J. Qiu, H. Fan, A. Li, Mechanism and application of solid phase adsorption toxin tracking for monitoring microcystins, *Journal of Chromatography A*, 1300 (2013) 159-164.
- [8] G. Pizarro, A. Morono, B. Paz, J.M. Franco, Y. Pazos, B. Reguera, Evaluation of passive samplers as a monitoring tool for early warning of dinophysis toxins in shellfish, *Marine drugs*, 11 (2013) 3823-3845.
- [9] J.-P. Lacaze, *New trends in Marine Freshwater Toxins*, Nova Science Publishers, Inc, 2012.
- [10] R.M. Kudela, Characterization and deployment of Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) resin for monitoring of microcystins in fresh and saltwater, *Harmful Algae*, 11 (2011) 117-125.
- [11] L.A. MacKenzie, A.I. Selwood, P. McNabb, L. Rhodes, Benthic dinoflagellate toxins in two warm-temperate estuaries: Rangaunu and Parengarenga Harbours, Northland, New Zealand, *Harmful Algae*, 10 (2011) 559-566.
- [12] E. Fux, R. Bire, P. Hess, Comparative accumulation and composition of lipophilic marine biotoxins in passive samplers and in mussels (*M. edulis*) on the West Coast of Ireland, *Harmful Algae*, 8 (2009) 523-537.
- [13] A. Caillaud, P. de la Iglesia, E. Barber, H. Eixarch, N. Mohammad-Noor, T. Yasumoto, J. Diogène, Monitoring of dissolved ciguatoxin and maitotoxin using solid-phase adsorption toxin tracking devices: Application to *Gambierdiscus pacificus* in culture, *Harmful Algae*, 10 (2011) 433-446.
- [14] D.A. Alvarez, J.D. Petty, J.N. Huckins, T.L. Jones-Lepp, D.T. Getting, J.P. Goddard, S.E. Manahan, Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23 (2004) 1640-1648.
- [15] C. Harman, I.J. Allan, E.L.M. Vermeirssen, Calibration and use of the polar organic chemical integrative sampler-a critical review, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31 (2012) 2724-2738.
- [16] S.L. Kaserzon, K. Kennedy, D.W. Hawker, J. Thompson, S. Carter, A.C. Roach, K. Booi, J.F. Mueller, Development and calibration of a passive sampler for perfluorinated alkyl carboxylates and sulfonates in water, *Environmental science & technology*, 46 (2012) 4985-4993.

- [17] J.N. Huckins, M.W. Tubergen, G.K. Manuweera, Semipermeable-membrane devices containing model lipid- A new approach to monitoring the bioavailability of lipophilic contaminants and estimating their bioconcentration potential, *Chemosphere*, 20 (1990) 533-552.
- [18] I.J. Allan, C. Harman, S.B. Ranneklev, K.V. Thomas, M. Grung, Passive sampling for target and nontarget analyses of moderately polar and nonpolar substances in water, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32 (2013) 1718-1726.
- [19] L.J. Bao, S.P. Xu, Y. Liang, E.Y. Zeng, Development of a low-density polyethylene-containing passive sampler for measuring dissolved hydrophobic organic compounds in open waters, *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 31 (2012) 1012-1018.
- [20] D. Shea, P. Tester, J. Cohen, S. Kibler, S. Varnam, Accumulation of brevetoxins by passive sampling devices, *African Journal of Marine Science*, 28 (2006) 379-381.
- [21] T.P. Rusina, F. Smedes, J. Klanova, K. Booij, I. Holoubek, Polymer selection for passive sampling: a comparison of critical properties, *Chemosphere*, 68 (2007) 1344-1351.
- [22] S.A. Wood, P.T. Holland, L. MacKenzie, Development of solid phase adsorption toxin tracking (SPATT) for monitoring anatoxin-a and homoanatoxin-a in river water, *Chemosphere*, 82 (2011) 888-894.
- [23] T. Jauffrais, J. Kilcoyne, V. Sechet, C. Herrenknecht, P. Truquet, F. Herve, J.B. Berard, C. Nulty, S. Taylor, U. Tillmann, C.O. Miles, P. Hess, Production and Isolation of Azaspiracid-1 and-2 from *Azadinium spinosum* Culture in Pilot Scale Photobioreactors, *Marine drugs*, 10 (2012) 1360-1382.
- [24] W. Medhioub, V. Sechet, P. Truquet, M. Bardouil, Z. Amzil, P. Lassus, P. Soudant, *Alexandrium ostenfeldii* growth and spirolide production in batch culture and photobioreactor, *Harmful Algae*, 10 (2011) 794-803.
- [25] R.A. Andersen, *Algal culturing techniques*, Elsevier academic press, 2005.
- [26] P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Grauso, L. Tartaglione, F. Guerrini, R. Pistocchi, Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 24 (2010) 2735-2744.
- [27] T. Jauffrais, C. Herrenknecht, V. Sechet, M. Sibat, U. Tillmann, B. Krock, J. Kilcoyne, C.O. Miles, P. McCarron, Z. Amzil, P. Hess, Quantitative analysis of azaspiracids in *Azadinium spinosum* cultures, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403 (2012) 833-846.

- [28] T. Rundberget, E. Gustad, I.A. Samdal, M. Sandvik, C.O. Miles, A convenient and cost-effective method for monitoring marine algal toxins with passive samplers, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 53 (2009) 543-550.
- [29] E. Nezan, N. Chomerat, *Vulcanodinium rugosum* gen. nov., sp. nov. (Dinophyceae): a new marine dinoflagellate from the French Mediterranean coast, *Cryptogamie Algologie*, 32 (2011) 3-18.
- [30] P. Hess, E. Abadie, F. Herve, T. Berteaux, V. Sechet, R. Araoz, J. Molgo, A. Zakarian, M. Sibat, T. Rundberget, C.O. Miles, Z. Amzil, Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 75 (2013) 16-26.
- [31] M. Geiger, G. Desanglois, K. Hogeveen, V. Fessard, T. Lepretre, F. Mondeguer, Y. Guitten, F. Herve, V. Sechet, O. Grovel, Y.-F. Pouchus, P. Hess, Cytotoxicity, fractionation and dereplication of extracts of the dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*, a producer of pinnatoxin G, *Marine drugs*, 11 (2013) 3350-3371.
- [32] R. Munday, A.I. Selwood, L. Rhodes, Acute toxicity of pinnatoxins E, F and G to mice, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 60 (2012) 995-999.
- [33] P. Otero, A. Alfonso, C. Alfonso, M.R. Vieytes, M.C. Louzao, A.M. Botana, L.M. Botana, New protocol to obtain spirolides from *Alexandrium ostenfeldii* cultures with high recovery and purity, *Biomedical Chromatography*, 24 (2010) 878-886.
- [34] A. Gerssen, M.A. McElhinney, P.P.J. Mulder, R. Bire, P. Hess, J. de Boer, Solid phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 394 (2009) 1213-1226.
- [35] J. Kilcoyne, E. Fux, Strategies for the elimination of matrix effects in the liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of the lipophilic toxins okadaic acid and azaspiracid-1 in molluscan shellfish, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 7123-7130.
- [36] H. Uchida, Y. Taira, T. Yasumoto, Structural elucidation of palytoxin analogs produced by the dinoflagellate *Ostreopsis ovata* IK2 strain by complementary use of positive and negative ion liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27 (2013) 1999-2008.
- [37] A.I. Selwood, R. van Ginkel, D.T. Harwood, P.S. McNabb, L.R. Rhodes, P.T. Holland, A sensitive assay for palytoxins, ovatoxins and ostreocins using LC-MS/MS analysis of

cleavage fragments from micro-scale oxidation, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 60 (2012) 810-820.

[38] C. Alfonso, N. Rehmann, P. Hess, A. Alfonso, C.B. Wandscheer, M. Abuin, C. Vale, P. Otero, M.R. Vieytes, L.M. Botana, Evaluation of Various pH and Temperature Conditions on the Stability of Azaspiracids and Their Importance in Preparative Isolation and Toxicological Studies, *Analytical chemistry*, 80 (2008) 9672-9680.

[39] A. Gerssen, E.H.W. van Olst, P.P.J. Mulder, J. de Boer, In-house validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of lipophilic marine toxins in shellfish using matrix-matched calibration, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397 (2010) 3079-3088.

[40] T.P. Rusina, F. Smedes, J. Klanova, Diffusion coefficients of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in polydimethylsiloxane and low-density polyethylene polymers, *Journal of Applied Polymer Science*, (2010) NA-NA.

[41] L. MacKenzie, V. Beuzenberg, P. Holland, P. McNabb, T. Suzuki, A. Selwood, Pectenotoxin and okadaic acid-based toxin profiles in *Dinophysis acuta* and *Dinophysis acuminata* from New Zealand, *Harmful Algae*, 4 (2005) 75-85.

Supplementary Material

Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins

S1: Evaluation of toxin adsorption on cartridges

S2: Monitoring of toxin decrease in spiked seawater for Oasis HLB, Strata-X, HP-20, LDPE and PDMS

S1: Evaluation of toxin adsorption on SPE cartridges and glassware

To evaluate toxin adsorption on empty cartridges (procedural losses), known amounts of toxin were loaded onto the cartridges and directly recovered just as wash and elution solvents. After loading, 100% recovery was obtained for none of the cartridges. However, the reservoir with 2 frits (Agilent) and the one of Oasis HLB yielded better recoveries than BondElut C18 and Strata-X reservoirs, indicating that there was less toxin adsorption on those cartridges. The washing step enabled recoveries to increase to up to 100% for all toxins except for AZA1. Indeed, for AZA1, the first elution step was required to reach 100% recovery. It is noteworthy that most of OvTX-a was retrieved after the loading step. Very high recoveries were obtained with the reservoirs containing 2 frits and Strata-X reservoirs gave the lowest OvTX-a recovery. Overall, all cartridges enable satisfactory recovery of nearly all toxins throughout the procedure. This is not the case for OvTX-a for which top down yields are obtained from 2-frits-reservoir, then BondElut C18, Oasis HLB and Strata-X, respectively.

Toxin adsorption evaluated from recovery (average $\pm$ SD) after load (1 mL spiked seawater) wash (1 ml of 5% MeOH) and elution (2*1 mL MeOH) through empty SPE cartridges. Standard deviation calculated from 3 replicates.

	<i>Steps</i>	SPX-1	PnTX-G	OA	DTX-1	AZA-1	AZA-2	OvTX-a
BondElut C18	<i>Load</i>	89 $\pm$ 3	85 $\pm$ 6	89 $\pm$ 6	83 $\pm$ 8	61 $\pm$ 8	88 $\pm$ 6	73 $\pm$ 9
	<i>Wash</i>	8.8 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 0.4	10 $\pm$ 1	7.8 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.1	9 $\pm$ 1	n.d
	<i>Elution 1</i>	10 $\pm$ 1	17 $\pm$ 3	10 $\pm$ 2	15 $\pm$ 1	37 $\pm$ 6	10 $\pm$ 2	8 $\pm$ 7
	<i>Elution 2</i>	0.8 $\pm$ 0.5	2 $\pm$ 0.4	n.d	2 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1	0.6 $\pm$ 0.3	n.d
	Total recovery	109 $\pm$ 3	110 $\pm$ 2	109 $\pm$ 5	109 $\pm$ 8	104 $\pm$ 1	107 $\pm$ 5	81 $\pm$ 7
Strata-X	<i>Load</i>	87 $\pm$ 2	85 $\pm$ 4	83 $\pm$ 1	86 $\pm$ 2	80 $\pm$ 5	83 $\pm$ 3	85 $\pm$ 7
	<i>Wash</i>	10.2 $\pm$ 0.4	9 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1	9.8 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 0.4	11 $\pm$ 1	5 $\pm$ 5
	<i>Elution 1</i>	5.7 $\pm$ 0.2	9 $\pm$ 1	5.0 $\pm$ 0.6	7 $\pm$ 1	15 $\pm$ 2	4.8 $\pm$ 0.5	n.d
	<i>Elution 2</i>	0.1 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	n.d	n.d	1.9 $\pm$ 0.1	n.d	n.d
	Total recovery	103 $\pm$ 2	104 $\pm$ 3	99 $\pm$ 2	103 $\pm$ 2	100 $\pm$ 4	99 $\pm$ 2	90 $\pm$ 9
Oasis HLB	<i>Load</i>	99 $\pm$ 2	99 $\pm$ 6	92 $\pm$ 3	96 $\pm$ 2	86 $\pm$ 5	96 $\pm$ 4	82 $\pm$ 9
	<i>Wash</i>	15 $\pm$ 7	15 $\pm$ 7	17 $\pm$ 8	17 $\pm$ 7	7 $\pm$ 4	16 $\pm$ 7	n.d
	<i>elution 1</i>	6 $\pm$ 2	6 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2	7 $\pm$ 2	13 $\pm$ 5	4 $\pm$ 1	n.d
	<i>Elution 2</i>	0.2 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	n.d	n.d	1.7 $\pm$ 0.1	n.d	n.d
	Total recovery	109 $\pm$ 2	111 $\pm$ 7	103 $\pm$ 3	109 $\pm$ 2	99 $\pm$ 5	105 $\pm$ 4	82 $\pm$ 9
Agilent 2-frits-	<i>Load</i>	96 $\pm$ 1	97 $\pm$ 5.4	97 $\pm$ 3	93 $\pm$ 2	89 $\pm$ 2	98 $\pm$ 4	95 $\pm$ 9
	<i>Wash</i>	12.2 $\pm$ 0.2	11.2 $\pm$ 0.5	14.0 $\pm$ 0.2	12.3 $\pm$ 0.6	4.4 $\pm$ 1.3	13.5 $\pm$ 0.2	n.d
	<i>Elution 1</i>	2.2 $\pm$ 0.3	2.8 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.4	7 $\pm$ 1	0.4 $\pm$ 0.4	n.d
	<i>Elution 2</i>	n.d	0.7 $\pm$ 0.0	n.d	n.d	1.9 $\pm$ 0.3	n.d	n.d
	Total recovery	111 $\pm$ 1	111 $\pm$ 6	113 $\pm$ 3	106 $\pm$ 2	102 $\pm$ 3	112 $\pm$ 4	95 $\pm$ 9

n.d: not detected

S2: Monitoring of toxin decrease (%) in spiked seawater for Oasis HLB, Strata-X, HP-20, LDPE and PDMS

	Time (hrs)	SPX-1	PnTX-G	OA	AZA-1	OvTX-a
HLB 100 mg	0	100	100	100	100	100
	1	49	44	32	48	7
	7	21	16	0	23	0
	24	33	28	12	28	0
HLB 200 mg	0	100	100	100	100	100
	1	105	105	103	99	124
	7	58	62	35	62	14
	24	36	36	17	33	0
HLB 300 mg	0	100	100	100	100	100
	1	75	90	63	87	49
	7	40	52	41	59	0
	24	25	32	12	35	0
Strata-X 100 mg	0	100	100	100	100	100
	1	87	88	83	95	-
	7	46	53	41	64	0
	24	28	32	0	36	0
Strata-X 200 mg	0	100	100	100	100	100
	1	118	81	62	75	-
	7	53	39	13	48	0
	24	37	30	0	33	0
Strata-X 300 mg	0	100	100	100	100	100
	1	45	56	48	61	78
	7	36	39	28	47	14
	24	16	28	16	36	0
HP-20 100 mg	0	100	100	100	100	100
	1	-	81	60	80	22
	7	112	33	6	41	0
	24	79	24	0	26	0
HP-20 200 mg	0	100	100	100	100	100
	1	81	95	100	90	56
	7	83	84	76	88	0
	24	44	44	23	42	0
HP-20 300 mg	0	100	100	100	100	100
	1	94	98	104	93	85
	7	78	73	59	71	24
	24	39	31	10	32	0
PDMS	0	100	100	100	100	100
	1	104	89	105	93	94
	7	82	44	95	78	72
	24	82	27	100	54	65

	Time (hrs)	SPX-1	PnTX-G	OA	AZA-1	OvTX-a
LDPE	0	100	100	100	100	100
	1	111	99	102	94	101
	7	122	112	110	102	109
	24	103	99	99	64	68

***CHAPITRE 2 – CHROMATOGRAPHIE EN PHASE
LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE
MASSE POUR LE CRIBLAGE DES
PHYCOTOXINES***

CONTEXTE

L'analyse chimique par LC-MS/MS est, depuis 2011, la méthode officielle d'analyse des toxines lipophiles dans les mollusques bivalves. Cependant, l'utilisation de cette méthode, en particulier avec des sources d'ionisation de type ESI, peut donner lieu à des effets matrices (augmentation ou suppression du signal) (King et al., 2000). Plusieurs études antérieures ont évalué ces effets matrice et essayé d'apporter des solutions pour les corriger, lors de l'analyse des toxines lipophiles par LC-MS/MS. Les solutions proposées consistent, entre autres, en la purification préalable des échantillons, par extraction sur phase solide (SPE)(Gerssen et al., 2009a), l'utilisation de courbes de calibration dans la matrice (Kilcoyne and Fux, 2010), la réduction du volume d'échantillon injecté (McCarron et al., 2014). Ces études ont été menées sur des spectromètres de masse basse résolution et uniquement sur la matrice mollusque bivalve. Les effets matrices, lors de l'analyse d'extraits d'échantillonneurs passifs, sont très peu connus et n'ont encore jamais été évalués. Par conséquent, afin de conforter l'utilisation des capteurs passifs, une étude comparative des effets matrice obtenus avec des matrices de type mollusque bivalves et des matrices de type échantillonneurs passifs doit donc être réalisée. Par ailleurs, très peu de travaux ont porté sur l'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution pour l'analyse quantitative des toxines lipophiles dans les coquillages. Par conséquent, compte tenu des performances de la spectrométrie de masse haute résolution, en termes d'analyse qualitative (identification et analyse structurale dans des mélanges complexes), il est donc important d'évaluer ses performances en termes d'analyse quantitative, notamment pour des dosages de toxines.

A l'heure actuelle, pour chaque groupe de toxines, seule une minorité de standards et de matériaux de référence certifiés est disponible. C'est la raison pour laquelle l'estimation de la concentration des analogues d'un groupe de toxines, à partir du standard certifié d'un autre analogue (EU-RL-MB, 2011), est temporairement autorisée, lorsque les facteurs de réponse relatifs des analogues sont connus. Actuellement, rares sont les études ayant évalué les facteurs de réponse molaire entre analogues d'une même famille de toxines, lors de l'analyse par CL-SM/SM. Kilcoyne et al. (2014) ont montré que plusieurs facteurs peuvent influencer les facteurs de réponse molaires : le pH la phase mobile utilisée (neutre vs acide), les paramètres de séparation chromatographique (mode gradient vs isocratique), le mode d'acquisition (Single Ion Monitoring : SIM vs SRM).

Dans ce chapitre seront donc abordés deux aspects liés à l'analyse quantitative des toxines lipophiles, par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. La **première partie** (article n°1) discutera des effets matrices liés à l'analyse de toxines lipophiles dans les matrices moules et les échantillonneurs passifs, ainsi que des apports de la HRMS par rapport à la LRMS. Dans la **deuxième partie**, sera abordée l'évaluation des facteurs de réponse molaire d'analogues d'une même famille de toxines. Ces facteurs de réponse ont été évalués pour des analogues d'une même famille de toxines (exemple : pectenotoxines, acide okadaïque, azaspiracides, imines cycliques) avec des phases mobiles acides, sur des spectromètres de masse basse et haute résolution, en utilisant différents paramètres d'acquisition (SIM, full scan, SRM et « All-ions fragmentation ») et de séparation (isocratique et gradient).

I. High resolution mass spectrometry for quantitative analysis and untargeted screening of algal toxins in mussels and passive samplers

Article publié: Z. Zendong, P. McCarron, C. Herrenknecht, M. Sibat, Z. Amzil, R.B. Cole, P. Hess. *Journal of Chromatography A* 1416, 10-21.

I.1. RESUME

Alors que l'analyse des toxines algales repose traditionnellement sur la surveillance des coquillages, depuis une dizaine d'années l'échantillonnage passif a été introduit comme un outil complémentaire aux méthodes traditionnelles de surveillance. Depuis 2011, la CL-SM/SM a été adoptée par l'Union Européenne comme méthode de référence pour la détection et la quantification des toxines lipophiles. Traditionnellement, les méthodes d'analyses des toxines lipophiles utilisent la spectrométrie de masse basse résolution (LRMS). Cependant, les avancées dans la technologie des spectromètres de masse haute résolution (HRMS) ont augmenté les potentialités de ces derniers pour la détection et la quantification des toxines. Ce travail décrit l'intérêt de l'utilisation de la HRMS, en combinaison avec l'échantillonnage passif, comme approche supplémentaire pour le suivi des toxines marines dans l'environnement marin.

Les effets matrices, problème récurrent en analyse LC-MS, ont été évalués, pour les extraits de moules (*Mytilus galloprovincialis*) et d'échantillonneurs passifs, sur des spectromètres de masse basse (triple quadripôle) et haute résolution (quadripôle temps-de-vol et Orbitrap). Des solutions de calibration contenant de l'acide okadaïque et des dinophysistoxines, de la pecténotoxine, des azaspiracides, des yessotoxines, de l'acide domoïque, des pinnatoxines, de la gymnodimine A et du 13-desmethyl spirolide C ont été préparées à cet effet dans des matrices de moules ou d'échantillonneurs passifs. Pour une matrice donnée (moule ou échantillonneur passif), des effets matrices similaires ont été observés, quel que soit le type d'analyseur utilisé. Plus précisément, une augmentation de signal a été observée pour les pecténotoxine, acide okadaïque/dinophysistoxines, d'une part, et une suppression du signal pour les yessotoxines, d'autre part. Il est intéressant de noter l'influence du choix de l'ion utilisé pour quantifier PTX2 sur l'intensité de l'effet matrice observé. En effet, l'adduit ammonium s'est avéré moins susceptible aux effets matrices que l'adduit sodium. Comme supposé, la matrice moule, matrice biologique complexe, a donné lieu à des effets matrices quantitativement plus importants que ceux obtenus avec la matrice échantillonneur passif, et ceci quelle que soit la toxine analysée. La dilution de l'échantillon a montré son efficacité pour diminuer les effets matrices.

Les limites de détection ainsi que la précision de la méthode obtenues sur chaque système testé étaient comparables d'un instrument à l'autre, démontrant la possibilité d'utiliser la SMHR comme outil de criblage et d'analyse quantitative des toxines de microalgue. Ce résultat est essentiel car, lors de l'analyse des échantillons en utilisant la HRMS, une analyse non-ciblée, de même qu'une analyse rétrospective des données est possible. Les données de HRMS obtenues à partir d'échantillonneurs passifs se sont avérées beaucoup moins complexes que celles obtenues à partir d'échantillons de moules, permettant une recherche plus aisée de molécules inconnues. De ce fait, nous recommandons, l'utilisation de la SMHR en combinaison avec l'échantillonnage passif, pour l'investigation de toxines émergentes ou encore non caractérisées.

I.2. ABSTRACT and KEYWORDS

Measurement of marine algal toxins has traditionally focussed on shellfish monitoring while, over the last decade, passive sampling has been introduced as a complementary tool for exploratory studies. Since 2011, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-

MS/MS) has been adopted as the EU reference method (No.15/2011) for detection and quantitation of lipophilic toxins. Traditional LC-MS approaches have been based on low-resolution mass spectrometry (LRMS), however, advances in instrument platforms have led to a heightened interest in the use of high-resolution mass spectrometry (HRMS) for toxin detection. This work describes the use of HRMS in combination with passive sampling as a progressive approach to marine algal toxin surveys. Experiments focused on comparison of LRMS and HRMS for determination of a broad range of toxins in shellfish and passive samplers.

Matrix effects are an important issue to address in LC-MS; therefore, this phenomenon was evaluated for mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and passive samplers using LRMS (triple quadrupole) and HRMS (quadrupole time-of-flight and Orbitrap) instruments. Matrix-matched calibration solutions containing okadaic acid and dinophysistoxins, pectenotoxin, azaspiracids, yessotoxins, domoic acid, pinnatoxins, gymnodimine A and 13-desmethyl spirolide C were prepared. Similar matrix effects were observed on all instruments types. Most notably, there was ion enhancement for pectenotoxins, okadaic acid/dinophysistoxins on one hand, and ion suppression for yessotoxins on the other. Interestingly, the ion selected for quantitation of PTX2 also influenced the magnitude of matrix effects, with the sodium adduct typically exhibiting less susceptibility to matrix effects than the ammonium adduct. As expected, mussel as a biological matrix, quantitatively produced significantly more matrix effects than passive sampler extracts, irrespective of toxin. Sample dilution was demonstrated as an effective measure to reduce matrix effects for all compounds, and was found to be particularly useful for the non-targeted approach.

Limits of detection and method accuracy were comparable between the systems tested, demonstrating the applicability of HRMS as an effective tool for screening and quantitative analysis. HRMS offers the advantage of untargeted analysis, meaning that datasets can be retrospectively analysed. HRMS (full scan) chromatograms of passive samplers yielded significantly less complex data sets than mussels, and were thus more easily screened for unknowns. Consequently, we recommend the use of HRMS in combination with passive sampling for studies investigating emerging or hitherto uncharacterised toxins.

Keywords: monitoring, marine toxins, passive sampling, SPATT, matrix effects

I.3. INTRODUCTION

A number of micro-algae produce marine toxins that can be accumulated in filter-feeding shellfish species such as mussels and oysters, and thus lead to human intoxication through consumption [1]. For several decades, the complexity of the toxins produced by these algae has impeded method development due to the lack of reference calibrants and materials. Therefore, generic mouse bioassays were often used, despite commonly accepted drawbacks [2]. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has become a versatile tool for the analysis of food and environmental contaminants, including toxins. LC-MS/MS is now the reference method for the detection and quantitation of toxins produced by harmful algae [3]. To achieve this goal, different studies have developed and validated quantitative methods for the analysis of phycotoxins, typically using low resolution mass spectrometry (LRMS) [4-9]. This technique is now being increasingly used for monitoring [10, 11] and for characterization of reference materials [12, 13]. Additionally, methods using high resolution mass spectrometry (HRMS) have recently been developed and quantitatively validated for some marine toxins [14-16].

However, an important issue to address when developing or validating a quantitative analytical method using LC-MS via electrospray (ESI) and atmospheric pressure ionization (API) sources is the possible occurrence of matrix effects [17, 18]. Matrix effects are considered to be an alteration in analyte response due to the presence of co-eluting compounds, either due to mass interference (isobaric compounds) or alteration of the desorption/ionization efficiency due to co-elution. These co-eluting compounds may increase (ion enhancement) or reduce (ion suppression) the desorption/ionization of the targeted analyte [19, 20]. Matrix effects may arise from different co-eluting components: endogenous compounds already present as sample constituents and still present after extraction or sample pre-treatment, or from reagents added to the mobile phase to improve chromatographic separation and peak shape [21], as well as from interfering materials used during extraction procedures or even from variable elution flow-rates [22]. Matrix effects can be easily detected when comparing the response obtained from standard solutions to those from spiked matrix extracts. In the presence of matrix effects, both identification and determination of analytes can be affected [22]. Therefore, the evaluation of matrix effects in MS detection and solutions to overcome them should be examined in the early stages of development of new methods. Several approaches have been used to alleviate matrix effects in the quantitative analysis of lipophilic marine toxins. These approaches include SPE cleanup and column flushing [23,

24], matrix-matched calibration and standard addition [24-26], reduction of the injection volume [11], use of an internal standard and use of a different ionization source such as APCI [19].

For applications that require analyses of complex biological samples, the use of HRMS can offer at least two major advantages: (i) the ability to overcome mass interferences stemming from overlapping signals of isobaric species (at low resolution such interferences lead to overestimation of the quantity of the analyte present) and (ii) non-targeted screening (where mass spectrometry is used to survey the contents of a complex mixture). In the field of toxins a good example of HRMS dealing with interfering isobaric compounds is the case of anatoxin-a, which may be hampered by the presence of phenylalanine [27]. HRMS has also been the prime technique for non-targeted screening of complex samples for unknowns, employing Orbitrap and Time-of-Flight mass spectrometers [9, 28, 29].

While monitoring of biotoxins has traditionally been carried out in mussels, passive samplers, also referred to as Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) have been more recently introduced to detect toxins in the marine environment [30]. Subsequently, many studies have successfully implemented passive sampling, using mainly the HP20 resin, to detect lipophilic toxins in different aquatic environments [31-35]. This technique has not yet proven to be useful as a monitoring tool for early warning of harmful algal blooms [36]. However, passive samplers have the advantage that unlike in mussels, the adsorbed toxins do not undergo biotransformation. Mussels have traditionally been used in many monitoring programs since they can be classified as a sentinel species due to the relatively unselective feeding of mussels compared to other bivalve mollusks, e.g. oysters.

In this study, we evaluate and compare matrix effects caused by mussel matrix and passive sampler components in the analysis of different phycotoxins, using both low and high resolution mass spectrometers. As a complement to the overall non-targeted approach employing HRMS, a range of toxins was investigated quantitatively: from relatively hydrophilic toxins such as domoic acid (DA) and yessotoxins (YTX and homo-YTX), over toxins of intermediate lipophilicity such as pinnatoxins E, F and G (PnTX-E, -F, -G), gymnodimine A (GYM-A), 13-desmethylspirolide-C (13-desmeSPX-C), to the more lipophilic ones including azaspiracids 1 to 3 (AZA1, -2, -3), okadaic acid (OA) dinophysistoxins 1 and 2 (DTX1, -2), pectenotoxin 2 (PTX2) and brevetoxin-1 and 2 (BTX1, -2). A chromatographic separation method was developed and optimized to obtain good separation of the toxins of interest. Matrix matched calibration curves, prepared using mussel and passive sampler extracts, were injected on different analytical systems with low resolution

(triple quadrupole) and high resolution (orbitrap and quadrupole time-of-flight) mass spectrometers. The impact of the ion selected for quantitation, sample dilution and use of low or high resolution detectors on matrix effects were assessed. Finally, the study evaluated the benefits of passive sampler matrix as a complementary tool to traditionally used shellfish matrix (mussels) with the help of HRMS for an untargeted, exploratory approach.

I.4. EXPERIMENTAL

I.4.1. Chemicals and reagents

Certified calibration solutions were from the National Research Council of Canada (NRCC, Halifax, NS, Canada). These included calibration solution CRMs: domoic acid (DA), azaspiracids 1, 2 and 3 (AZA1-3), pectenotoxin 2 (PTX2), okadaic acid (OA), dinophysistoxins 1 and 2 (DTX1 and -2), yessotoxin (YTX), homo-yessotoxin (homo-YTX), 13-desmethyl spirolide C (13-desmeSPX-C), pinnatoxin G (PnTX-G) and gymnodimine A (GYM-A); and mussel tissue CRMs: CRM-ASP-Mus-d, CRM-DSP-Mus-c and CRM-AZA-Mus. A multitoxin tissue material CRM-FDMT-1 undergoing certification, well-characterized in-house calibration solutions for PnTX-E and F, brevetoxins 1 and 2 (BTX1 and -2), 20-methyl spirolide G (20-me-SPX-G) and pectenotoxin-2-seco acid (PTX2sa), as well as a mussel extract (Bruckless, Donegal, Ireland – 2005) containing different azaspiracids were also provided by NRC.

Alexandrium ostenfeldii (*A. ostenfeldii*) extract containing 13,19-didesmethyl spirolide C (13,19-didesme-SPX-C) and *Ostreopsis ovata* (*O. ovata*) extract containing ovatoxin a (OvTX-a) were obtained from Ifremer as previously described [33, 37]. Those extracts were mixed with some of the above mentioned certified and in-house reference toxin calibration solutions as well as the mussel extract from Bruckless to obtain a composite multi-toxin sample, used for optimization of chromatographic separation.

HPLC-grade methanol, acetonitrile and formic acid (98%) were obtained from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany) and Caledon (Georgetown, ON, Canada). Ammonium formate was from Fluka (St. Louis, MI, USA). Milli-Q water was produced in-house at 18M Ω /cm quality, using a Milli-Q integral 3 system (Millipore). For analyses with HRMS instruments, acetonitrile and water of LCMS-grade were obtained from Fisher Scientific (Illkirch, France).

I.4.2. Instrumentation and analytical methods

I.4.2.a. LC-MS/MS systems

System A: Triple quadrupole (QqQ):

An Agilent HPLC 1100 series system (1.58 min dwell time) was connected to an API4000™ mass spectrometer (AB Sciex) equipped with a TurboIonSpray™ ionization source. For quantitation, the mass spectrometer was operated in MRM mode, scanning two transitions for each toxin. Q1 and Q3 resolutions of the instrument were set at Unit (arbitrary terms). Data were acquired in scheduled MRM and the target scan time was 1 s in both positive and negative modes. MRM detection windows were set at 45 s in both polarities. Data acquisition was carried out with Analyst 1.6 Software (AB Sciex). Optimized parameters are shown in Table I-1.

Table I-1: Optimized transitions selected for scheduled MRM method.

Toxin	DP [V]	Q1	Q3 quantifier	CE [eV]	Q3 qualifier	CE [eV]
<i>DA</i>	61	312.1	266.1	23	161.1	35
<i>OvTX-a</i>	65	1315.7	327.1	45	1298	25
<i>GYM-A</i>	90	508.4	490.2	30	392.3	50
<i>13,19-didesMe-C</i>	120	678.5	430.5	45	164.5	65
<i>13-desmeSPX-C</i>	90	692.5	164.1	70	444.2	60
<i>20-me-SPX-G</i>	85	706.6	164.1	70	346.3	50
<i>PnTX-G</i>	125	694.5	164.1	80	458.3	60
<i>PnTX-E</i>	125	784.5	164.1	80	766.5	60
<i>PnTX-F</i>	125	766.5	164.1	80	748.5	60
<i>AZA1</i>	60	842.5	672.4	65	362.3	75
<i>AZA2</i>	60	856.5	672.4	65	362.3	75
<i>AZA3</i>	60	828.5	658.4	65	362.3	75
<i>AZA6</i>	110	842.5	658.4	65	362.3	75
<i>AZA33</i>	110	716.5	698.5	40	362.4	70
<i>AZA34</i>	116	816.5	798.4	41	672.5	69
<i>BTX1</i>	70	884.6	221.1	35	403.4	30
<i>BTX2</i>	90	912.5	895.5	19	877.5	29
<i>PTX2</i>	80	876.5	823.5	35	213.1	55
<i>PTX2sa</i>	85	894.5	823.5	35	213.1	60
<i>OA, DTX2</i>	-80	803.5	255.1	-65	113.1	-85

Toxin	DP [V]	Q1	Q3 quantifier	CE [eV]	Q3 qualifier	CE [eV]
<i>DTX1</i>	-70	817.5	255.1	-70	113.1	-90
<i>YTX</i>	-70	1141.6	1061.6	-55	855.5	-70
<i>homo-YTX</i>	-70	1155.6	1075.6	-55	869.5	-70

System B: Quadrupole Time of Flight (Q-ToF):

A UHPLC system (1290 Infinity II, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with a 0.3 min dwell time was coupled to a 6550 iFunnel QToF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a dual ESI source. This instrument was operated with a dual electrospray ion source with Agilent Jet Stream Technology™ in positive (ESI⁺) and negative (ESI⁻) ionization modes. Mass spectra were acquired over the scan range m/z 100 - 1200 with an acquisition rate of 0.5 s. The parameters of the Jet Stream Technologies™ source in ESI⁺ were: gas temperature 205 °C, drying gas flow 16 L/min, nebulizer pressure 50 psi, sheath gas temperature 355 °C, sheath 12 L/min, capillary voltage 2 kV, fragmentor voltage, 200 V. In ESI⁻ the parameters were as follows: gas temperature 290 °C, drying gas flow 12 L/min, nebulizer pressure 50 psi, sheath gas temperature 355 °C, sheath 12 L/min, capillary voltage - 3.5 kV, fragmentor voltage, 180 V. The instrument was mass calibrated in positive and negative ionization modes before each analysis, using the Agilent tuning mix. Additionally, all experiments were carried out using reference mass correction using purine (m/z 121.05087 [M+H]⁺; m/z 119.03632 [M-H]⁻) and HP-921 = hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy) phosphazine (m/z 922.00979 [M+H]⁺; m/z 966.00072 [M+HCOO]⁻). The reference ions were infused constantly with an isocratic pump to a separate ESI sprayer in the dual spray source. MassHunter Acquisition B05.01 software was used to control the instrument and data were processed with MassHunter B07.00.

System C: Orbitrap:

Analyses were carried out on an Accela™ High Speed LC (dwell time 0.75 min) coupled to an Exactive™ mass spectrometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), equipped with an Orbitrap mass analyzer and a heated electrospray ionization probe (HESI-II). The instrument was operated and mass calibrated in positive and negative ionization modes as described previously [14]. “Balanced” automatic gain control (AGC) was

used for all analyses, with a maximum injection time set to 50 ms across a scan range of m/z 100 - 1500. Data acquisition was carried out with Xcalibur software (ThermoFisher Scientific).

Optimal ion source and interface conditions consisted of a spray voltage of 3 kV (positive mode) or -2.7 kV (negative mode), sheath gas flow rate of 50 (ESI⁺) and 25 (ESI⁻), auxiliary gas flow rate of 10, capillary temperature of 360°C and heater temperature of 250°C. Acquisitions were made in full scan with high collision dissociation (HCD) using an energy of 60 eV. Full scan and HCD data were acquired at high (50000) and medium (10000) resolutions respectively. Alternative full scan and HCD data were obtained at a scan rate of 2Hz, resulting in an overall cycle time of ca. 1 s.

1.4.2.b. Liquid chromatography conditions

Three different Kinetex stationary phases (C18, XB-C18 and Biphenyl from Phenomenex) of identical geometry and particle size have been initially evaluated (see supplementary material Table S1). The column finally selected was a Phenomenex Kinetex XB-C18 (100 x 2.1 mm; 2.6 μ m).

The binary mobile phase consisted of (A) 100% water and (B) 95% acetonitrile. All phases contained 2 mM ammonium formate and 50 mM formic acid. The final gradient selected after optimization of chromatographic separation used a flow-rate of 400 μ L/min, and acetonitrile in the organic component. The elution gradient rose from 5% to 50% of B in 3.6 min, then 100% B was reached by 8.5 min. After 1.5 min of hold time at 100% B, 5% B was reached within 10 s, followed by 5 min re-equilibration of the column at 5% B. The total chromatographic run time was 15 min. For all experiments the column temperature was maintained at 40 °C and injection volumes were 3 μ L. This gradient was used to compare the chromatographic separation between columns in the triple quadrupole system and also to assess matrix effects in all three mass spectrometry systems listed above.

1.4.3. Sample preparation

1.4.3.a. Mussel, passive samplers and CRMs extraction protocol

Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and blank HP-20 passive samplers (300 mg) used to prepare matrix-matched calibration solutions had been deployed over the same 1-week period at Villefranche-sur-mer bay (France). Mussels were prepared according to the

EURLMB SOP [38] by extracting 2 g of homogenized mussels with 2×9 mL of 100% MeOH. After centrifugation, the supernatants were combined into a volumetric flask and the volume adjusted to 20 mL using MeOH. Passive samplers were prepared and extracted as described [33]. SPATTs were prepared from HP20 resin (300 mg) contained between sheets of mesh that were held together by embroidery rings. After retrieval, each SPATT was rinsed with deionized water, the resin transferred to an empty SPE cartridge and eluted with 15 mL of MeOH. Since the procedure for the preparation of matrix-matched standard required diluting the matrix extract to 4/3 of the original volume, initial blank extracts were concentrated to 3/4 of the original volume under a gentle stream of nitrogen, to yield appropriate matrix concentration in the final matrix-matched solutions. A protocol adapted from McCarron *et al* [13] was used to extract CRM samples. CRM material (2 g) was serially extracted four times with 5.5 mL of MeOH. The supernatants were collected and brought to 25 mL into a volumetric flask.

1.4.3.b. Matrix-matched calibration solutions for the evaluation of matrix effects

Due to potential stability problems of AZAs, PnTX-E and PTX2 in acidic conditions [39-41] (and the acid present in the certified calibrant to enhance storage capacity of 13-desmeSPX-C), three initial toxin mixtures were prepared in methanol: (i) Mix-1 containing PTX2, AZA1 to 3, OA, DTX1 and 2, PnTX-E, YTX, homo-YTX and DA; (ii) Mix-2 containing 13-desmeSPX-C, GYM-A, PnTX-F, PnTX-G and DA and (iii) BTX1,2-mix with BTX1 and BTX2. These stock solutions were then serially diluted in MeOH using a Hamilton Microlab diluter-dispenser (Hamilton Company, Reno, NV). The samples from the serial dilution series were spiked into previously prepared and concentrated blank mussel and SPATT extracts (from section 2.3.1): firstly, aliquots of extract (225 μ L) were dispensed into HPLC vials, then 75 μ L of each dilution level solution was added. This operating procedure resulted in a consistent matrix concentration at each concentration level. Matrix-free samples were prepared similarly, using pure methanol instead of mussel or passive sampler extracts. The calibration curves thus covered a range from approximately 0.07 ng mL^{-1} to 50 ng mL^{-1} for AZAs and okadaic acid groups, 0.04 ng mL^{-1} to 26 ng mL^{-1} for cyclic imines, 0.3 ng mL^{-1} to 220 ng mL^{-1} for YTXs, 1.5 ng mL^{-1} to 1070 ng mL^{-1} for DA, 11 ng mL^{-1} to 740 ng mL^{-1} for BTX1 and 25 ng mL^{-1} to 1620 ng mL^{-1} for BTX2. Based on triplicate injections of seven points methanol and matrix-matched calibration curves, mean slopes, intercept and correlation

coefficients (R^2) were calculated by application of least squares adjustment without weighting.

Matrix effects were evaluated on the QqQ, the Q-ToF and on the Orbitrap using the Phenomenex Kinetex XB-C18 (100 x 2.1 mm; 2.6 μ m) column with the optimized gradient.

I.4.4. Method performance characteristics

To assess method performances and matrix effects, each concentration for each calibration curve was injected in triplicate, alternating between standards in methanol, standards in SPATT matrix and standards in mussel matrix. After the injection of each matrix-matched calibration curve, a check standard sample containing the monitored toxins was injected in-between two blank injections. This procedure led to injection sequences of approximately 100 injections. Drift correction, if necessary, was applied before any further data processing: evaluation of linearity, accuracy, matrix effects, *etc.* (supplementary material S1).

Mass-to-charge ratio on high resolution instruments and the corresponding standard deviations were calculated from triplicate injections of methanol, SPATT or mussel calibration solutions. Mass extraction was made with a mass accuracy window of ± 5 ppm. To avoid positive and negative errors cancelling each other out when calculating errors (ppm) [42], absolute values of the individual mass errors were used.

As there is not always sufficient noise to calculate signal-to-noise ratios in HRMS, detection limits (LoD) were determined with the ordinary least-squares regression data method [43, 44] using the lowest 3 points from the calibration curves (in MeOH, SPATT and mussel extracts). The LoD was calculated as 3 times the standard deviation of the y-intercepts, over the slope of the calibration curve [43, 44].

To evaluate the accuracy of the method on all three systems (QqQ, Q-ToF and Orbitrap), certified reference materials containing targeted toxins at known concentrations were analyzed: CRM-ASP-mus-d for DA; CRM-DSP-mus-c for OA, DTX1 and -2; CRM-AZA-mus-d for AZA-1, -2 and -3 and CRM-FDMT-1 for 13-desme-SPX-C and PTX2.

I.4.5. Data treatment

Statistical evaluations were carried out using SigmaPlot 12.5. Significance tests used to compare matrix effects between different conditions were a t-test, a Wilcoxon signed rank

test and an ANOVA on ranks according to Friedman using repeated measures. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

The *Agilent Molecular Feature Extractor* (MFE) algorithm was used to obtain the *Total Compound Chromatogram* of samples [45]. This algorithm is designed for use with full scan data and treats all of the mass spectral data as a three-dimensional array of retention time, m/z and abundance values. At this stage, any point corresponding to persistent or slowly-changing background is removed from that array of values. Subsequently, the algorithm searches for ion traces (= *Features*) that have common elution profile, i.e. ion traces that elute at very nearly the same retention times. Those ion traces are then grouped into entities called *Compounds* regrouping all ion traces that are related, i.e. those that correspond to mass peaks in the same isotope cluster, or can be explained as being different adducts or charge states of the same entity. The results for each detected *Compound* are a mass spectrum containing the ions with the same elution time and explainable relationships, and an extracted compound chromatogram (ECC) computed using all of these related ion traces in the compound spectrum (and only those traces). Finally, all *Compounds* eluting at very nearly the same retention time are grouped into compound groups to facilitate data reduction. Indeed, the algorithm does not allow for regrouping of true fragments different from adducts or isotopic clusters, and thus two or more of the entities called *Compounds* from a same group may actually be derived from in-source fragmentation of a single molecule.

Non-targeted analysis of field samples often show more complex blanks as all ionisable compounds from the solvents and additives used in extraction, sample preparation and mobile phases, as well as ghost-peaks from previous injections, may appear in the mass analyzer. Thus, some samples were blank-subtracted post-acquisition for evaluation of data complexity. For this blank-subtraction, a database was constituted with all peaks that appeared in solvent blanks and HP20 (passive sampler = SPATT matrix) extraction blanks. When using the *MFE*TM algorithm described above, an exclusion list may be added to exclude these compounds present in the blank from those extracted into total compound chromatograms (TCCs). Whenever blank subtraction was applied this is specifically mentioned in the result and discussion section.

I.5. RESULTS AND DISCUSSION

I.5.1. Method Selection and Performance

Initial chromatographic method development focused on achieving good separations within the OA group to avoid quantitation errors (different toxicity of OA and DTX2). During method development Kinetex C18, Kinetex XB-C18 and Kinetex Biphenyl columns (100 x 2.1 mm; 2.6 μ m) were compared (Supplementary material Table S1). Better resolutions between neighboring peaks ($R_s > 2$) were obtained on Kinetex C18 and XB-C18 compared to the Kinetex Biphenyl (supplementary material Table S2). It is noteworthy that AZA3 and PTX2 were resolved on the Kinetex XB-C18 column ($R_s = 6.9$) but not on the Kinetex C18, probably due to the slightly higher polarity of the Kinetex XB-C18 column, as well as its different steric interactions [46].

A methanol-based mobile phase was also tested with the same gradient on the three columns. Methanol has a selectivity different to that of acetonitrile, and use of the same gradient led to more co-elution between toxins, regardless of the column stationary phase, in particular the type of bonding (supplementary material Table S2). Therefore, the mobile phase with methanol was discarded for further experiments. However, it is noteworthy that better sensitivity was obtained for BTXs when using the methanol mobile phase, compared to the acetonitrile mobile phase (supplementary material Figure S1).

The column finally chosen was the Kinetex XB-C18, with resolutions of $R_s = 6.9$ between PTX2 and AZA3, $R_s = 4.5$ between OA and DTX2 and $R_s = 3.2$ between YTX and OA. PnTX-F and PnTX-G were barely baseline resolved ($R_s = 2$), but significant co-elution remained for BTX2 and AZA2 ($R_s = 1.1$) in positive ionization, and for YTX and homo-YTX in negative ion mode (supplementary material Table S2 and Figure S2). We aimed to develop a relatively short method for a multiclass screening of phycotoxins. Figure I-1 shows the LC separation of 29 different algal toxins using the optimized gradient. LRMS and HRMS approaches for multi-toxin determination were examined further using these conditions for a reduced set of toxins as certified calibration solutions were not available for all toxins.

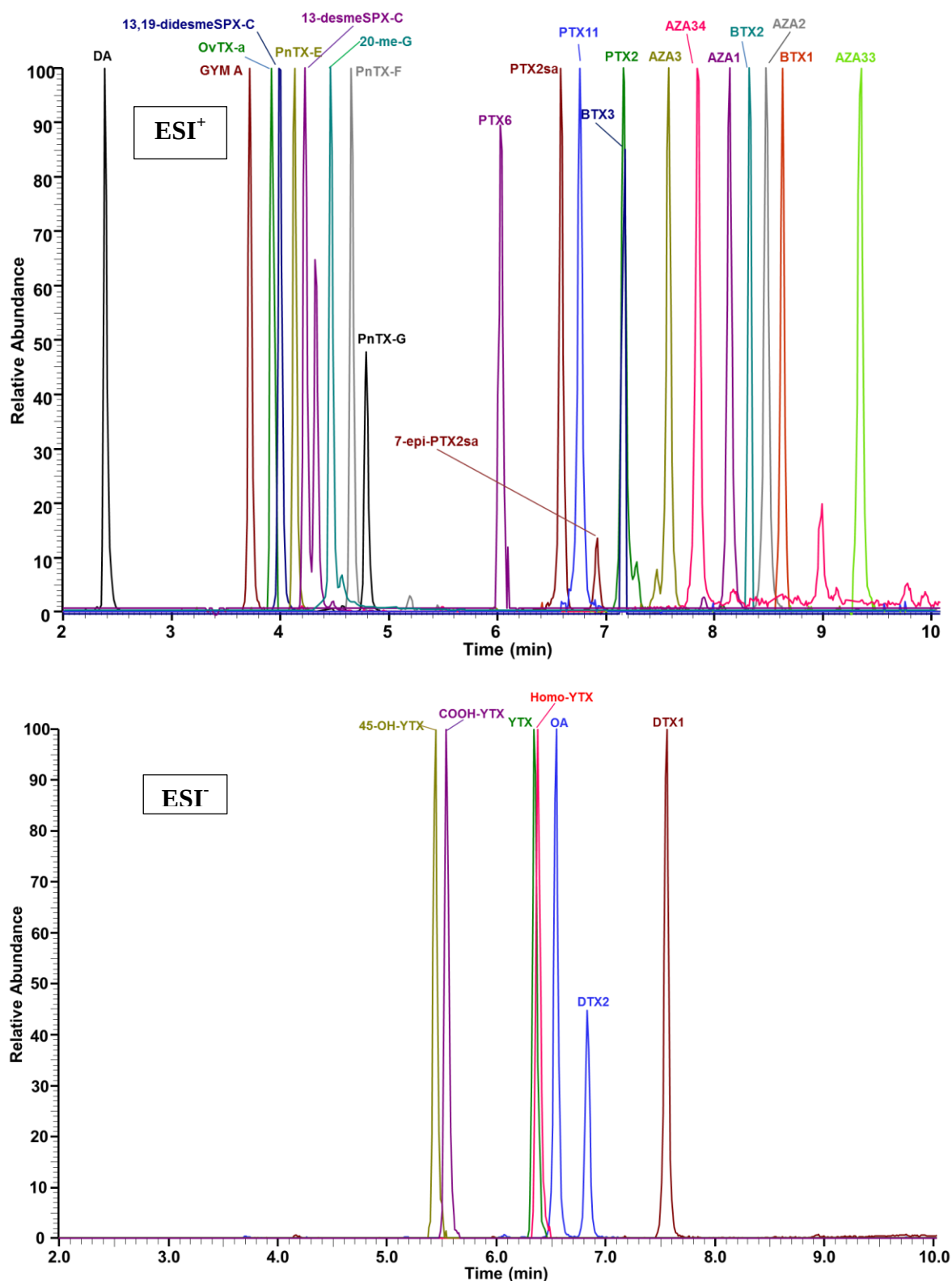


Figure I-1: HPLC chromatogram in ESI^+ and ESI, of the composite multi-toxin sample (section 2.1) acquired on the Orbitrap using the Phenomenex Kinetex XB-C18 (100 x 2.1 mm; 2.6 μ m) with the optimized gradient (acetonitrile).

There was good reproducibility of retention times throughout the entire gamut of injection sequences (101 injections) on all the instruments. Indeed, standard deviation for retention times were all below 0.16 min (n=63) (Table I-2). Some shifts in retention times were observed as could be expected between Systems A to C due to different delay volumes.

Table I-2: Reproducibility of retention times (RT $\pm$ SD) throughout a 24 h injection sequence (n=63) on all systems using Phenomenex Kinetex XB-C18 (100 x 2.1; 2.6 μ m) and the optimized gradient.

	Retention times $\pm$ SD (min)		
	System A	System B	System C
	QqQ	Q-ToF	Orbitrap
DA	3.18 $\pm$ 0.02	1.90 $\pm$ 0.13	2.35 $\pm$ 0.02
GYM A	4.72 $\pm$ 0.08	3.24 $\pm$ 0.004	3.71 $\pm$ 0.02
PnTX-E	5.13 $\pm$ 0.02	3.67 $\pm$ 0.05	4.10 $\pm$ 0.02
13-desmeSPX-C	5.38 $\pm$ 0.08	3.83 $\pm$ 0.004	4.31 $\pm$ 0.02
PnTX F	5.74 $\pm$ 0.02	4.15 $\pm$ 0.004	4.64 $\pm$ 0.02
PnTX G	5.85 $\pm$ 0.01	4.23 $\pm$ 0.003	4.74 $\pm$ 0.02
YTX	7.28 $\pm$ 0.03	6.18 $\pm$ 0.02	6.32 $\pm$ 0.02
homo-YTX	7.30 $\pm$ 0.03	6.21 $\pm$ 0.02	6.35 $\pm$ 0.02
OA	7.59 $\pm$ 0.03	6.08 $\pm$ 0.01	6.52 $\pm$ 0.04
DTX 2	7.89 $\pm$ 0.04	6.35 $\pm$ 0.01	6.80 $\pm$ 0.03
PTX 2	8.20 $\pm$ 0.02	6.67 $\pm$ 0.004	7.16 $\pm$ 0.08
DTX 1	8.69 $\pm$ 0.03	7.06 $\pm$ 0.01	7.53 $\pm$ 0.02
AZA 3	8.72 $\pm$ 0.03	6.59* $\pm$ 0.004	7.52 $\pm$ 0.02
AZA 1	9.33 $\pm$ 0.02	7.05 $\pm$ 0.09	8.08 $\pm$ 0.02
AZA 2	9.68 $\pm$ 0.02	7.27 $\pm$ 0.16	8.41 $\pm$ 0.03

NB: (*) Acquisitions on System A (QqQ) and System C (Orbitrap) were carried out in May and June 2014, while acquisition on System B (Q-ToF) were carried out in March 2015 on the exact same column. Therefore the inversion in retention times between AZA3 and DTX1 is supposed to be due to modifications of the chemical properties of the stationary phase of the column in between the two injection periods, because of the large number of samples injected.

Mass accuracy measured for both instruments ranged between 0.31 ppm to 3 ppm in positive mode and between 0.39 ppm to 3.42 ppm in negative mode (see supplementary

material Table S3). Under defined conditions, both instruments claim sub-ppm mass accuracy in full scan mode, and our study showed overall good mass accuracy (< 3.5 ppm). Furthermore, the highest mass errors were not observed for the same compounds (or ionization modes) on the two high resolution systems: on Q-ToF the highest mass errors were obtained in negative mode for YTX and homo-YTX, while on the Orbitrap the highest mass error was observed in positive mode for PTX2.

Standard deviations of the error of mass measurements ranged from 0.05 to 1.56 ppm for the Q-ToF and, from 0.17 ppm to 1.04 ppm for the Orbitrap. Overall, standard deviations of the error were slightly lower on the Orbitrap (0.46 ppm) compared to the Q-ToF (0.58 ppm). These results showed a good stability in mass measurement for both instruments and were consistent with previously published mass accuracy data [14, 15]. For all toxins on all instruments, mean calibration curves obtained from triplicate injections of methanol, SPATT and mussel solutions showed good linearity ($R^2 > 0.99$) (see supplementary material Table S4).

I.5.2. Evaluation of matrix effects

I.5.2.a. Mussel vs passive sampler matrix effects

The response including the matrix effect was expressed as a percentage of the response obtained for each compound in MeOH and determined by comparison of the mean slope of methanol calibration curves ($n=3$) to those of matrix-matched calibration curves ($n=3$). Responses $> 100\%$ correspond to ion enhancement while responses $< 100\%$ reflect ion suppression. For all three systems, passive sampler matrix quantitatively led to less matrix effects than mussel matrix (Figure I-2). The largest matrix effects were observed for PTX2, OA, DTX1 and DTX2, and in all these cases, ion enhancement was observed.

Fewer toxins were affected by matrix effects on the Q-ToF (statistically significantly). However, matrix effects on the Q-ToF were among the highest of the three systems for PTX2 (+53%), OA (+111%), DTX1 (+222%), DTX2 (+119%) and DA (+49%). Still, in these chromatographic conditions, no ion suppression higher than 16% was observed for any toxin on the Q-ToF, regardless of the matrix. For the other two systems (QqQ and Orbitrap), a greater number of toxins were affected by matrix effects (statistically significantly). On the QqQ ion enhancement was also observed for DA (+14%), PTX2 (+2%), OA (+62%), DTX1 (+77%) and DTX2 (+51%), while AZA1,-2 and -3 suffered respectively from 28%, 31% and 27% ion suppression. These were overall among the highest ion suppression phenomena

observed. On the Orbitrap, ion enhancement was again observed for PTX2 (+65%), DTX1 (+31%) and DTX2 (+20%) and, ion suppression for GYM A (-30%), PnTX-F (-24%), PnTX-G (-22%), YTX (-23%) and homo-YTX (-23%). Since the most important factor in non-target screening is detectability, a system and chromatographic conditions should be chosen to avoid or minimize ion suppression. In the conditions tested, the Q-ToF gave least ion suppression. This finding should certainly be taken with caution as different matrices and chromatographic conditions should also be evaluated on all systems before generalizing this conclusion.

Due to unfavorably high detection limits, matrix effects and detection limits for BTX1 and BTX2 were not fully evaluated. On the triple quadrupole, while negligible ion suppression (<10%) was observed with the passive sampler matrix for BTX1 and BTX2, the mussel matrix gave the highest ion suppression (-13% for BTX1 and -29% for BTX2) (data not shown).

Although the causes of matrix effects are not fully understood, it is a common assumption that such effects may originate from competition between an analyte and co-eluting matrix components for the available charges inside the ionization source [17-20]. In fact, all three instruments used in this study had electrospray ionization sources. Therefore, it is not surprising that similar matrix effects were observed on all three systems for those toxins susceptible to the largest matrix effects (PTX2, OA, DTX1 and -2); the only difference being the degree of suppression or enhancement.

Also, regardless of the analytical system used, mussel matrix almost always led to quantitatively more matrix effects than passive sampler matrix. This was expected as mussels are biological samples, consequently containing multiple exogenous and endogenous compounds that may have further undergone biotransformation. The SPATT extract was obtained from HP20 resin exposed to the Mediterranean Sea (1-week deployment). Notably, the resin had already been pre-extracted with MeOH for activation prior to deployment. Hence, most of the technical by-products that may still be present in technical polymeric resin had been washed out. Additionally, different extraction protocols for mussels and SPATTs yielded extract with different matrix concentrations (solvent-to-sample ratios of 10 for mussel and 33.3 for SPATT). Therefore, the SPATT sample was presumed to contain significantly less matrix components and the observation of lower matrix effects from SPATT than from mussel samples may be attributed, at least in part, to this difference. Previous studies have demonstrated the ability of passive samplers to accumulate biotoxins quite effectively [30, 33, 47]. Since our study clearly shows that passive sampler matrix causes much less matrix

effects, we would recommend this technique for non-targeted studies as a complementary tool useful to toxin discovery or dereplication.

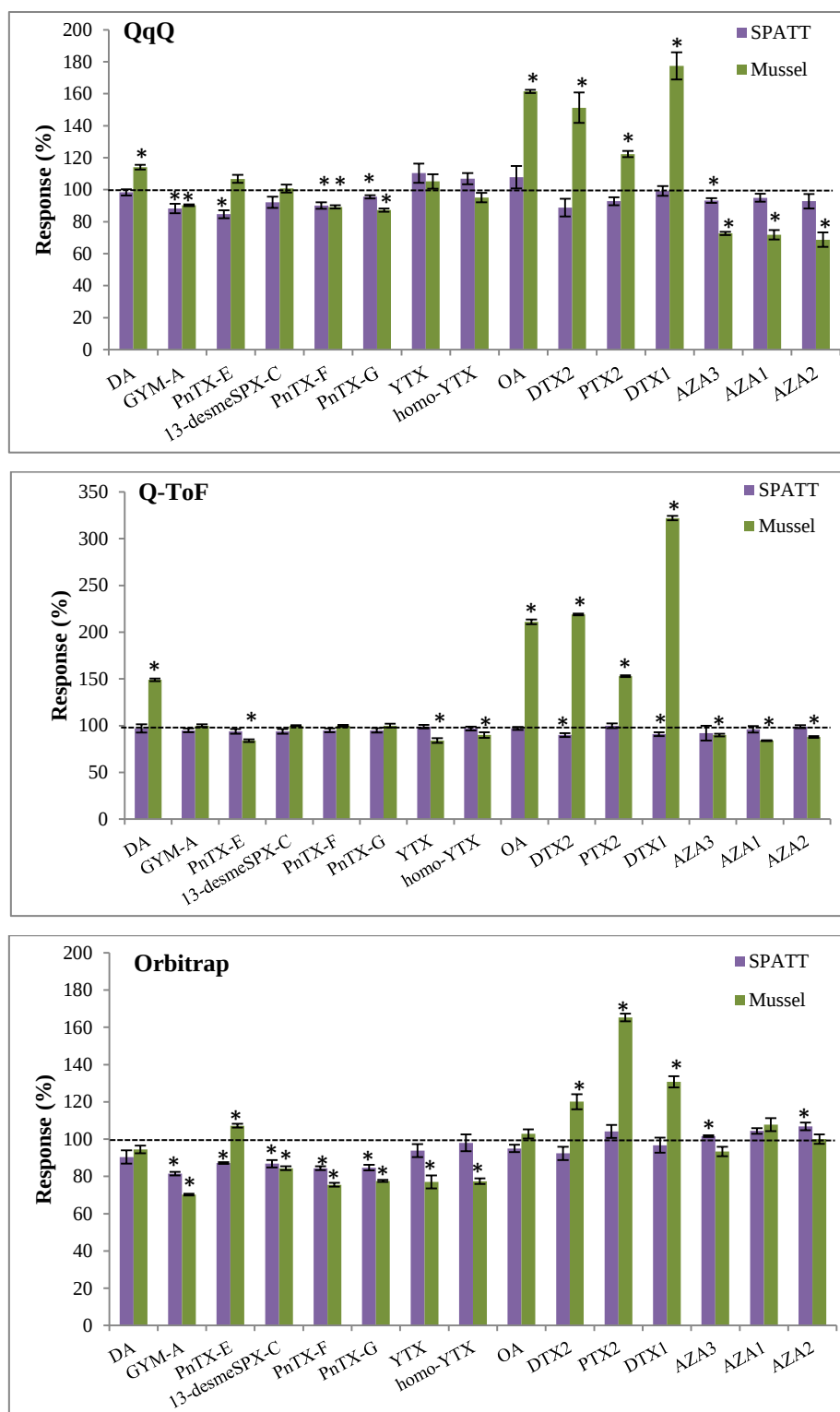


Figure I-2: SPATT and mussel matrix effects (% response compared to response in MeOH $\pm$ %RSD, $n=3$) for various toxins using three instrument systems. Asterisk (*) indicates that response for matrix is statistically significantly different ($p < 0.05$) than response for methanol (t-test). *Nota bene:* For PTX2, the ammonium adduct was used for the

quantitative evaluation of matrix effects on all instruments. The other toxins were quantitated using the $[M+H]^+$ or the $[M-H]^-$.

I.5.3. Parameters affecting matrix effects

I.5.3.a. Ion chosen for quantitation

Characteristic ions for PTX2 in positive electrospray ionization are: m/z 876.5 ($[M+NH_4]^+$) and m/z 881.4 ($[M+Na]^+$), and the proportions can vary depending on instrument and method set-up. On all the HRMS systems the sodium adduct gave a higher response than the ammonium adduct; however, the relative abundances of sodium vs. ammonium ions initially present in the ion source at the time of desorption/ionization, and the generally higher stability of sodium adducts in the ion source will certainly influence this competition. It was therefore necessary to assess what importance the quantifier ion could have on matrix effects. This comparison was undertaken on both high resolution mass spectrometers (QToF, and Orbitrap) using methanol and matrix-matched calibration solutions. On both instruments, either no matrix effect (SPATT) or ion enhancement (mussel) was observed when the ammonium adduct was used for quantitation. However, mostly ion suppression was observed when using the sodium adduct (Figure I-3). Differences in matrix effects obtained with the sodium or ammonium adducts were statistically significant according to a t-test ($p < 0.05$), except for SPATT samples on the Orbitrap. The sodium adduct not being subject to changes in volatility, ion suppression is the more likely matrix effect, due to the presence of high concentrations of nonvolatile compounds in the spray inside the source [22]. Furthermore, a reduced evaporation rate of the most volatile species present including ammonia may also lead to increased ammonium concentration thereby causing the enhancement of ammonium adducts.

The use of sodium adducts is not recommended for quantitation both due to the suppression observed and because of their inherent resistance to fragmentation for structure confirmation purposes [29]. However, in a full scan screening approach using HRMS, this ion still provides some benefits. The sodium adduct could be used for better sensitivity and as a confirmatory ion, however, caution should be taken when interpreting ion abundance ratios.

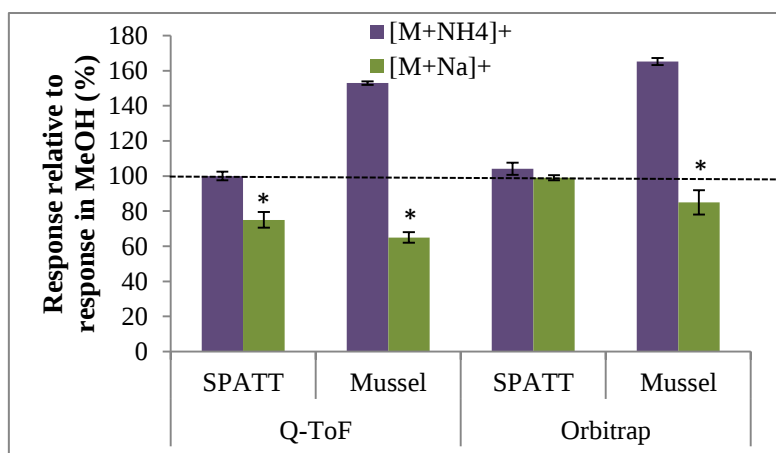


Figure I-3: Matrix effects (% response compared to response in MeOH $\pm$ %RSD, $n=3$) for PTX2 in SPATT and mussel samples using ammonium ($[M+NH_4]^+$) and sodium ($[M+Na]^+$) adducts. *Nota bene:* the absolute response of the sodium adduct is higher than that of the ammonium adduct, the response shown here is relative to the response in MeOH. An asterisk (*) indicates that response of adducts for this matrix-toxin combination is statistically significantly different ($p < 0.05$) from the response in methanol (individual t-test for each matrix-instrument combination).

I.5.3.b. Sample dilution

A simple way of reducing matrix effects is to reduce the amount of matrix entering the system, either by use of smaller injection volumes or by diluting the sample [11, 13]. On the Q-ToF matrix effects were compared using matrix-matched calibration solutions prepared either with crude or 10-fold diluted extracts. In crude SPATT extracts, only ion suppression had been observed, and dilution reduced matrix effects to a negligible level (<10%) (Figure I-4). These differences were, however, only statistically significant for OA ($p=0.007$), DTX1 ($p=0.028$) and DTX2 ($p=0.003$), where the largest matrix effects had been observed for crude extracts. For mussel samples, the reduction in matrix effects was significant for 7 out of 11 compounds evaluated. Again, matrix effects were less significant for passive samplers. While dilution is beneficial in terms of matrix effects its application must be considered in relation to dilution of toxin signal response.

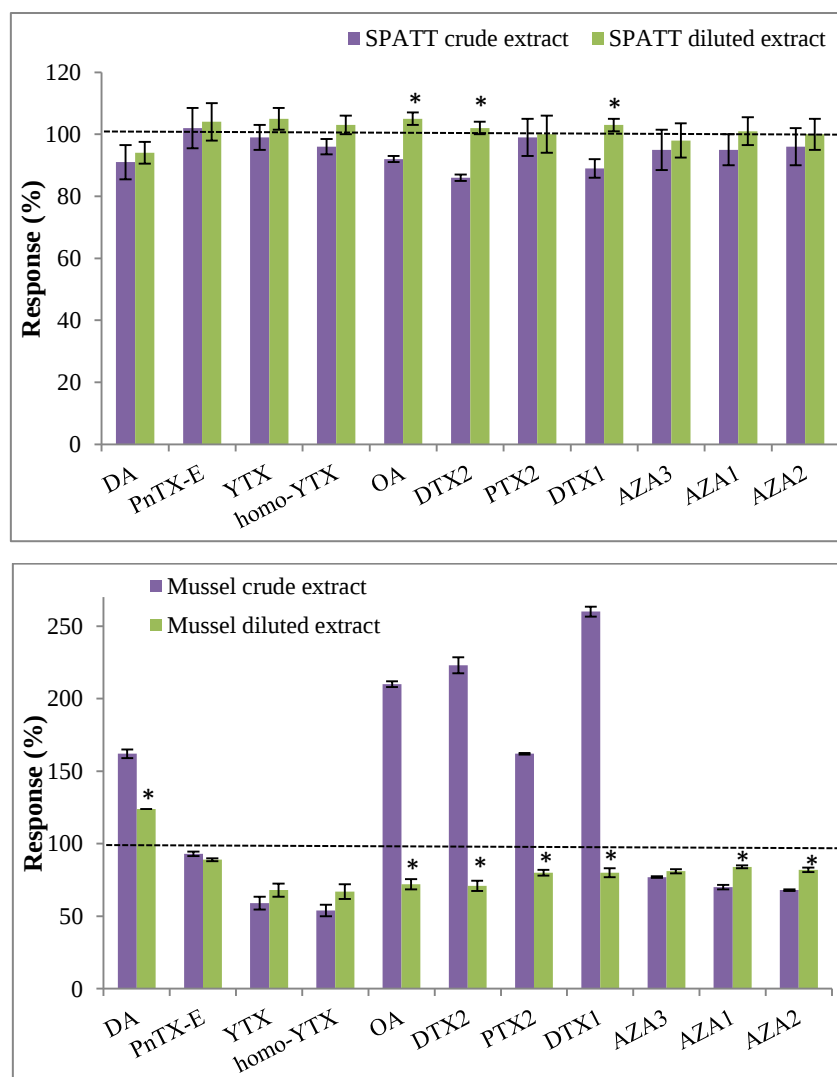


Figure I-4: Matrix effects on Q-ToF (% response compared to response in MeOH $\pm$ %RSD, $n=3$) obtained with calibration solutions prepared using crude or diluted SPATT (top) and mussel (bottom) extracts. Asterisk (*) indicates that response of diluted extracts for this matrix-toxin combination is statistically significantly different ($p < 0.05$) from the response in crude extracts (individual t-test for each matrix-toxin combination).

I.5.4. Low resolution vs high resolution mass spectrometry

Since matrix effects were observed on both low and high resolution analytical systems (section 3.2.1), analysis of high resolution mass spectra of our targeted toxins was undertaken. PTX2 in positive ionization and DTX1 in negative ionization were the toxins with the highest matrix effects, irrespective of the instrument used. High resolution full scan spectra at the retention times of these toxins showed more co-eluting compounds in mussel matrix than in passive sampler matrix (Figure I-5). As already discussed passive sampler extracts potentially contained less matrix components overall. Consequently, less co-elution would be expected during the analysis of these extracts. Despite matrix co-elution with DTX1 and PTX2, no interfering ions were observed when zooming in on the targeted m/z values of interest. These results suggest that mass interference played no role in the matrix effects observed. While HRMS could neither reduce nor remove matrix effects in this study, it does offer the ability to perform quantitative screening of known toxins as efficiently as low resolution MS/MS. In addition, HRMS also facilitates retrospective screening of any additional analogues or metabolites and enables untargeted screening *via* database screening and metabolomics software.

To illustrate the advantages of using full scan HRMS for untargeted analysis, chromatograms were plotted for all compounds potentially present in a SPATT and mussel sample taken at the same location and time (Figure 6). Both chromatograms exhibited a high number of compounds. The mussel sample contained significantly more compounds than the SPATT sample, either over the whole chromatogram or over the time span over which toxins eluted (Figure I-6). For clarity, Figure 6 shows only a single sample each of SPATT and mussel extracts, however, statistical assessment of non-targeted data was carried out on triplicate injections. In this particular case, the chromatograms were blank-subtracted after acquisition (see section 2.5). The blank subtraction removed on average 197 and 210 compounds from the SPATT and mussel chromatograms, respectively. After blank-subtraction, SPATT and mussel extracts contained 814 and 4562 compounds respectively. Moreover, the absolute abundances of compounds in the passive sampler were much lower (Figure I-6). Therefore, the data complexity is more than five-fold reduced by using passive samplers rather than complex biological models, such as mussels. Interestingly, approximately half of the compounds found in the passive samplers were also present in the mussel sample. This reflects well the fact that metabolites from micro-organisms (including algal metabolites) are efficiently adsorbed passively on the SPATT samplers in addition to

being actively ingested as particulate matter by mussels. The fact that on average 363 compounds were unique to extracts of the passive sampler also means that the passive samplers may capture compounds from the dissolved phase which are not available to mussels due to inefficient absorption via the gills. Such compounds may be derived from algal blooms that occurred elsewhere with dissolved metabolites being advected with currents to the sampling area. They may also be from cryptic organisms that are present in the sampling area, *e.g.* as benthic or epiphytic micro-algae, but are not available to filtration feeding mussels as the compounds are in the dissolved and not in the particulate phase. If this were indeed the case, then, the accumulation of dissolved compounds in the passive samplers may be considered to be an “over-estimation” of the risk that such compounds pose to the consumer of shellfish. However, in the case of non-targeted, exploratory analysis of waters from a coastal area, any overestimation could be considered to err on the side of caution. Inversely, the metabolism pathways that algal toxins undergo in shellfish may be considered a complexity that merits further exploration.

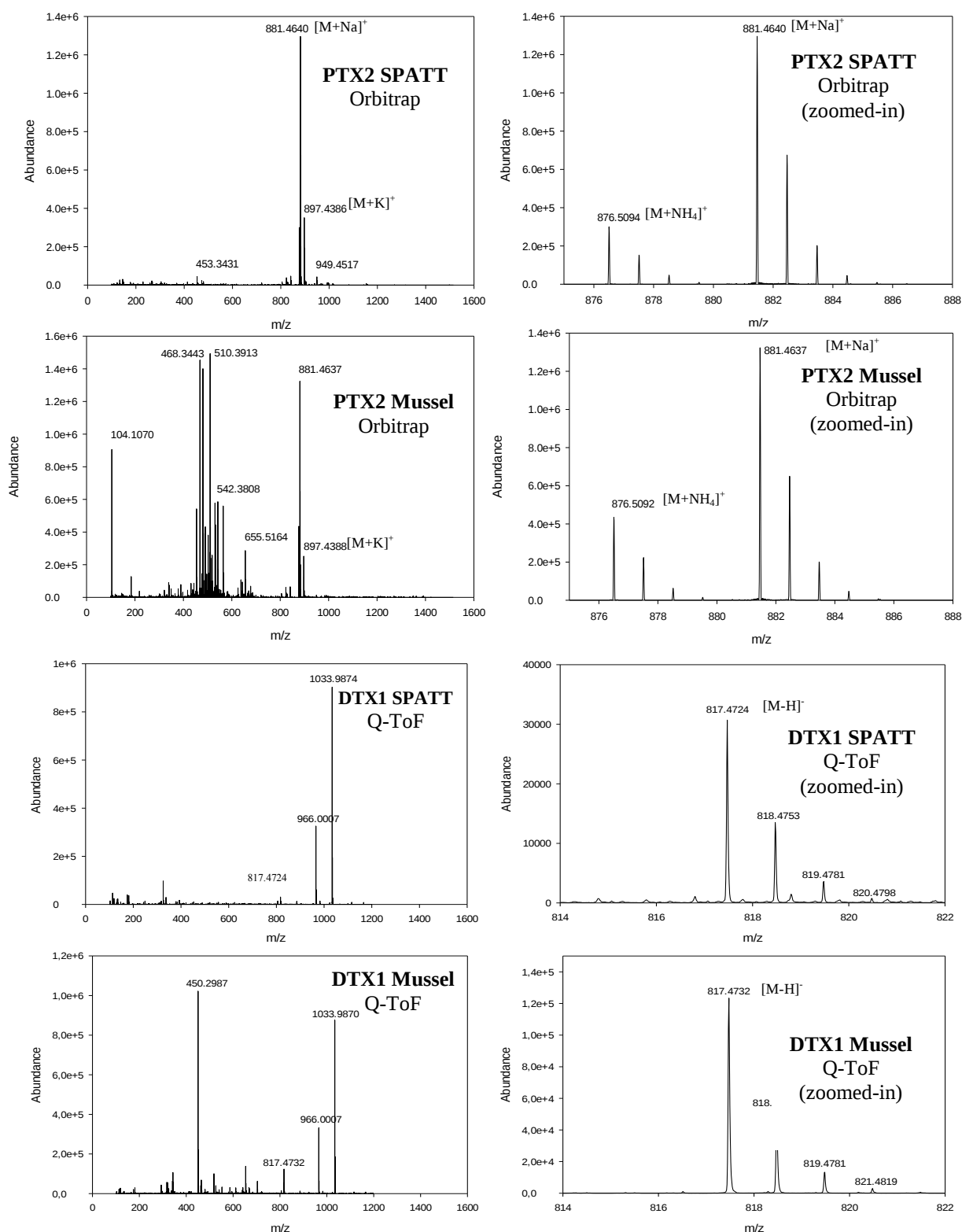


Figure I-5: PTX2 (Orbitrap) and DTX1 (Q-ToF) high resolution mass spectra on the apex of the peak for SPATT and mussel extracts. Images on the left-hand side represent the whole spectrum while images on the right-hand side are zoomed-in on the m/z of interest, showing no interfering masses. *Nota bene:* the ion m/z 966.0007 in Q-ToF spectra is from the continuously infused reference mass.

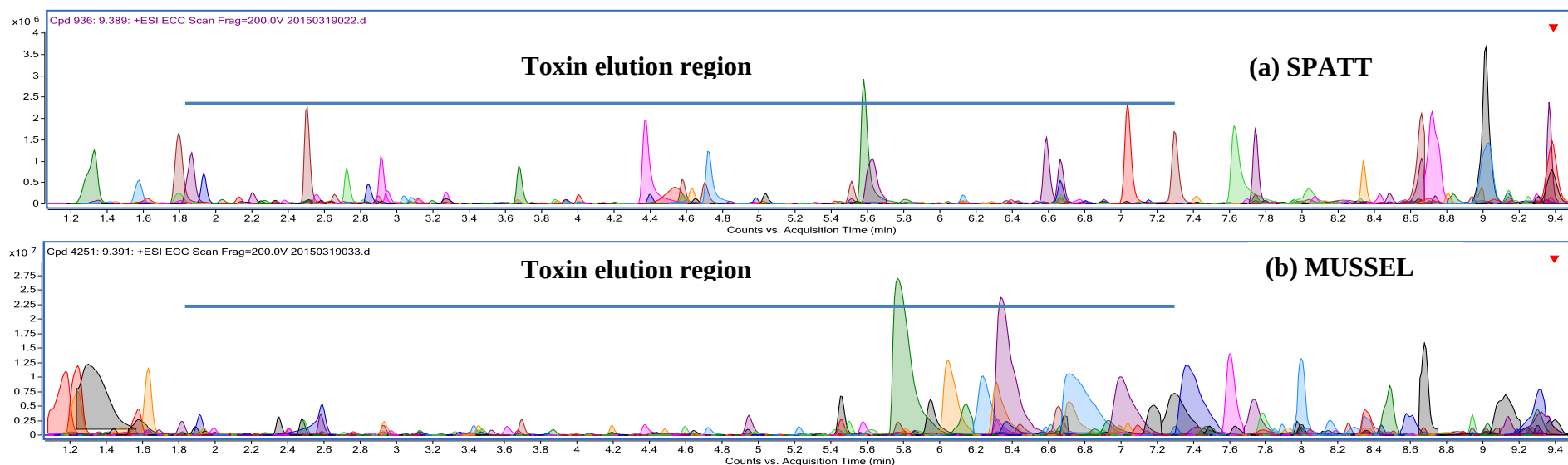


Figure I-6: Total compound chromatogram (TCC) of the spiked blank SPATT sample (a) and blank mussel sample (b), both deployed at Villefranche during the same week. TCCs were obtained using the “Find by Molecular Feature”-algorithm and show the complexity of each sample (all compounds from 1 to 9.5 min). The TCC was blank-subtracted, i.e. compounds appearing in blank solvent or blank HP20 matrix extracts were removed. There were 936 compounds present in the SPATT sample and 4251 compounds present in mussel sample. The number of compounds in the region where toxins eluted (1.8 – 7.3 min) was 619 and 2542 for the SPATT and the mussel sample, respectively. *Nota bene*: the scale of the TCC for the SPATT sample is ca. eight times lower than that of the mussel sample, reflecting a reduced total abundance of matrix compounds in SPATT matrix.

I.5.5. Accuracy and detection limits

Mussel tissue CRMs were analyzed to assess the accuracy of the method. For many toxins recoveries were acceptable, ranged from 80% to 120% on low and high resolution systems, and were comparable between the different instruments (Table I-3). This was not the case for DA on the QToF (121%), PTX2 on all instruments (123-135%), YTX on the Orbitrap and Q-ToF (52% and 51%, respectively) and for OA (64%) and AZA3 (72%) on the Q-ToF. The CRM results were not entirely consistent with the matrix effects observed in the evaluation work for the same toxins (Figure 2), however, the type and magnitude of observed matrix effects were generally consistent. Recoveries for the CRMs were calculated based on methanol calibration solutions. As the CRM matrices were different from the mussel sample matrix used in the matrix effect evaluation study it is not surprising that the CRM recoveries were not entirely consistent with the observed matrix effects.

Table I-3: Recoveries from CRMs (% $\pm$ RSD; n=3): CRM-ASP-mus-d (DA), CRM-DSP-mus-c (OA, DTX1 and -2), CRM-AZA-mus-d (AZA1, -2 and -3) and CRM-FDMT-1 (13-desmeSPX-C, PTX2). (*) The authentic NRC CRM certificates should be referred to for the original certified values.

<i>Toxin</i>	<i>Target value*</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recoveries (%)		
		QqQ	Q-ToF	Orbitrap
DA	49 $\pm$ 3	104 $\pm$ 2	121 $\pm$ 1	117 $\pm$ 1
13-desmeSPX-C*	2.7 $\pm$ 0.14	92 $\pm$ 6	90 $\pm$ 4	88 $\pm$ 1
AZA1	1.16 $\pm$ 0.10	83 $\pm$ 7	88 $\pm$ 2	95 $\pm$ 2
AZA2	0.27 $\pm$ 0.02	98 $\pm$ 1	106 $\pm$ 1	112 $\pm$ 2
AZA3	0.21 $\pm$ 0.02	90 $\pm$ 5	72 $\pm$ 4	109 $\pm$ 3
PTX2	0.68 $\pm$ 0.06	135 $\pm$ 3	134 $\pm$ 4	123 $\pm$ 11
OA	1.05 $\pm$ 0.8	97 $\pm$ 3	64 $\pm$ 25	97 $\pm$ 15
DTX1	1.05 $\pm$ 0.02	94 $\pm$ 5	85 $\pm$ 46	120 $\pm$ 4
DTX2	0.85 $\pm$ 0.02	121 $\pm$ 5	76 $\pm$ 24	112 $\pm$ 2
YTX	2.57 $\pm$ 0.25	81 $\pm$ 8	51 $\pm$ 40	52 $\pm$ 4

Instrumental limits of detection (LoDs) were equivalent between instruments, with the exception of YTX and homo-YTX on the QqQ which gave the lowest detection limits, and OA where the QqQ gave the highest detection limit (Table I-4). LoDs varied between analytes

but also between matrices. Indeed, lower LoDs were expected for PTX2 in mussel compared to passive sampler, as the mussel matrix caused ion enhancement for PTX2. This was not the case, perhaps reflecting the high level of variability previously associated with this toxin [6, 13]. With regard to regulatory levels for toxins, satisfactory detection limits were obtained on both low and high resolution mass spectrometers for methanol, mussel and SPATT matrices. Even for the OA-group which had relatively high LoDs, the sum of detection limits results in a limit of quantitation (LoQ) of $\sim 51 \mu\text{g OA-equivalent kg}^{-1}$ shellfish matrix. To obtain this value the individual LoDs were weighted by the relative toxicity of the analogues and summed up. The toxicity of DTX1 is the same as that of OA while the toxicity of DTX2 is only half that of OA. Subsequently, the sum of weighted LoDs was multiplied by 3 to obtain the LoQ. This is approximately three times below the regulatory limit for this group ($160 \mu\text{g kg}^{-1}$ OA-equivalents). In general the good detection limits obtained with HRMS for the other toxins illustrated the capacity for quantitative screening of toxins in comparison with more conventional LRMS approaches. The significant added advantage of HRMS is the ability to perform full scan and MS/MS acquisitions simultaneously [15, 16], and thus enable retrospectively evaluation of data.

I.6. CONCLUSIONS

LRMS and HRMS were compared for quantitative and qualitative screening on toxins in mussels and passive samplers. Matrix effects were similar on all instruments (*e.g.* ion enhancement for PTX2, OA, DTX1 and DTX2), and generally were consistent with previously published results. There were significantly less matrix effects associated with passive samplers than mussels, regardless of the toxin or the instrument used. While high resolution would not be expected to alleviate matrix effects, it was demonstrated that the matrix effect issue for toxin measurement by LC-MS was not mass interference during ion detection. Acquisition of high resolution mass spectra enabled visualization of co-eluting compounds and clarified the absence of interfering masses.

Accuracy was good with all analytical systems. An approach such as matrix-matched calibration can be used to correct matrix effects, but to do so effectively would require a blank matrix which affects ionization to the same extent as the matrix of samples of interest. Sample dilution significantly reduced matrix effects in mussel matrix, while it made the issue effectively negligible for the passive sampler matrix. For PTX2, quantitation using the

ammonium-adduct led to ion enhancement compared to the sodium-adduct; however, the ammonium adduct yields more fragments for comprehensive confirmation.

This study assessed parameters involved in quantitative analysis of biotoxins in mussels and passive samplers, using LRMS and HRMS. The minimal matrix effects associated with passive samplers, as well as the reduced data complexity, means that passive sampling in combination with HRMS is a technique with great utility for non-targeted screening of algal toxins in the marine environment.

Table I-4: Detection limits (LoDs) in ng analyte mL⁻¹ injected solution (3 µL injected of either methanol, SPATT or mussel matrix solutions) and in µg kg⁻¹ (mussel matrix) on QqQ, Q-ToF and Orbitrap.

<i>Toxin</i>	Detection limits (ng mL ⁻¹)									Detection limits (µg kg ⁻¹)		
	QqQ			Q-ToF			Orbitrap			Mussel		
	MeOH	Spatt	Mussel	MeOH	Spatt	Mussel	MeOH	Spatt	Mussel	QqQ	Q-ToF	Orbitrap
<i>DA</i>	3.07	1.17	2.87	1.27	1.06	2.53	1.60	1.64	2.41	28.7	25.3	24.1
<i>GYM-A</i>	0.10	0.01	0.16	0.003	0.03	0.09	0.01	0.01	0.09	1.61	0.90	0.87
<i>PnTX-E</i>	0.03	0.06	0.05	0.07	0.01	0.05	0.01	0.08	0.01	0.46	0.47	0.09
<i>13-desmeSPX-C</i>	0.04	0.06	0.41	0.02	0.05	0.02	0.02	0.02	0.03	4.13	0.15	0.30
<i>PnTX-F</i>	0.02	0.05	0.01	0.02	0.02	0.03	0.01	0.01	0.03	0.07	0.31	0.31
<i>PnTX-G</i>	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.03	0.22	0.09	0.29
<i>YTX</i>	0.34	0.71	1.24	1.82	1.51	2.15	1.83	1.71	3.35	12.4	21.5	33.5
<i>homo-YTX</i>	0.29	0.51	1.18	0.69	1.76	1.74	1.58	2.60	0.54	11.8	17.4	5.39
<i>OA</i>	2.29	1.88	1.43	0.23	0.65	0.17	0.15	0.34	0.56	14.3	1.67	5.6
<i>DTX2</i>	0.47	0.48	0.20	0.12	0.08	0.19	0.41	0.42	0.30	1.95	1.94	3.02
<i>PTX2</i>	0.10	0.55	0.10	0.06	0.07	0.17	0.08	0.06	0.12	1.00	1.66	1.20
<i>DTX1</i>	0.12	0.03	0.19	0.15	0.08	0.33	0.44	0.11	0.49	1.94	3.29	4.91
<i>AZA3</i>	0.03	0.04	0.05	0.05	0.03	0.05	0.01	0.03	0.06	0.45	0.52	0.64
<i>AZA1</i>	0.09	0.06	0.14	0.06	0.03	0.04	0.02	0.01	0.02	1.36	0.40	0.20
<i>AZA2</i>	0.18	0.08	0.21	0.06	0.07	0.11	0.01	0.04	0.24	2.14	1.07	2.38

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interest.

Aknowledgments

This study was carried out under the Coselmar project supported by Ifremer and Nantes University and co-funded by the Regional Council of the “Pays de la Loire”. The authors thank Thomas Glauner, Maxime Grives, John Lee and Thierry Faye of Agilent Technologies for their collaboration on the Agilent Q-ToF technology and software. The authors would also like to acknowledge Jean-Philippe Antignac (Laberca-ONIRIS, Nantes, France) for valuable discussions. We also thank all the members of the Laboratoire Phycotoxines at the Atlantic Centre of Ifremer and the Biotoxin Metrology team at the National Research Council of Halifax, for their help and advice during this study.

References

- [1] G.P. Rossini, P. Hess, Phycotoxins: chemistry, mechanisms of action and shellfish poisoning, *Exs*, 100 (2010) 65-122.
- [2] P. Hess, B. Grune, D.B. Anderson, T. Aune, L.M. Botana, P. Caricato, H.P. van Egmond, M. Halder, S. Hall, J.F. Lawrence, C. Moffat, R. Poletti, J. Richmond, G.P. Rossini, C. Seamer, J.S. Vilageliu, Three Rs approaches in marine biotoxin testing - The report and recommendations of a joint ECVAM/DG SANCO workshop (ECVAM workshop 55), *ATLA-Altern. Lab. Anim.*, 34 (2006) 193-224.
- [3] EURL, EU Reference Laboratory Marine Biotoxins, web-site, last accessed on 21 February 2013:
http://www.aesan.msssi.gob.es/en/CRLMB/web/procedimientos_crlmb/crlmb_standard_operating_procedures.shtml, in, 2011.
- [4] A. Brana-Magdalena, J. Manuel Leao-Martins, T. Glauner, A. Gago-Martinez, Infra laboratory Validation of a Fast and Sensitive UHPLC/MS/MS Method with Fast Polarity Switching for the Analysis of Lipophilic Shellfish Toxins, *Journal of Aoac International*, 97 (2014) 285-292.

- [5] E. Fux, D. McMillan, R. Bire, P. Hess, Development of an ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins, *Journal of chromatography. A*, 1157 (2007) 273-280.
- [6] H.J. van den Top, A. Gerssen, P. McCarron, H.P. van Egmond, Quantitative determination of marine lipophilic toxins in mussels, oysters and cockles using liquid chromatography-mass spectrometry: inter-laboratory validation study, *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 28 (2011) 1745-1757.
- [7] A. These, C. Klemm, I. Nausch, S. Uhlig, Results of a European interlaboratory method validation study for the quantitative determination of lipophilic marine biotoxins in raw and cooked shellfish based on high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Part I: collaborative study, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 399 (2011) 1245-1256.
- [8] P. McNabb, A.I. Selwood, P.T. Holland, Multiresidue method for determination of algal toxins in shellfish: Single-laboratory validation and interlaboratory study, *Journal of Aoac International*, 88 (2005) 761-772.
- [9] M.A. Quilliam, P. Hess, C. Dell'Aversano, Recent developments in the analysis of phycotoxins by liquid chromatography-mass spectrometry, in, 2001, pp. 383-391.
- [10] H.Y. Wu, M.M. Guo, Z.J. Tan, H.Y. Cheng, Z.X. Li, Y.X. Zhai, Liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry for multiclass screening and identification of lipophilic marine biotoxins in bivalve mollusks, *Journal of Chromatography A*, 1358 (2014) 172-180.
- [11] P. McCarron, E. Wright, M.A. Quilliam, Liquid Chromatography/Mass Spectrometry of Domoic Acid and Lipophilic Shellfish Toxins with Selected Reaction Monitoring and Optional Confirmation by Library Searching of Product Ion Spectra, *Journal of Aoac International*, 97 (2014) 316-324.
- [12] P. McCarron, S.D. Giddings, K.L. Reeves, P. Hess, M.A. Quilliam, A mussel (*Mytilus edulis*) tissue certified reference material for the marine biotoxins azaspiracids, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407 (2015) 2985-2996.
- [13] P. McCarron, S.D. Giddings, M.A. Quilliam, A mussel tissue certified reference material for multiple phycotoxins. Part 2: liquid chromatography-mass spectrometry, sample extraction and quantitation procedures, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400 (2011) 835-846.

- [14] P. Blay, J.P. Hui, J. Chang, J.E. Melanson, Screening for multiple classes of marine biotoxins by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400 (2011) 577-585.
- [15] A. Domenech, N. Cortes-Francisco, O. Palacios, J.M. Franco, P. Riobo, J.J. Llerena, S. Vichi, J. Caixach, Determination of lipophilic marine toxins in mussels. Quantification and confirmation criteria using high resolution mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1328 (2014) 16-25.
- [16] G. Orellana, J. Vanden Bussche, L. Van Meulebroek, M. Vandegheuchte, C. Janssen, L. Vanhaecke, Validation of a confirmatory method for lipophilic marine toxins in shellfish using UHPLC-HR-Orbitrap MS, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406 (2014) 5303-5312.
- [17] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Analytical chemistry*, 75 (2003) 3019-3030.
- [18] J.P. Antignac, K. de Wasch, F. Monteau, H. De Brabander, F. Andre, B. Le Bizec, The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue, *Analytica chimica acta*, 529 (2005) 129-136.
- [19] R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah, Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11 (2000) 942-950.
- [20] H. Trufelli, P. Palma, G. Famiglini, A. Cappiello, An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry, *Mass spectrometry reviews*, 30 (2011) 491-509.
- [21] T. Benijts, R. Dams, W. Lambert, A. De Leenheer, Countering matrix effects in environmental liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals, *Journal of Chromatography A*, 1029 (2004) 153-159.
- [22] F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M.C. Gennaro, Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 3929-3937.
- [23] A. Gerssen, M.A. McElhinney, P.P.J. Mulder, R. Bire, P. Hess, J. de Boer, Solid phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid

chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 394 (2009) 1213-1226.

[24] J. Kilcoyne, E. Fux, Strategies for the elimination of matrix effects in the liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of the lipophilic toxins okadaic acid and azaspiracid-1 in molluscan shellfish, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 7123-7130.

[25] E. Fux, D. Rode, R. Bire, P. Hess, Approaches to the evaluation of matrix effects in the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis of three regulated lipophilic toxin groups in mussel matrix (*Mytilus edulis*), *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 25 (2008) 1024-1032.

[26] S. Ito, K. Tsukada, Matrix effect and correction by standard addition in quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins, *Journal of Chromatography A*, 943 (2002) 39-46.

[27] A. Furey, J. Crowley, B. Hamilton, M. Lehane, K.J. James, Strategies to avoid the mis-identification of anatoxin-a using mass spectrometry in the forensic investigation of acute neurotoxic poisoning, *Journal of Chromatography A*, 1082 (2005) 91-97.

[28] F. Mondegue, J.P. Antignac, Y. Guitton, F. Monteau, S. LeBorgne, P. Hess, Nouvelle stratégie de caractérisation non ciblée de type métabolomique au service de l'identification de composés bioactifs accumulés dans les mollusques bivalves., *Spectra Analyse*, 284 (2012) 24-33.

[29] R.B. Cole, J.-C. Tabet, J.-C. Blais, Stabilities of fast atom bombardment desorbed alkali metal adducts of pyrimidine molecules, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 98 (1990) 269-283.

[30] L. MacKenzie, V. Beuzenberg, P. Holland, P. McNabb, A. Selwood, Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): a new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 44 (2004) 901-918.

[31] E. Fux, R. Bire, P. Hess, Comparative accumulation and composition of lipophilic marine biotoxins in passive samplers and in mussels (*M. edulis*) on the West Coast of Ireland, *Harmful Algae*, 8 (2009) 523-537.

[32] M. McCarthy, F.N.A.M. van Pelt, V. Bane, J. O'Halloran, A. Furey, Application of passive (SPATT) and active sampling methods in the profiling and monitoring of marine biotoxins, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 89 (2014) 77-86.

- [33] Z. Zendong, C. Herrenknecht, E. Abadie, C. Brissard, C. Tixier, F. Mondegue, V. Sechet, Z. Amzil, P. Hess, Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 91 (2014) 57-68.
- [34] J.-P. Lacaze, *New trends in Marine Freshwater Toxins*, Nova Science Publishers, Inc, 2012.
- [35] M. Garcia-Altares, A. Casanova, V. Bane, J. Diogene, A. Furey, P. de la Iglesia, Confirmation of Pinnatoxins and Spirolides in Shellfish and Passive Samplers from Catalonia (Spain) by Liquid Chromatography Coupled with Triple Quadrupole and High-Resolution Hybrid Tandem Mass Spectrometry, *Marine drugs*, 12 (2014) 3706-3732.
- [36] G. Pizarro, A. Morono, B. Paz, J.M. Franco, Y. Pazos, B. Reguera, Evaluation of passive samplers as a monitoring tool for early warning of dinophysis toxins in shellfish, *Marine drugs*, 11 (2013) 3823-3845.
- [37] C. Brissard, F. Herve, M. Sibat, V. Sechet, P. Hess, Z. Amzil, C. Herrenknecht, Characterization of ovatoxin-h, a new ovatoxin analog, and evaluation of chromatographic columns for ovatoxin analysis and purification, *Journal of Chromatography A*, 1388 (2015) 87-101.
- [38] EU-RL-MB, EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS, in, EU-RL-MB, 2011, pp. 31.
- [39] T. Suzuki, V. Beuzenberg, L. Mackenzie, M.A. Quilliam, Liquid chromatography-mass spectrometry of spiroketal stereoisomers of pectenotoxins and the analysis of novel pectenotoxin isomers in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand, *Journal of Chromatography A*, 992 (2003) 141-150.
- [40] C. Alfonso, N. Rehmann, P. Hess, A. Alfonso, C.B. Wandscheer, M. Abuin, C. Vale, P. Otero, M.R. Vieytes, L.M. Botana, Evaluation of Various pH and Temperature Conditions on the Stability of Azaspiracids and Their Importance in Preparative Isolation and Toxicological Studies, *Analytical chemistry*, 80 (2008) 9672-9680.
- [41] A.I. Selwood, C.O. Miles, A.L. Wilkins, R. van Ginkel, R. Munday, F. Rise, P. McNabb, Isolation, structural determination and acute toxicity of pinnatoxins E, F and G, *Journal of agricultural and food chemistry*, 58 (2010) 6532-6542.
- [42] A.G. Brenton, A.R. Godfrey, Accurate Mass Measurement: Terminology and Treatment of Data, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21 (2010) 1821-1835.

- [43] J. Vial, A. Jardy, Experimental comparison of the different approaches to estimate LOD and LOQ of an HPLC method, *Analytical chemistry*, 71 (1999) 2672-2677.
- [44] M.M. Sanagi, S.L. Ling, Z. Nasir, D. Hermawan, W.A.W. Ibrahim, A. Abu Naim, Comparison of Signal-to-Noise, Blank Determination, and Linear Regression Methods for the Estimation of Detection and Quantification Limits for Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography, *Journal of Aoac International*, 92 (2009) 1833-1838.
- [45] Agilent, Agilent Metabolomics Workflow Rev. B, http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/5990-7067EN_MetabolomicsDiscoveryWorkflow_Guide_B.pdf, in, website, 29 Oct 2012, last accessed 24/06/2015.
- [46] S.C. Moldoveanu, V. David, Chapter 6 - Stationary Phases and Their Performance, in: S.C.M. David (Ed.) *Essentials in Modern HPLC Separations*, Elsevier, 2013, pp. 191-362.
- [47] E. Fux, C. Marcaillou, F. Mondeguer, R. Bire, P. Hess, Field and mesocosm trials on passive sampling for the study of adsorption and desorption behaviour of lipophilic toxins with a focus on OA and DTX1, *Harmful Algae*, 7 (2008) 574-583.

Supplementary Material

High resolution mass spectrometry for quantitative analysis and untargeted screening of algal toxins in mussels and passive samplers

Table S1: Characteristics of Kinetex columns tested for optimum toxins separation as given by the manufacturer. Void volumes estimated from injections of thiourea.

S1: Detailed procedure for drift correction.

Table S2: Elution orders and resolutions obtained with acetonitrile (a) and methanol (b) mobile phases on three Kinetex columns from the same dimensions (100 x 2.1mm; 2.6µm. Resolutions always refer to the separation between the compound in this row and the next eluting compound (in the following row).

Figure S1: Comparison of sensitivity (Abundance $\pm$ SD, n=3) for some toxins, obtained on the QqQ using Kinetex XB-C18 (150 x 2.1 mm; 2.6 µm) and ACN or MeOH mobile phases.

Figure S2: HPLC-scheduled MRM chromatogram in ESI⁺ and ESI⁻, on the Phenomenex Kinetex XB-C18 (100 x 2.1 mm; 2.6µm) with the optimized gradient for the small set of toxins for which matrix effects were evaluated.

Table S3: Mass measurement for toxins obtained on (a) Q-ToF and (b) Orbitrap with MeOH, SPATT and mussel samples. Errors and SD expressed as ppm (n=3).

Table S4: Methanol and matrix-matched calibration curves data from triplicate injection of eight calibration points (including the blank extract) obtained on (a) QqQ, (b) Q-ToF and (c) Orbitrap.

Table S1: Characteristics of Kinetex columns tested for optimum toxins separation as given by the manufacturer. Void volumes were estimated from injections of thiourea.

Stationary phase	Column dimension (mm×mm)	Particle size (µm)	Pore size (Å)	Void volume (mL)	Specific surface area (m ² /g)	Carbon load %	Bonding type	TMS End-capped
Kinetex (C ₁₈)	100 × 2.1	2.6	100	0.195	200	12	C ₁₈	Yes
Kinetex (XB-C ₁₈)	100 × 2.1	2.6	100	0.195	200	10	C ₁₈ , with di-isobutyl side chains	Yes
Kinetex (Biphenyl)	100 × 2.1	2.6	100	0.195	200	11	Biphenyl	Yes

S1: Detailed procedure for drift correction.

The replicate injections of the control standard were further used to check for any instrumental drift throughout the injection sequence: using the Excel Analysis ToolPack add-in tool, a linear regression was calculated for the check standard from X (injection number) and Y (analyte peak area). There was a drift if a correlation between the injection number X and the peak area was observed. The drift was thus corrected using the formula below:

$$\text{Area}_{\text{corr}} = \text{Area}_{\text{raw}} * \left[\frac{\text{slope} * \text{Inj\#}_{\text{final}} + \text{Intercept}}{\text{slope} * \text{Inj\#}_{\text{current}} + \text{Intercept}} \right]$$

Where

Area_{Corr} = area corrected for linear drift

Area_{Raw} = peak area from raw data before correction

Slope = slope of least squares fit where X = injection# and Y = peak area, taken from regression analysis (X variable 1 coefficient)

Intercept = intercept of least squares fit, also taken from regression analysis (Intercept coefficient)

Inj#_{final} = injection # of the last check standard used

Inj#_{current} = injection # of the particular sample that is being corrected for instrumental drift

Table S2: Elution orders and resolutions obtained with acetonitrile (a) and methanol (b) mobile phases on three Kinetex columns from the same dimensions (100 x 2.1mm; 2.6µm). Resolutions always refer to the separation between the compound in this row and the next eluting compound (in the following row).

<i>(a) Acetonitrile</i>					
Kinetex C18		Kinetex XB-C18		Kinetex Biphenyl	
<i>Elution order</i>	<i>Resolution (Rs)</i>	<i>Elution order</i>	<i>Resolution (Rs)</i>	<i>Elution order</i>	<i>Resolution (Rs)</i>
DA	27	DA	26	DA	37.8
GYM A	6.2	GYM A	7.3	GYM A	2.0
PnTX-E	3.2	PnTX-E	3.3	PnTX-E	6.2
13-desmeSPX-C	5.5	13-desmeSPX-C	5.9	13-desmeSPX-C	4.9
PnTX-F	2.1	PnTX-F	2.0	PnTX-F	2.8
PnTX-G	17.6	PnTX-G	25.0	PnTX-G	4.2
YTX. homo-YTX	2.0	YTX. homo-YTX	3.2	YTX. homo-YTX	7.2
OA	4.6	OA	4.5	OA	3.0
DTX 2	4.2	DTX 2	3.3	DTX 2	7.1
AZA 3	0.0	PTX 2	6.9	DTX 1	0.1
PTX 2	6.6	AZA 3	1.1	PTX 2	5.8
AZA 1	1.1	DTX 1	6.6	AZA 3	4.2
DTX 1	2.3	AZA 1	3.4	BTX 2	1.1
AZA 2	4.5	BTX 2	1.1	AZA 1	2.4
BTX 2	6.5	AZA 2	3.7	BTX 1	0.7
BTX 1		BTX 1		AZA 2	

<i>(b) Methanol</i>					
Kinetex C18		Kinetex XB-C18		Kinetex Biphenyl	
<i>Elution order</i>	<i>Resolution (Rs)</i>	<i>Elution order</i>	<i>Resolution (Rs)</i>	<i>Elution order</i>	<i>Resolution (Rs)</i>
<i>DA</i>	21	<i>DA</i>	19	<i>DA</i>	41.1
<i>GYM A</i>	13.9	<i>GYM A</i>	13.5	<i>GYM A</i>	7.6
<i>13-desmeSPX-C</i>	7.7	<i>13-desmeSPX-C</i>	7.0	<i>PnTX-E</i>	5.5
<i>PnTX-E</i>	1.8	<i>PnTX-E</i>	1.6	<i>13-desmeSPX-C</i>	3.1
<i>PnTX-F</i>	4.7	<i>PnTX-F</i>	3.2	<i>PnTX-F</i>	1.8
<i>PnTX-G</i>	29.2	<i>PnTX-G</i>	30.5	<i>PnTX-G</i>	16.7
<i>PTX 2</i>	1.1	<i>PTX 2</i>	0.0	<i>OA</i>	0.0
<i>OA</i>	1.2	<i>OA</i>	2.3	<i>BTX 1</i>	2.2
<i>DTX 2</i>	1.8	<i>DTX 2</i>	3.4	<i>DTX 2</i>	0.0
<i>YTX. homo-YTX</i>	0.0	<i>AZA 3</i>	0.4	<i>YTX. homo-YTX</i>	2.2
<i>AZA 3</i>	2.5	<i>DTX 1</i>	3.1	<i>DTX 1</i>	2.2
<i>DTX 1</i>	1.2	<i>AZA 1</i>	2.1	<i>BTX 2</i>	4.4
<i>AZA 1</i>	2.3	<i>YTX. homo-YTX</i>	0.0	<i>PTX 2</i>	6.9
<i>AZA 2</i>	1.2	<i>AZA 2</i>	2.3	<i>AZA 3</i>	3.4
<i>BTX 2</i>	3.4	<i>BTX 2</i>	4.0	<i>AZA 1</i>	2.5
<i>BTX 1</i>		<i>BTX 1</i>		<i>AZA 2</i>	

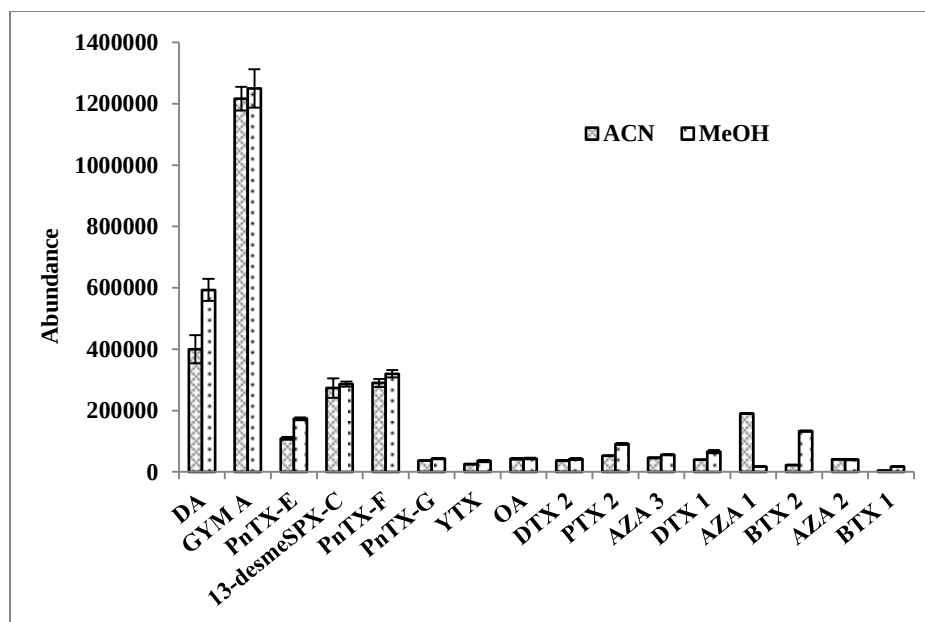


Figure S1: Comparison of sensitivity (Abundance $\pm$ SD, n=3) for some toxins, obtained on the QqQ using Kinetex XB-C18 (150 x 2.1 mm; 2.6 μ m) and ACN or MeOH mobile phases.

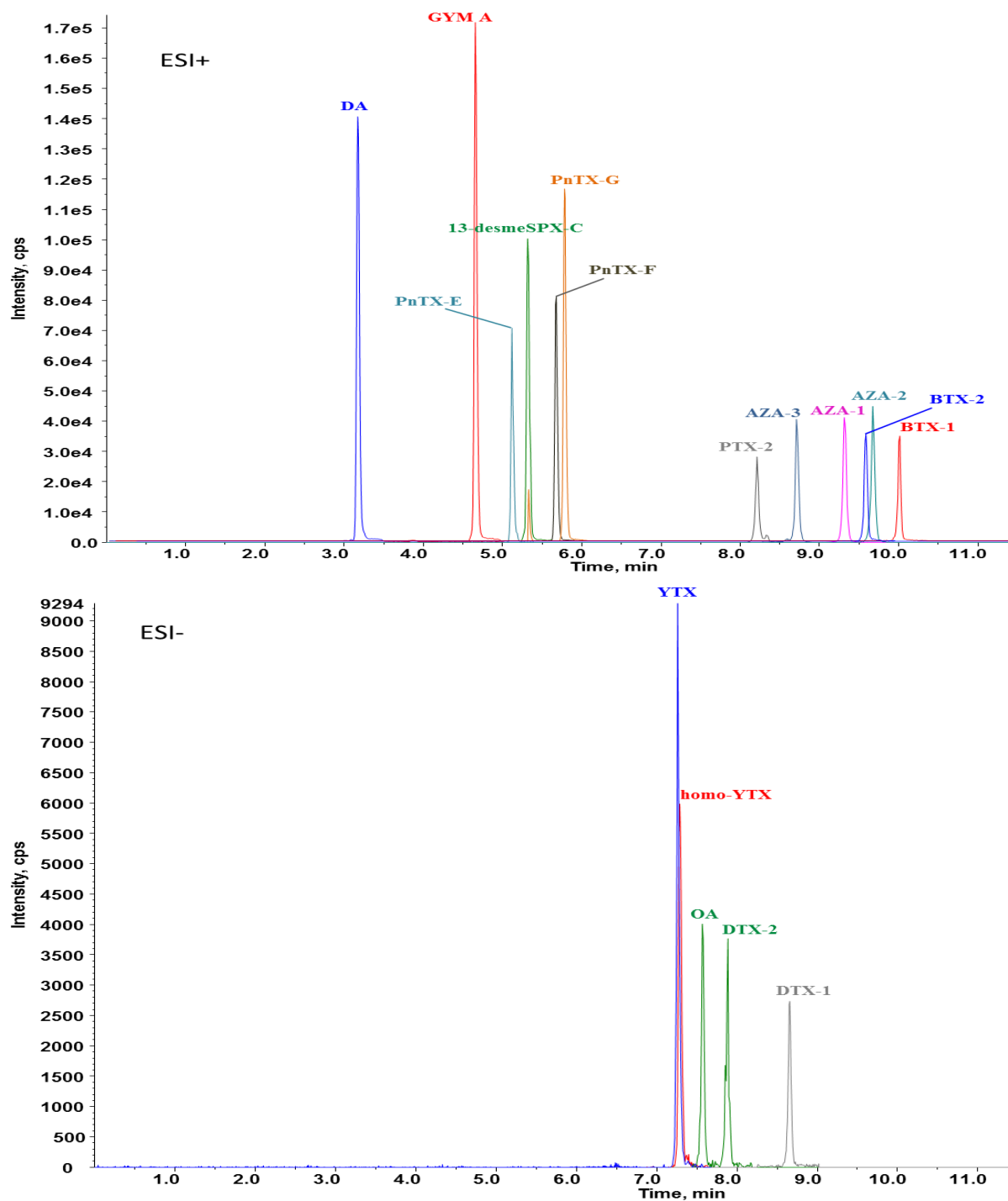


Figure S2: HPLC-scheduled MRM chromatogram in ESI⁺ and ESI⁻, on the Phenomenex Kinetex XB-C18 (100 x 2.1 mm; 2.6µm) with the optimized gradient for the small set of toxins for which for matrix effects were evaluated.

Table S3: Mass measurement for toxins obtained on (a) Q-ToF and (b) Orbitrap with MeOH, SPATT and mussel samples. Errors and SD expressed as ppm (n=3).

(a) Q-ToF								
			Methanol		SPATT		Mussel	
<i>Compound Name</i>	<i>Detected ion</i>	<i>Calculated m/z</i>	<i>Measured m/z</i>	<i>Error (SD)</i>	<i>Measured m/z</i>	<i>Error (SD)</i>	<i>Measured m/z</i>	<i>Error (SD)</i>
<i>DA</i>	[M+H] ⁺	312.1442	312.1438	1.28 (0.64)	312.1440	0.75 (0.18)	312.1436	1.92 (0.85)
<i>GYM-A</i>	[M+H] ⁺	508.3421	508.3415	1.18 (1.56)	508.3415	1.18 (0.71)	508.3412	1.77 (0.68)
<i>13-desmeSPX-C</i>	[M+H] ⁺	692.4521	692.4511	1.44 (1.18)	692.4515	1.01 (1.04)	692.4509	1.68 (0.46)
<i>PnTX-G</i>	[M+H] ⁺	694.4677	694.4676	0.86 (0.29)	694.4677	0.19 (0.08)	694.4669	1.10 (0.74)
<i>PnTX-E</i>	[M+H] ⁺	784.4994	784.5000	0.89 (0.64)	784.4978	2.08 (0.99)	784.4977	2.12 (0.27)
<i>PnTX-F</i>	[M+H] ⁺	766.4889	766.4881	1.35 (0.85)	766.4880	1.48 (0.92)	766.4889	1.09 (0.42)
<i>AZA1</i>	[M+H] ⁺	842.5049	842.5044	0.63 (0.30)	842.4705	1.27 (0.45)	842.5026	2.69 (0.45)
<i>AZA2</i>	[M+H] ⁺	856.5206	856.5188	2.10 (0.40)	856.5191	1.71 (1.25)	856.5202	0.70 (0.51)
<i>AZA3</i>	[M+H] ⁺	828.4893	828.4886	0.84 (0.91)	828.4875	2.13 (0.97)	828.4869	2.94 (2.37)
<i>PTX2</i>	[M+NH ₄] ⁺	876.5104	876.5086	2.09 (1.74)	876.5091	1.75 (1.13)	876.5091	2.28 (1.51)
<i>OA</i>	[M-H] ⁻	803.4587	803.4570	2.16 (0.14)	803.4567	2.45 (0.52)	803.4577	1.29 (0.14)
<i>DTX2</i>	[M-H] ⁻	803.4587	803.4569	2.20 (0.64)	803.4567	2.53 (0.50)	803.4577	1.24 (0.12)
<i>DTX1</i>	[M-H] ⁻	817.4744	817.4725	2.28 (0.46)	817.4727	2.12 (0.19)	817.4737	0.90 (0.25)
<i>YTX</i>	[M-H] ⁻	1141.4717	1141.4678	3.42 (0.18)	1141.4680	3.27 (0.05)	1141.4682	3.04 (0.27)
<i>homo-YTX</i>	[M-H] ⁻	1155.4874	1155.4843	2.71 (0.64)	1155.4839	3.06 (0.48)	1155.4838	3.09 (0.30)

Compound Name	Detected ion	Calculated m/z	(b) Orbitrap					
			Methanol		SPATT		Mussel	
			Measured m/z	Error (SD)	Measured m/z	Error (SD)	Measured m/z	Error (SD)
DA	[M+H] ⁺	312.1442	312.1438	1.38 (0.17)	312.1439	1.12 (0.22)	312.1441	0.31 (0.30)
GYM-A	[M+H] ⁺	508.3421	508.3416	0.94 (0.46)	508.3417	0.74 (0.44)	508.3417	0.84 (0.27)
13-desmeSPX-C	[M+H] ⁺	692.4521	692.4508	1.90 (0.53)	692.4510	1.63 (0.65)	692.4510	1.66 (0.05)
PnTX-G	[M+H] ⁺	694.4677	694.4664	1.82 (0.55)	694.4667	1.42 (0.74)	694.4665	1.68 (0.34)
PnTX-E	[M+H] ⁺	784.4994	784.4984	1.31 (0.37)	784.4988	0.71 (0.23)	784.4988	0.77 (0.50)
PnTX-F	[M+H] ⁺	766.4889	766.4875	1.84 (0.48)	766.4877	1.52 (0.52)	766.4875	1.81 (0.25)
AZA1	[M+H] ⁺	842.5049	842.5038	1.32 (0.20)	842.5038	1.25 (0.20)	842.5035	1.66 (0.23)
AZA2	[M+H] ⁺	856.5206	856.5195	1.34 (0.21)	856.5193	1.49 (0.40)	856.5191	1.77 (0.46)
AZA3	[M+H] ⁺	828.4893	828.4882	1.36 (0.47)	828.4882	1.38 (0.19)	828.4876	2.04 (0.19)
PTX2	[M+NH ₄] ⁺	876.5104	876.5095	2.99 (0.21)	876.5095	2.92 (0.21)	876.5089	2.25 (0.22)
BTX1	[M+Na] ⁺	889.4709	889.4702	0.84 (0.76)	889.4699	1.09 (0.67)	889.4697	1.35 (0.43)
BTX2	[M+H] ⁺	895.4838	895.4829	0.99 (0.48)	895.4826	1.31 (0.52)	895.4830	0.95 (0.87)
OA	[M-H] ⁻	803.4587	803.4583	0.64 (0.47)	803.4584	0.51 (0.63)	803.4586	0.92 (0.38)
DTX2	[M-H] ⁻	803.4587	803.4582	0.66 (0.42)	803.4584	0.64 (0.59)	803.4585	0.84 (0.47)
DTX1	[M-H] ⁻	817.4744	817.4741	0.39 (0.55)	817.4740	0.61 (0.67)	817.4744	0.64 (0.42)
YTX	[M-H] ⁻	1141.4717	1141.4706	0.95 (0.55)	1141.4707	0.87 (0.98)	1141.4709	1.07 (0.67)
homo-YTX	[M-H] ⁻	1155.4874	1155.4858	1.38 (0.62)	1155.4860	1.24 (0.87)	1155.4862	1.19 (1.04)

Table S4: Methanol and matrix-matched calibration curves data from triplicate injection of 8 calibration points (including the blank extract) obtained on (a) QqQ, (b) Q-ToF and (c) Orbitrap.

<i>Toxin</i>	Range (ng/mL)	(a) QqQ								
		<i>MeOH</i>			<i>SPATT</i>			<i>Mussel</i>		
		R ²	Slope (RSD %)	Intercept	R ²	Slope (RSD %)	Intercept	R ²	Slope (RSD %)	Intercept
<i>PTX2</i>	0.08 - 56.4	0.999	1475 (6)	291	1.000	1369 (5)	1526	1.000	1804 (4)	280
<i>PnTX-E</i>	0.03 - 23.5	0.999	6952 (2)	684	0.999	5886 (5)	557	0.999	7420 (5)	391
<i>DA</i>	1.54 - 1071	0.999	419 (3)	-1159	1.000	412 (4)	255	1.000	478 (3)	807
<i>AZA1</i>	0.07 - 47.8	0.999	2404 (3)	251	0.999	2282 (5)	285	0.999	1726 (6)	266
<i>AZA2</i>	0.07 - 50.5	0.999	2311 (3)	-75	0.999	2145 (9)	272	0.999	1589 (9)	590
<i>AZA3</i>	0.07 - 38.9	1.000	2806 (3)	-27	1.000	2616 (3)	35	0.999	2039 (2)	77
<i>OA</i>	0.07 - 51.3	0.999	257 (18)	119	0.999	277 (14)	600	0.999	415 (2)	738
<i>DTX1</i>	0.07 - 51	0.999	253 (11)	97	0.999	251 (6)	55	0.999	449 (17)	97
<i>DTX2</i>	0.07 - 51.4	0.997	242 (15)	-39	1.000	215 (11)	54	0.999	366 (19)	158
<i>YTX</i>	0.31 - 219	0.999	116 (20)	-10	0.999	128 (12)	-62	0.999	122 (9)	-63
<i>homo-YTX</i>	0.32 - 224	1.000	101 (20)	-24	0.999	108 (7)	9	0.999	96 (6)	14
<i>13-desmeSPX-C</i>	0.04 - 24.9	0.999	19653 (5)	2208	0.999	18111 (7)	2452	1.000	19808 (5)	3176
<i>GYM-A</i>	0.04 - 26.5	0.999	28002 (2)	2910	0.999	24706 (6)	4416	1.000	252877 (1)	5023
<i>PnTX-F</i>	0.04 - 26.7	0.999	13431 (6)	870	1.000	12097 (4)	648	0.999	11985 (2)	1005
<i>PnTX-G</i>	0.04 - 25.8	1.000	19181 (2)	910	0.999	18339 (2)	1603	0.999	16745 (2)	3251
<i>BTX1</i>	11.76 - 738	0.998	85 (14)	-620	0.998	79 (13)	-265	0.995	74 (5)	116
<i>BTX2</i>	25.88 - 1624	0.998	28 (8)	-676	0.997	26 (2)	-588	0.992	20 (17)	-520

<i>Toxin</i>	Range (ng/mL)	(b) Q-ToF								
		<i>MeOH</i>			<i>SPATT</i>			<i>Mussel</i>		
		R ²	Slope (RSD %)	Intercept	R ²	Slope (RSD %)	Intercept	R ²	Slope (RSD %)	Intercept
<i>PTX2</i>	0.08 - 56.42	0.996	13235 (4)	-10245	0.9959	13264 (5)	-5339	0.9985	20198 (2)	-10100
<i>PnTX-E</i>	0.03 - 23.50	0.9963	51441 (6)	-17340	0.998	48306 (5)	-11668	0.9978	43106 (3)	-10865
<i>DA</i>	1.54 - 1070.87	0.9915	1142 (10)	-25956	0.9946	1110 (9)	-18394	0.9970	1696 (3)	-26240
<i>AZA1</i>	0.07 - 47.83	0.9959	75865 (7)	-51349	0.9987	72794 (7)	-32483	0.9968	63745 (1)	-36068
<i>AZA2</i>	0.07 - 50.48	0.9973	54728 (6)	-36510	0.9981	53985 (3)	-29508	0.9988	47997 (2)	-22545
<i>AZA3</i>	0.07 - 38.86	0.9972	59553 (6)	-30573	0.9995	54803 (16)	-15514	0.9986	53683 (3)	-21357
<i>OA</i>	0.07 - 51.26	0.9979	2547 (2)	-1275	0.9966	2467 (3)	-155	0.9968	5362 (5)	1986
<i>DTX1</i>	0.07 - 50.97	0.9981	2651 (5)	-1349	0.9974	2418 (4)	-1338	0.9949	8528 (5)	-4906
<i>DTX2</i>	0.07 - 51.43	0.9974	2790 (2)	-1613	0.9962	2516 (4)	-1623	0.9969	6115 (2)	-3579
<i>YTX</i>	0.31 - 218.93	0.9970	340 (9)	-1037	0.9958	336 (4)	-1055	0.9977	247 (5)	-696
<i>homo-YTX</i>	0.32 - 223.86	0.9975	356 (8)	-1085	0.9966	344 (4)	-1109	0.9982	232 (6)	-656
<i>13-desmeSPX-C</i>	0.04 - 24.89	0.9982	77554 (7)	-19702	0.9990	72949 (5)	-13731	0.9989	68180 (1)	-6713
<i>GYM-A</i>	0.04 - 26.53	0.9981	124887 (2)	-31320	0.9986	118751 (4)	-25656	0.9986	98513 (3)	-9614
<i>PnTX-F</i>	0.04 - 26.67	0.9973	65121 (5)	-22672	0.9981	62106 (4)	-19058	0.9985	54602 (2)	-14246
<i>PnTX-G</i>	0.04 - 25.80	0.9990	80623 (4)	-22104	0.9990	76833 (5)	-16340	0.9988	72502 (4)	-17124

<i>Toxin</i>	Range (ng/mL)	(c) Orbitrap								
		<i>MeOH</i>			<i>SPATT</i>			<i>Mussel</i>		
		R ²	Slope (RSD %)	Intercept	R ²	Slope (RSD %)	Intercept	R ²	Slope (RSD %)	Intercept
<i>PTX2</i>	0.08 - 56.4	0.999	18978 (7)	-4634	0.999	19767 (7)	10622	0.999	31371 (4)	-6659
<i>PnTX-E</i>	0.03 - 23.5	0.999	42344 (6)	-3423	0.999	36918 (1)	-5177	0.999	45403 (2)	-4255
<i>DA</i>	1.54 - 1071	0.999	691 (2)	-3385	0.999	625 (7)	-4461	0.999	653 (4)	-3888
<i>AZA1</i>	0.07 - 47.8	0.999	169347 (3)	-50109	0.999	176879 (3)	-44090	0.999	182561 (7)	-42758
<i>AZA2</i>	0.07 - 50.5	0.999	133203 (3)	-34345	0.999	142299 (4)	-38428	0.999	132977 (5)	-26197
<i>AZA3</i>	0.07 - 38.9	0.999	128849 (4)	-230407	0.999	130957 (1)	-25578	0.999	120348 (5)	-23826
<i>OA</i>	0.07 - 51.3	0.999	4787 (9)	-622	0.999	4549 (4)	6519	1.000	4923 (5)	3845
<i>DTX1</i>	0.07 - 51	0.999	4812 (6)	-961	0.999	4656 (8)	-1218	0.999	6292 (6)	-1787
<i>DTX2</i>	0.07 - 51.4	0.999	4826 (5)	-1493	0.999	4457 (7)	-1498	0.999	5796 (8)	-1409
<i>YTX</i>	0.31 - 219	0.998	821 (7)	-463	0.999	771 (7)	-514	0.999	633 (7)	-1207
<i>homo-YTX</i>	0.32 - 224	0.999	798 (10)	-1139	0.999	782 (9)	-1731	0.998	618 (3)	-1793
<i>13-desmeSPX-C</i>	0.04 - 24.9	0.999	129076 (1)	5463	1.000	112084 (4)	-108	1.000	108918 (2)	15340
<i>GYM-A</i>	0.04 - 26.5	0.999	117126 (1)	4055	1.000	95447 (2)	-3828	1.000	82290 (1)	16296
<i>PnTX-F</i>	0.04 - 26.7	0.999	121908 (2)	6659	0.999	102891 (2)	-4464	1.000	92109 (2)	1060
<i>PnTX-G</i>	0.04 - 25.8	0.999	136443 (0)	4601	1.000	115588 (3)	1723	1.000	105878 (1)	7961

II. Relative Molar Response (RMR) factors of lipophilic algal toxins in mass spectrometry

Article en préparation pour soumission dans RCMS: Z. Zendong, M. Sibat, C.

Herrenknecht, P. Hess, P. McCarron.

II.1. RESUME:

Raisonnement:

L'utilisation de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse pour l'analyse des toxines lipophiles nécessite la disponibilité de standards de référence certifiés. Alors que des standards certifiés sont disponibles pour la plupart des toxines lipophiles réglementées, la quantification d'une toxine à l'aide du standard certifié d'une toxine analogue de la même famille est tolérée, à condition que leurs facteurs de réponses molaires relatifs (RMR), en spectrométrie de masse, soient connus.

Méthodes:

Les facteurs de réponse ont été évalués pour les toxines des groupes : acide okadaïque (AO/DTXs), imine cyclique (ICs), yessotoxine (YTXs), pecténotoxine (PTXs) et azaspiracide (AZAs). Etant donné que la réponse des toxines en spectrométrie de masse peut être influencée par leurs facultés d'ionisation ou de fragmentation, les facteurs de réponse ont été évalués sous différentes conditions chromatographiques (gradient, isocratique), paramètres d'acquisition (SIM, SRM, All-ion, Target MS/MS) et, sur des appareils de CL-SM différents.

Résultats:

D'une manière générale, l'impact des conditions chromatographiques (isocratique, gradient) sur les facteurs de réponses molaires, s'est avéré non significatif, excepté pour DTX1. Les paramètres et modes d'acquisition ont, quant à eux, eu une influence sur les facteurs de réponses molaires relatifs obtenus. De plus, pour un groupe de toxines donné, les variations entre facteurs de réponses molaires étaient inférieures à un facteur deux.

Conclusions:

Alors que les différences de facteurs de réponses entre toxines analogues étaient la plupart du temps relativement faibles (inférieures à un facteur deux), quelques-unes se sont avérées significatives. Par conséquent, les facteurs de réponses molaires devraient être évalués, lors de la validation de méthodes d'analyses quantitatives utilisant un standard unique pour un groupe

de toxines donné. De plus, les résultats obtenus s'avèrent encourageants pour envisager l'utilisation de l'approche non-ciblée pour le criblage des toxines. En effet, les différences entre facteurs de réponses molaires de toxines d'une même famille ne semblent pas compromettre de manière significative la détectabilité globale des analogues de ce groupe de toxines.

II.2. ABSTRACT:

Rationale:

The use of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) for quantitative analysis of lipophilic toxins requires the availability of certified reference materials (CRMs). While toxin standards are now available for many of the regulated lipophilic toxins, toxin quantitation using a certified standard of an analog in the same toxin group may be acceptable if the MS relative molar response (RMR) factor is known.

Methods:

RMR factors were evaluated for toxins from the okadaic acid (OA/DTXs), cyclic imine (CI), yessotoxin (YTX), pectenotoxin (PTX) and azaspiracid (AZA) toxin groups. Since compound ionization and fragmentation can influence the response of toxins, response factors were assessed under different chromatographic (gradient, isocratic) and MS conditions (SIM, SRM, All-ion, target MS/MS), as well as on different LC-MS instruments.

Results:

Overall, relative molar responses were not impacted significantly by chromatographic conditions (isocratic vs gradient) with the exception of DTX1. MS acquisition modes and parameters had a more significant influence. For a given toxin group, response factors did not vary by more than a factor two between toxins.

Conclusions:

While differences in RMRs between analogues were relatively small (< 2-fold), some were statistically significant. Therefore RMRs should be evaluated when validating quantitative methods based on single-analogue-quantitation per toxin group. Furthermore, these results are encouraging for non-targeted approaches to toxin screening as the overall detectability of analogues does not appear to be dramatically compromised by differences in relative molar response.

Keywords: Mussel, SIM, SSRM, All-ion, target-MS/MS.

II.3. INTRODUCTION

Filter-feeding shellfish such as mussels, oysters and clams, can accumulate lipophilic toxins produced by microalgae. The consumption of contaminated shellfish thus constitutes a potential threat to human health. Lipophilic marine toxins include okadaic acid (OA), dinophysistoxins (DTXs), yessotoxins (YTXs), azaspiracids (AZAs), pectenotoxins (PTXs) and cyclic imines such as spirolides (SPXs) and pinnatoxins (PnTXs) (Figure II-1).

Harmful algal blooms (HAB) are complex to manage due to their intermittent nature. The conditions that promote the occurrence and distribution of individual species are not yet fully understood. However, climate change and anthropogenic activities are suspected to be significant factors. Also, the rise of seawater temperature and acidity, and the transfer of ship ballast waters are factors contributing to the dispersion of toxin producing microalgae. This is the reason why some toxins have recently been described by researchers as “emerging toxins” [1]. The emergence may arise from the discovery of new toxin analogs, the recent appearance of known toxins in regions where they had not previously been described, or the lack of information on the mechanism of action of these toxins [1]. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) is now the reference method for the analysis of lipophilic toxins in shellfish [2]. Certified reference materials (CRMs) are vital for calibration in LC-MS to ensure accurate analytical results. Considerable efforts have been made and CRM standards are now available for most of the regulated analogues of each lipophilic toxin group. For some toxins standards are not available, and in these cases an approach has been used whereby a standard for a toxin analog from the same group is used [3]. This is acceptable so long as relative response factors between analogues are known. Few studies have evaluated response factors from toxins from the same family. In studies on AZAs [4-6] it was found that response factors were dependent both on chromatographic and acquisition parameters. There is lack of knowledge concerning response factors for most toxins including toxins from the OA/DTXs, the PTXs, the YTXs and the cyclic imine families. Due to CRM standards not being available for all toxin analogues of the various groups knowledge of relative molar response (RMR) would help ensure seafood safety.

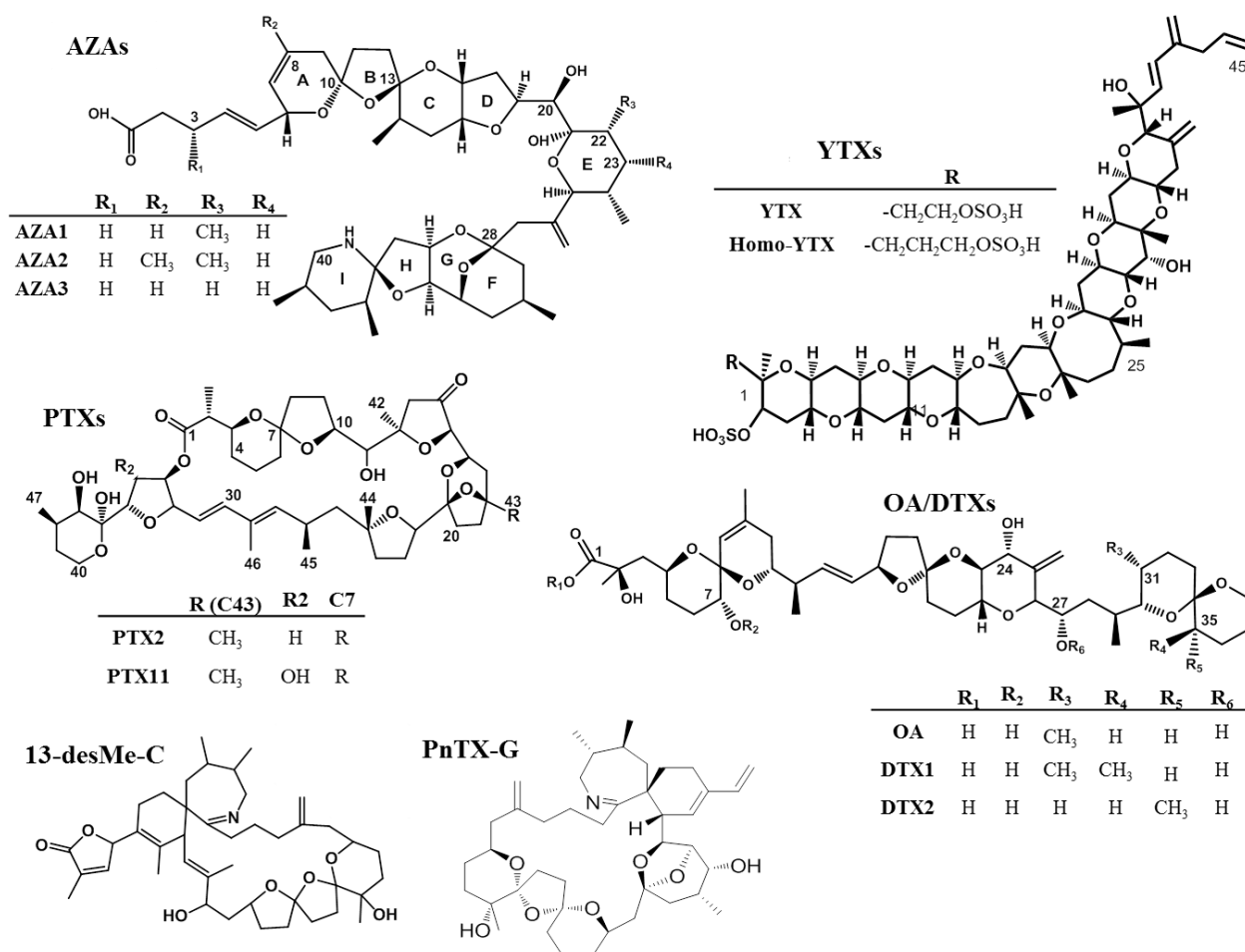


Figure II-1: Structures of investigated toxins: AZA 1-3; OA, DTX1, & -2; YTX and homo-YTX; pectenotoxins 2 and 11 (PTX2 and 11); PnTX-G; and 13-desMe-C.

Most marine toxin monitoring programs aim to respond to regionally established legislation. However, for the safety of shellfish consumers, “emerging toxins” should also be taken into consideration. Also, most LC-MS methods designed for the analysis of lipophilic toxins are targeted methods, looking only for known or regulated toxins using low resolution mass spectrometry. Introduction of high resolution mass spectrometry detection for the analysis of phycotoxins is recent and, until now has been used only in a targeted approach [7-9]. An advantage of high resolution over low resolution mass spectrometry is the possibility of retrospective screening of data and untargeted analysis, which could enable the screening of a large number of emerging toxins. However, in order to use the untargeted approach in a semi-quantitative mode, especially for emerging toxins and toxins analogues, the availability of standards, while desirable, is not always adequate or may be costly. Hence, there is a need for better knowledge on relative response factors between analogs from the same toxin family so that issues associated with limited availability of standards can be mitigated.

In this study, relative response factors have been evaluated for toxin analogs from the OA/DTXs, YTXs, PTXs, AZAs and cyclic imines families, under different chromatographic and MS conditions. These evaluations were carried out on different analytical liquid chromatography-mass spectrometry systems, including low and high resolution mass spectrometry detectors.

II.4. EXPERIMENTAL

II.4.1. Chemicals and Reagents:

Certified calibration solutions CRMs were from the National Research Council (NRC) (Halifax, NS, Canada). CRMs were available for azaspiracids 1 to 3 (AZA1, -2, -3), pectenotoxin-2 (PTX2), okadaic acid (OA) dinophysistoxin-1 and 2 (DTX1, -2), yessotoxin (YTX), homo-yessotoxin (homo-YTX), 13-desmethyl spirolide C (13-desMe-C) and pinnatotoxin-G (PnTX-G). A blank mussel tissue reference materials (CRM-Zero-Mus) as well as an in-house pectenotoxin-11 (PTX11) calibration solution were also provided.

HPLC grade methanol, acetonitrile and formic acid (98%) were obtained from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany) and Caledon (Georgetown, ON, Canada). Ammonium formate was acquired from Fluka (St. Louis, MI, USA). Milli-Q water was produced in-house to 18M Ω /cm quality, using a Milli-Q integral 3 system (Millipore). For analyses with the high resolution mass spectrometry instrument, acetonitrile and water of very high purity grade were obtained from Fischer Scientific (Illkirch, France).

II.4.2. LC-MS/MS analyses at Ifremer:

Toxins were separated on a Phenomenex Kinetex XB-C₁₈ column (100 $\times$ 2.1 mm, 2.6 μ m) maintained at 40 °C, using a mobile phase consisting of (A) water and (B) 95% acetonitrile, both containing 2 mM ammonium formate and 50 mM formic acid.

The elution gradient was first raised from 5% to 50% B over 3.5 min, then to 100% B over a further period of 5 min and was finally held for 2.5 min before dropping down to initial conditions in 10 s and holding at 5% B for 5 min to re-equilibrate the column. In isocratic conditions, the mobile phase was set to 60% B during 7 min for most toxins, except for the cyclic imine group for which the mobile phase contained 40% B. Both isocratic and gradient conditions were operated at a flow rate of 0.4 mL/min and, the injection volume was 3 μ L.

II.4.2.a. *System 1: API4000 QTrap*

LC-MS/MS experiments were performed using a LC system (UFLC Nexera, Shimadzu) connected to a hybrid triple quadrupole/ion-trap mass spectrometer (API 4000 Qtrap, Sciex) equipped with a Turbospray[®] interface. For quantitation, the mass spectrometer was operated either in selected ion monitoring (SIM) mode or in selected reaction monitoring (SRM) mode, scanning two transitions for each toxin. Positive and negative acquisition experiments were established using the following source settings: curtain gas at 30 psi, ion spray at 5500 V (ESI⁺) and -4500 V (ESI⁻), Turbogas temperature of 550 °C, gas 1 and 2 at 40 and 50 psi, respectively and, entrance potential of 10 V. Acquisitions parameters including collision energies (CE) and exit potentials (CXP) are reported in Table II-1.

Table II-1: SRM and SIM acquisition parameters on the API4000 QTrap.

Toxin	Ionization mode	DP (V)	SIM (m/z)	SRM transitions (m/z)	CE (eV)	CXP (V)
OA	ESI ⁻	-170	803.4	803.4/255.1	-62	-16
				803.4/113.1	-92	-9
DTX2	ESI ⁻	-170	803.4	803.4/255.1	-62	-16
				803.4/113.1	-92	-9
DTX1	ESI ⁻	-170	817.5	817.5/255.1	-68	-13
				817.5/113.1	-92	-5
YTX	ESI ⁻	-120	1141.4	1141.4/1061.6	-48	-17
				1141.4/855.6	-98	-19
Homo-YTX	ESI ⁻	-120	1155.6	1155.5/1075.6	-48	-17
				1155.5/869.4	-98	-19
AZA 1	ESI ⁺	116	842.6	842.6/654.4	69	16
				842.6/672.3	69	16
AZA 2	ESI ⁺	116	856.6	856.6/654.4	69	16
				856.6/672.4	69	16
AZA 3	ESI ⁺	116	828.6	828.6/640.4	69	16
				828.6/658.4	69	16
13-desMe-C	ESI ⁺	121	692.6	692.6/444.3	53	26
				692.6/164.2	69	8
PnTX-G	ESI ⁺	141	694.4	694.4/458.3	75	10
				694.4/164.1	75	10
PTX2	ESI ⁺	91	876.6	876.6/805.6	37	12
				876.6/823.6	31	12
PTX11	ESI ⁺	91	892.6	892.6/839.5	37	12
				892.5/821.5	31	12

II.4.2.b. *System 2: Quadrupole Time of Flight (QToF)*

Analyses were performed using a LC system (UHPLC 1290 Infinity, Agilent Technologies) coupled to a 6540 UHD accurate-mass quadrupole time-of-flight hybrid mass spectrometer (Q-TOF; Agilent Technologies) equipped with a Dual Jet Stream[®] ESI source. The instrument was operated in “All-ion” MS/MS mode and targeted MS/MS mode. The “All-ion” MS/MS mode consisted of combining a full scan acquisition over m/z 100 to 1700, with a collision energy of 40 eV and an acquisition range of 2 spectra/s per experiment (1 full scan and 1 MS/MS). The targeted MS/MS mode was applied over the scan range m/z 50 - 1700, with a MS scan rate of 10 spectra/s and a MS/MS scan rate of 3 spectra/s. Three different collision energies (20, 40 and 60 eV) were applied to the precursor ions to obtain an overview of the fragmentation pathways (Table II-2).

The temperature of the source was set at 205°C with the drying gas and sheath gas flow-rate at 5 L/min and 12 L/min, respectively. The sheath gas temperature was 355°C and, the capillary and nozzle voltages were 3500 V and 500 V, respectively.

Calibration was carried out continuously over the entire run time using reference masses m/z 121.0509 and m/z 922.0099 and data were analyzed using MassHunter software (Agilent Technologies).

Table II-2: “All-ion” and Target MS/MS acquisition parameters and ion used for quantification.

Toxin	Ionization mode	Fragmentor (V)	Targeted Mass (m/z)	Corresponding ion
<i>OA</i>	ESI ⁻	180	803.4587	[M-H] ⁻
<i>DTX2</i>	ESI ⁻	180	803.4587	[M-H] ⁻
<i>DTX1</i>	ESI ⁻	180	817.4744	[M-H] ⁻
<i>YTX</i>	ESI ⁻	180	1141.4717	[M-H] ⁻
<i>Homo-YTX</i>	ESI ⁻	180	1155.4874	[M-H] ⁻
<i>AZA 1</i>	ESI ⁺	200	842.5049	[M+H] ⁺
<i>AZA 2</i>	ESI ⁺	200	856.5206	[M+H] ⁺
<i>AZA 3</i>	ESI ⁺	200	828.4893	[M+H] ⁺
<i>13-desMe- C</i>	ESI ⁺	200	692.4521	[M+H] ⁺
<i>PnTX-G</i>	ESI ⁺	200	694.4677	[M+H] ⁺
<i>PTX2</i>	ESI ⁺	200	876.5104	[M+NH ₄] ⁺
<i>PTX11</i>	ESI ⁺	200	892.5053	[M+NH ₄] ⁺

II.4.3. LC-MS/MS analyses at National Research Council (NRC),

Halifax:

II.4.3.a. System 3: API4000 QTrap

Separations were performed using an Agilent 1200 liquid chromatograph (Agilent Inc., Palo Alto, CA, USA) connected to a hybrid triple quadrupole-linear ion trap API4000 Qtrap mass spectrometer (Sciex, Concord, ON, Canada). The MS was equipped with a TurboV[®] electrospray ionization source. LC separations were modified from a previous method as follows: flow rate of 300 μ L/min at 20 °C on a 50 $\times$ 2 mm i.d. column packed with 3 μ m Synergi MaxRP C₁₂ (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA). An isocratic mobile phase of water/acetonitrile (62:38 v/v), containing 5 mM ammonium acetate, was used. Injection volumes were 5 μ L. The collision and source parameters in positive ionisation mode were: 20 psi curtain gas, 4500 V ion spray voltage, 275 °C aux gas temperature, 50 psi pressure nebulizer and auxiliary gases, level 4 (pressure arbitrary units) collision-activated dissociation. Full scan spectra were acquired using a Q1 scan range of m/z 700-900, with source declustering potentials of 20, 40 and 60 V. SIM was conducted using declustering potentials of 20 and 60 V, monitoring m/z 769.5, 787.5, 805.5, 822.5, 827.5, 843.5, 849.5 and 863.5 for OA and DTX2, and monitoring m/z 783.5, 801.5, 819.5, 836.5, 841.5, 857.5, 863.5, 877.5 for DTX1. In negative ion mode the equivalent source conditions were applied, acquiring full-scan spectra with a Q1 range of m/z 700-900, with SIM using declustering potentials of 20 and 60 V, monitoring m/z 803.5 for OA and DTX2, and m/z 817.5 for DTX1.

II.4.4. Sample preparation

Blank passive samplers, also referred to as Solid Phase Adsorption Toxin Tracking devices (SPATTs) containing 300 mg of HP-20 resin, had been deployed over a 1-week period at Villefranche-sur-Mer bay (France). Extracts of those passive samplers were prepared and extracted as described previously [10]. Briefly, SPATTs were prepared from HP-20 resin (300 mg) contained between sheets of mesh that were held together by embroidery rings. After retrieval, SPATTs were rinsed with deionized water, then the resin was transferred to an empty SPE cartridge and eluted with 15 mL of 50% MeOH. CRM-Zero-Mus was extracted using a protocol adapted from McCarron *et al* [11]. CRM material (2 g) was serially extracted four times with 5.5 mL of MeOH. The supernatants were collected and brought to 25 mL into a volumetric flask.

CRMs of each toxin were used to prepare stock mixture solutions containing toxins from the same family group at approximate equimolar concentrations. Working solutions were then obtained by diluting the stock solutions to 1/5 of their original volume, using methanol, SPATT or mussel extracts.

Table II-3: Final molar concentrations of toxins in mixtures of toxins from the same family group.

		Concentrations (nM)	
		Ifremer	NRC*
OA/DTXs	OA	0.73	162.3
	DTX1	0.77	167.0
	DTX2	0.88	176.0
AZAs	AZA1	0.056	-
	AZA2	0.059	-
	AZA3	0.054	-
YTXs	YTX	0.22	-
	homo-YTX	0.21	-
PTXs	PTX2	0.19	-
	PTX11	0.17	-
Cyclic Imines	13-desMe-C	43	-
	PnTX-G	43	-

*: concentrations of toxins in solutions analysed on system 3 were significantly higher to allow acquisition of full scan spectra on the API 4000 triple quadrupole – QTrap hybrid mass spectrometer.

II.4.5. Quantitative and Statistical analyses

Individual equimolar solutions containing AZA1 -3, OA, DTX1 and -2, YTX and homo-YTX, PTX2 and -11 and the cyclic imines 13-desMe-SPX-C and PnTX-G were separately injected three times per day on three different days, yielding nine replicate measurements per condition. This was done on systems 1 and 2. The relative molar response (RMR) factor of a compound is the ratio of the molar response of this compound to that of a reference compound. In this study, the reference compounds used were: AZA1 for AZA2 and 3, OA for DTX1 and 2, YTX for homo-YTX, PTX2 for PTX11 and 13-desMe-C for PnTX-G. The RMR was calculated using the following formula:

$$RMR_i = \frac{A_i * C_j}{A_j * C_i}$$

Where RMR_i is the relative molar response of the investigated compound (i) related to the reference analogue; A_i is the area under the peak of the compound; A_j is the area under the

peak of the reference analogue and C_i and C_j are the molar concentrations of the investigated compound (i) and the reference compound (j), respectively.

Statistical evaluations were carried out using SigmaPlot 12.5. The significance test used to compare response factors between different chromatographic and acquisition condition was the two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA). The significance test used to compare response factors between chromatographic conditions or between acquisition conditions was the t-test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

II.5. RESULTS and DISCUSSION

Using two-way repeated measures analysis of variance (Anova), an overall comparison of all relative molar responses (Supporting information Table S1), all toxins considered, obtained on System 1 (API4000 QTrap) and on System 2 (QToF), was carried out: isocratic vs gradient results were compared on one side and acquisition modes results on the other side. On System 1 and 2, there was no statistically significant difference between relative molar responses obtained using isocratic or gradient chromatographic conditions, irrespective of the acquisition mode (SIM / SRM or All-ion/Target MS²) used. Similarly, the difference observed between relative molar responses in SIM or SRM (and All-ion or Target MS²) were not statistically significantly different ($p > 0.05$), irrespective of the chromatographic conditions. With regards to these results, t-tests were carried out for individual toxins to compare relative molar responses between different chromatographic and acquisition parameters.

II.5.1. Impact of chromatographic conditions on RMRs

II.5.1.a. System1: API4000 QTrap

In SRM acquisition mode, the relative response factors appeared not to be significantly different between gradient and isocratic conditions for most toxins, except for DTX1 and PnTX-G (Figure II-2). The ionization yield and hence response of a compound can be different with a different percentage of the organic solvent in the mobile phase. Indeed, as RMRs were determined relative to reference compounds, RMRs were generally close to 1 when the retention time of the investigated compound was close to that of the reference compound. This was the case for homo-YTX compared to YTX and DTX2 compared to OA,

which had close retention times (0.02 min and 0.26 min, respectively) and thus very similar percentages of organic solvent in the mobile phase.

The retention time difference between OA and DTX1 was significantly different in gradient conditions, irrespective of the instrument and the observed difference in RMR was thus most likely attributable to different ionization yields due to different solvent compositions, rather than due to differences in MS acquisition parameters. Indeed, the difference between RMR in isocratic and gradient chromatographic conditions was statistically significant ($p < 0.05$) both in SRM and SIM acquisition mode. These results indicated that the mobile phase composition can influence the ionization in the source and therefore yielded different relative responses (this was also the case for OA and DTXs on system 3; see Supporting Information Table S2).

It is noteworthy that of all toxins studied, RMRs obtained for PnTX-G were the highest (> 1). This was most likely related to the fact that these RMRs were relative to 13-desMe-C, which is a cyclic imine with a structure slightly different to that of PnTX-G.

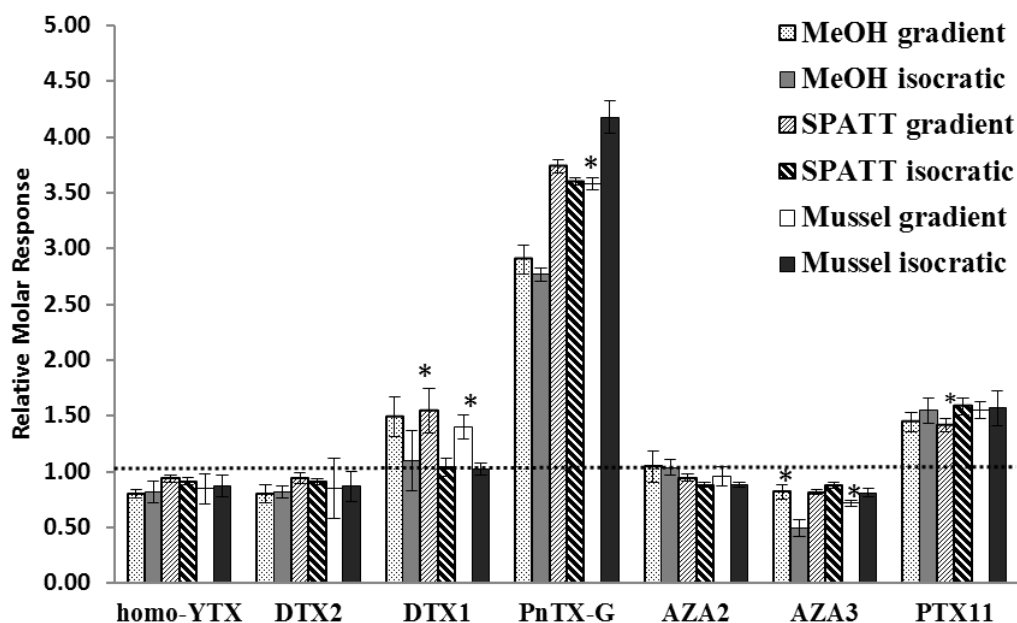


Figure II-2: Comparison of relative molar response factors (RMRs $\pm$ SD; $n=9$) for homo-YTX (relative to YTX), DTX1 and 2 (relative to OA), PnTX-G (relative to 13-desMe-C), AZA2 and 3 (relative to AZA1) and PTX11 (relative to PTX2), in isocratic and gradient conditions. These response factors were obtained on System 1 (API4000 QTrap) (in SRM acquisition

mode) for methanol, SPATT and mussel extracts, Asterisk (*) indicates that response factor in gradient and isocratic conditions are statistically significantly different ($p < 0.05$) (t-test).

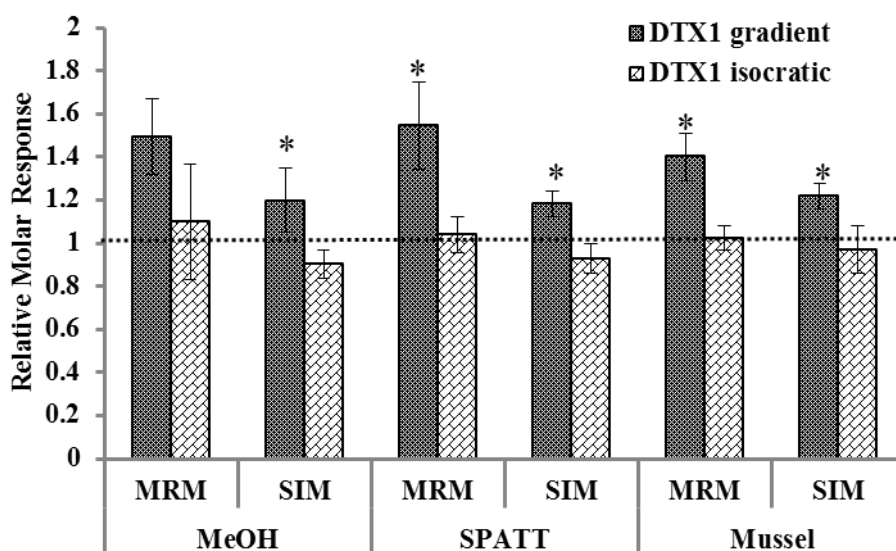


Figure II-3: Comparison of Relative molar response factors (RMRs $\pm$ SD; $n=9$) for DTX1 in relation to OA, in isocratic and gradient conditions for methanol, SPATT and mussel extracts analyzed at Ifremer (Table II-3), on System 1 (API4000 QTrap). Asterisk (*) indicates that response factor in gradient and isocratic conditions are statistically significantly different ($p < 0.05$) (t-test).

II.5.1.b. System 2: QToF

Similarly to observations made for System 1 (API4000 QTrap), in All-ion acquisition mode on the 6540 Q-ToF, the relative response factors were not significantly different between gradient and isocratic conditions for most toxins, except for DTX1 (for mussel extract), AZA2 (for SPATT and mussel extracts) and PnTX-G in mussel matrix and for AZA2 and PnTX-G in SPATT matrix (Figure II-4). Solvent composition for elution of AZA2 in gradient mode did not differ more for system 2 (Q-ToF) than for system 1 (Qtrap), and precision for this analogue in gradient mode was also quite similar on both systems (Table S1), hence the additional difference in RMRs of AZA2 could only be attributed to slightly different source design affecting ionization yields for the two slightly more complex matrices.

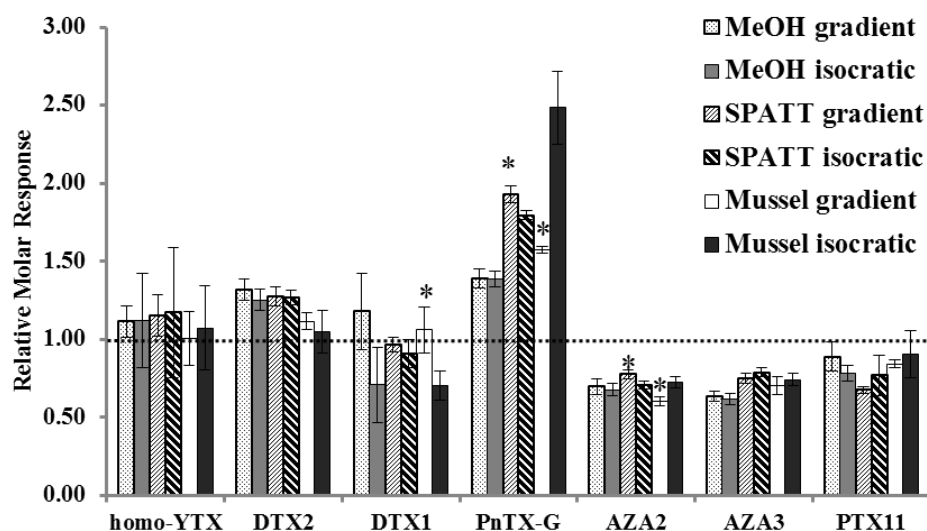


Figure II-4: Comparison Relative molar response factors (RMRs $\pm$ SD; $n=9$) for homo-YTX (relative to YTX), DTX1 and 2 (relative to OA), PnTX-G (relative to 13-desMe-C), AZA2 and 3 (relative to AZA1) and PTX11 (relative to PTX2), in isocratic and gradient conditions. These response factors were obtained on System 2 (QToF) (in All-ion acquisition mode), for methanol, SPATT and mussel extracts. Asterisk (*) indicates that response factor in gradient and isocratic conditions are statistically significantly different ($p < 0.05$) (t-test).

II.5.2. Impact of acquisition parameters

II.5.2.a. System1: API4000 QTrap

Previously described results have shown that there was no major difference between RMRs for lipophilic toxins in gradient and isocratic conditions. Interestingly, individual comparison of RMRs for each toxin indicated that the acquisition mode can influence the response of toxins. This was especially the case for PnTX-G, DTX1 and PTX11 (Figures II-3 and II-5). Moreover, RMRs obtained in SRM acquisition mode tend to deviate more from the expected value of 1 than those acquired in SIM mode (Figure II-5; see also Figure II-3). The nature of the matrix used to prepare the solutions does not seem, in this particular case, to significantly impact the RMRs, since the same tendencies were observed between matrices. However, as shown in a previous study [12], the nature of the matrix can cause matrix effects (Supporting Information Figure S1), and the observed matrix effects can also be dependent on the chromatographic conditions.

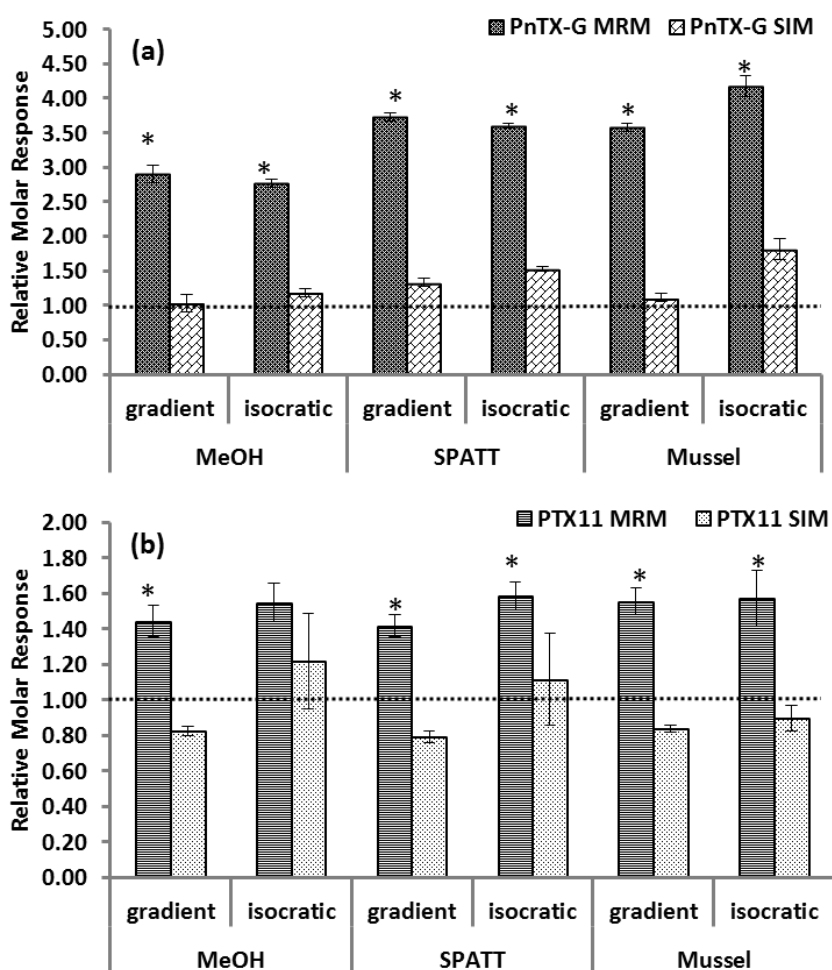


Figure II-5: Relative molar response factors $\pm$ SD ($n=9$) for (a) PnTX-G and (b) PTX11 obtained on System 1 (API4000 QTrap), in SRM and SIM acquisition modes conditions. Asterisk (*) indicates that response factor in SRM and SIM acquisition modes are statistically significantly different ($p < 0.05$) (t-test).

II.5.2.b. System 2: QToF

Due to concentrations of OA, DTX1 and 2, YTX and homo-YTX not being sufficiently high for acquisitions in target MS/MS mode, only the results for the other toxins (AZAs, PnTX-G, PTX11) are discussed in this section. The RMRs obtained in All-ion acquisition mode were not significantly different ($p > 0.05$, t-test) from those obtained in target MS/MS mode for all toxins (Table S1), except for PnTX-G (Figure II-6).

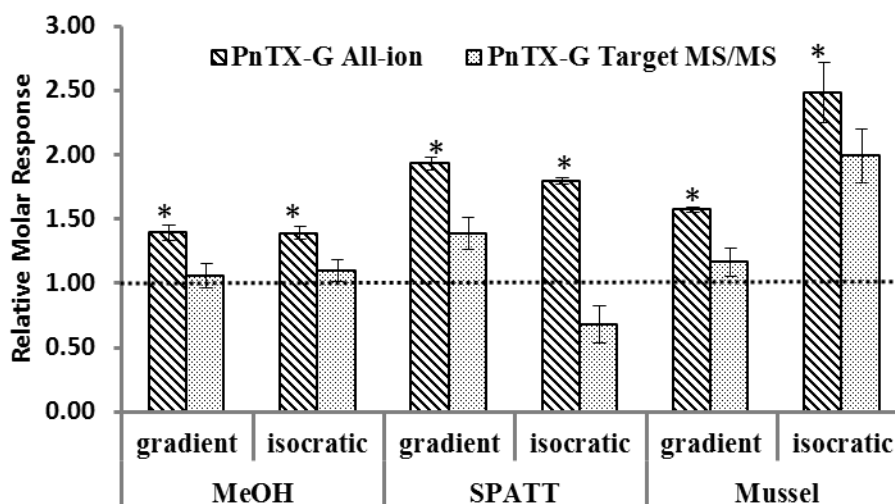


Figure II-6: Relative molar response factors $\pm$ SD ($n=9$) for PnTX-G obtained on System 2 (QToF), in All-ion and target MS/MS conditions. Asterisk (*) indicates that response factor in All-ion and target MS/MS acquisition modes are statistically significantly different ($p < 0.05$) (t-test).

High resolution All-ion spectra of PTX2 and PTX11 were acquired on System 2 (QToF) and analyzed to investigate the difference in RMR observed for PTX11 on System 1 (API4000 QTrap) in SIM and SRM acquisition modes (Figure II-5b). The transitions used for quantification on System 1 were m/z 876.6>805.6 for PTX2 and m/z 892.6>839.5 for PTX11, which do not correspond to the same fragmentation pathway. Indeed, the fragment with m/z 805.6 corresponds to three consecutive water losses [13], while the fragment with m/z 839.5 corresponds to the loss of two water molecules. The high resolution spectrum of PTX2 and PTX11 indicated that the abundance of the PTX2-fragment with m/z 805.6 was considerably lower than the abundance of the PTX11-fragment with m/z 839.5 (Supporting Information Figures S3 and S4). Therefore, since different ions were used for optimal quantitation, RMRs for PTX11 (relative to PTX2) were different from 1. Also, the differences were higher with SRM acquisition mode compared to SIM acquisition mode, since in SIM mode only the parent ions were used for quantification (Table S1).

II.5.3. Impact of declustering potential and ion choice

Experiments in this section were carried out only on System 3. The declustering potential and the ion chosen for quantification are other parameters to be taken into account

when evaluating response factors. To examine this issue, an approximately equi-molar mixture of OA, DTX1 and DTX2 was accurately prepared using CRMs. Full scans (Q1) were run on this mixture in positive and negative mode to determine the distribution of charge for the various toxins. As can be seen in Table II-4 (see also Supporting Information Figure S2), a variety of adducts were observed for OA, DTX2 and DTX1 in positive ionization mode, including water losses resulting from in-source fragmentation and the distribution of ion clusters was not equivalent for the different toxins. Also, the distribution of charges was slightly different with differing declustering potentials (DP).

Table II-4: Contribution of various adducts/water losses (in %) after Q1 scan acquisition in positive mode for OA, DTX2 and DTX1 mixture. Adducts $[M+45]^+$ and $[M+59]^+$ are assumed to be $[M+2Na-H]^+$ and $[M+NH_4+CH_3CN]^+$, respectively.

	OA		DTX2		DTX1	
	DP20	DP60	DP20	DP60	DP20	DP60
(-2 x H₂O)	0%	3%	0%	2%	0%	6%
(-1 x H₂O)	3%	9%	3%	8%	7%	7%
(M+H)⁺	14%	23%	21%	31%	13%	20%
(+NH₄)	67%	48%	60%	42%	65%	51%
(+Na)	9%	10%	8%	8%	9%	10%
(+K)	1%	1%	1%	1%	1%	1%
(+45)	1%	2%	1%	2%	1%	1%
(+59)	5%	5%	6%	6%	4%	4%
<i>total</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>

Response factors for DTX1 and DTX2 (relative to OA) were assessed at DP of 20 eV and 60 eV, and indicated an influence of DP (Figure II-7). Although the RMRs of DTX1 and DTX2 were not statistically significantly different from OA for several adducts (sodium, ammonium, potassium, di-sodium and +59), there were significant differences for the molecular ion for DTX2, and even more so for the first and second water loss for DTX1 and for the second water loss of DTX2. As the declustering potential is used in mass spectrometry to strip residual water-molecules from the mobile phase off molecules it is not surprising that this step also affects water losses of the molecule itself, especially in the case of polyethers and hydroxylated molecules which easily lose water, such as OA and analogues.

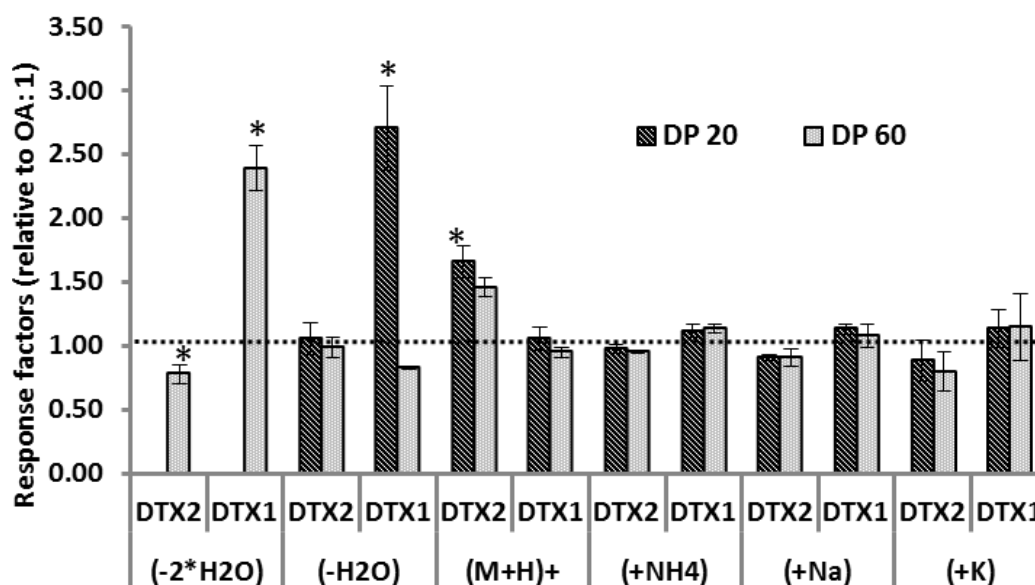


Figure II-7: Relative molar response factors $\pm$ SD ($n=5$) with different quantifying ions, for DTX1 and DTX2 (relative to OA) on System 3 and at declustering potentials of 20 and 60 V. Asterisk (*) indicates that response factor with acquisition made at DP20 and DP60 are statistically significantly different ($p < 0.05$) (t-test).

II.6. CONCLUSION

Relative response factor were evaluated for analogues belonging to several lipophilic toxin groups, in different chromatographic conditions, and using various MS acquisition parameters, on different LC-MS systems. Results indicated that relative response factors varied by less than a factor of two between toxins from the same group. An exception was PnTX-G that was evaluated relative to 13-desMe-C. Although both these toxins are related cyclic imines they have different structures which results in the demonstrated difference in response. The results for the AZA group were consistent with those obtained by other authors [6, 14]. Interestingly, the relative response factors were impacted less by the elution conditions (e.g. gradient or isocratic) than by MS acquisition parameters. An exception was DTX1 on System 1 (API4000 QTrap). Consequently, it is preferable to use the appropriate standard, whenever available, for accurate quantification of lipophilic toxins. However, the knowledge of RMR-variations within a toxin group is valuable information for semi-quantitative screening of toxins when using untargeted approaches.

Aknowlegdments

This study was carried out under the Coselmar project supported by Ifremer and Nantes University and co-funded by the Regional Council of the “Pays de la Loire”. The authors would like to thank all the members of the Laboratoire Phycotoxins at the Atlantic Centre of Ifremer and the Biotoxin Metrology, Measurement Science and Standards team at the National Research Council of Halifax, for their help and advice during this study. Sabrina Giddings (NRC, Halifax) is acknowledged for assistance in preparation of samples for analysis.

References

- [1] J. Diogene, P. de la Iglesia, M. Fernandez, M. Campas, A. Caillaud, M. Garcia Altares, O. Carnicer, L. Solino, G. Gimenez, A. Casanova, Emerging marine toxins: Interaction between management & research for the survey of emerging toxins, *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology, 75 (2013) 205-205.
- [2] EU.Commission, Commission Regulation (EU) No 15/2011 of 10 January 2011 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs., *Official Journal of the European Union.*, (2011).
- [3] EU-RL-MB, EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS, in, EU-RL-MB, 2011.
- [4] J. Kilcoyne, P. McCarron, M.J. Twiner, C. Nulty, S. Crain, M.A. Quilliam, F. Rise, A.L. Wilkins, C.O. Miles, Epimers of Azaspiracids: Isolation, Structural Elucidation, Relative LC-MS Response, and in Vitro Toxicity of 37-epi-Azaspiracid-1, *Chemical Research in Toxicology*, 27 (2014) 587-600.
- [5] J. Kilcoyne, C. Nulty, T. Jauffrais, P. McCarron, F. Herve, B. Foley, F. Rise, S. Crain, A.L. Wilkins, M.J. Twiner, P. Hess, C.O. Miles, Isolation, Structure Elucidation, Relative LC-MS Response, and in Vitro Toxicity of Azaspiracids from the Dinoflagellate *Azadinium spinosum*, *Journal of natural products*, 77 (2014) 2465-2474.
- [6] N.P. Rehmann, Preparative isolation and purification of Azaspiracids and related toxins from blue mussels and characterisation of new toxin analogs, in, *University College Dublin*, 2008, pp. 245.
- [7] A. Domenech, N. Cortes-Francisco, O. Palacios, J.M. Franco, P. Riobo, J.J. Llerena, S. Vichi, J. Caixach, Determination of lipophilic marine toxins in mussels. Quantification and

confirmation criteria using high resolution mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1328 (2014) 16-25.

[8] G. Orellana, J. Vanden Bussche, L. Van Meulebroek, M. Vandegehuchte, C. Janssen, L. Vanhaecke, Validation of a confirmatory method for lipophilic marine toxins in shellfish using UHPLC-HR-Orbitrap MS, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406 (2014) 5303-5312.

[9] M. Garcia-Altares, A. Casanova, V. Bane, J. Diogene, A. Furey, P. de la Iglesia, Confirmation of Pinnatoxins and Spirolides in Shellfish and Passive Samplers from Catalonia (Spain) by Liquid Chromatography Coupled with Triple Quadrupole and High-Resolution Hybrid Tandem Mass Spectrometry, *Marine drugs*, 12 (2014) 3706-3732.

[10] Z. Zendong, C. Herrenknecht, E. Abadie, C. Brissard, C. Tixier, F. Mondeguer, V. Sechet, Z. Amzil, P. Hess, Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 91 (2014) 57-68.

[11] P. McCarron, S.D. Giddings, M.A. Quilliam, A mussel tissue certified reference material for multiple phycotoxins. Part 2: liquid chromatography-mass spectrometry, sample extraction and quantitation procedures, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400 (2011) 835-846.

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

[13] A. Gerssen, P. Mulder, H. van Rhijn, J. de Boer, Mass spectrometric analysis of the marine lipophilic biotoxins pectenotoxin-2 and okadaic acid by four different types of mass spectrometers, *Journal of Mass Spectrometry*, 43 (2008) 1140-1147.

[14] J. Kilcoyne, M.J. Twiner, P. McCarron, S. Crain, S.D. Giddings, B. Foley, F. Rise, P. Hess, A.L. Wilkins, C.O. Miles, Structure Elucidation, Relative LC-MS Response and In Vitro Toxicity of Azaspiracids 7-10 Isolated from Mussels (*Mytilus edulis*), *Journal of agricultural and food chemistry*, 63 (2015) 5083-5091.

[15] S. Ito, K. Tsukada, Matrix effect and correction by standard addition in quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins, *Journal of Chromatography A*, 943 (2002) 39-46.

Supporting Information

Relative Molar Response (RMR) factors of lipophilic algal toxins in mass spectrometry

Table S1: Relative molar response factors on API4000QTrap and QToF, in isocratic and gradient chromatographic conditions and in different acquisition modes (SIM, SRM, ALL-ion and Target MS²)

Table S2: Peak areas for OA and DTX1 on the API4000 QTrap, under different chromatographic (isocratic, gradient) and acquisition (SIM, SRM) conditions.

Figure S1: Impact of chromatographic gradient on matrix effects

Figure S2: Positive mode Q1 scan of OA, DTX2 and DTX1 mixture.

Figure S3: High resolution spectrum for PTX2 and PTX11 acquired in ESI⁺, in target MS/MS at CE=40 eV, on System 2 (QToF) for a SPATT solution.

Figure S4: Proposed fragmentations for (a) PTX2 and (b) PTX11.

Figure S5: Chemical formula, detected ion, calculated m/z and structure for lipophilic toxins

Table S1: Relative molar response factors (RMRs $\pm$ SD, n=9), on System 1 (API4000 QTrap) and System 2 (Q-ToF), in isocratic and gradient chromatographic conditions and in different acquisition modes (SIM, SRM, ALL-ion and Target MS²).

		<i>Gradient</i>			<i>Isocratic</i>		
API4000 Qtrap:		<i>MeOH</i>	<i>SPATT</i>	<i>Mussel</i>	<i>MeOH</i>	<i>SPATT</i>	<i>Mussel</i>
Homo YTX	SRM	0.81 $\pm$ 0.03	0.94 $\pm$ 0.03	0.85 $\pm$ 0.05	0.82 $\pm$ 0.03	0.91 $\pm$ 0.04	0.87 $\pm$ 0.04
	SIM	0.90 $\pm$ 0.04	0.96 $\pm$ 0.03	1.07 $\pm$ 0.14	0.89 $\pm$ 0.10	0.95 $\pm$ 0.03	1.03 $\pm$ 0.10
DTX2	SRM	1.31 $\pm$ 0.07	1.25 $\pm$ 0.04	1.45 $\pm$ 0.19	1.18 $\pm$ 0.09	1.16 $\pm$ 0.04	1.39 $\pm$ 0.12
	SIM	1.24 $\pm$ 0.08	1.16 $\pm$ 0.05	1.47 $\pm$ 0.27	1.13 $\pm$ 0.05	1.10 $\pm$ 0.03	1.44 $\pm$ 0.14
DTX1	SRM	1.50 $\pm$ 0.18	1.55 $\pm$ 0.20	1.40 $\pm$ 0.11	1.10 $\pm$ 0.27	1.04 $\pm$ 0.08	1.02 $\pm$ 0.06
	SIM	1.20 $\pm$ 0.15	1.18 $\pm$ 0.06	1.22 $\pm$ 0.06	0.90 $\pm$ 0.07	0.93 $\pm$ 0.07	0.97 $\pm$ 0.11
PnTX-G	SRM	2.90 $\pm$ 0.20	3.74 $\pm$ 0.17	3.58 $\pm$ 0.12	2.77 $\pm$ 0.15	3.60 $\pm$ 0.07	4.18 $\pm$ 0.26
	SIM	1.03 $\pm$ 0.13	1.33 $\pm$ 0.06	1.11 $\pm$ 0.06	1.18 $\pm$ 0.06	1.53 $\pm$ 0.03	1.82 $\pm$ 0.15
AZA2	SRM	1.05 $\pm$ 0.04	0.95 $\pm$ 0.03	0.96 $\pm$ 0.03	1.04 $\pm$ 0.05	0.88 $\pm$ 0.05	0.88 $\pm$ 0.04
	SIM	0.91 $\pm$ 0.14	0.85 $\pm$ 0.04	1.03 $\pm$ 0.09	0.78 $\pm$ 0.07	0.77 $\pm$ 0.02	0.72 $\pm$ 0.03
AZA3	SRM	0.82 $\pm$ 0.05	0.82 $\pm$ 0.04	0.72 $\pm$ 0.03	0.49 $\pm$ 0.05	0.88 $\pm$ 0.04	0.81 $\pm$ 0.03
	SIM	0.67 $\pm$ 0.06	0.78 $\pm$ 0.02	0.74 $\pm$ 0.03	0.60 $\pm$ 0.08	0.79 $\pm$ 0.03	0.70 $\pm$ 0.04
PTX11	SRM	1.44 $\pm$ 0.09	1.42 $\pm$ 0.06	1.55 $\pm$ 0.07	1.55 $\pm$ 0.11	1.59 $\pm$ 0.08	1.57 $\pm$ 0.16
	SIM	0.82 $\pm$ 0.03	0.79 $\pm$ 0.03	0.84 $\pm$ 0.02	1.22 $\pm$ 0.27	1.12 $\pm$ 0.26	0.90 $\pm$ 0.07

		<i>Gradient</i>			<i>Isocratic</i>		
QToF:		<i>MeOH</i>	<i>SPATT</i>	<i>Mussel</i>	<i>MeOH</i>	<i>SPATT</i>	<i>Mussel</i>
Homo YTX	All-ion	1.11 $\pm$ 0.10	1.15 $\pm$ 0.14	1.01 $\pm$ 0.17	1.12 $\pm$ 0.30	1.17 $\pm$ 0.42	1.07 $\pm$ 0.27
DTX2	All-ion	1.32 $\pm$ 0.07	1.27 $\pm$ 0.06	1.12 $\pm$ 0.06	1.25 $\pm$ 0.07	1.27 $\pm$ 0.05	1.05 $\pm$ 0.14
DTX1	All-ion	1.18 $\pm$ 0.24	0.96 $\pm$ 0.05	1.06 $\pm$ 0.15	0.71 $\pm$ 0.24	0.91 $\pm$ 0.09	0.71 $\pm$ 0.09
PnTX-G	All-ion	1.39 $\pm$ 0.06	1.93 $\pm$ 0.05	1.57 $\pm$ 0.02	1.39 $\pm$ 0.05	1.80 $\pm$ 0.03	2.48 $\pm$ 0.23
	Target MS²	1.06 $\pm$ 0.09	1.38 $\pm$ 0.12	1.16 $\pm$ 0.11	1.10 $\pm$ 0.08	0.68 $\pm$ 0.15	1.99 $\pm$ 0.21
AZA2	All-ion	0.70 $\pm$ 0.05	0.78 $\pm$ 0.03	0.60 $\pm$ 0.03	0.68 $\pm$ 0.04	0.71 $\pm$ 0.02	0.72 $\pm$ 0.04
	Target MS²	0.79 $\pm$ 0.09	0.78 $\pm$ 0.07	0.61 $\pm$ 0.10	0.69 $\pm$ 0.07	0.69 $\pm$ 0.03	0.81 $\pm$ 0.06
AZA3	All-ion	0.64 $\pm$ 0.03	0.75 $\pm$ 0.03	0.70 $\pm$ 0.06	0.62 $\pm$ 0.03	0.79 $\pm$ 0.03	0.74 $\pm$ 0.04
	Target MS²	0.77 $\pm$ 0.11	0.75 $\pm$ 0.10	0.65 $\pm$ 0.10	0.67 $\pm$ 0.05	0.83 $\pm$ 0.07	0.90 $\pm$ 0.08
PTX11	All-ion	0.89 $\pm$ 0.09	0.68 $\pm$ 0.02	0.84 $\pm$ 0.02	0.78 $\pm$ 0.05	0.77 $\pm$ 0.13	0.90 $\pm$ 0.15
	Target MS²	0.62 $\pm$ 0.18	0.74 $\pm$ 0.09	1.05 $\pm$ 0.10	0.79 $\pm$ 0.09	1.27 $\pm$ 0.49	0.89 $\pm$ 0.12

Table S2: Peak areas (Area $\pm$ %RSD, n=9) for OA and DTX1 on the API4000 QTrap, under different chromatographic (isocratic, gradient) and acquisition (SIM, SRM) conditions.

		OA		DTX1	
	Matrix	Gradient	Isocratic	Gradient	Isocratic
SRM	MeOH	95494 $\pm$ 9	82080 $\pm$ 12	19920813 $\pm$ 13	107358 $\pm$ 18
	SPATT	105078 $\pm$ 18	84083 $\pm$ 14	196956 $\pm$ 22	105622 $\pm$ 13
	Mussel	194813 $\pm$ 10	108565 $\pm$ 17	348226 $\pm$ 7	134155 $\pm$ 17
SIM	MeOH	2908363 $\pm$ 38	1874105 $\pm$ 2	5046112 $\pm$ 52	2038193 $\pm$ 3
	SPATT	3008124 $\pm$ 13	2433928 $\pm$ 5	4309294 $\pm$ 12	2723863 $\pm$ 4
	Mussel	5749387 $\pm$ 7	3129959 $\pm$ 8	8461843 $\pm$ 2	3693569 $\pm$ 18

Additional experiments were made on the system with the quadrupole time-of-flight mass spectrometer. The Phenomenex Kinetex XB-C18 column and two different gradients (1 and 2) (see Table below) were used to assess the impact of the gradient on matrix effects.

Gradient 1		Gradient 2	
<i>Time (min)</i>	<i>%B</i>	<i>Time (min)</i>	<i>%B</i>
0	5	0	5
3.6	50	5	5
8.5	100	9.9	50
10	100	11.41	100
10.1	5	11.51	100
15.1	5	16.41	5

A matrix-matched calibration solution was prepared as previously published [12] and contained PTX2, AZA1 to 3, OA, DTX1 and 2, PnTX-E, YTX, homo-YTX and DA. Matrix effects were evaluated by comparing the slope of methanol calibration curves (n=3) to the slope of matrix-matched calibration curves (n=3). The matrix effect was expressed as a recovery and compared to methanol recovery considered 100% and represented as the discontinued line. Recoveries > 100% were considered ion enhancement while recoveries < 100% reflected ion suppression. Matrix effects were considered statistically significant for $p < 0.05$ using a t-test.

Adding an isocratic in gradient 2 should theoretically impact early eluting toxins (DA, PnTX-E), while late eluting compounds should be less impacted. For SPATT samples, it appeared that gradient 2 led to less matrix effect regardless of the toxin considered. However, statistical t-test did not find a significant difference between gradient 1 and gradient 2. As for mussel samples, there was statistically significant difference between matrix effects observed with either gradient 1 or gradient 2, except for PnTX-E. According to Ito *et al.*[15], the matrix effect can be dependent on the degree of sample purification and chromatographic separation of the analytes from the sample matrix components on the column. This could explain the difference observed in matrix effects when the chromatographic gradient is modified. The compounds supposed to be more affected by interferences, thus matrix effect, are those eluting near the solvent front and at the end of the elution gradient (Bonfiglio 1999). In our case, this concerned DA and, AZAs and PTX-2 respectively.

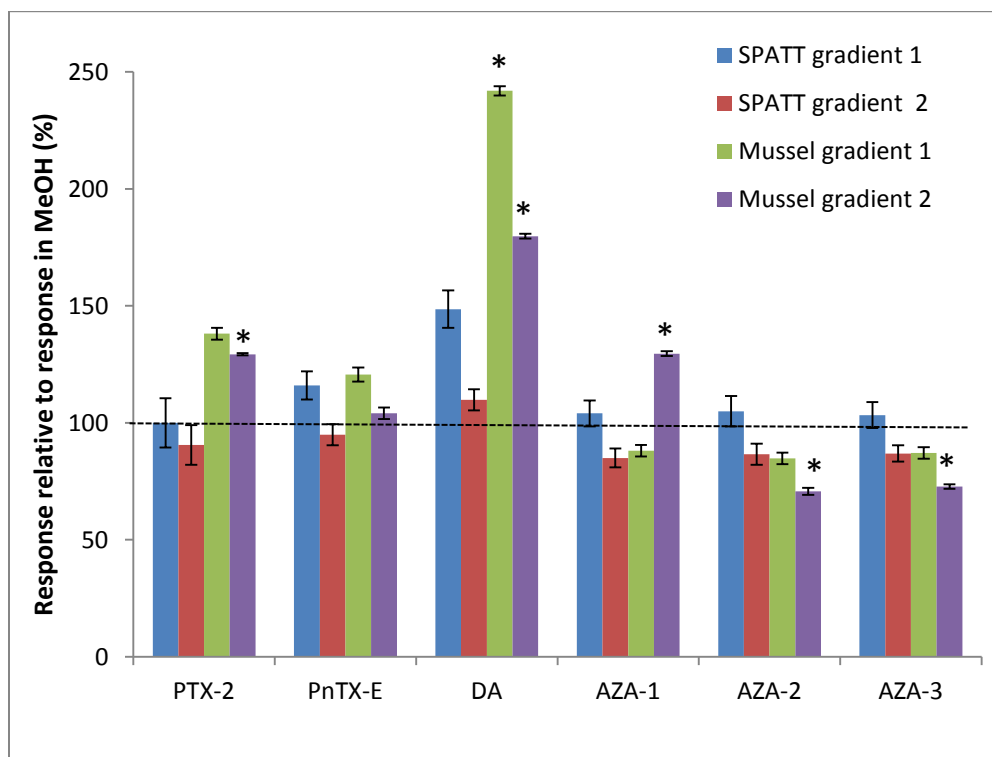


Figure S1: Matrix effects (recoveries $\pm$ %RSD, $n=3$) for SPATT and mussel samples using gradient 1 and gradient 2 on the QToF instrument. (*) represents statistically significant matrix effects ($p < 0.05$).

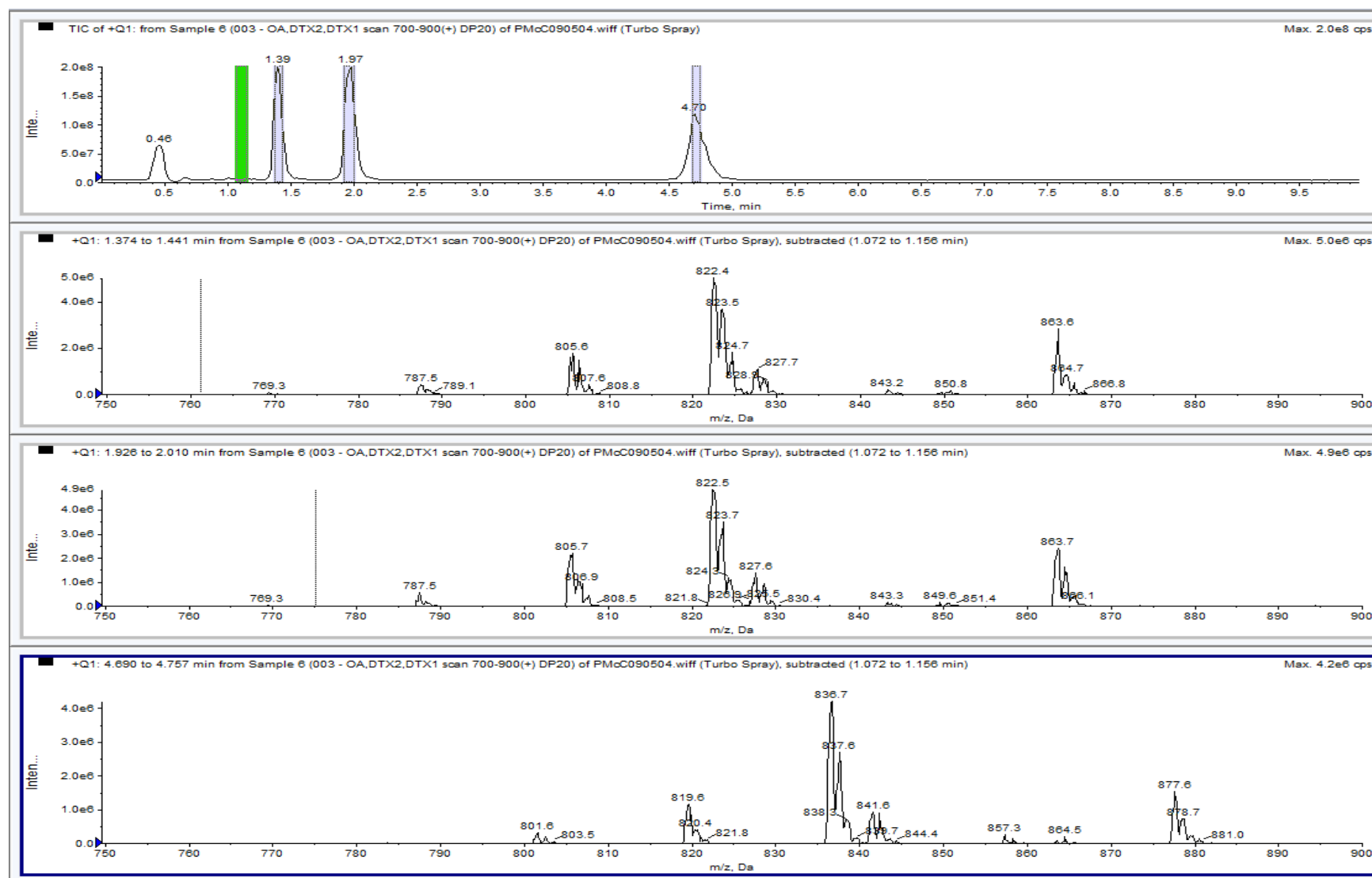


Figure S2: Positive mode Q1 scan of OA, DTX2 and DTX1 mixture as obtained on System 3 (API4000 QTrap).

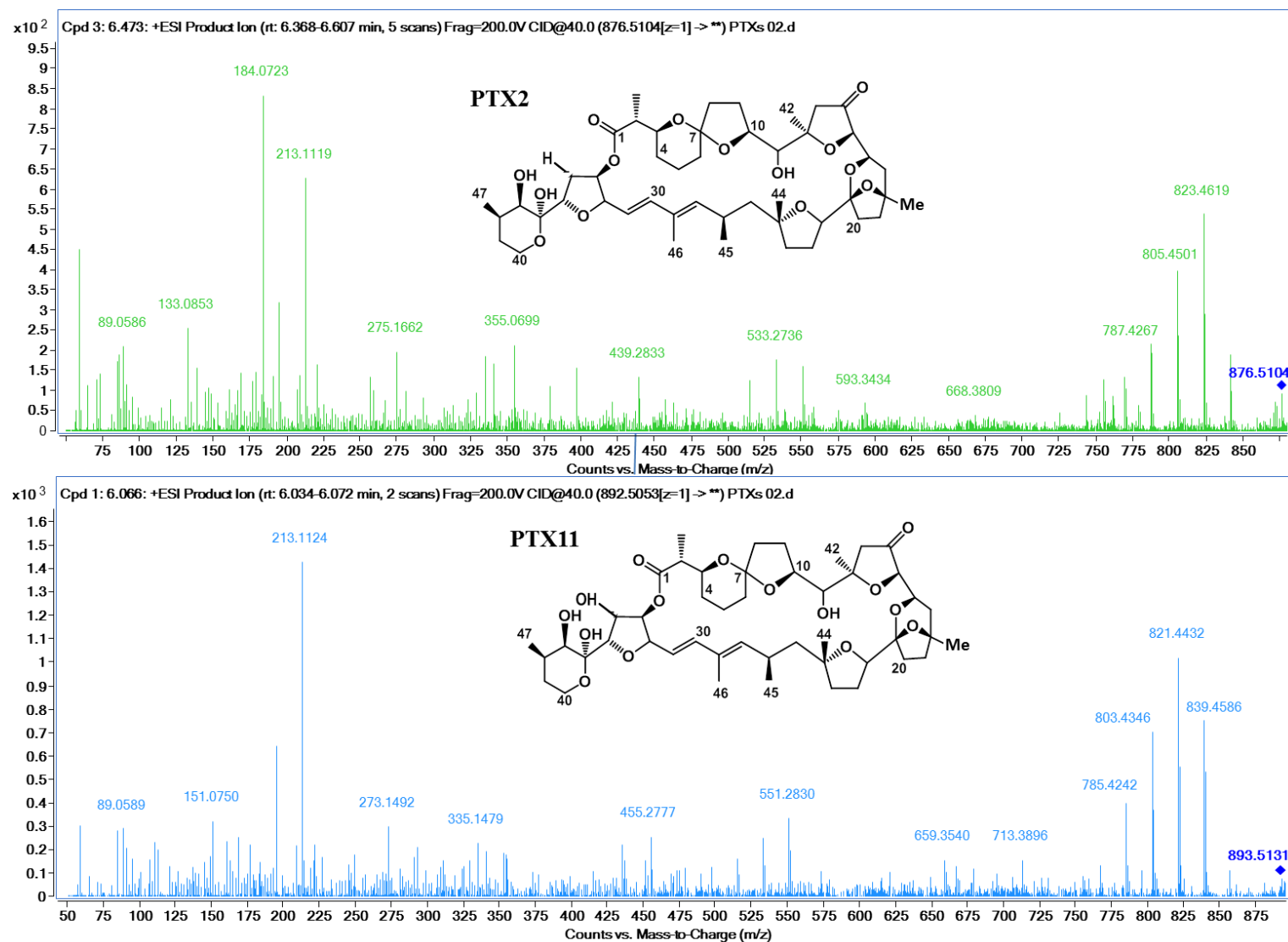
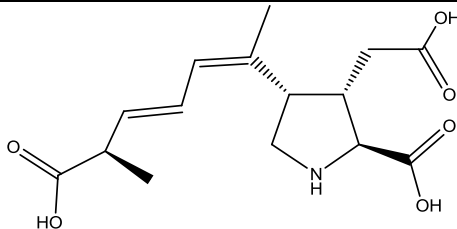
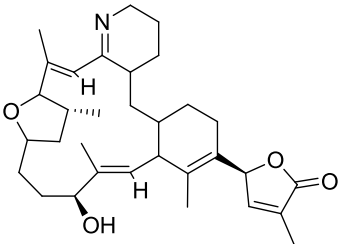
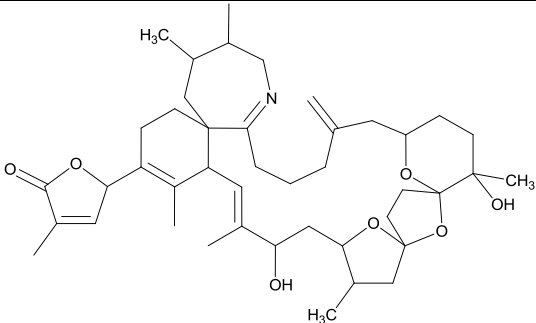
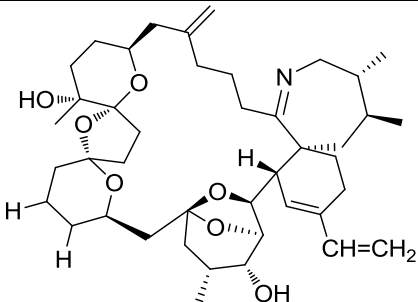
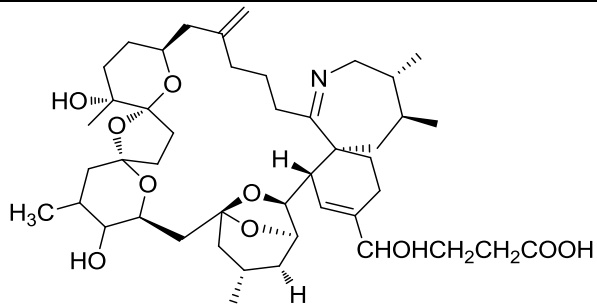
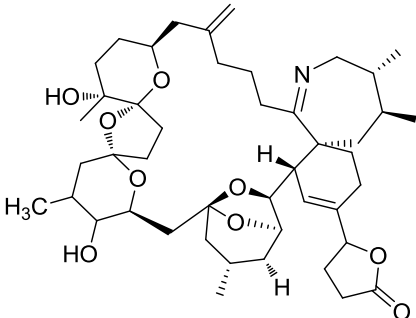
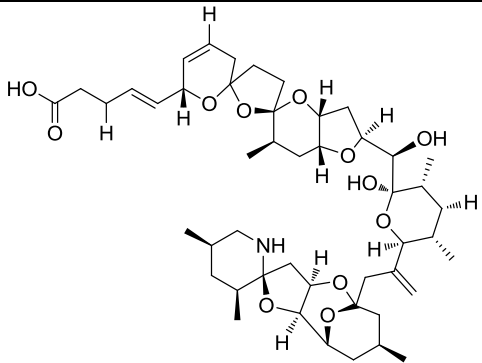
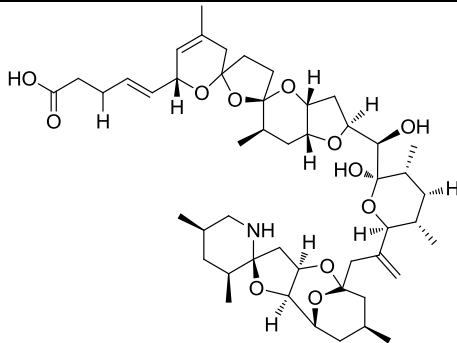
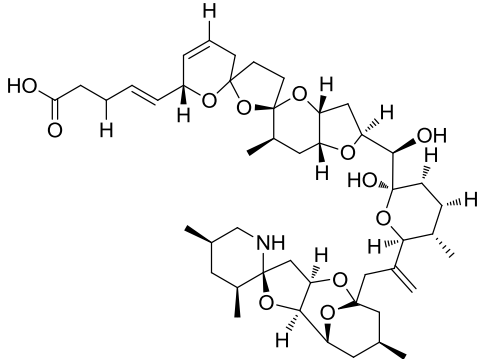
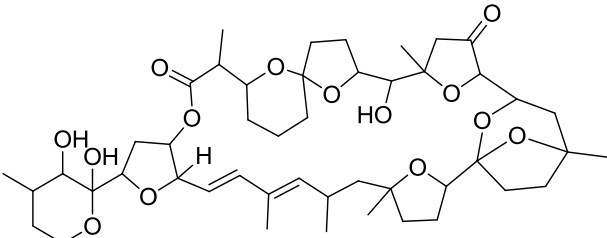
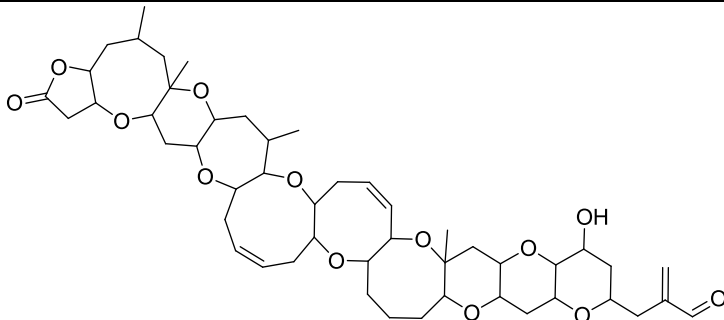
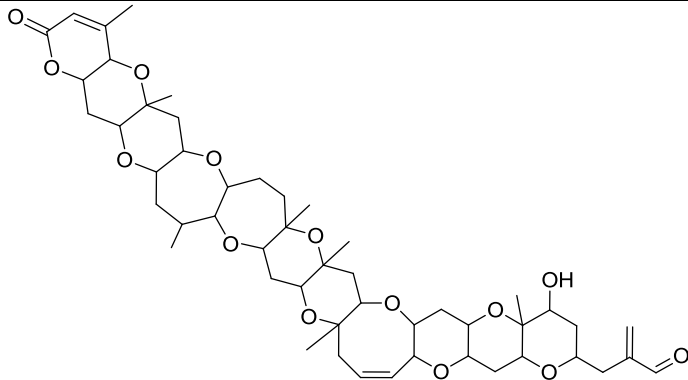
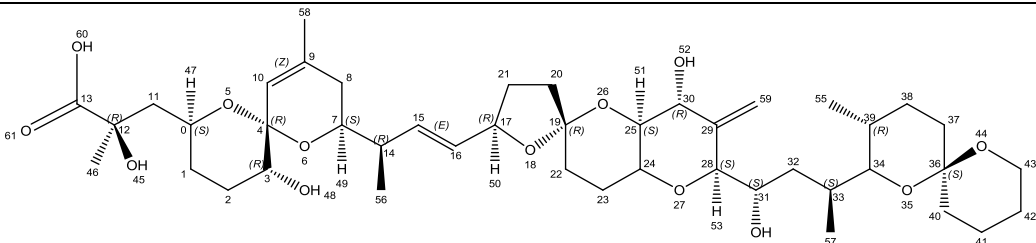


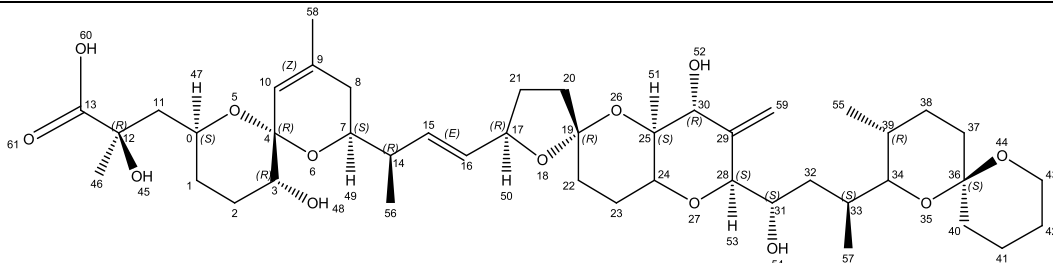
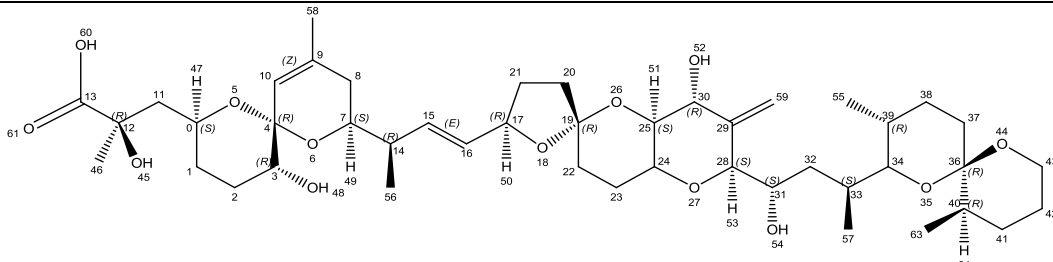
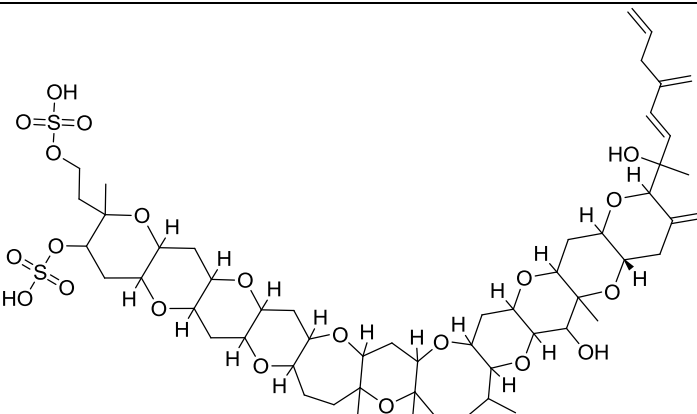
Figure S3: High resolution spectrum for PTX2 and PTX11 acquired in ESI⁺, in target MS/MS at CE=40 eV, on System 2 (QToF) for a SPATT solution, showing different responses of the fragment ions.

<i>Toxin</i>	<i>Chemical formula</i>	<i>Detected ion</i>	<i>Calculated m/z</i>	<i>Structure</i>
DA	C ₁₅ H ₂₁ NO ₆	[M+H] ⁺	312.1442	
GYM A	C ₃₂ H ₄₅ NO ₄	[M+H] ⁺	508.3421	
13-desMe-C (SPX1)	C ₄₂ H ₆₁ NO ₇	[M+H] ⁺	692.4521	
PnTX-G	C ₄₂ H ₆₃ NO ₇	[M+H] ⁺	694.4677	

<i>Toxin</i>	<i>Chemical formula</i>	<i>Detected ion</i>	<i>Calculated m/z</i>	<i>Structure</i>
<i>PnTX E</i>	$C_{45}H_{69}NO_{10}$	$[M+H]^+$	784.4994	
<i>PnTX F</i>	$C_{45}H_{67}NO_9$	$[M+H]^+$	766.4889	
<i>AZA 1</i>	$C_{47}H_{71}NO_{12}$	$[M+H]^+$	842.5049	

<i>Toxin</i>	<i>Chemical formula</i>	<i>Detected ion</i>	<i>Calculated m/z</i>	<i>Structure</i>
AZA 2	C ₄₈ H ₇₃ NO ₁₂	[M+H] ⁺	856.5206	
AZA 3	C ₄₆ H ₆₉ NO ₁₂	[M+H] ⁺	828.4893	
PTX 2	C ₄₇ H ₇₀ O ₁₄	[M+NH ₄] ⁺	876.5104	

<i>Toxin</i>	<i>Chemical formula</i>	<i>Detected ion</i>	<i>Calculated m/z</i>	<i>Structure</i>
BTX 1	C ₄₉ H ₇₀ O ₁₃	[M+Na] ⁺	889.4709	
BTX 2	C ₅₀ H ₇₀ O ₁₄	[M+H] ⁺	895.4838	
OA	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	803.4587	

<i>Toxin</i>	<i>Chemical formula</i>	<i>Detected ion</i>	<i>Calculated m/z</i>	<i>Structure</i>
DTX2	$C_{44}H_{68}O_{13}$	$[M-H]^-$	803.4587	
DTX 1	$C_{45}H_{70}O_{13}$	$[M-H]^-$	817.4744	
YTX	$C_{55}H_{82}O_{21}S_2$	$[M-H]^-$	1141.4717	

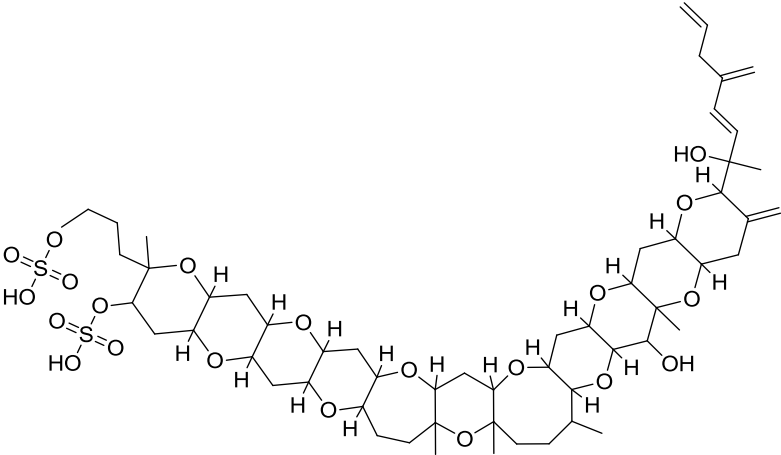
<i>Toxin</i>	<i>Chemical formula</i>	<i>Detected ion</i>	<i>Calculated m/z</i>	<i>Structure</i>
homo-YTX	$C_{56}H_{84}O_{21}S_2$	$[M-H]^-$	1155.4874	

Figure S5: Chemical formula, detected ion, calculated m/z and structure for lipophilic toxins

***CHAPITRE 3 - CRIBLAGE DES ECHANTILLONS
ENVIRONNEMENTAUX ET BIOLOGIQUES:
ANALYSE CIBLEE ET NON CIBLEE***

CONTEXTE

Les efflorescences d'algues toxiques sont de plus en plus fréquentes avec une répartition géographique de plus en plus étendue. Ceci est principalement dû à l'eutrophisation, aux eaux de ballaste des bateaux et aux changements climatiques (Anderson et al., 2002; James et al., 2010; Smayda, 2007). La contamination des mollusques bivalves par les toxines de microalgues étant un risque sanitaire pour l'homme, des teneurs maximales en toxines marines admissibles dans les produits destinés à la consommation humaine ont été réglementées. Les réglementations sont cependant spécifiques à leurs zones d'application (généralement européenne ou américaine) et focalisées sur les toxines connues pour être présentes dans des environnements marins géographiquement déterminés. Cependant, comme mentionné précédemment, avec les changements climatiques et l'eutrophisation il devient difficile de prédire quelles toxines seront présentes dans tel ou tel environnement marin. La surveillance traditionnelle, par le suivi des populations de phytoplancton et l'analyse des coquillages, ainsi que l'échantillonnage passif, permettent d'avoir des informations sur la présence de phytoplancton toxique.

La ***première partie*** de ce chapitre s'est intéressée à l'échantillonnage passif dans le Golfe de Guinée, zone pour laquelle on dispose de peu d'informations sur les populations de microalgues présentes. L'analyse quantitative ciblée a permis d'identifier et de quantifier des toxines de microalgues pouvant être retrouvées dans les zones étudiées. L'analyse non-ciblée a permis, quant à elle, de réaliser une ébauche d'identification des composés présents dans l'eau de mer lors de l'échantillonnage, et potentiellement représentatifs de la population de phytoplancton présente dans ces zones.

Dans la ***deuxième partie***, la spectrométrie de masse haute résolution a été utilisée, en combinaison avec l'échantillonnage passif, pour le criblage ciblé des toxines mais aussi pour l'analyse non-ciblée du profil chimique global de différentes zones côtières françaises.

Enfin, la ***troisième partie*** est consacrée à l'évaluation de la concentration en toxines dissoutes dans l'eau. En effet, très peu d'informations quantitatives sont disponibles dans la littérature sur le lien entre les concentrations en toxines présentes dans l'eau de mer et celles dans les mollusques bivalves ou dans les échantillonneurs passifs placés dans le même environnement. Par ailleurs très peu d'études portant sur la détermination des concentrations en toxines dissoutes ont été réalisées sur le terrain. De grands volumes d'eau de mer ont donc

été collectés et concentrés par percolation au travers de résine HP-20, pour essayer de déterminer les concentrations en toxines dissoutes.

I. Algal toxin profiles in Nigerian coastal waters (Gulf of Guinea) using passive sampling and liquid chromatography coupled to mass spectrometry

Article soumis dans “Toxicon”: Z. Zendong, M. Kadiri, C. Herrenknecht, E. Nézan, A. Mazzeo, P. Hess.

I.1. RESUME

Les toxines algales, ainsi que les algues qui les produisent, sont régulièrement surveillées dans plusieurs pays d'Europe, d'Amérique du nord, au Japon et dans d'autres contrées. Cependant, très peu d'informations sont disponibles sur la présence de microalgues toxiques dans la plupart des pays Africains. C'est pourquoi nous avons cherché à savoir si des microalgues toxiques pouvaient être présentes au large des côtes africaines et notamment dans les eaux côtières du Nigéria.

Des échantillons d'eau de mer ont été prélevés sur les côtes nigériennes dans quatre sites d'étude (Bar Beach, Lekki, Port Harcourt et Uyo) situés dans le golfe de Guinée, près du delta du Niger, entre Octobre 2014 et Février 2015. Pendant cette période, la communauté de phytoplancton présente était généralement dominée par la présence de diatomées et de cyanobactéries. Cependant, plusieurs espèces de dinoflagellés ont également été identifiées : *Dinophysis caudata*, *Lingulodinium polyedrum* et deux espèces benthiques de *Prorocentrum*. De faibles salinités de l'eau, allant de 2 à 20, ont été observées durant la période de l'étude. Ces faibles salinités ne sont, en général, pas appropriées pour le développement de microalgues marines, raison pour laquelle peu de dinoflagellés toxiques ont été détectés dans les eaux prélevées. Il faut cependant noter que les périodes d'échantillonnage ne représentant que de courtes périodes de l'année, des efflorescences de microalgues ont pu être manquées.

Dans le but d'obtenir le profil des algues présentes dans l'eau de mer et de montrer l'intérêt de l'utilisation de capteurs passifs, des échantillonneurs passifs contenant de la résine HP-20 ont été déployés pour des durées d'une semaine, dans les quatre sites d'étude. De l'acide okadaïque (AO) et de la pecténotoxine 2 (PTX2) ont été détectés dans ces échantillons, à des concentrations quantifiables, et la dinophysistoxine 1 (DTX1) a été

détectée à l'état de traces. Les concentrations les plus élevées (60 ng d'AO/g de résine HP-20) ont été relevées à Lekki et Bar Beach, sites pour lesquels les niveaux de salinité étaient également les plus forts. La détection d'AO s'est avérée cohérente avec la mise en évidence de la présence de *D. caudata* et d'espèces de *Prorocentrum* dans les zones étudiées. L'analyse non-ciblée, réalisée en spectrométrie de masse haute résolution, a permis de mettre en évidence des différences entre métabolites algaux retrouvés, selon le site et la période d'échantillonnage. Par ailleurs, en interrogeant des bases de données, des composés produits par des cyanobactéries ont potentiellement été mis en évidence, ce qui a permis de montrer la concordance des résultats de l'analyse non ciblée avec les résultats de l'analyse du phytoplancton réalisée dans le milieu marin.

Pour conclure, la présence d'AO et de PTX2, toxines de dinoflagellés marins, a été mise en évidence dans les eaux côtières du Nigéria pendant cette étude. Par conséquent, ce travail démontre l'intérêt de la mise en place d'une surveillance des coquillages au large des côtes nigériennes, pour déterminer le risque que pourrait représenter l'accumulation de ces toxines dans les coquillages.

I.2. ABSTRACT and KEYWORDS

Algal toxins may accumulate in fish and shellfish and thus cause poisoning in consumers of seafood. Such toxins and the algae producing them are regularly surveyed in many countries, including Europe, North America, Japan and others. However, very little is known regards the occurrence of such algae and their toxins in most African countries. This paper reports on a survey of phytoplankton and algal toxins in Nigerian coastal waters.

Seawater samples were obtained from four sites for phytoplankton identification, on three occasions between the middle of October 2014 and the end of February 2015 (Bar Beach and Lekki in Lagos State, Port Harcourt in Rivers State and Uyo in Akwa Ibom State). The phytoplankton community was generally dominated by diatoms and cyanobacteria; however several species of dinoflagellates were also identified: *Dinophysis caudata*, *Lingulodinium polyedrum* and two benthic species of *Prorocentrum*. Low salinities ranging from approximately 2 to 20 were observed during the study period. These low salinities normally do not favour marine micro-algal development *in situ*, and indeed only small numbers of toxic dinoflagellates were detected. However, the survey only consisted in three sampling occasions over four months, and hence toxic blooms could have easily been missed.

Passive samplers (containing HP-20 resin) were deployed for several 1-week periods on the same four sites to obtain profiles of algal toxins present in the seawater. Quantifiable amounts of okadaic acid (OA) and pectenotoxin 2 (PTX2), as well as traces of dinophysistoxin 1 (DTX1) were detected at several sites. Highest concentrations (60 ng OA g⁻¹ HP-20 resin) were found at Lekki and Bar Beach stations, which also had the highest salinities. The occurrence of OA was consistent with the observation of *D. caudata* and *Prorocentrum* spp. Non-targeted analysis using full-scan high resolution mass spectrometry showed that algal metabolites differed from site to site and for different sampling occasions. Screening against a marine natural products database indicated the potential presence of cyanobacterial compounds in the water column, which was also consistent with phytoplankton analysis.

During this study, the occurrence of the marine dinoflagellate toxins OA and PTX2 has been demonstrated in coastal waters of Nigeria despite unfavourable environmental conditions. Hence shellfish samples should be monitored in future to assess the risk for public health through accumulation of such toxins in seafood.

Keywords: Dinoflagellates, *Dinophysis*, phycotoxins, untargeted analysis, phytoplankton

I.3. INTRODUCTION

Toxins from marine micro-algae frequently accumulate in seafood, including fish and shellfish, and maximum concentrations for such toxins have therefore been regulated at global and regional levels [1-4]. As fisheries have only limited potential to increasingly contribute to the global food supply, it is expected that any growth in seafood supply will have to come from aquaculture. Therefore, it is important to investigate the potential of coastal areas for seafood production, and also the risks associated with such production. In terms of public health risks, those originating from harmful algal blooms are particularly common in many parts of the world and must therefore be assessed relatively early on in any survey for aquaculture feasibility.

To our knowledge, no algal toxins have been reported in coastal waters of central Western Africa, except one preliminary report on potentially toxic fish in Cameroon [5]. The southernmost records of algal toxins in Northern Africa are from the Moroccan coastline where an official monitoring program is in place [6, 7]. Lipophilic shellfish toxins were shown to accumulate in mussels, cockles, oysters and solen, causing poisoning in the Dakhla

region, *i.e.* the South Atlantic Moroccan coast [8]. Toxins of the okadaic acid (OA) group, *i.e.* OA and dinophysistoxins (DTXs) and their associated esters were the agents responsible for those shellfish poisoning events, attributable to the presence of several potentially toxic species of *Dinophysis*. Taleb *et al.* [9] also were the first to report of azaspiracids in mussels in Morocco.

In southern parts of Africa, regular monitoring is in place in South Africa and Namibia. Production of saxitoxin (STX) off the west coast of South Africa has been attributed to *Alexandrium catenella* [10, 11]. Fawcett *et al.* [12] deployed a bio-optical buoy for monitoring HABs in the southern Benguela Current region off South Africa, to provide both real-time and time-series data on the frequent harmful algal blooms (HABs) occurring in the region. The northernmost records of algal toxins in the southern African region are from Angola [13, 14].

Phytoplankton surveys in Nigeria by one of the authors have reported non-toxin producing as well as potentially toxic algae including *Prorocentrum micans*, *Protoperidinium depressum*, *Prorocentrum mite*, *Dinophysis caudata* (*D. caudata*), *Peridinium gatunense*, *P. cinctum*, *Gymnodinium fuscum* and an array of *Ceratium* species [15-20]. Previous studies by other authors also showed sporadic occurrences of *D. caudata*, *Protoperidinium depressum*, *P. diabolus*, *Prorocentrum micans*, *Noctiluca scintillans* in Lagos Lagoon [21, 22]. A recent report additionally recorded *Lingulodinium polyedrum*, *Prorocentrum minimum*, *P. sigmoides* and *Scrippsiella trochoidea* in Lagos, Cross Rivers and Delta States [23].

As potentially toxic algae have repeatedly been reported from Nigerian coastal waters this study attempted to verify whether algal toxins actually do occur in Nigerian waters. Since there was no algal culturing facility available on site, and as many dinoflagellates are difficult to bring into culture, in particular *Dinophysis*, we have opted for an indirect approach based on passive sampling of algal toxins in Nigerian coastal waters. This approach had been introduced for monitoring of toxins by MacKenzie *et al.* [24]. We have focussed on regulated lipophilic toxins known to cause problems in terms of public health but have also used in parallel, an approach for untargeted analysis based on high-resolution mass spectrometry as previously described [25].

I.4. MATERIALS AND METHODS

I.4.1. Chemicals, reagents and sorbent materials

Certified standard solutions of okadaic acid (OA), domoic acid (DA), dinophysistoxins (DTX1, DTX2), 13-desmethyl spirolide C (13-desmeSPX-C), pectenotoxin 2 (PTX2), gymnodimine A (GYM-A), azaspiracids (AZA1,-2 and -3), yessotoxin (YTX) and homo-yessotoxin (homo-YTX) were obtained from the National Research Council in Halifax, Canada. HPLC grade methanol and acetonitrile as well as ammonium formate and formic acid (98%) were acquired from AtlanticLabo (Bordeaux, France) and Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Deionized water was produced in-house to $18\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$ quality, using a Milli-Q integral 3 system (Millipore). For analyses with the high resolution mass spectrometry instrument, acetonitrile and water of LC/MS grade were obtained from Fischer Scientific (Illkirch, France). For passive sampler devices, Diaon[®] HP-20 polymeric resin was purchased as bulk resin from Sigma-Aldrich and 12 mL capacity polypropylene 2 frits-Reservoirs were from Agilent Technologies.

Brucine-sulfanilic acid reagent was prepared by dissolving 1 g brucine sulfate $[(\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$ and 0.1 g sulfanilic acid $(\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H} \cdot \text{H}_2\text{O})$ into 70 ml of hot distilled water. Concentrated hydrochloric acid (3 mL) was further added and this mixture was cooled, mixed and then diluted to 100 mL with distilled water. The final mixture was stored in a dark bottle at 5 °C. For ascorbic acid, the ready-made PhosVer 3 Hach[™] was used.

I.4.2. Study area

The study area (Figure 1), *i.e.* the Nigerian coastal area, is situated in the Guinea Current Large Marine Ecosystem, in the Gulf of Guinea. The area is influenced by coastal upwelling which occurs seasonally along the northern and eastern coasts. There are two (major and minor) upwelling seasons. Those seasons occur annually with differing duration and intensities off Ghana and Cote d'Ivoire, in the central part of the large marine ecosystem. The major upwelling season occurs from June to September and transient upwelling events are from January to March [26].

The coastline of Nigeria is approximately 853 km long between latitude $4^{\circ}10'$ to $6^{\circ}20'$ N and longitude $2^{\circ}45'$ to $8^{\circ}35'$ E. The Nigerian coastal area is low-lying of not more than 3.0 m above sea level, generally covered by fresh water swamp, mangrove swamp, lagoonal marshes, tidal channels, beach ridges and sand bars [27].

The Nigerian coast is composed of four distinct geomorphological units namely: the Barrier-Lagoon complex; the Mud coast; the Arcuate Niger delta; and the Strand coast [28]. The vegetation of the Nigerian coastal area is characterised by mangrove forests, brackish swamp forests and rain forests.

The coastal zone is richly endowed with a variety of mineral resources, including oil and gas. The selected sites are located in the Gulf of Guinea (Atlantic Ocean), in the Bight of Bonny to the East and the Bight of Benin to the West. There are two main seasons in the deploying sites: the rainy (wet) season spanning from May to October and the dry season from November to April.

Seawater sampling for nutrients and for phytoplankton analysis, as well as passive sampling were carried out at sites and dates as listed in Table I-1.

Table I-1: Sampling sites and dates for water and toxin analysis (date format: dd/mm/yy)

Sampling site	Latitude	Longitude	Dates for water sampling	Dates for passive sampling
Bar Beach	N 6° 25.340'	E 3° 26.189'	18/10/14, 02/02/15, 21/02/15	18/10/14, 08/11/14, 07/02/15, 28/02/15
Lekki	N 6° 25.256'	E 3° 32.180'	21/02/15	08/11/14, 28/02/15
Port Harcourt	N 4° 41.828'	E 7° 10.706'	29/01/15, 22/02/15	04/02/15, 28/02/15
Uyo	N 4°33.203'	E 8° 00.202'	17/10/14, 28/01/15, 23/02/15	18/10/14, 07/11/14, 03/02/15, 25/02/15

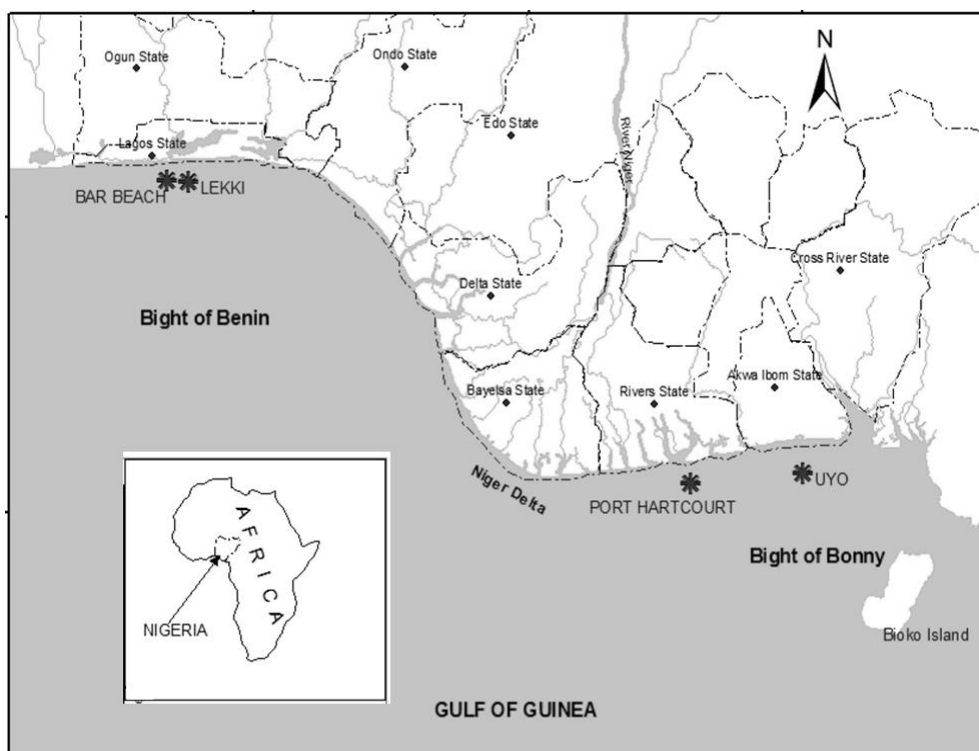


Figure I-1: Location of sampling sites (red stars): Bar Beach and Lekki are both in Lagos State off Lagos lagoon; Port Harcourt is in Rivers State, in the vicinity of the Niger delta, and Uyo is in Akwa Ibom State towards the Eastern Limit of Nigerian waters.

I.4.3. Physico-chemical parameters and water sampling for analysis of nutrients and phytoplankton identification

Water samples (1 L) were obtained for analysis of nutrients at an integrated depth of 10 m to the surface of the ocean, with a Lund tube of 2.5 cm diameter. Temperature was measured with a mercury-in-glass thermometer. Dissolved oxygen was measured using a Milwaukee NW 600 probe and salinity was measured with a Hach™ Salinity/Conductivity probe (Hach Company, USA).

Nutrients were analysed according to ASTM [29]. For the determination of nitrate, brucine sulphanilic acid reagent (1 mL) was added to standard solutions as well as to samples (10 mL). The resultant mixtures were mixed thoroughly and allowed to stand for 15 min. Then 10 mL of H₂SO₄ solution were carefully added to 10 mL of distilled water and the resulting solution was added to each of the beakers containing the nitrate standard solutions and the water samples, respectively. This was allowed to stand for 20 min in the dark. Similar treatment was performed on the blank solution, using the same protocol except that no brucine sulphanilic reagent was added to it. The absorbance of standards and samples was determined

at 410 nm wavelength using a UV/Visible spectrophotometer. Phosphate was determined using the ascorbic acid method. The programmed method of Hach was used using the Hach spectrophotometer DR2000™ (Hach Company, USA).

Phytoplankton samples were collected by horizontal and vertical tows using a plankton net made from fine bolting silk (10 µm mesh, length: 107 cm and Diameter: 29 cm). Samples were drained into the plankton bucket and preserved with Lugol's iodine in sample bottles. Light microscopy (LM) observations were carried out from 50 µL of fixed net samples deposited on a glass slide, using an Olympus IX70 inverted light microscope equipped with a digital camera DP72 (Olympus, Tokyo, Japan). Cells were photographed, either directly or after isolation with a micropipette, depending on concentration of organisms and particles.

I.4.4. Passive sampler design, handling and extraction

Passive sampling devices (Solid Phase Adsorption Toxin Tracking = SPATT) were prepared using a 68 mm embroidery frame (Singer, Nantes, France). Three grams (3 g) of the HP-20 resin were placed between two layers of a 30 µm nylon mesh (Mougel, France), and clamped in the embroidery frame to form a thin layer of resin. To activate the HP20 resin, the passive samplers were soaked for 3 h in methanol, rinsed twice with deionized water to remove methanol residues [30, 31] and directly deployed. Three SPATTs were put in three separate compartments cylinders made of steel to firmly secure them and deployed in the sea at 1m depth for 7 days at each site. After deployment, the SPATTs were retrieved, rinsed with seawater to remove residual biofilm and transported in frozen ice packs to the laboratory. The SPATTs were shipped to the analytical laboratory in France on ice and arrived in good condition. They were then stored in the freezer (-20 °C) until analysis. The HP-20 resin was extracted according to previously published methods, with slight changes [30, 32]. Briefly, after deployment, the SPATTs were rinsed twice in 500 mL deionized water, transferred into empty polypropylene reservoirs placed on a manifold and eluted drop wise with 24 ml of methanol. The extracts were then evaporated at 45 °C under a gentle nitrogen stream. The dry residue was further reconstituted in 500 µL of 50% methanol, filtered on Nanosep MF centrifugal filters 0.2 µm (Pall) and transferred into HPLC vials for analysis.

I.4.5. Liquid chromatography - mass spectrometry analyses

Three different analytical systems were used: (1) for quantitative targeted analysis of toxins; (2) for untargeted screening of unknowns as well as known toxins; (3) for characterisation and confirmation of toxins. For all three systems, chromatographic separation was achieved after injection of a 3 μ L sample volume onto a Phenomenex Kinetex XB-C18 (100 x 2.6 mm; 2.6 μ m) column maintained at 40 °C, with a flow rate of 400 μ L/min. The binary mobile phase consisted of water (A) and 95% acetonitrile/water (B), both containing 2 mM ammonium formate and 50 mM formic acid. The elution gradient rose from 5% to 50% of B in 3.6 min, then 100% B was reached by 8.5 min. After 1.5 min of hold time at 100% B, 5% B was reached within 10 s, followed by 5 min re-equilibration of the column at 5% B. The total chromatographic run time was 15 min. To avoid cross contamination of samples, the needle was washed for 10 s in the flush port with 90% MeOH before each injection. On all analytical systems, mass spectrometric acquisitions were carried out separately in positive (ESI^+) and negative (ESI^-) ionization modes.

I.4.5.a. System 1: LC-MS/MS for quantitative analysis

A UFLC-XR Shimadzu liquid chromatography system (Champs-sur-Marne, France) was connected to a hybrid triple quadrupole/linear ion-trap mass spectrometer (API4000TM; AB Sciex) equipped with a TurboIonSprayTM ionization source. For quantitation, the mass spectrometer was operated in MRM mode, scanning two transitions for each toxin. Q1 and Q3 resolutions of the instrument were set at Unit (arbitrary terms). Data were acquired in MRM and the target scan time was 1 s. In ESI^+ , the following source parameters were used: curtain gas set at 30 psi, ion spray at 5500 V, a turbogas temperature of 450°C, gas 1 and 2 both set at 50 psi, and an entrance potential of 10 V. In ESI^- , the curtain gas was set at 20 psi, the ion spray at -4500 V, the turbogas temperature at 550°C, gas 1 and 2 at 40 and 50 psi, respectively, and finally the entrance potential at -13 V. MRM transitions used for each toxin are displayed in Table I-2. Data acquisition was carried out with Analyst 1.6 Software (AB Sciex).

Table I-2: Multiple Reaction Monitoring (MRM) transitions used for quantitative analysis on System 1 (30 msec dwell in ESI⁺ and 80 msec dwell in ESI⁻).

Toxin	DP	Q1	Q3 quantifier	CE	Q3 qualifier	CE
<i>DA</i>	61	312.1	266.1	23	161.1	35
<i>GYM-A</i>	86	508.4	490.2	33	392.3	49
<i>13-desmeSPX-C</i>	121	692.5	164.2	69	444.3	53
<i>PnTX-G</i>	141	694.5	164.1	75	458.3	75
<i>AZA1</i>	116	842.5	672.4	69	654.4	69
<i>AZA2</i>	116	856.5	672.4	69	654.4	69
<i>AZA3</i>	116	828.5	658.4	69	640.4	69
<i>PTX2</i>	91	876.5	823.5	31	805.6	37
<i>PTX2sa</i>	91	894.6	823.5	31	805.6	37
<i>OA, DTX2</i>	-170	803.5	255.1	-62	113.1	-92
<i>DTX1</i>	-170	817.5	254.9	-68	112.9	-92
<i>YTX</i>	-120	1141.4	1061.6	-48	855.5	-98
<i>homo-YTX</i>	-120	1155.6	1075.6	-48	869.4	-98

I.4.5.b. System 2: LC-HRMS for untargeted and targeted screening of toxins and unknowns

A UHPLC system (1290 Infinity, Agilent Technologies) was coupled to a 6540 UHD Accurate-Mass QToF (Agilent Technologies) equipped with a dual ESI source. Full-scan analyses were performed over the range m/z 65 to 1700 with an acquisition rate of 2 spectra s^{-1} . In ESI⁺ the temperature of the Jet Stream TechnologiesTM source was set at 205°C with the drying gas flow-rate at 5 L min^{-1} . The sheath gas temperature was 355°C. Other parameters were as follows: capillary voltage, 2000 V; fragmentor voltage, 200 V. The parameters of the Jet Stream TechnologiesTM source in ESI⁻ were: gas temperature 305°C, drying gas flow 5 L min^{-1} , nebulizer pressure 50 psig, sheath gas temperature 355 °C, sheath 12 L/min, capillary voltage 3500 V, fragmentor voltage, 180 V.

All experiments were done with reference mass correction using purine (m/z 121.0509 [M+H]⁺ ; m/z 119.03632 [M-H]⁻) and HP-921 = hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy) phosphazine (m/z 922.0099 [M+H]⁺ ; m/z 966.00072 [M+HCOO]⁻). The reference ions were infused constantly with an isocratic pump to a separate ESI sprayer in the dual spray source. Raw data files obtained on System 2 were retreated using the Agilent *Molecular Feature Extractor* (MFE) algorithm in MassHunter Qual software (B.07). This algorithm was used to obtain the *Total Compound Chromatogram* of samples as previously described [25]. This algorithm designed for use with full scan data treats the mass spectral data as a three-

dimensional array of retention time, m/z and abundance values. Any point corresponding to persistent or slowly-changing background is removed from that array of values. Then the algorithm searches for ion traces that elute at very nearly the same retention times. Those ion traces are then grouped into entities called Compounds regrouping all ion traces that are related, *i.e.* those that correspond to mass peaks in the same isotope cluster, or can be explained as being different adducts or charge states of the same entity. The results for each detected *Compound* are a mass spectrum containing the ions with the same elution time and explainable relationships, and an extracted compound chromatogram (ECC) computed using all of these related ion traces in the compound spectrum (and only those traces). The results from the MFE analysis were then uploaded to the MassProfilerProfessional software (Agilent) to carry out statistical analysis (PCA: Principal Component Analysis). Before statistical analysis retention time and mass alignment were performed with 0.2 min and 15 ppm retention time and mass tolerance windows, respectively.

1.4.5.c. System 3: LC-HRMS for toxins confirmation

Analyses were carried out using a UHPLC system (1290 Infinity II, Agilent Technologies) coupled to a 6550 iFunnel QToF (Agilent Technologies) equipped with a dual ESI source. This instrument was operated with a dual electrospray ion source with Agilent Jet Stream Technology™ in positive and negative ionization modes. Analyses were performed over the range m/z 100 to 1200 with an acquisition rate of 2 spectra s^{-1} . The parameters of the Jet Stream Technologies™ source in ESI⁺ were: gas temperature 205°C, drying gas flow 16 L/min, nebulizer pressure 50 psig, sheath gas temperature 355°C, sheath 12 L/min, capillary voltage 2000 V, fragmentor voltage, 200 V. In ESI⁻ the parameters were as follows: gas temperature 290°C, drying gas flow 12 L/min, nebulizer pressure 50 psig, sheath gas temperature 355°C, sheath 12 L/min, capillary voltage 3500 V, fragmentor voltage, 180 V. Three collision energies (20, 40 and 60 eV) were applied to the precursor ions to generate fragmentation spectrum. All experiments were done with reference mass correction as described above for System 2. MassHunter Acquisition B05.01 software was used to control the instrument and data were processed with MassHunter B07.00 service pack.

I.5. RESULTS AND DISCUSSION

I.5.1. Physico-chemical measurements

Water temperatures, salinity and nutrient levels in the study area confirm a strong correlation with seasonality (Table I-3). Salinity ranged from 2 to 20, all areas and periods confounded, which is comparatively low for marine dinoflagellates. The two stations in the North-west of the study area (Lekki and Bar Beach) displayed the highest salinities, ranging from 17.2 to 18.2 during the end of the wet season (October 2014), and from 18.1 to 19.3 during the dry season (January / February 2015). The stations closer to the Niger delta (off the cities of Port Harcourt and Uyo) showed much lower salinities, with the Port Harcourt station (directly outside the main delta in River States) showing the lowest overall salinity of 2 in wet season (October 2014) but still reaching a salinity of 9 during dry season (February 2015).

Table I-3: Surface water temperature, dissolved oxygen (DO), salinity and nutrient concentrations at sampling stations in Nigerian coastal waters 2014-15.

Parameter	Bar Beach		Lekki		Port Harcourt		Uyo	
	18/10/14	02/02/15	17/10/14	30/01/15	19/10/14	04/02/15	18/10/14	03/02/15
Water Temp (°C)	26	27	27	26	32	30	25.5	31
DO (mg/L)	7.8	9.8	7.8	7.9	7.8	6.5	7.4	6.5
Salinity	18.2	19.3	17.2	18.1	2.0	8.8	6.6	7.8
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	0.07	0.51	0.03	0.2	0.07	0.22	0.03	0.51
NO ₃ ⁻ (mg/L)	1.48	1.61	1.44	1.59	0.37	1.26	1.48	1.61

I.5.2. Identification of phytoplankton species

Phytoplankton samples were generally dominated by diatoms and cyanobacteria, especially filamentous cyanobacteria. However, several species of marine dinoflagellates were also observed (Figure IV-2). In particular, a few cells of *Dinophysis caudata* were observed in a sample from Bar Beach (21 February 2015). *D. caudata* had previously been reported as a producer of OA and PTX2 in different areas and should thus be considered as a potentially toxic species [33-36]. Interestingly, different regions reported different profiles of toxins in picked cells of *D. caudata*. In Northwestern Spain and China, the toxin profile was dominated by PTX2 [33, 34], while OA was shown to be present in picked cells of *D. caudata* from both Japanese and Singapore waters [35, 36].

Another potentially toxic dinoflagellate was observed in the sample from Bar Beach: *Lingulodinium polyedrum*. The thecal plate tabulation of *Lingulodinium polyedrum* fits into the genus *Lingulodinium* Wall. This species is characterized by its polyhedral shape with a flat antapex lacking any projections, thick thecal plates with ridges along the sutures and circular depressions over the surface of the plates (Dodge, 1989), see also Figure S2 (supplementary information). The same organism had also been detected at a concentration of several thousand cells L^{-1} in coastal waters of Atlantic Morocco [37], and cultures of Spanish strains of *L. polyedrum* were shown to produce yessotoxin [38].

Three cells of two unidentified benthic *Prorocentrum* species have also been observed (Figure I-2c and d). A number of benthic *Prorocentrum* species have been associated with the production of toxins of the okadaic acid, the prorocentrolide and the hoffmaniolide groups: *P. lima*, *P. belizeanum*, *P. maculosum*, *P. rhathymum* and *P. hoffmanianum* [39-42], but even a pelagic species of *Prorocentrum* (*P. texanum*) has recently been associated with the production of okadaic acid [43]. Therefore, this observation should be verified to determine the exact species of *Prorocentrum*.

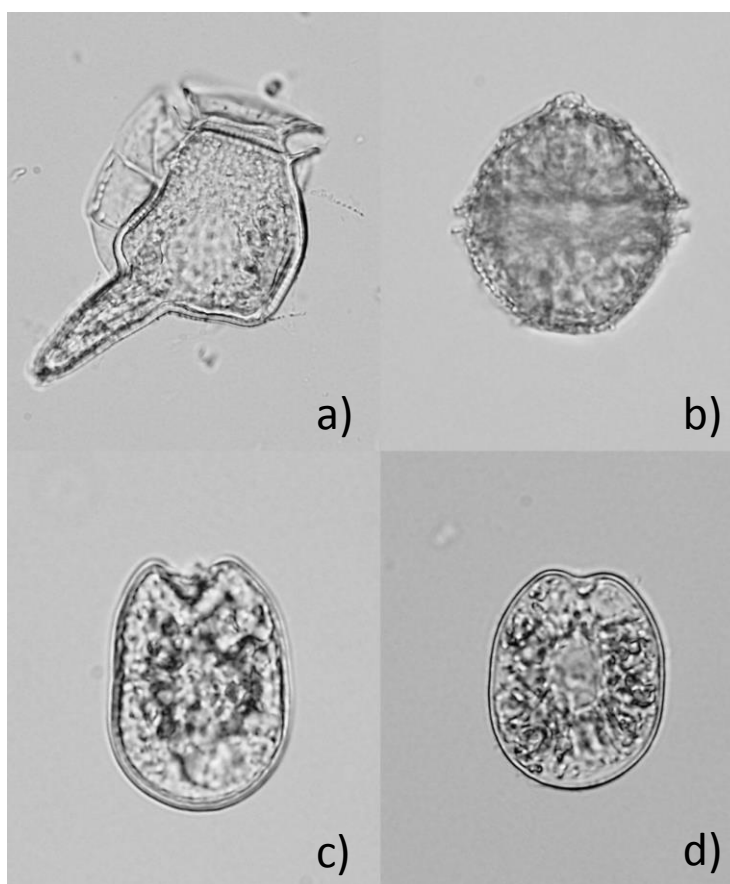


Figure I-2: Marine dinoflagellates identified on Bar Beach (Lagos State, Nigeria, 21 February 2015): a) *Dinophysis caudata* ($L = 100 \mu m$), b) *Lingulodinium polyedrum* ($L \times W$:

40 x 38 μm), c) *Prorocentrum* sp1 (L x W : 37 x 27 μm) and d) *Prorocentrum* sp2 (L x W: 36.3 x 28.8 μm).

I.5.3. Quantitative analysis of SPATT samples and toxin confirmation

Passive samplers were deployed on different dates in November 2014 and February 2015. Analyses of SPATT carried out on System 1 revealed the presence of OA and PTX2 at different concentrations (Figure IV-3a). The highest concentrations of OA and PTX2 were registered at Lekki and Bar Beach. Contrarily, OA and PTX2 concentrations were significantly lower at Port Harcourt and Uyo. This overall pattern seems consistent with the higher potential for *Dinophysis* to survive in areas of higher salinity. *Dinophysis caudata* had also been previously found at Bar Beach and Lekki, sites which at that time had almost oceanic salinity [23]. As abovementioned, *D. caudata* had previously been associated with the production of OA and PTX2, and hence the occurrence of these toxins in Nigerian waters can most likely be attributed to this species. The levels of okadaic acid found (ca. 60 ng OA g⁻¹ HP-20 resin) were of a similar magnitude of order than those found by MacKenzie *et al.* [24] in the initial study introducing passive sampling for algal toxins, but comparatively low compared to those reported in a previous study in Ireland [44]. However, the concentrations in mussels (*M. edulis*) in the latter study also exceeded the regulatory level ca. 6-fold, and hence the actual contamination levels in shellfish in Nigeria should be verified to evaluate the risk for public health or before establishing commercial aquaculture sites. Interestingly, the levels of PTX2 observed in the present study were similar to those observed in the Irish study [44], which may be attributed to the different causative species in both areas: *D. acuminata* and *D. acuta* in Ireland, as compared to *D. caudata* in Nigeria. Rundberget, Gustad, Samdal, Sandvik and Miles [31] had used passive samplers of the same geometry in Norway, and they also found levels of a similar height of order as those in the present study. They also established that SPATTs contained typically three times as much toxin as mussels in a given location, yet occasionally levels in mussels were higher than those in the passive samplers. Since the Irish study did not have the same ratios as those established in the Norwegian study, we anticipate that any correlation between the concentrations observed in passive samplers and a given shellfish species would have to be established locally and verified over time.

The ratio of OA to PTX2 was examined to look for major changes in phytoplankton community structure of OA-producing organisms (Figure IV-3b). As *Prorocentrum* species

have not been found to produce PTX2 but DTX1, a relative increase of OA over PTX2 could be indicative of their increasing importance. The ratio remained relatively constant over the study period indicating that there was either not much change in the population of micro-algae or similar ratios were produced by the organisms present. This is also consistent with the fact that DTX1 was found only in trace amounts at Lekki and Bar Beach, but not in the two other locations. DTX1 has been reported from *P. lima* [45] and the low concentrations in passive samplers deployed at 1 m below the surface could be related to the dilution effect for these toxins if they had been produced by low density benthic species. However, it has been shown that even toxins from *P. lima* can accumulate to significant levels in shellfish locally [46], and hence care should be taken before discarding benthic organisms as a risk to public health.

At Bar Beach, it appeared that toxin concentrations were higher in November and in February which also coincides with a slight increase in salinity and the dry season, for which upwelling had been previously indicated [26]. At Port Harcourt and Uyo, concentrations of OA and PTX2 in the passive samplers were *ca.* 10-fold lower than the maxima observed at Bar Beach and Lekki. This significant difference is understandable from the very low salinities observed at Port Harcourt and Uyo (Table I-3), which are detrimental for most marine dinoflagellates. Port Harcourt and Uyo are considered to be brackish water zones and are consequently significantly different from Bar Beach and Lekki (see also section on untargeted analysis).

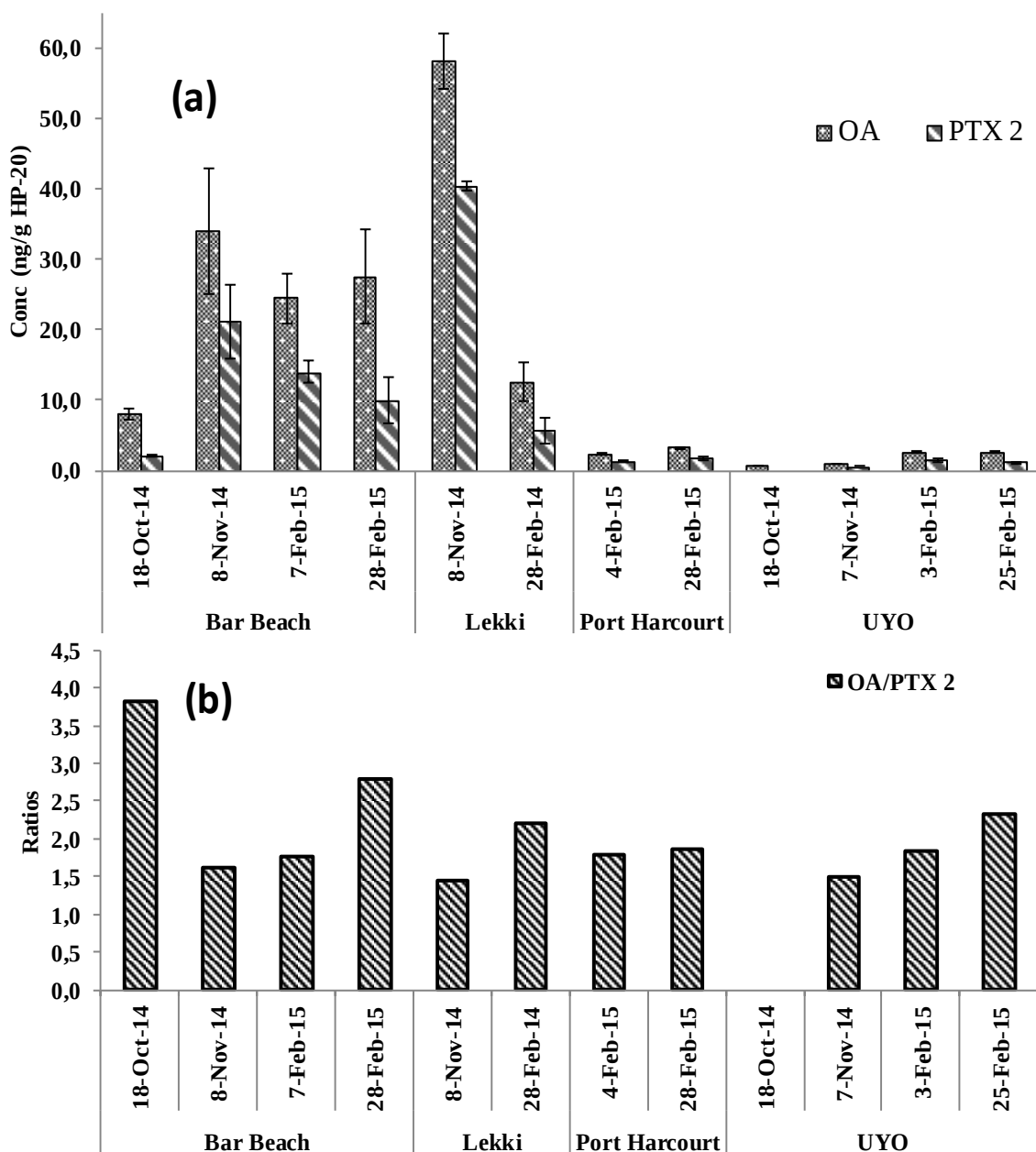


Figure I-3: Average concentrations (a) and ratios (b) of okadaic acid (OA) and pectenotoxin 2 (PTX2) detected at each deployment site (ng/g of HP-20 resin $\pm$ RSD%, $n=3$).

I.5.4. Confirmation of okadaic acid and pectenotoxin 2 by high resolution mass spectrometry coupled to liquid chromatography

For confirmatory purposes, System 3 was used to obtain high resolution spectra from toxins quantified using System 1. For instance, the same spectrum was observed in a standard and a sample from Bar Beach for OA in negative ionisation mode (figure I-4).

Accurate mass measurements for OA for the sample from Bar Beach were also verified and compared well with those of the certified standard of OA: the molecular ion $[M-H]^-$ of OA in the Bar Beach sample (m/z 803) showed 1.2 ppm mass error compared to the standard, while the two main fragments m/z 113.060 and 255.123 had a mass error of 0.88 and 0.39 ppm, respectively. Mass accuracy for PTX2 was slightly less good, but fragmentation pattern and fragment ion ratios matched very well that of the standard (see Figure S1, supplementary information). Therefore, the presence of OA and PTX2 can be considered unequivocal as demonstrated by both low and high resolution tandem mass spectrometry.

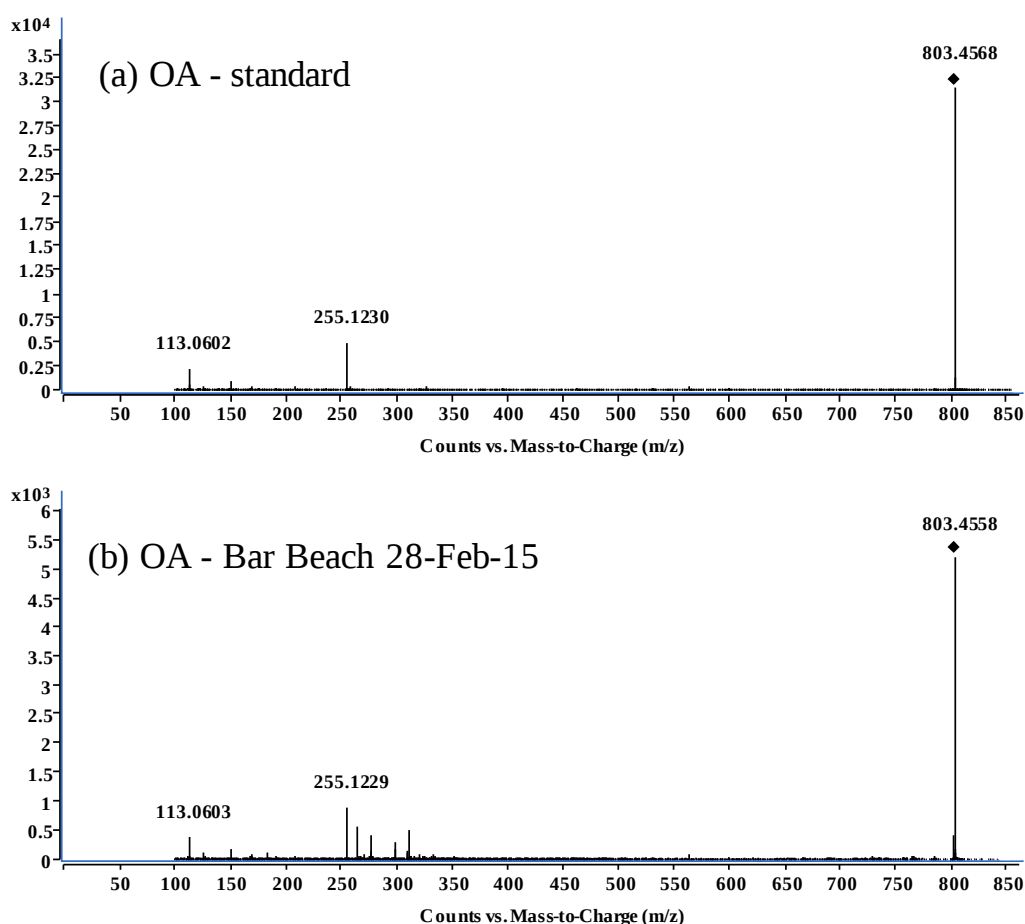


Figure I-4: Average high resolution spectrum of (a) OA standard and (b) OA in a SPATT extract from Bar Beach. Spectra were obtained on System 3 (QToF 6550) in ESI using target MS/MS with collision energies of 20 V, 40 V and 60 eV.

I.5.5. Untargeted screening approach for passive samplers

Principal component analysis including all masses identified in extracts of the passive samplers clearly showed separation between samples taken at the end of the wet season and those taken during the dry season, irrespective of the sampling site (Figure I-5).

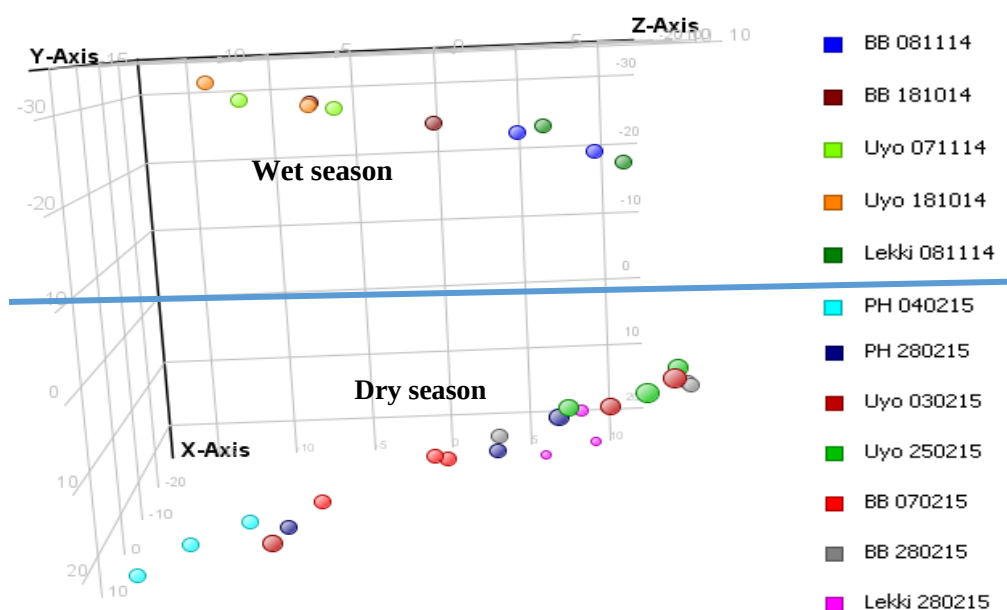


Figure I-5: Score plot of the principal component analysis of all passive samplers ($n=2$ for 2014 and $n=3$ for 2015). Data were acquired by full scan HRMS on System 2. During Molecular Feature Extraction samples were blank-subtracted, ion traces extracted and combined into compounds. The three principal components plotted on the X, Y, and Z axes account for ca. 58% of the total variability in the data set. Note: BB=Bar Beach and PH= Port Harcourt.

This separation of seasons in the passive sampler extracts was not as distinct as in the targeted analysis of toxins (Figure I-3a) but is consistent with changes expected in the phytoplankton community structures in different seasons. When analysing the trend on a single site, Bar Beach (BB), it was also apparent that each sampling occasion gave a different chemical profile (Figure I-6).

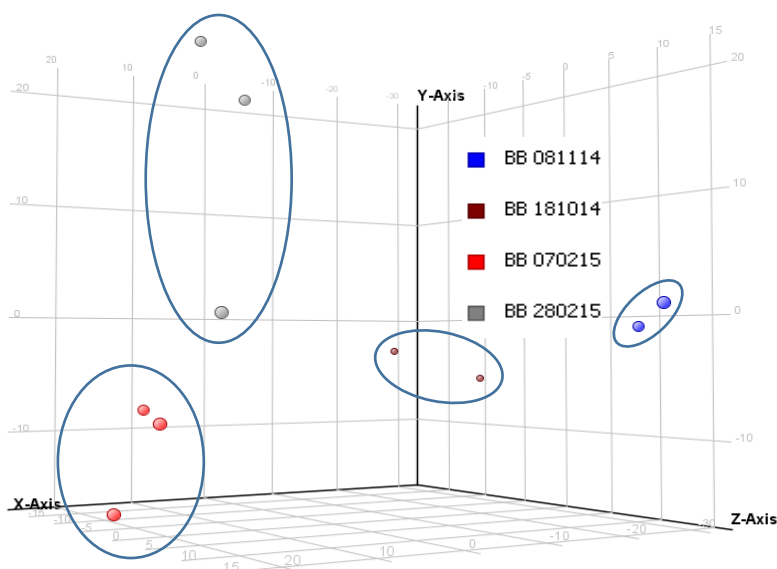


Figure I-6: Score plot of the principal component analysis of passive samplers from Bar Beach taken on four separate occasions ($n=2$ for 2014 and $n=3$ for 2015). Data were acquired by full scan HRMS on system 2. The three principal components plotted on the X, Y, and Z axes account for ca. 66% of the total variability in the data set.

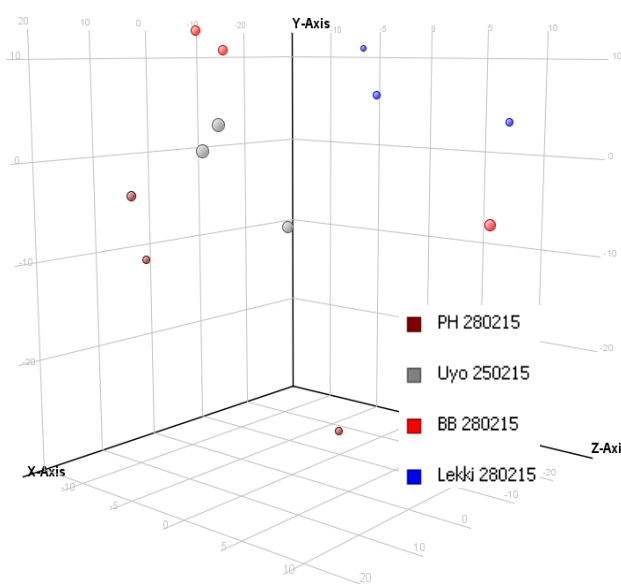


Figure I-7: Score plot of the principal component analysis of passive samples from all four sites (BB=Bar Beach, PH=Port Harcourt), all taken during week 9 of 2015 ($n=3$). The three principal components plotted on the X, Y, and Z axes account for ca. 63% of the total variability in the data set.

Interestingly, all four sites gave also different chemical profiles on a single sampling occasion (Figure I-7). In this initial untargeted analysis, no identification of compounds was necessary to obtain this trend.

Still, the separation of the sites by PCA is not surprising when considering that the complete set of data for these four sites on a single occasion consisted of 2394 compounds. Amongst those compounds, 1828 occurred only at the two sites of high salinity (Lekki and Bar Beach) and 245 were unique to the sites with low salinity (Uyo and Port Harcourt). This also means that only 321 compounds were common to all four sites during that particular week. This observation also led us to tentatively identify what compounds may occur on the different sites. For this purpose, several samples were also screened against a database derived from the Dictionary of Marine Natural Products [47]. When applying stringent criteria (1 ppm mass accuracy, 5000 count abundance threshold) for matching compounds identified in the Nigerian data set by full scan HRMS, several hundred compounds gave tentative hits.

In particular, we examined what compounds were responsible for distinguishing weeks at Bar Beach station. In the PCA analysis for Bar Beach samples from October/November 2014 were grossly separated from samples taken during February (Figure 6). When examining compounds with extreme loadings in the PCA analysis (< -0.03 or > 0.03 normalised loading values, arbitrary choice, see Figure S3), 20 compounds of 196 distinctive entities were tentatively identified for the earlier period (October and November 2014, end of wet season), while 20 compounds of 424 distinctive entities were tentatively identified for the later period (February 2015, dry season, Table I-4). In summary, among the database propositions were many compounds that had initially been identified either in tropical sponges, nudibranches or marine or freshwater cyanobacteria (Table I-4). The fact that cyanobacterial compounds were identified appears coherent with previous identification of cyanobacteria as a problem in Nigerian waters [48]. These findings also suggest that additional efforts in Nigerian coastal waters should focus on identifying cyanobacterial toxins and source organisms.

On a given site for one sampling occasion many more compounds were tentatively identified but not all were distinctive features of that site – occasion combination. For instance Bar Beach was analysed for identifiable compounds on 08/11/2014 and 170 compounds gave a hit in the Dictionary of Marine Natural Products [47]. Interestingly, these compounds tentatively identified in the non-targeted analysis also included for instance okadaic acid already identified in the targeted analysis (Table S1).

Table I-4. Compounds tentatively identified in non-targeted analysis using high-resolution mass spectrometry (system 2)

No.	Compound	Month	Freq.	T _R	Mass	Identification Marine Natural Products Dictionary
1	6-Tridecylamine	Feb	6	4.01	199.2296	Isolated from the cyanobacterium <i>Microcoleus lyngbyaceus</i>
2	Hedaol B; A5-Isomer(Z-)	Feb	6	7.08	261.1977	Constituent of a <i>Sargassum</i> sp.
3	8,11,14-Heptadecatrienal; (all-Z) -form, 14,15-Dihydro	Feb	6	5.27	250.2293	Constituent of cucumber, tobacco and wheat. Also found in the algae <i>Enteromorpha</i> sp., <i>Scytosiphon lomentaria</i> and <i>Ulva pertusa</i>
4	Glycerol 1-alkyl ethers; Glycerol 1-pentadecyl ether	Feb	6	8.61	302.2818	Constituent of <i>Desmaysamma anchorata</i> and <i>Tethya aurantiaca</i>
5	10-Aromadendranol; (1ct,4a,5 13,6a,7a,10a)-form, O -(2-O -	Feb	6	7.21	405.3120	Constituent of <i>Eucalyptus globulus</i> (Tasmanian blue gum) and <i>Thryptomene kochii</i>
6	Petroformyne 1; 3- or 44- Ketone	Feb	6	3.22	666.5018	Constituent of <i>Petrosia ficiformis</i>
7	Dideacetylraspacionin; 10,28- Dihydro, 103-hydroxy, 4,10, 15,21-tetra-Ac	Feb	6	8.16	661.4090	Constituent of sponge <i>Raspaciona aculeata</i>
8	Dideacetylraspacionin; 10,28- Dihydro, 103-hydroxy, 21- ketone, 4,10,15-tri-Ac	Feb	6	8.21	634.4068	Constituent of sponge <i>Raspaciona aculeata</i>
9	Cholestane-3,5,6,7-tetrol; (3i, 5ct,613,713)-form, 3,7-Di-Ac	Feb	6	8.25	503.3500	Constituent of the gorgonian <i>Plexaurella grisea</i>
10	6-Pentadecyl-1,2,4-benzenetriol; 1-Ac	Feb	6	7.59	400.2594	Constituent of the sponge <i>Axinella polycapella</i>
11	Etzionin; N,O -Di-Ac	Feb	6	7.41	558.3422	cytotoxic & antifungal; isolated from <i>Didemnum rodriguesi</i>
12	Fumiquinazoline F; 4-Epimer	Feb	6	7.47	358.1420	Cytotoxin prod. by a marine-derived <i>Aspergillus fumigatus</i>
13	Picrotoxinin	Feb	6	3.77	314.0767	Ichthyotoxin isolated from desmosponge <i>Spirastrella inconstans</i>
14	Louludinium(1+)	Feb	6	4.82	294.2211	Isolated from marine cyanobacterium <i>Lyngbya gracilis</i>
15	Aeruginosamide	Feb	6	2.66	560.3399	Isolated from <i>Microcystis aeruginosa</i> (cyanobacteria)
16	Bengamide Z; 6-Deoxy	Feb	6	2.30	372.2264	Isolated from sponge <i>Jaspis cf. coriacea</i>
17	Ulithiacyclamide F	Feb	6	9.26	814.2046	Isolated from the ascidian <i>Lissoclinum patella</i>
18	4-Cadinen-10-ol; (1ct,63,7i3,10 13)-form	Feb	6	4.46	222.1987	Isolated from the sponge <i>Acanthella cavernosa</i> .
19	Drechslerine G	Feb	6	3.85	270.1823	Metabolite of the algicolous fungus <i>Drechslera dematioidea</i>
20	Acremonin A; (+)-form	Feb	6	5.25	176.0836	Prod. by a marine-derived micromycete <i>Acremonium</i> sp.
21	10-O -(3,4- Dihydroxy-E -cinnamoyl) geniposidic	Oct/Nov	4	2.87	536.1535	Constituent of <i>Genipa americana</i> (genipap) and <i>Premna barbata</i> (higher

No.	Compound	Month	Freq.	T _R	Mass	Identification Marine Natural Products Dictionary
	acid					terrestrial plants)
22	6- Sulfate Cholestane-3,6,8,15,24-pentol; (313,5ct,6a,15ct,24S)-form,	Oct/Nov	4	2.1	532.3077	Constituent of <i>Oreaster reticulatus</i> (tropical sea star)
23	3-Propanoyl, 12-Ac-3,12-Dihydroxy-20,24- dimethyl-17-scalaren-25,24-olide	Oct/Nov	4	6.36	545.371	Constituent of <i>Phyllospongia lamellosa</i>
24	1-Tricosene	Oct/Nov	4	9.23	339.3865	Constituent of the alga <i>Botryococcus braunii</i> and various plant spp. incl. <i>Gardenia tahitensis</i>
25	4,10-Dimethyldodecanoic acid	Oct/Nov	4	3.85	245.2352	Isolated from a halophilic <i>Bacillus</i> sp.
26	2-Amino-11-dodecen-3-ol	Oct/Nov	3	5.50	199.1939	Isolated from a marine sponge <i>Haliclona n. sp.</i>
27	N - Eicosanoyl 2-Aminobenzoic acid	Oct/Nov	4	5.65	453.3218	Isolated from aerial parts of <i>Ononis natrix</i> (African terrestrial plant)
28	Dysidazirine; (S ,E)-form	Oct/Nov	4	3.69	307.2516	Isolated from Fijian marine sponge, <i>Dysidea fragilis</i>
29	Malonganenone B	Oct/Nov	4	6.75	470.3256	Isolated from <i>Leptogorgia gilchristi</i> (gorgonian, soft coral)
30	Glanvillic acid A	Oct/Nov	4	6.29	306.2190	Isolated from <i>Plakortis halichondrioides</i>
31	13',14'-Dihydro-amphiasterin B2	Oct/Nov	3	6.72	401.3506	Isolated from <i>Plakortis quasiamphiaster</i> (marine sponge)
32	Enterocin	Oct/Nov	4	3.75	444.1060	Isolated from a marine ascidian <i>Didemnum</i> sp.
33	Phloeodictyne A; Phloeodictyne 4,6i	Oct/Nov	4	8.59	407.3622	Isolated from the New Caledonian deep water sponge <i>Phloeodictyon</i> sp. and shallow-water sponge <i>Oceanapia fistulosa</i> (<i>Phloeodictyon fistulosa</i>)
34	2-Amino-18-methyl-4- nonadecene-1,3-diol	Oct/Nov	3	8.7	327.3141	Isolated from the sponge <i>Discodermia calyx</i>
35	2-Amino-9-hexadecen-3-ol; (2 S ,3R ,9Z)-form	Oct/Nov	4	7.87	255.2563	Isolated from the tunicate <i>Pseudodistoma obscurum</i>
36	6-Octadecenoic acid; (E)- form	Oct/Nov	4	7.72	282.2559	Minor constituent of plant oils
37	Choline; O -(2-Methyl-2- propenoyl)	Oct/Nov	4	8.08	194.1157	Monomer. Polymers are used as coagulants in sewage treatment
38	2-Dodecenoic acid; (E)-form, Et ester	Oct/Nov	4	7.12	226.1909	Occurs in pears
39	Hexadecanoic acid; Dimethylamide	Oct/Nov	4	5.74	283.2876	Widely distributed in plants
40	2-Methylpropanoic acid	Oct/Nov	4	7.69	106.0627	The free acid and its esters occur in many plants

I.6. CONCLUSION

The survey in Nigerian coastal waters confirmed the presence of toxic algae in this area, in particular *Dinophysis caudata*. For the first time, lipophilic toxins were identified in Nigerian coastal waters. Okadaic acid and pectenotoxin 2 have been quantified in passive samplers deployed for 1-week periods and can most likely be attributed to *Dinophysis* species, although a partial contribution by *Prorocentrum* species cannot be excluded. Untargeted analysis using high resolution mass spectrometry also pointed towards the possible accumulation of cyanobacterial metabolites in the passive samplers. Therefore, any further studies investigating the risks for public health from shellfish consumption should examine concentrations of algal as well as cyanobacterial toxins.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Aknowledgments

This study was carried out under the Coselmar project supported by Ifremer and Nantes University and funded by the Regional Council of the *Pays de la Loire*, France. The authors would like to thank all the members of the Laboratory Phycotoxins at the Atlantic Centre of Ifremer for their help and advice during this study. Tertiary Education Trust (TETF) is appreciated for providing logistics support for the collection of samples. Dr Denise Mukoro and Mr. Timothy Efe Unusiotame-Owolagba are gratefully acknowledged for the deployment of the SPATTs.

References

[1] J. Lawrence, H. Loreal, H. Toyofuku, P. Hess, K. Iddya, L. Ababouch, Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs, FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No., 551 (2011) 337 pages.

- [2] P. Hess, Phytoplankton and biotoxin monitoring programmes for the safe exploitation of shellfish in Europe, in: A.G. Cabado, J.M. Vieites (Eds.) *New Trends in Marine and Freshwater Toxins: Food Safety Concerns*, Nova Science Publishers Inc., 2012.
- [3] T. Suzuki, R. Watanabe, Shellfish toxin monitoring system in Japan and some Asian countries, in: A.G. Cabado, J.M. Vieites (Eds.) *New Trends in Marine and Freshwater Toxins: Food Safety Concerns*, Nova Science Publishers Inc., 2012.
- [4] S.L. DeGrasse, K. Martinez-Diaz, Biotoxin control programmes in North, Central and South American countries, in: A.G. Cabado, J.M. Vieites (Eds.) *New Trends in Marine and Freshwater Toxins: Food Safety Concerns*, Nova Science Publishers Inc., 2012.
- [5] P. Bienfang, B. Oben, S. DeFelice, P. Moeller, K. Huncik, P. Oben, R. Toonen, T. Daly-Engel, B. Bowen, Ciguatera: the detection of neurotoxins in carnivorous reef fish from the coast of Cameroon, West Africa, *Afr. J. Mar. Sci.*, 30 (2008) 533-540.
- [6] H. Taleb, P. Vale, M. Blaghen, Spatial and temporal evolution of PSP toxins along the Atlantic shore of Morocco, *Toxicon*, 41 (2003) 199-205.
- [7] R. Abouabdellah, H. Taleb, A. Bennouna, K. Erler, A. Chafik, A. Moukrim, Paralytic shellfish poisoning toxin profile of mussels *Perna perna* from southern Atlantic coasts of Morocco, *Toxicon*, 51 (2008) 780-786.
- [8] R. Abouabdellah, A. Bennouna, J. El Attar, K. Erler, M. Dellal, A. Chafik, A. Moukrim, Diarrhetic shellfish poisoning toxin profile of shellfish from Southern Atlantic coasts of Morocco, *South Asian Journal of Experimental Biology*, 1 (2011) 101-106.
- [9] H. Taleb, P. Vale, R. Amanhir, A. Benhadouch, R. Sagou, A. Chafik, First detection of azaspiracids in mussels in north west Africa, *J. Shellfish Res.*, 25 (2006) 1067-1070.
- [10] G.C. Pitcher, D. Calder, Harmful algal blooms of the southern Benguela Current: a review and appraisal of monitoring from 1989 to 1997, *South Afr. J. Mar. Sci.-Suid-Afr. Tydsk. Seewetens.*, 22 (2000) 255-271.
- [11] G.C. Pitcher, J.M. Franco, G.J. Doucette, C.L. Powell, A. Mouton, Paralytic shellfish poisoning in the abalone *Haliotis midae* on the west coast of South Africa, *Journal of Shellfish Research*, 20 (2001) 895-904.
- [12] A. Fawcett, S. Bernard, G.C. Pitcher, T.A. Probyn, A. du Randt, Real-time monitoring of harmful algal blooms in the southern Benguela, *Afr. J. Mar. Sci.*, 28 (2006) 257-260.

- [13] P. Vale, I. Rangel, B. Silva, P. Coelho, A. Vilar, Atypical profiles of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish from Luanda and Mussulo bays, Angola, *Toxicon*, 53 (2009) 176-183.
- [14] J. Blanco, F. Livramento, I.M. Rangel, Amnesic shellfish poisoning (ASP) toxins in plankton and molluscs from Luanda Bay, Angola, *Toxicon*, 55 (2010) 541-546.
- [15] M.O. Kadiri, Phytoplankton distribution in the coastal waters of Nigeria, *Nigerian Journal of Botany*, 12 (1999) 51-62.
- [16] M.O. Kadiri, Some marine phytoplankton species from Atlantic Ocean, Nigeria, *Biosci. Res. Comm*, 13 (2001) 197-207.
- [17] M.O. Kadiri, A spectrum of phytoplankton flora along salinity gradient in the eastern Niger Delta area of Nigeria, *Acta Botanica Hungarica*, 44 (2002) 75-83.
- [18] M.O. Kadiri, Phytoplankton flora and physico-chemical attributes of some waters in the Eastern Niger delta area of Nigeria, *Nigerian J. Botany*, 19 (2006) 188-200.
- [19] M.O. Kadiri, Phytoplankton survey in the Western Niger Delta, Nigeria, *Afr. J. Environ. Pollut. Health*, 5 (2006) 48-58.
- [20] M.O. Kadiri, Notes on harmful algae from Nigerian coastal waters, *Acta Botanica Hungarica*, 53 (2011) 137-143.
- [21] D.I. Nwankwo, A survey of the dinoflagellates of Nigeria. Armoured dinoflagellates of Lagos Lagoon and associated Tidal creeks., *Nigerian Journal of Botany* 4(1991) 49-60.
- [22] D.I. Nwankwo, A first list of dinoflagellates (Pyrrhophyta) from Nigerian coastal waters (creek, estuaries lagoons)., *Pol. Arch. Hydrobiol* 44 (1997) 313-321.
- [23] C. Ajuzie, G. Houvenaghel, Preliminary survey of potentially harmful dinoflagellates in Nigeria's coastal waters, *Fottea*, 9 (2009) 107-120.
- [24] L. MacKenzie, V. Beuzenberg, P. Holland, P. McNabb, A. Selwood, Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): a new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 44 (2004) 901-918.
- [25] Z. Zendong, P. McCarron, C. Herrenknecht, M. Sibat, Z. Amzil, R.B. Cole, P. Hess, High resolution mass spectrometry for quantitative analysis and untargeted screening of algal toxins in mussels and passive samplers, *Journal of Chromatography* <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.064>, (2015).

- [26] A.C. Ibe, T.O. Ajayi, Possible Upwelling Phenomenon off the Nigerian Coast, NIOMR Technical Publication, 25 (1985) 1-30.
- [27] C.O. Dublin-Green, A. Awobanise, E.A. Ajao, Large Marine Ecosystem Project for the Gulf of Guinea (Coastal Profile of Nigeria), Nigeria Institute of Oceanography Encyclopedia Americana, 1994. International Edition, Grolier Incorporated (1997).
- [28] A.C. Ibe, The Niger Delta and the global rise in sea level., Proc. SCORE Workshop on sea level rise and subsidiary coastal areas. Milliman Press, New York., (1988).
- [29] ASTM, American Society for Testing and Materials. Annual Book of ASTM Standard, (1980) pp. 547-549.
- [30] Z. Zendong, C. Herrenknecht, E. Abadie, C. Brissard, C. Tixier, F. Mondeguer, V. Sechet, Z. Amzil, P. Hess, Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 91 (2014) 57-68.
- [31] T. Rundberget, E. Gustad, I.A. Samdal, M. Sandvik, C.O. Miles, A convenient and cost-effective method for monitoring marine algal toxins with passive samplers, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 53 (2009) 543-550.
- [32] E. Fux, C. Marcaillou, F. Mondeguer, R. Bire, P. Hess, Field and mesocosm trials on passive sampling for the study of adsorption and desorption behaviour of lipophilic toxins with a focus on OA and DTX1, *Harmful Algae*, 7 (2008) 574-583.
- [33] A.F. Li, G. Sun, J.B. Qiu, L. Fan, Lipophilic shellfish toxins in *Dinophysis caudata* picked cells and in shellfish from the East China Sea, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 22 (2015) 3116-3126.
- [34] M.L. Fernández, B. Reguera, S. González-Gil, A. Míguez, Pectenotoxin-2 in single-cell isolates of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis acuta* from the Galician Rías (NW Spain), *Toxicon*, 48 (2006) 477-490.
- [35] A.N. Marasigan, S. Sato, Y. Fukuyo, M. Kodama, Accumulation of a high level of diarrhetic shellfish toxins in the green mussel *Perna viridis* during a bloom of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis miles* in Sapan Bay, Panay Island, the Philippines, *Fish. Sci.*, 67 (2001) 994-996.
- [36] M.J. Holmes, S.L.M. Teo, F.C. Lee, H.W. Khoo, Persistent low concentrations of diarrhetic shellfish toxins in green mussels *perna viridis* from the johor strait, singapore: first record of diarrhetic shellfish toxins from south-east asia, *Marine-Ecology-Progress-Series*, 181 (1999) 257-268.

- [37] A. Bennouna, B. Berland, J. El Attar, O. Assobhei, *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge red tide in shellfish areas along Doukkala coast (Moroccan Atlantic), *Oceanologica Acta*, 25 (2002) 159-170.
- [38] B. Paz, P. Riobó, M.L. Fernández, S. Fraga, J.M. Franco, Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture, *Toxicon* [Toxicon], 44 (2004) 251-258.
- [39] T. An, J. Winshell, G. Scorzetti, J.W. Fell, K.S. Rein, Identification of okadaic acid production in the marine dinoflagellate *Prorocentrum rhathymum* from Florida Bay, *Toxicon*, 55 (2010) 653-657.
- [40] A.E. Jackson, J.C. Marr, J.L. McLachlan, The production of diarrhetic shellfish toxins by an isolate of *Prorocentrum lima* from Nova Scotia, Canada, (1993) 513-518.
- [41] T. Hu, A.S.W. DeFreitas, J.M. Curtis, Y. Oshima, J.A. Walter, J.L.C. Wright, Isolation and structure of prorocentrolide B, a fast-acting toxin from *Prorocentrum maculosum*, *J. Nat. Prod.*, 59 (1996) 1010-1014.
- [42] S.L. Morton, P.D.R. Moeller, K.A. Young, B. Lanoue, Okadaic acid production from the marine dinoflagellate *Prorocentrum belizeanum* Faust isolated from the Belizean coral reef ecosystem, *Toxicon*, 36 (1998) 201-206.
- [43] D.W. Henrichs, P.S. Scott, K.A. Steidinger, R.M. Errera, A. Abraham, L. Campbell, Morphology and Phylogeny of *Prorocentrum texanum* sp nov (Dinophyceae): A New Toxic Dinoflagellate From the Gulf of Mexico Coastal Waters Exhibiting Two Distinct Morphologies, *J. Phycol.*, 49 (2013) 143-155.
- [44] E. Fux, R. Bire, P. Hess, Comparative accumulation and composition of lipophilic marine biotoxins in passive samplers and in mussels (*M. edulis*) on the West Coast of Ireland, *Harmful Algae*, 8 (2009) 523-537.
- [45] Y. Pan, A.D. Cembella, M.A. Quilliam, Cell cycle and toxin production in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*, *Mar. Biol.*, 134 (1999) 541-549.
- [46] J.E. Lawrence, J. Grant, M.A. Quilliam, A.G. Bauder, A.D. Cembella, Colonization and growth of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* and associated fouling macroalgae on mussels in suspended culture, *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 201 (2000) 147-154.
- [47] J.W. Blunt, M.H. Munro, *Dictionary of Marine Natural Products*, with CD-ROM, Chapman & Hall, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, London, New York, (2008).

[48] L.O. Odokuma, J.C. Isirima, Distribution of cyanotoxins in aquatic environments in the Niger Delta, *Afr. J. Biotechnol.*, 6 (2007) 2375-2385.

Supplementary material

Algal toxin profiles in Nigerian coastal waters (Gulf of Guinea) using passive sampling and liquid chromatography coupled to mass spectrometry

Figure S1: Comparison of the high-resolution mass spectrum of PTX2 in a sample from Bar Beach to the spectrum of a certified standard of PTX2.

Figure S2: Surface focus of a *Lingulodinium polyedrum* cell in ventro-antapical view, in ventro-apical view and, in dorso-apical view showing ornamentation of plates (ridges along the sutures and circular depressions).

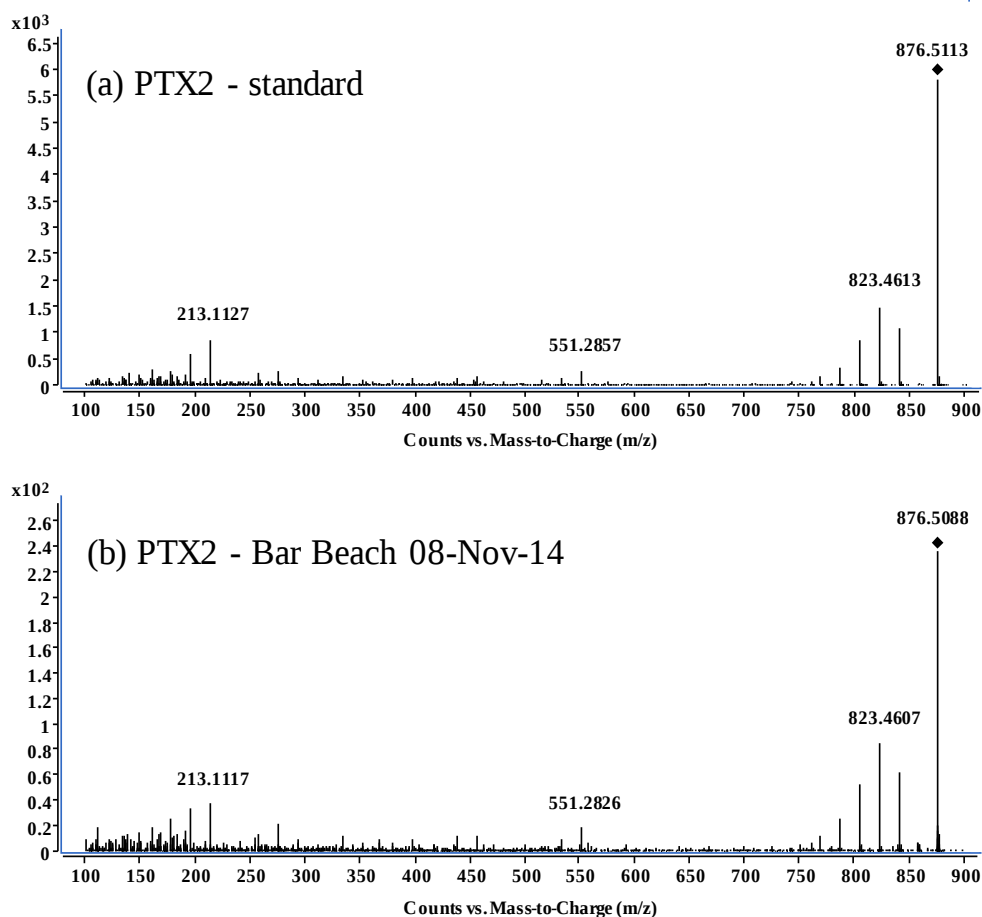


Figure S1: Comparison of the high-resolution mass spectrum of PTX2 in a sample from Bar Beach to the spectrum of a certified standard of PTX2.

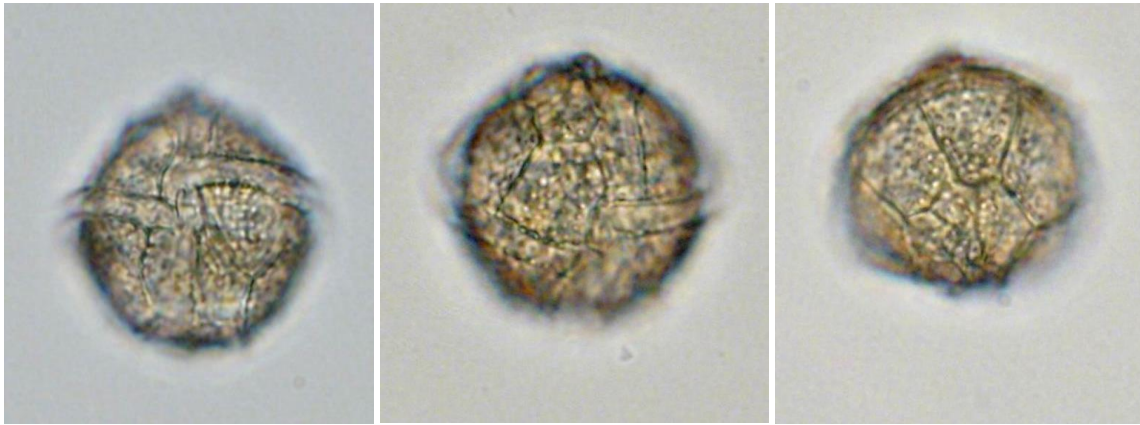


Figure S2: Surface focus of a *Lingulodinium polyedrum* cell in ventro-antapical view, in ventro-apical view and, in dorso-apical view showing ornamentation of plates (ridges along the sutures and circular depressions).

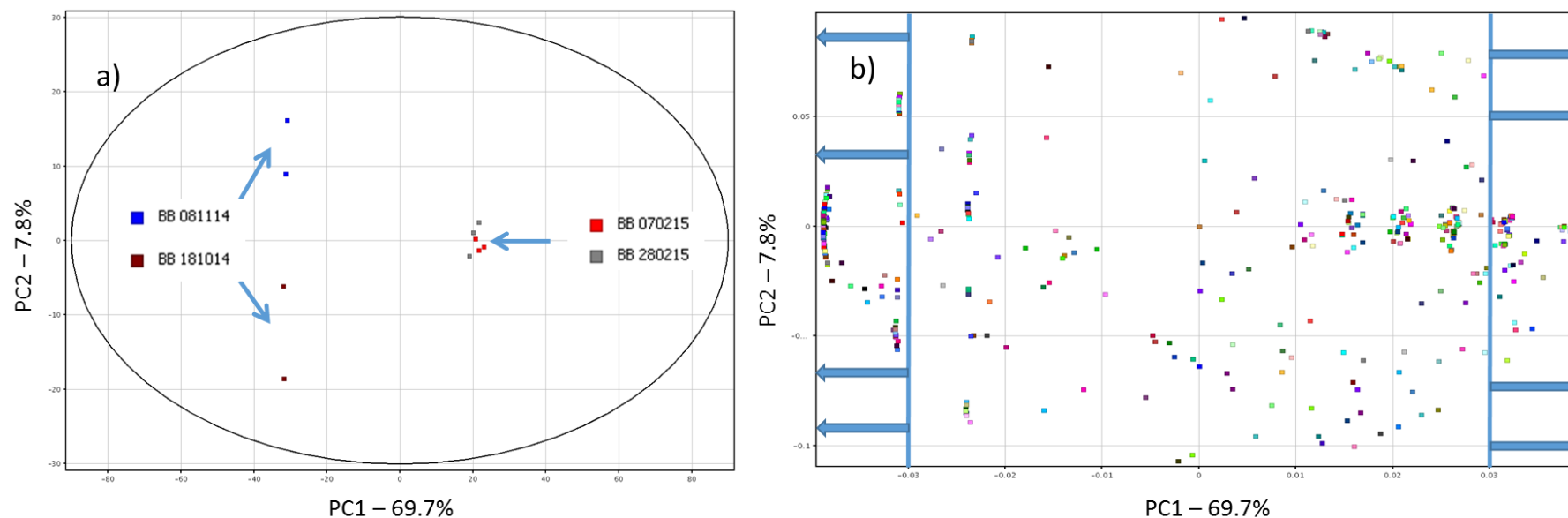


Figure S3. Principal Component Analysis (PCA) of passive samples taken at Bar Beach, Nigeria, in 2014/2015. The score plot (a) shows good separation of samples from October/November (left-hand side of graph) from those taken in February (right-hand side of graph). As this separation was almost exclusively on principle component 1 (accounting for almost 70% variability in the dataset), compounds most responsible for this separation are those that appear on the left- and right-hand side of the loadings plot (b). An arbitrary cut-off of 0.03 was chosen to select the most “separative” compounds. These compounds were subsequently screened against the Marine Natural Products Dictionary and results are given in Table 4 of the manuscript.

Table S1. 170 compounds tentatively identified at Bar Beach on 08/11/2014

Name	<i>m/z</i>	Height	Diff (DB, ppm)	RT (min)	Score (DB) %	Mass
1(10),5-Germacradien-4-ol; (1(10)E ,4a,5E)-form, O -(2-O - Acetyl-13-D-glucopyranoside)	444,296	14204	-0,87	6,33	99,29	426,2621
1,21-Heneicosanediol	328,3575	58944	-0,24	5,30	99,96	328,3342
1,2-Benzenedicarboxylic acid; Ditridecyl ester	535,4124	33691	-0,5	9,08	99,72	530,4338
1,7-Dihydroxy-2,5,10,14-phytatetraen-13-one; (2E ,5E ,7r, 10E)-form	303,2316	38682	0,73	5,32	99,63	320,2349
1,7-Dihydroxy-2,5,10,14-phytatetraen-13-one; (2E ,5E ,7r, 10E)-form	303,2318	32854	0,11	6,57	99,99	320,2351
10-Aromadendranol; (113,4a,5 13,6a,7ct,10ct)-form, O -[2-Methylpropanoyl-(α -D-glucopyranoside)]	438,3216	12346	-0,5	6,80	99,76	438,2984
11,14-Dihydroxy-12-spongien-16-one; (1113,14a)-form	317,2111	93172	0,12	4,84	99,99	334,2144
11,15-Dihydroxy-9-oxo-13-prostenoic acid; (8R ,11R ,12R , 13E ,15S)-form, Et ester	365,2687	26037	-0,07	6,61	100	382,272
11,15-Dihydroxy-9-oxo-5,13-prostadienoic acid; (5Z ,8R ,11R ,	366,2637	25639	0,49	2,22	99,8	366,2404
12,16,22-Trihydroxy-24-methyl- 24-oxo-25-scalaranoic acid; (12/3, 16/3)-form, 22-Ac, Me ester	506,3474	98047	0,39	4,59	99,83	506,3242
13,17-Epoxy-16-hydroxy-19-kauranoic acid; (ent -16ct)-form, Me ester	331,2268	64105	-0,03	5,08	100	348,2301
13-Docosenoic acid; (E)-form	338,3419	22888	-0,41	8,99	99,87	338,3186
14-Hydroxy-4,7,10,12,16,19-docosahexaenoic acid; (4Z ,7Z , 10Z ,12E ,14?,16Z ,19Z)-form	327,2321	37561	-0,73	6,48	99,59	344,2354
15,17-Epoxy-15,17-dihydroxy-16-isocopalanoic acid; (13aH ,14aH , 15a,1713)-form, Di-Ac, Me ester	468,296	49780	-0,97	4,82	99,07	450,2622
15-Anhydrothyrsiferol; 10- Epimer, A15(28)-isomer	586,33	18533	0,33	7,44	99,86	586,3067
16,24-Epoxy-21,24,25-trihydroxy-17-cheilanthen-19,25-olide; (24?, 25?)-form	452,3005	99390	0,41	4,73	99,84	434,2667
16,24-Epoxy-21,24,25-trihydroxy-17-cheilanthen-19,25-olide; (24?, 25?)-form	452,3007	35080	-0,1	4,82	99,99	434,2669
17-Methyl-1,17-tricosadiene-4,6,8,10,12,14,16-heptol	446,3472	26475	0,83	5,86	99,32	446,324
1-Amino-4,12-tridecadien-2-ol; (α)-(E)-form, N ,O -Di-Ac	278,2114	28107	0,11	3,70	99,99	295,2147

Name	<i>m/z</i>	Height	Diff (DB, ppm)	RT (min)	Score (DB) %	Mass
1-Bromo-4,6-eudesmanediol; (113,4a,6a,713H)-form, 4,6-Di- Ac	420,1945	201266	-0,35	2,60	99,89	402,1607
1H-Indole-5,6-diol; Di-Me ether, N-Me	191,118	45686	-0,45	1,99	99,92	191,0947
1-O -Alkylglycero-3-phosphocholines; 1-Hexadecylglycero-3-phosphocholine, 2-Benzyl ether	576,3786	34960	0,34	7,52	99,86	571,4000
2-(Aminomethyl)-2-propenoic acid; N -(2-Hydroxyhexadecanoyl), Me ester	370,2951	19604	0,35	7,35	99,90	369,2878
2-(Aminomethyl)-2-propenoic acid; N -(2-Oxohexadecanoyl), Me ester	350,2691	129147	-0,44	2,71	99,84	367,2724
2-(Aminomethyl)-2-propenoic acid; N -Hexadecanoyl	322,2739	88009	0,4	3,82	99,88	339,2772
2,3,4,9-Tetrahydro-1H -pyrido[3, 4-b]indol-1-one; 6-Methoxy	199,0868	148648	-0,98	1,73	99,57	216,0901
2,3,5,14,20,22,26-Heptahydroxyergost-7-en-6-one	510,3429	72813	-0,63	5,44	99,56	510,3196
2,3,5,14,20,22,26-Heptahydroxyergost-7-en-6-one; (213,313,513,14a,20R ,22R ,24?,25R)-form	510,3419	36288	-0,05	5,32	100	510,3193
2,3'-Iminobispropanoic acid; ($i\frac{1}{2}$)-form, Di-Et ester, N -Ac	242,1386	39061	0,3	3,13	99,95	259,1419
2',4,6,6'-Tetrahydroxy-4'-methylbenzophenone-2-carboxylic acid; 2',6-Di-Me ether, Me ester	329,1021	34581	-0,34	3,66	99,91	346,1054
2,4,6-Tribromophenol; 4-Methylbenzenesulfonyl	486,8214	23862	-0,94	2,95	99,08	481,8427
2,6,10-Farnesatrien-1-oic acid; 6S,7S :10R ,11-Diepoxy, Me ester	300,2169	76280	0,13	5,21	99,99	282,1831
22,25-Epoxy-24-methylfurostane-2,3,11,20-tetrol; (2ct,3ct,5ct,1113,1613,20R ,22S ,24S)-form, 3-Ac	543,3288	21999	0,73	5,29	99,4	520,3396
24-Methyl-16-pentacosene-2, 4-diyne-1,6-diol	393,313	39095	-0,66	8,80	99,62	388,3344
25-Methyl-1,25- hentriacontadiene-4,6,8,10, 12,14,16,18,20,22,24-undecol	640,4633	19787	-0,48	2,92	99,7	622,4295
2-Amino-1,3,4,5- octadecanetetrol	334,2953	70164	-0,45	4,64	99,85	333,2881
2-Amino-1,3,4-hexadecanetriol; (2S ,3R ,4S)- form	290,2689	70470	0,2	4,65	99,98	289,2616
2-Amino-1,3-octadecanediol;(2R ,3S)-form, N ,O ,O -Tri-Ac	410,3266	19374	-0,01	7,17	100	427,3298
2-Amino-14-methyl-1,3,4-pentadecanetriol	290,2691	142823	-0,42	2,96	99,89	289,2618
2-Amino-3-hydroxy-4- octadecene-1-sulfonic acid	708,502	22708	-0,94	2,23	99,29	363,2447
2-Amino-4-octadecene-1,3- diol; (2?,3?,4?)-form	282,2793	42655	-0,56	8,36	99,79	299,2826

Name	m/z	Height	Diff (DB, ppm)	RT (min)	Score (DB) %	Mass
2-Azetidinecarboxylic acid; (R) - form, N -Benzyl, Me ester	223,1441	45912	-0,14	2,16	99,99	205,1103
2-Ethyl-11-methoxy-3-methyl-3H - [1,6]naphthyridino[6,5,4-def] quinoxaline	279,1606	315814	-0,69	9,86	99,7	279,1374
2-Hydroxy-10-oxo-4,10-seco-4,13(15),17-spatatrien-12-al	299,2008	64485	-0,69	6,37	99,66	316,2041
2-Methyl-1,16-dithiocyanato- 8-hexadecanol	370,2346	636724	-0,03	1,94	100	370,2113
2-Oxohexadecanoic acid; Me ester, (Z)-oxime	282,2428	73942	-0,03	2,94	100	299,2461
3-(12-Nitrododecyl)pyridine	310,2488	164095	0,38	3,54	99,91	292,215
3(20)-Phytene-1,2-diol; (2?,7 ?,11?)(1)-form, Di-Ac	397,3311	52692	0,26	8,29	99,94	396,3239
3-(2-Hydroxyethyl)-6- prenylindole; Aldehyde, oxime	243,149	146928	0,67	3,72	99,77	242,1418
3-(3-Oxo-1-nonadecenyl) oxiranecarboxylic acid	367,2845	65781	-0,68	6,33	99,63	366,2773
3,11-Dihydroxy-15-cembren-6- one; (1R ,3R ,4R ,8S ,11R ,12R)- form	307,2634	43991	-0,68	9,02	99,67	324,2667
3,24-Dihydroxy-24-methylstanost- 8-en-30-oic acid; (313,24?)-form	511,3757	36745	0,19	8,68	99,96	488,3865
3,4,6,24-Tetrahydroxycholest- 8(14)-en-15-one; (3i ,43,5ct,6a, 25S)-form	448,3425	48064	-0,77	7,81	99,41	448,3192
3,5-Dihydroxy-6,7-megastigmadien-9-one; (3S ,5S , 7R ax)-form	224,1645	127638	0,16	3,61	99,99	224,1412
3,6-Epidioxy-6-methoxy-4,16,18-eicosatrienoic acid	349,2372	40176	0,25	6,35	99,95	366,2405
3,7,11-Cembratrien-15-ol; (1S ,3E ,7E ,11E)-form, O -(6-O - Acetyl-13-D-galactopyranoside)	494,348	28402	-0,86	8,11	99,21	494,3248
3-Hydroxy-11-oxo-12-oleanen-30-oic acid; (3i3,183)-form, 3-O-13-DGlucuronopyranoside	646,3948	29679	0,29	2,88	99,89	646,3715
3-Hydroxycholan-24-oic acid; (3ct, 513)-form, Glycine amide	416,3163	48077	-0,93	7,81	99,18	433,3196
3-Hydroxypregn-5-en-20- one; (313,13ct,17ct)-form, Ac	358,2738	80308	0,59	4,35	99,72	358,2506
3-Hydroxypregn-5-en-20- one; (313,17ct)-form, Ac	341,2477	16660	-0,41	6,58	99,87	358,2509
3-Hydroxyundecanoic acid; ()-form, O -[ct-L- Rhamnopyranosyl-(1--*3)-3- hydroxyundecanoyl]	550,3946	19328	0,72	2,55	99,41	532,3608
4,15:6,7-Diepoxy-1,8- dihydroxy-5-hirsutanone; (1ct, 4?,63,7i3,83)-form, 1-(2- Hydroxyoctanoyl)	405,227	58107	0,34	2,10	99,89	422,2303
4,7-Epoxy-3-hydroxy-8,12(18)-dolabelladien-13-one	301,2164	142942	-0,49	6,04	99,83	318,2197
4,8-Dimethyl-3-nonen-1-ol	193,1563	13004	0	5,92	100	170,1671

Name	<i>m/z</i>	Height	Diff (DB, ppm)	RT (min)	Score (DB) %	Mass
4-Amino-3-hydroxybenzoic acid; 2,7-Tetradecadienyl ester (2E ,7?)	328,2271	80099	0,14	3,02	99,99	345,2303
4-Hydroxy-16-heptadecene-5,7-diyn-2-one	243,1742	17956	0,65	6,27	99,76	260,1775
4-Hydroxyphenylacetic acid; O -(3-Methyl-2-butenyl), nitrile	201,1383	34054	0,16	2,38	99,99	201,1153
4-Nitrophenol; Octadecanoyl	388,2848	206543	-0,48	2,83	99,79	405,2881
5,6-Epoxy-3,11-dihydroxyergost-22-en-1-one; (3i3,5i3,63,11ct,22E , 24R)-form, Di-Ac	533,3241	28449	-0,7	3,67	99,44	528,3455
5,6-Epoxy-7,10-cyclofarnesadien- 9-ol; (5i3,63,7Z ,9?)-form	236,2008	30610	0,27	2,22	99,96	236,1776
5,8-Epidioxyergosta-6,24(28)- dien-3-ol	411,3257	34172	0,06	9,12	100	428,329
5,8-Epidioxyergosta-6,9(11),22-trien-3-ol; (3i ,5ct,8a,22E ,24R)-form, O -3-D-Glucopyranoside	589,3741	301379	-0,81	3,40	99,19	588,3667
5-Cyclohexene-1,2,3,4-tetrol; (1RS ,2RS ,3SR ,4RS)-form, Tetra-Ac	297,0971	57968	-0,62	1,87	99,73	314,1004
6,13-Epoxy-4(18)-eunicellene-3,8,9,12-tetrol; (3a,6ct,83,9i3,12i3,13ct)-form, 12-Butanoyl, 3-Ac	466,3167	132888	-0,9	5,07	99,18	466,2935
6,13-Epoxy-4(18)-eunicellene-7,8,9,12-tetrol	354,2644	12350	0,62	6,63	99,7	354,2404
6,13-Epoxy-4(18)-eunicellene-8,9,12-triol; (6ct,8ctOH ,9i,12ctOH ,13a)-form	321,2427	114679	-0,94	6,63	99,34	338,246
6,13-Epoxy-4,8,9,12-eunicellane-4,9,12,13-tetrol; (4I ,6a,8ct,9i3, 12i3,13ct)-form, 9-Me ether, 12-Ac	825,5718	835123	0,23	2,91	99,95	412,2824
6,13-Epoxy-8(19)-eunicellene-3,4,9,12-tetrol; (3ct,4i3,6a,9i3,12i3,13a)-form, 3,4,12-Tri-Ac	480,2953	39046	0,49	3,25	99,75	480,2721
7,11-Dihydroxy-13-spongien-16-one; (7i3,11i3)-form	334,2379	44495	-0,83	7,81	99,48	334,2147
7,11-Dihydroxy-8-drimen-12,11-olide; (7ct,11i3)-form, 11-Et ether	277,1797	72298	0,49	5,74	99,84	294,183
7,14-Dihydroxy-15-nor-16-isocopalanoic acid	307,227	56414	-0,67	5,64	99,67	324,2303
7,8-Didehydro-13,13-carotene-3,3',4,4'-tetrol; (3S ,3'S ,4S ,4'S) -form	581,3992	17509	-0,53	8,49	99,65	598,4025
9,11,15-Trihydroxyprost-13-enoic acid; (8RS ,9SR ,11RS ,13E ,15 SR)-form, Me ester	353,2684	67371	0,76	5,85	99,52	370,2716
9-Hydroxy-5,7,11,14-eicosatetraenoic acid; (5Z ,7E ,9S ,11Z ,14Z)-form, Me ester	317,2476	62084	-0,15	5,78	99,98	334,2508
9-Hydroxy-7-hexadecenoic acid; (7E ,9S)-form, Ketone	251,2007	32112	-0,62	6,20	99,78	268,204
Ageline B	532,3523	52722	-0,6	7,48	99,59	531,3451

Name	<i>m/z</i>	Height	Diff (DB, ppm)	RT (min)	Score (DB) %	Mass
Amphiasterin C1; 3-Epimer	484,3034	112434	-0,11	2,49	99,99	479,3247
Amphidinolide T2	452,3373	24688	-0,53	6,64	99,72	452,314
Antillatoxin B	548,3478	73840	0,92	6,65	99	565,3511
Aplaminone; (R)-form, A9' - Isomer(E -), 11'-hydroxy	492,2308	22650	0,04	3,40	100	509,234
Aplysia MIP-related peptides; GAPRFI amide	641,3888	16326	-0,96	5,12	98,77	658,3921
Aspergillamide A	492,2967	10636	0,55	6,92	99,69	474,2628
Batzellaside A	314,2691	30268	-0,34	7,98	99,92	331,2724
Belamide A	622,3959	17749	0,71	7,48	99,36	604,362
Bengazole Z; O 6- Heneicosanoyl	629,4136	191826	-0,03	2,74	100	606,4244
Biliverdin IX6; Di-Me ester	593,2762	16779	-0,51	8,79	99,67	610,2794
Chaetoglobosin A; 19-Deoxy, 20-deoxo	481,2854	26963	-0,87	6,93	99,18	498,2887
Cholest-9(11)-ene-3,6,22-triol; (3i ,5ct,6a,22R)-form, 22-Ac, 3,6-di-O -sulfate	638,303	91823	-0,5	4,70	99,67	620,2692
Cholestane-3,5,6,7-tetrol; (313, 5ct,6ct,7ct)-form, 3,6,7-Tri-Ac	545,3833	50889	0,73	4,18	99,37	562,3865
Clathrynamide A; N -(4- Hydroxy-1-methylpentyl)	584,2541	34317	0,94	4,39	98,96	561,2648
Cochlioquinone A; 17-Methoxy	545,311	19411	-0,1	4,28	99,99	562,3142
Cochlioquinone A; Hydroquinone, 11-ketone	532,327	43782	-0,28	5,14	99,91	532,3038
Conicamine	206,1178	56844	0,2	1,81	99,98	201,1391
Crambescidin 431	449,3123	36591	-0,21	2,46	99,96	431,2785
Criamide A; N 1-Me	682,4764	54752	-0,23	2,75	99,93	682,4532
Cyclo(tryptophylvalyl); (3S ,6S)-form, 3,6-Bis(methylthio)	377,1462	53953	0,68	1,97	99,61	377,1229
Dideacetylraspacionin; 10,28-Dihydro, 103-hydroxy, 10,15- di-Ac	594,437	38496	-0,96	9,56	98,87	594,4137
Didemniserinolipid C; O 10-Ac	602,4022	20574	0,88	3,33	99,03	597,4235
Dolabelide B	755,4944	23468	-0,47	2,57	99,68	754,4871
Ergosta-7,24(28)-diene-3,4,6,20, 22-pentol; (33,4f3,5a,6a,20?,22?) -form, 4,6-Di-Ac	546,379	48858	-0,11	6,36	99,98	546,3557
Ergostane-3,5,6,7,15-pentol	471,3449	15081	-0,79	4,62	99,36	466,3662
Exophilin A	576,4109	38199	-0,42	6,72	99,78	576,3876
Fasciospongide B	466,28	94817	-0,13	4,11	99,98	448,2462
Fellutamide A; 1-Deoxy	556,3703	19846	0,39	2,12	99,82	555,363
Fungichromin	671,4006	13344	-0,68	5,83	99,37	670,3933
Glutamic acid; (S)-form, N -(9Z , 12Z ,15Z -Octadecatrienoyl)	815,5419	51820	-0,34	3,50	99,89	407,2673
Glycerol 1,2-dialkanoates; Glycerol 1-hexadecanoate 2- tetradecanoate, 3-O -3-DGalactopyranoside	725,5178	40381	-0,51	2,99	99,63	702,5286
Glycerol 1,2-dialkanoates;Glycerol 1-(9Z-hexadecenoate) 2- tetradecanoate, 3-O -?-DGalactopyranoside	723,5021	32832	-0,46	3,03	99,7	700,5129

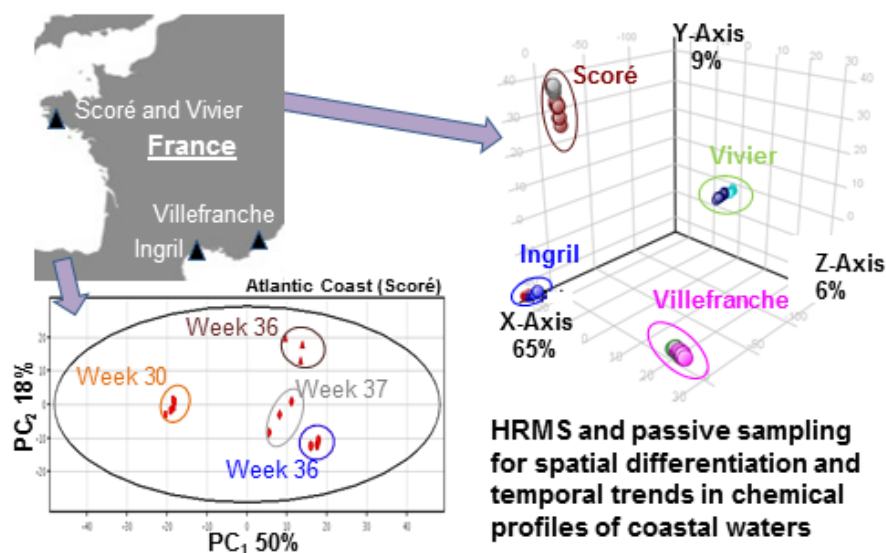
Name	<i>m/z</i>	Height	Diff (DB, ppm)	RT (min)	Score (DB) %	Mass
Glycerol 1-alkanoates; Glycerol 1-(8,9-methylenehexadecanoate)	365,2665	26024	-0,69	5,76	99,64	342,2772
Glycerol 1-alkanoates; Glycerol 1-(9Z -octadecenoate), 2-Ac	381,3001	40190	0,54	6,87	99,74	398,303
Glycerol 1-alkyl ethers; Glycerol 1-tetradecyl ether	288,2895	39536	0,62	5,17	99,76	288,2663
Halichomycin	557,3951	18682	-0,29	9,06	99,9	539,3612
Halimedalactone	314,2116	49951	-0,5	2,64	99,83	314,1884
Hemiasterlin	526,3747	469332	0,8	3,06	99,28	526,3515
Hennoxazole A; 4-Deoxy	498,3331	18685	-0,89	4,09	99,14	498,3098
Hurghaperoxide	405,3001	32507	-0,48	8,05	99,79	422,3034
Kahalalide D	613,3826	29507	-1	2,70	98,77	595,3488
Kailuin A	680,459	20500	0,35	3,18	99,83	697,4623
Kailuin B	726,5014	96294	-0,3	3,16	99,87	725,4941
Korormicin D	430,295	131313	0,32	4,36	99,9	447,2983
Labiataamide A	536,3218	15258	0,02	6,11	100	535,3145
Lasonolide F; Et ester	632,3797	168668	-0,63	2,67	99,5	614,3459
Manzamine A; (+)-form, 6,31 13-Dihydroxy, 32,33-dihydro	600,3904	17080	0,66	3,27	99,46	582,3566
Manzamine A; (+)-form, 8-Hydroxy, 1R ,2,3,4-tetrahydro, N 2-Me	600,4272	27839	0	2,08	100	582,3934
Martiriol	522,3788	213917	0,21	4,32	99,95	522,3555
Melophlins; Melophlin K	306,2424	31428	0,97	3,26	99,32	323,2457
Montipyridine	274,1803	76954	-0,47	2,47	99,86	291,1836
Muqubilin; (13R ,16R ,17R)- form	392,3159	32409	-0,06	5,51	100	392,2927
Noroxopenlanfuran	201,1272	12797	0,73	6,27	99,76	218,1305
Okadaic acid	822,5002	10380	-0,62	6,02	99,42	804,4665
Oscillatoxin A	583,2873	20647	0,72	2,75	99,37	578,3087
Palinurine A	440,2795	89875	0,16	3,66	99,97	457,2828
Pectenotoxin 1; Dihydro (?)	876,5109	29177	-0,54	6,57	99,53	876,4876
Pectinoacetal C	535,3627	24008	0,45	7,13	99,76	534,3554
Phosphatidylcholine; Glycerol 1,2-didecanoate 3- phosphocholine	583,4079	169882	0,44	2,81	99,76	565,3741
Pinnaic acid	408,2299	79150	0,31	3,23	99,91	425,2332
Plakortin acid*; 3-Epimer, 9, 10-dihydro, Me ester	319,2246	48230	-0,76	7,17	99,6	314,2459
Pregnane-3,20-dione; 5ct- form	299,2371	62148	-0,65	5,78	99,7	316,2404
Rhopaladin A; Debromo, 6- deoxy	354,1347	44400	0,37	2,58	99,89	354,1115
Roserythrin	578,3628	13687	0,14	4,80	99,98	578,3395
Saframycin A; 5ct-Hydroxy	596,2345	31886	1	3,79	98,79	578,2007
Sarcotragin A; N -De-(2-phenylethyl), N - (carboxymethyl)	447,2857	80580	-0,85	2,99	99,29	447,2625
Scalusamide A; 6',7'- Didehydro(E -), 8',9'-dihydro	264,1960	37731	-0,74	2,41	99,66	281,1993
Secoasbestinin	392,2434	59078	-0,7	2,09	99,58	392,2202
Semiplenamamide E; 2R *,3S *-Epoxide	434,3243	17707	-0,6	5,99	99,67	411,3351
Siphonarin A; 3R -Alcohol	491,3001	27544	0,38	6,53	99,84	508,3034
Solanapyrone B; 73-Hydroxy, 4'-	365,2073	42412	-0,71	2,49	99,61	347,1735

Name	<i>m/z</i>	Height	Diff (DB, ppm)	RT (min)	Score (DB) %	Mass
demethoxy, 4'-[(2-hydroxyethyl)amino], 1- aldehyde						
Sordaricin; O -[2-Methyl-2Z, 4E - hexadienoyl-(1 $\frac{1}{2}$ *3)-6- deoxy-4-O - methyl-3-Daltropyranoside]	618,3632	12711	0,85	2,57	99,1	600,3293
Stigmast-5-en-3-ol; (313,24R)- form, O -[3-D-Glucopyranosyl-(1 $\frac{1}{2}$ *4)-ct-L-arabinopyranoside]	709,4880	210398	0,8	2,52	99,11	708,4807
Stigmast-5-en-3-ol; (313,24R)- form, O -[ct-Rhamnopyranosyl-(1 $\frac{1}{2}$ *5)-ct-L-arabinofuranoside]	692,5090	587162	0,8	2,77	99,12	692,4858
Stigmasta-7,22-diene-2,3,5,6,9, 11,19-heptol; (2a,3i3,5ct,63,11ct, 24S)-form, 11,19-Di-Ac	575,3574	40356	0,83	3,25	99,15	592,3606
Stigmastane-3,4,6,15,16,29- hexol; (313,4f3,5ct,6ct,1513,163,24R)- form	519,3661	68075	-0,96	2,97	99,01	496,3769
Stigmastane-3,5,6,15,29-pentol; (3i3,5a,63,15a,24R)-form, 29- Carboxylic acid	477,3578	24274	-0,7	8,94	99,48	494,3611
Stolononic acid A	434,3268	20806	-0,73	7,80	99,49	434,3035
Synechobactin A	578,3756	20813	0,7	2,56	99,42	560,3417
Taurospongine A	741,5078	78719	0,5	2,64	99,63	741,4846
Tedanolid	628,3686	15008	0,9	4,97	98,98	610,3348
Theopederin A	526,3010	22820	0,17	4,93	99,97	543,3043
Thorectandramine	438,2052	85140	-0,28	2,67	99,92	438,1819
Tumonoic acid A; Me ester	336,2531	53235	0,54	4,37	99,77	353,2564

II. Passive sampling and high resolution mass spectrometry for chemical profiling of French coastal areas with a focus on marine biotoxins

Article soumis dans “Environmental Science and Technology”: Z. Zendong, S. Bertrand, C. Herrenknecht, E. Abadie, C. Jauzein, R. Lemée, J. Gouriou, Z. Amzil, P. Hess.

Graphic Abstract:



II.1. RESUME

Les échantillonneurs passifs sont capables d'accumuler les toxines produites par les microalgues et dissoutes dans l'eau, et fournissent ainsi des informations utiles pour la surveillance environnementale. Des échantillonneurs passifs contenant 0,3, 3 et 10 g de résine HP-20 et déployés en France dans quatre milieux marins différents, ont été analysés par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution. Le criblage quantitatif ciblé a permis d'obtenir le profil toxinique et a montré que la concentration en toxines dans les échantillonneurs était dépendante de la quantité de résine utilisée. Les logiciels MassHunter et Mass Profiler Professional ont été utilisés pour le retraitement et

l'analyse statistique des données. Une approche de profilage différentiel a été développée pour une analyse et une comparaison globale de la diversité chimique des substances dissoutes dans des eaux marines de différentes provenances. L'analyse en composantes principales (ACP) a permis d'obtenir une différenciation spatiale des zones géographiques. De la même manière, les échantillonneurs passifs issus de dates de début, milieu et fin de déploiement ont pu être différenciés par ACP, reflétant des variations saisonnières des profils chimiques mais aussi de la population de microalgues. Cette étude a utilisé une approche de métabolomique non-ciblée en combinaison avec les échantillonneurs passifs pour la différenciation spatiale et temporelle des profils chimiques d'environnements marins. Nous proposons cette approche comme une étape pour la découverte de marqueurs de changements dans la structure des communautés microbiennes.

II.2. ABSTRACT and KEYWORDS

Passive samplers are able to accumulate biotoxins produced by microalgae directly from seawater, thus providing useful information for monitoring of the marine environment. Passive samplers containing 0.3, 3 and 10 g of HP-20 resin were deployed at four different coastal areas in France and analyzed using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. Quantitative targeted screening provided insights into toxin profiles and showed that toxin concentrations in passive samplers were dependent on the amount of resin used. MassHunter and Profiler Professional Softwares were used for data reprocessing and statistical analyses. A differential profiling approach was developed to investigate and compare the overall chemical diversity of dissolved substances in different coastal water bodies. Principal component analysis (PCA) allowed for spatial differentiation between areas. Similarly, passive samplers retrieved from the same location at early, medium and late deployment periods were also differentiated by PCA, reflecting seasonal variations in chemical profiles and in the microalgal community. This study used an untargeted metabolomic approach for spatial and temporal differentiation of marine environmental chemical profiles using passive samplers, and we propose this approach as a step forward in the discovery of biomarkers of short- or long-term changes in the microbial community structure.

Keywords: Environmental change, environmental metabolomics, algal toxins, REPHY, SPATT

II.3. INTRODUCTION

Contamination of shellfish with toxins produced by microalgae is an issue for public health worldwide [1] and has led to regulation of toxins in shellfish [2]. To protect consumers, many countries have implemented biotoxin monitoring programs through phytoplankton counting and testing of bioaccumulation of toxins in shellfish.

On one hand, shellfish testing is expensive, time-consuming and, many of the toxins are metabolized in shellfish [3-7], thus increasing the complexity of the metabolite profile and making quantification more challenging. On the other hand, counting of microalgae is laborious, only gives a snapshot of the algal population at the sampling period and, is limited to species identified as toxic. Additionally, some toxin producing species are not easily detected in traditional monitoring, *e.g.* *Prorocentrum spp.* [8, 9], *Ostreopsis spp.* and *Amphidinium spp.*[8] and *Vulcanodinium rugosum* [10].

Recently, alternative sampling approaches have been introduced to improve toxin monitoring, *e.g.* Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT), a technique based on the passive adsorption of compounds directly from seawater to solid-phase adsorbents [11]. While the initial expectation of the technique providing early warning could not be confirmed in subsequent studies [12], the approach has been successfully used to track microbial metabolites that have not been searched for previously in coastal environments, *e.g.* microcystins [13]. Due to its higher adsorption capacity [14, 15], HP20 polymeric resin has been widely and successfully used to detect toxins from either pelagic [16, 17] or benthic[18-20] microalgal species. While 3 g of resin was the amount mostly used, fewer studies have tested passive samplers with higher (10 g) [21] or lower (0.3 g) [19] amounts of resin. Passive samplers offer the ability to integrate a wide range of environmental contaminants over an exposure period [16], in particular when combined with untargeted analysis using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) [19, 22]. Additionally, analysis of toxins from SPATT samples is easier and less prone to matrix effects [22], compared to shellfish analysis [22-25].

Monitoring programs are designed to comply with current regulation. However, there is growing concern about “emerging toxins”. This term is used to describe “newly” discovered

toxins (*e.g.* azaspiracids, pinnatoxins) or toxin-analogues, and the recent appearance of known toxins in areas where they had not been previously described (*e.g.* ciguatoxins) [26]. Hence, there is a necessity to monitor biotoxins in biological and environmental samples using targeted but also untargeted approaches, such as metabolomics. Metabolomics can be used for rapid assessment of the chemical diversity of biological samples. Environmental metabolomics uses metabolomics to characterize the interactions of living organisms with their environment [27]. It can also be used to characterize the response of organisms to stressors (climate change, pollution, environmental changes) [28], to identify differences and/or similarities between different strains from the same species [29] or to track species in different environments [30]. While passive sampling does, in principle, not account for all eventualities relevant to food safety due to the absence of biotransformations naturally occurring in foodstuffs, the profiles captured rather represent the metabolite profiles of micro-organisms in the water column and facilitate thus tracking of toxin-producing micro-organisms.

In this study, passive sampling was used in combination with LC-MS analysis to determine chemical profiles in four French coastal areas. Firstly, a targeted approach was used to compare passive samplers containing 0.3 g, 3 g or 10 g for their accumulation of lipophilic phycotoxins: impacts of the amount of the HP20 resin as well as the size of the passive sampling device were evaluated. Secondly, a profiling approach was used for spatial and temporal differentiation of coastal water bodies.

II.4. MATERIALS AND METHODS

II.4.1. Chemicals and reagents

Certified standard solutions of okadaic acid (OA) dinophysistoxins 1 and 2 (DTX1 and -2), 13-desmethyl spirolide C (13-desMe-C), pinnatoxin G (PnTX-G) and pectenotoxin 2 (PTX2) were obtained from the National Research Council (Halifax, NS, Canada). HPLC grade methanol (MeOH) and formic acid (98%) were from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Ammonium formate was from Fluka (St. Louis, MI, USA). Milli-Q water was produced in-house to 18M Ω /cm quality, using a Milli-Q integral 3 system (Millipore). LC/MS grade acetonitrile (ACN) and water were purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France).

II.4.2. Study area and, passive samplers design, handling and extraction

Deployment sites included two sites in the Mediterranean Sea: Ingril lagoon (3°46'25.94" N; 43°26'10.10" E) and Villefranche bay ("Rochambeau" site: 43°41'35.15" N; 7°18'31.59" E"), and two sites on the Atlantic coast: Concarneau Scoré (3°57'15.13" S; 47°52'31.76" E) and Concarneau Vivier (47°52'5.71" N; 3°54'59.92" W) (Supporting Information, Figure S1). Ingril lagoon and Concarneau Vivier (Vivier) were shallow semi-enclosed areas, while Concarneau Scoré (Scoré) and Villefranche were bays open to the sea. In summer 2014, SPATTs of different sizes were deployed at all sites: 0.3 and 3 g SPATTs at Ingril lagoon, and 3 and 10 g SPATTs at the three other sites (Supporting Information Figure S2). Deployment depths depended on the site (10 m at Scoré and 0.5 m for the other sites).

Passive samplers (SPATTs) were prepared from Diaon® HP20 resin (0.3, 3 or 10 g) contained between sheets of mesh (30 µm) that were held together by embroidery rings. For small SPATTs (0.3 g and 3 g) 68 mm wide embroidery frames were used, while for bigger SPATTs (10 g) the diameter of the embroidery frame was 94 mm. Activation, storage and deployment of the SPATTs was carried out as reported in our previous study [19]. After retrieval, each SPATT was rinsed with Milli-Q water, the resin transferred to an empty SPE cartridge and eluted with MeOH. Depending on the size of the SPATT, different amounts of MeOH were used for elution: 15 mL for 0.3 g SPATT, 24 mL for 3 g SPATT and 50 mL for 10 g SPATTs. Eluted fractions were then evaporated to dryness at 40 °C under a gentle nitrogen stream and reconstituted with 500 µL of 50 % aqueous MeOH.

II.4.3. Liquid chromatography Mass spectrometry analyses

Analyses were carried out using a UHPLC system (1290 Infinity, Agilent Technologies) coupled to a 6540 UHD Accurate-Mass QToF (Agilent Technologies) equipped with a dual ESI source. Mass spectrometry acquisitions in positive and negative modes, as well as chromatographic conditions were the same as previously published [31]. Briefly, chromatographic separation was obtained on a Phenomenex Kinetex XB-C18 column (100 x 2.1 mm; 2.6 µm), under acidic conditions with mobile phase composed of water and acetonitrile with a total chromatographic run time of 15 min (injection volume 3 µL).

II.4.4. QA/QC and quantitation

For quantitation, samples from each deployment week were injected in-between two calibration curves prepared by spiking a mixture of certified standard solutions into MeOH. A maximum number of 12 samples was injected in between two calibration curves. A maximum of 20% variation between the slopes of 2 consecutive calibration curves was accepted. The identification of each toxin relied on extraction of their accurate mass and specific retention time, as obtained with injection of standard solutions (Supporting information Table S1). Toxin concentrations were calculated based on peak area (external calibration). Pectenotoxin-2-seco-acid (PTX2sa) was quantified using PTX2 standard.

II.4.5. Data processing for differential profiling

Data were processed using the Molecular Feature Extractor (MFE) algorithm within the Agilent Profinder Software (B.06.00). A molecular feature consists of the mono-isotopic mass, its isotopic pattern as well as any sodium, potassium or ammonium adducts present. During the MFE, noise was estimated at 500 counts and was removed by using the *peak filters* parameter. This low threshold was selected to maintain a maximum of information. Singly charged features with abundances higher than 1500 counts and, not detected in methanol blanks and passive sampler blanks (*i.e.* SPATTs that were conditioned but not exposed in the field) were retained for further processing. Those features were validated back into the raw data using the recursive processing inside Profinder software. Finally, each sample data was exported to the Agilent Mass Profiler Professional (MPP) software (B.13.00) as compound exchange format file (.cef).

In MPP, profiles were aligned with 5 ppm and 0.2 min bins of mass and retention time windows, respectively. Data were log₂ transformed, centered and normalized to give compounds equal weight in classification. Groups were composed of SPATT samples from the same location and/or with the same amount of HP20 resin (0.3 g, 3 g or 10 g), and/or from the same deployment week. Data were analyzed by univariate and multivariate analysis to detect features of interest. For the multivariate data analysis (MVDA) all features present in less than 20% of all samples from the data set were discarded. For univariate data analysis, only entities with *p-values* > 0.05 and *fold-change* > 2 were retained. Features that were considered characteristic were tentatively identified based on mass and spectral accuracy using the Dictionary of Marine Natural Products (DMNP) library [32] with a 2 ppm tolerance [33].

II.5. RESULTS AND DISCUSSION

During summer 2014, SPATTs containing 0.3 g or 3 g of HP20 were deployed at Ingril lagoon, while SPATTs containing 3 g or 10 g of HP20 were deployed at Villefranche, Scoré and Vivier. On each occasion, three SPATTs were deployed for 1-week periods. After retrieval, passive samplers were extracted and analyzed using UHPLC-MS. Toxins OA, DTX1, PTX2, PTX2sa, 13-desMe-C and PnTX-G were quantified in each extracts. In parallel, untargeted analysis was carried out to compare chemical profiles of SPATT extracts. Features ($RT \times m/z \times \text{peak area}$) detected in the UHPLC-HRMS fingerprints of each replicate were deconvoluted using an automated peak-picking procedure that was optimized for the retrieval of relevant chromatographic ion traces. Then, the aligned data led to a large data-matrix (285 samples with a total of *ca.* 6600 features), which was explored by multivariate or univariate data analysis.

II.5.1. Impact of the size of the SPATT and amount of resin on accumulation

The toxins detected in the passive samplers were OA, DTX1, PTX2, PTX2sa, 13-desMe-C and PnTX-G. To evaluate the impact of the amount of resin on toxin accumulation, the ratio (R_x) of the amount of toxin (in ng) accumulated on the bigger-size SPATTs (3 g SPATTs or 10 g SPATTs) over the amount accumulated on the smaller-size SPATTs (0.3 g SPATTs or 3 g SPATTs) was calculated. Two ratios were then obtained: R_1 comparing the amount of toxins on 3 g over 0.3 g SPATTs and, R_2 comparing the amount of toxins on 10 g over 3 g SPATTs. In case of proportionality between the amount of resin and the level of toxin accumulated, the ratios should be equal to either 10 for R_1 or 3.3 for R_2 . For better comparability R_1 and R_2 were divided by 10 and 3.3, respectively to obtain a targeted ratio value of 1 for all sites.

The ratios varied from 0.06 (week 39 and 40 for PnTX-G at Ingril) to 1.74 (week 35 for OA at Scoré) (Table II-1). Some ratios were not determined because the toxins considered were not detected or detected only at trace levels. For weeks when toxin concentrations in the water column were lower (assumed from low concentrations adsorbed), there was more competition for adsorption of toxins on the passive samplers. Consequently, the ratios were lower than the target value of 1. Contrarily, when higher levels of toxins were dissolved in the water column, ratios were closer to or higher than 1. Concentrations adsorbed were elevated for: OA at Ingril

(weeks 39 and 42), Scoré (weeks 35 and 37), Villefranche (week 30, 31, 33 and 34) and; for PTX2 at Scoré (week 30 and 37).

Table II-1. Ratios of the amount of toxins accumulated on 3 g over 0.3 g SPATTs and, over amount of toxins accumulated on 10 g over 3 g SPATTs. The expected ratio is 1.

<i>Locations</i>	<i>Weeks</i>	Ratio of accumulated toxins (R)					
		<i>OA</i>	<i>DTX1</i>	<i>PTX2</i>	<i>PTX2sa</i>	<i>PnTX-G</i>	<i>13-desMe-C</i>
Ingril (3 g vs 0.3 g)	W 36	0.27	0.20	0.13	<i>n.c</i>	0.31	<i>n.d</i>
	W 37	0.24	0.27	0.15	<i>n.c</i>	0.08	<i>n.d</i>
	W 38	0.66	0.25	0.10	<i>n.c</i>	0.09	<i>n.d</i>
	W 39	1.09	0.38	0.12	<i>n.c</i>	0.06	<i>n.d</i>
	W 40	0.40	0.22	0.06	<i>n.c</i>	0.06	<i>n.d</i>
	W 41	0.56	0.24	0.22	<i>n.c</i>	0.12	<i>n.d</i>
	W 42	0.74	0.33	0.22	<i>n.c</i>	0.18	<i>n.d</i>
Vivier (10 g vs 3 g)	W 30	0.52	0.69	0.42	0.25	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
	W 31	0.54	0.47	0.49	0.41	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
	W 32	0.53	0.57	0.46	0.33	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
	W 33	0.57	0.73	0.42	0.36	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
Scoré (10 g vs 3 g)	W 30	0.31	0.44	0.89	0.39	<i>n.d</i>	0.07
	W 35	1.74	0.38	0.59	1.16	<i>n.d</i>	0.08
	W 36	0.63	0.45	0.28	0.48	<i>n.d</i>	0.08
	W 37	1.29	0.71	1.70	0.73	<i>n.d</i>	0.08
Villefranche (10 g vs 3 g)	W 29	0.31	<i>n.d</i>	0.41	0.28	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
	W 30	1.45	<i>n.d</i>	0.51	0.30	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
	W 31	0.83	<i>n.d</i>	0.26	0.45	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
	W 32	0.39	<i>n.d</i>	0.30	0.25	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
	W 33	0.80	<i>n.d</i>	0.32	0.29	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
	W 34	1.02	<i>n.d</i>	0.32	0.25	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>

n.d: not detected; *n.c*: not calculated due to their detection below quantification limit

When toxin concentrations were high, ratios equal to or higher than 1 could be explained by the saturation of SPATTs containing low amount of resin. However, when concentrations of dissolved toxins were low, ratios were lower. This could be explained by less exploitation of the capacity of adsorption of the resin or, by part of the HP20 resin not being accessible to toxin due to resin clogging. Indeed, during passive sampler extraction, it was noticed that for some SPATTs, some resin particles were clogged together. This was especially the case for some 10 g SPATTs. In particular, at Vivier, the water body was very limited as this site is an intertidal basin

of several cubic meters of water. Consequently, there was not sufficient toxin or water body for the 10 g SPATTs to reach equilibrium.

In fact, for both 0.3 g and 3 g SPATTs the available surface area of the inside of the embroidery ring was 36 cm², while for 10 g SPATTs the exposure area was 69 cm². Hence, while in the 0.3 g passive samplers the exposure area was sufficient to expose every HP20 particle to toxins, particles in 3 g or 10 g SPATTs were superimposed and diffusion inside the SPATT added to decreased adsorption. This phenomenon is worst for 10 g SPATTs for which the exposure area is only 1.9-times higher compared to 3 g SPATTs while the amount of resin is 3.33-times more. For practical reasons, wider embroidery frames could not be used for field deployments as they would not have fit inside the deployment cages. Overall, toxin concentrations depended on the amount of resin used in each SPATT. For most results, the amount of toxin detected (in ng) was higher on SPATTs with the highest amounts of resin, implying that for maximum detectability, the use of 10 g SPATTs could be useful.

Passive samplers containing 3 g of HP20 resin have been used numerous times and prove useful to accumulate toxins from pelagic and benthic microalgal species [11, 12, 16]. However, use of SPATTs containing 10 g or 0.3 g [19] of resin is scarce [19, 21]. The lowest amounts of toxin (in ng) detected using SPATTs of different sizes were typically in the range of detection or quantification limit (Supporting information Table S2). The lowest concentrations and lowest amounts of toxins were detected with 3 g-SPATTs, followed by 10 g-SPATTs and 0.3 g-SPATTs. As expected, on the same sampling occasion during a low toxicity period (Vivier, week 33), the amounts of toxin detected with 10 g-SPATTs were reproducibly higher than those detected with the corresponding 3 g-SPATTs, even though the concentrations in the 3 g-SPATTs were close to the quantification limit. Consequently, increasing the amount of resin (to 10 g) should be beneficial to improving toxin detectability of compounds. However, care should be taken to use the appropriate deployment device to avoid resin clogging, i.e. a device with a larger exposure surface than in the present study should be used. Interestingly, passive samplers with 0.3 g of resin contained similar, or even slightly higher, concentrations of toxins than the ones containing 3g of resin on the same sampling occasion (Ingril, week 36). Therefore, on specific sampling surveys, *e.g.* in the case of algal blooms where the amount of dissolved toxins should be sufficient to be detected [19], it may be relevant to use low amounts of resin to rapidly

achieve equilibrium, especially if the resin used is expensive compared to the price of the HP20 resin (case of Oasis HLB and Strata-X resins).

II.5.2. Toxin monitoring and profiles at different deployment areas

In this section, only results from 3 g-SPATTS are discussed to allow for comparison between all four sampling sites. As previously mentioned, toxins detected in passive samplers were OA, DTX1, PTX2, PTX2sa, 13-desMe-C and PnTX-G (Figures II-1 and II-2). Previous studies had already reported detection of those toxins using passive samplers, in France [19] and elsewhere [11, 19, 20, 34].

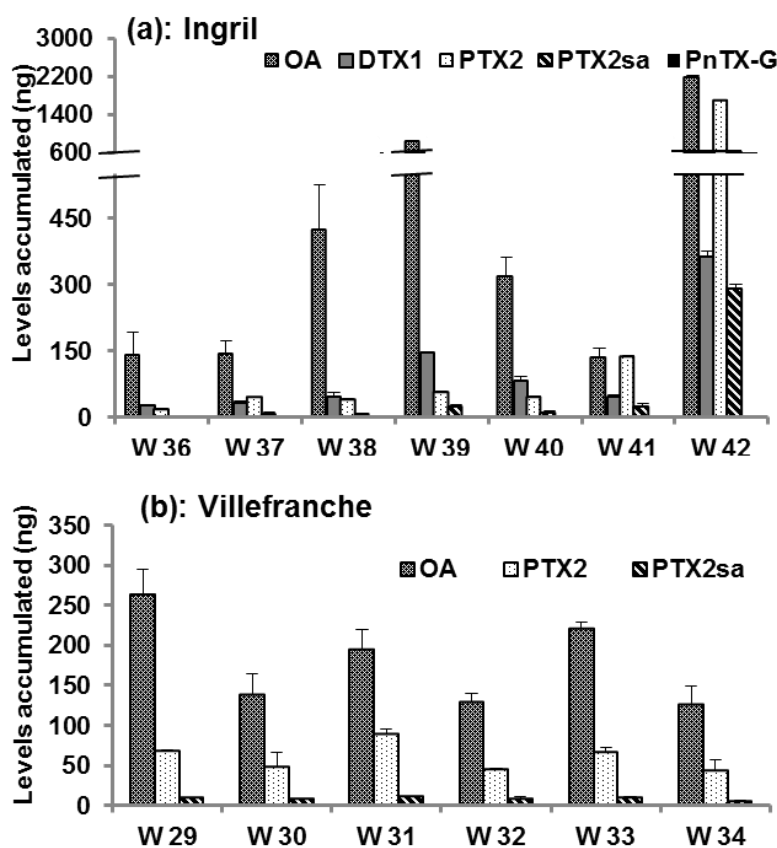


Figure II-1. Levels of toxins ($ng \pm SD$; $n=3$) accumulated on SPATTS (3 g) deployed for 1 week in the Mediterranean Sea for (a) Ingril lagoon and (b) Villefranche.

While PnTX-G was only detected in the Mediterranean Sea, at Ingril lagoon, levels were lower than those of the other toxins, notably OA and PTX2. Weekly monitoring showed an increase in concentration from week 36 to week 39, followed by a decrease from week 39 to week 41 and another increase at week 42 (Figure II-1a). At Villefranche, more OA was detected than PTX2 or PTX2sa, while no DTX1 or PnTX-G were detected. Toxin concentrations fluctuated from beginning to end of the deployment period (Figure II-1b).

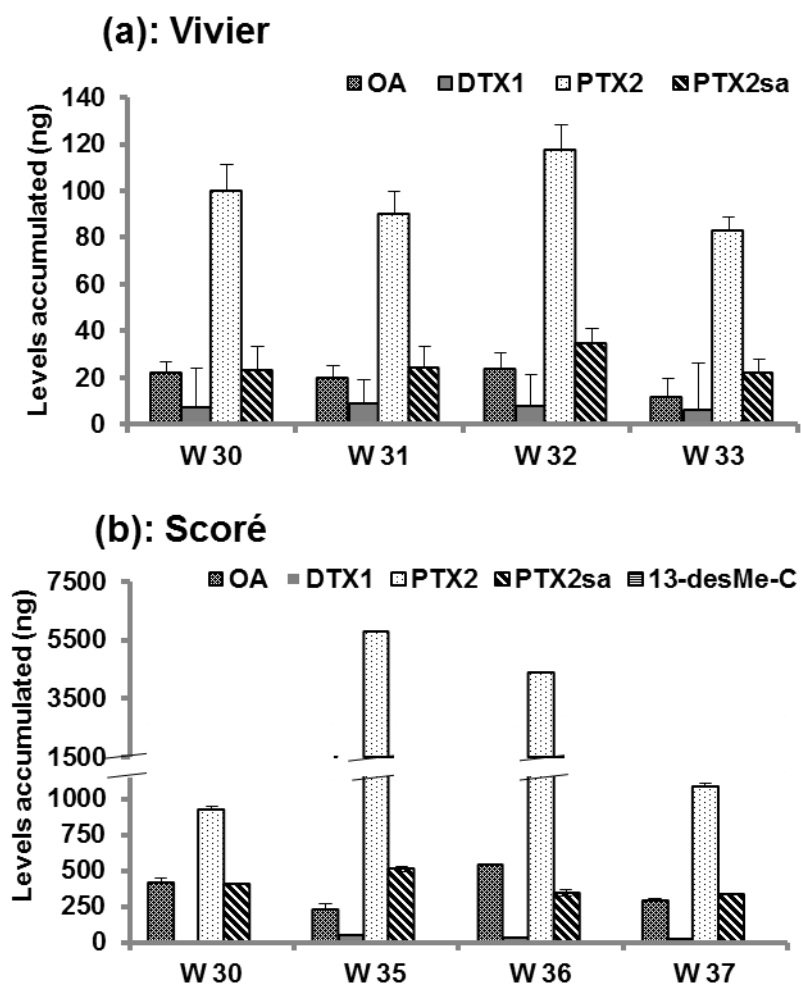


Figure II-2. Levels of toxins ($\text{ng} \pm \text{SD}$; $n=3$) accumulated on SPATTs (3 g) deployed for 1 week in the Atlantic Ocean for (a) Vivier and (b) Scoré.

On the Atlantic coast, at Vivier, the toxin profile was dominated by presence of PTX2 followed by OA or PTX2sa, and low concentrations of DTX1. Also, trace amounts of 13-desMe-C were detected. Overall at Vivier, levels of all toxins throughout the monitoring period were

quite stable (Figure 2a). Passive samplers from Scoré also exhibited higher levels of PTX2 compared to OA, PTX2sa and DTX1. Concentrations of PTX2 showed an increase from Week 30 to Week 35, followed by a decrease over the next two weeks, while levels of other toxins were quite stable throughout the deployment period (Figure II-2b). Variability was estimated from triplicate passive samplers deployed during the same week and was higher for sites where the concentrations in toxin were low in the water column and thus in the passive samplers (Figure II-1b and II-2a).

Comparing the four sites, the highest concentrations were detected at Scoré and the lowest at Vivier. Medium concentrations were observed at Ingril and Villefranche. OA, PTX2, PTX2sa and DTX1 were detected at all sites, except for DTX1 that was absent at Villefranche. Moreover, PnTX-G was detected only at Ingril and, 13-desMe-C was detected at trace levels at Scoré and at trace levels at Vivier. OA was predominant in the Mediterranean Sea (Ingril and Villefranche), while PTX2 was predominant in the Atlantic Ocean (Concarneau Scoré and Vivier). The detection of these toxins in passive sampler extracts suggests the presence of different species of the producing dinoflagellates. Indeed, *Prorocentrum* species produce OA and DTX1 [35], *Vulcanodinium rugosum* produces PnTX-G [36, 37] and, 13-desMe-C is produced by *Alexandrium ostenfeldii* [38, 39]. Moreover, *Dinophysis* spp. (*fortii*, *acuminata*, *acuta*) are known producers of OA, DTX1, PTX2 while PTX2sa is typically derived from the chemical hydrolysis or enzymatic metabolisation of PTX2 in shellfish [40]. According to these results, toxin profiles (detected toxins and/or levels) were different from one site to another, showing different microalgal communities in the water. These finding is also corroborated by the PCA results discussed below.

II.5.3. Differential profiling for detection of spatial and temporal trends

To compare the complete chemical composition of SPATT extracts (0.3 g, 3 g and 10 g), a PCA was carried out using data from all recorded profiles. Profiles of SPATT extracts varied mostly according to the sampling site (Figure II-3); the first three components of the PCA explained 80% of the total variance. While small differences were also observed between passive samplers of different sizes within each site (0.3 g against 3 g and, 3 g against 10 g) these differences were much lower than the site effect. For each site, specific features could be

determined by analyzing the PCA loadings (Supporting information Table S3). However, only few of those features were identified by database search in DMNP based on spectral and mass accuracy information. For each site, there was no major difference in chemical profile between the extracts from different amounts of resin. Consequently, 3 g-SPATTs seemed to be a good compromise between the amount of resin used and the observed chemical profiles and also allowed for comparison of all sites.

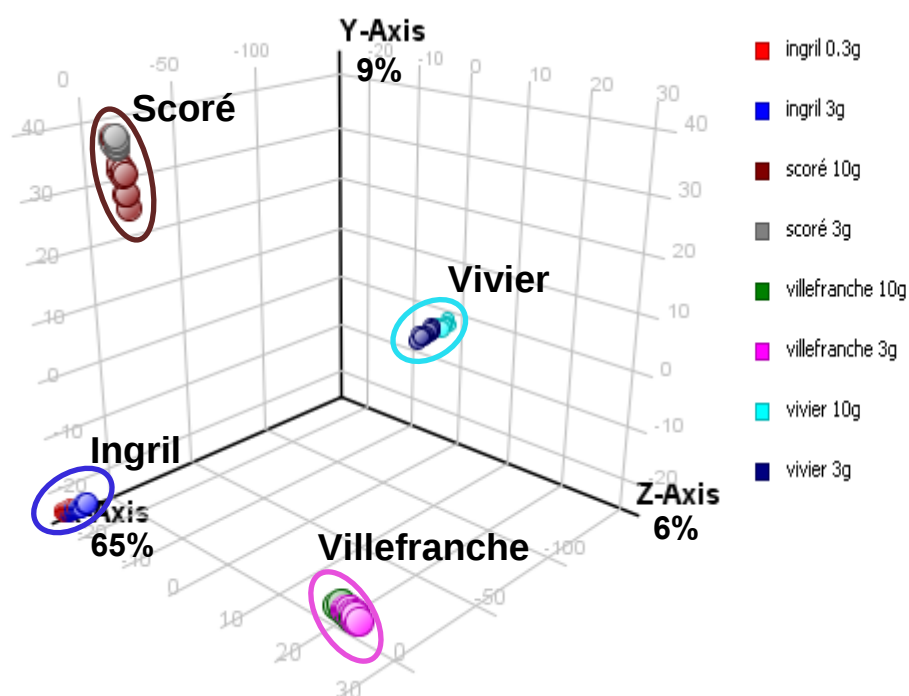


Figure II-3. PCA score plot of SPATT samples from different geographical locations: Ingril (0.3 g and 3 g) and, Villefranche, Scoré and Vivier (3 g and 10 g).

Thus, to explore the overall chemical profiles at different locations, MVDA was carried out on data from 3 g SPATTs. From the PCA on SPATTs from the same location, a clustering based on the deployment week was observed (Figure II-4). In addition, they separated sequentially from beginning to end of deployment, showing a typical pattern of a time course analyzed by PCA [41]. Thus, passive samplers from Vivier and Scoré were consecutively positioned in the PCA from Week 30 to week 33 and, from week 30 to week 37, respectively (Figure II-4a and II-4c). This could indicate the sequential appearance and/or disappearance of

features within each dataset as a function of time and reflects the evolution of the detected chemicals present in the water column of this location. Concerning the other sites, a similar pattern was observed (Figure II-4b and II-4d). However, this general pattern is less obvious in particular for W37-40 in the case of Ingril and, for W32-33 in the case of Villefranche. This could be explained by the larger number of samples being compared through PCA and could be visualized back when comparing only a limited number of weeks (Supporting Information Figure S3).

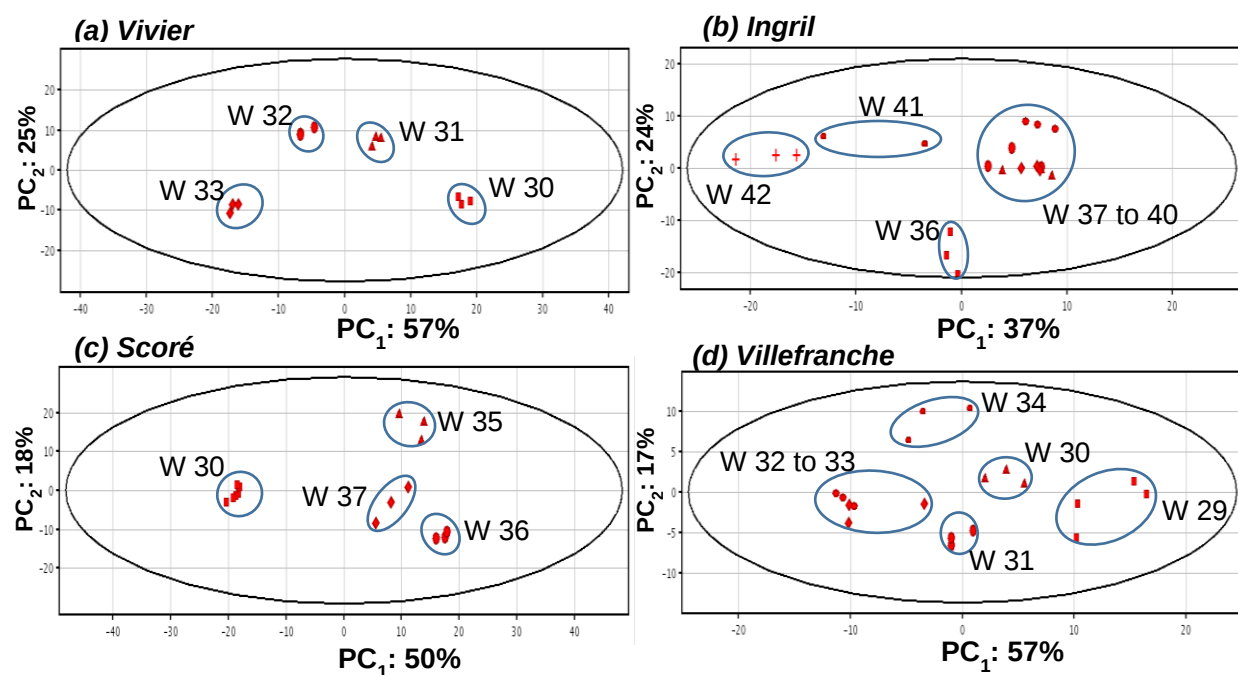


Figure II-4. PCA scores for 3 g SPATT samples from different deployment weeks (W) in 2014. (a) Vivier; (b) Ingril; (c) Scoré and (d) Villefranche.

Further investigations based on univariate data analysis were carried out to highlight specific features related to changes in chemical profiles between deployment weeks (Supporting Information Table S4). For one location, all weeks were compared to the first week of deployment. For one or two toxins for each site, trends observed in the untargeted and targeted analyses were compared. The variation between beginning and end of deployment followed the same tendency as with quantitative results. For example, DTX1 and PTX2 at Scoré were more concentrated in weeks 35 to 37 compared to week 30. Also, PTX2 at Ingril was more concentrated in weeks 37 to 42 compared to week 36 and, presence of PTX2 at Villefranche for

weeks 30 to 34 compared to week 29 increased and decreased. These trends from statistical data retreatment were consistent with targeted extraction as exemplified in Figures II-1 and II-2.

Furthermore, univariate analysis of SPATT extracts collected at Scoré allowed for highlighting 345 features characteristic of W30. Of these 345 features, 62 were tentatively identified using the DMNP (Supporting Information Table S5), and chemical formulae were generated for 203 other features. PTX2, DTX1 and traces of DTX2 were among the 62 features tentatively identified. PTX2 and DTX1 were confirmed thanks to the availability of standard solutions (using retention time and mass spectrum). Interestingly, among the other tentatively identified compounds was Goniodomin A (level 3 of identification) [42]. This toxin that can be produced by different dinoflagellate species (*Alexandrium molinatum* [43], *Alexandrium hiranoi* [44, 45], and had the similar but more pronounced trend throughout the deployment weeks as PTX2 *i.e.* more concentrated in weeks 35 to 37 compared to week 30 (Supporting Information Table S5). There were various regulation profiles for characteristic features throughout deployment weeks, with increase and decrease in comparison to week 30. These observations confirmed the hypothesis of a sequential appearance and/or disappearance of features within each dataset according to sampling time. These observations also demonstrated the ability to detect slight changes in chemical profiles of marine environments between weeks. Thus, temporal trends in profile change can clearly be detected using the non-targeted approach.

In this study, passive sampling has proven its usefulness for detection and quantification of toxins from both pelagic and benthic microalgae on one hand, and to obtain an overview of trends in chemical profiles of marine environments on the other. Part of the information from SPATT extracts is available *via* targeted analysis but thanks to untargeted analysis a general overview of the data is also available: the ability to differentiate between geographical locations as well as different deployment weeks. These temporal and spatial differentiations are useful information on the evolution of environmental systems at short- and long-term scales. Also, a number of differentiating features were tentatively identified, pointing towards the need for more studies on marine chemistry. Additionally, a larger experiment on one or several years at one location would be necessary for identification of biomarkers specific of a given marine environment or, specific of global change in chemical diversity in time.

Acknowledgments

This study was carried out under the COSELMAR project supported by Ifremer and Nantes University and co-funded by the Regional Council of the “Pays de la Loire”. We thank Agilent for their collaboration through the loan of the Agilent QToF mass spectrometer instrument. The authors would like to thank all the members of the Laboratory Phycotoxins at the Atlantic Centre of Ifremer for their help and advice during this study. We also thank Amélie Derrien of Ifremer Concarneau for help during SPATT deployment and the Total Foundation for funding part of this work through the LAGUNOTOX project. This study was facilitated by the French research network GdR PHYCOTOX (Ifremer – CNRS 3659).

References

- [1] G.M. Hallegraeff, A review of harmful algal blooms and their apparent global increase, *Phycologia*, 32 (1993) 79-99.
- [2] FAO/IOC/WHO, Report of the FAO/IOC/WHO ad hoc expert consultation on biotoxins in bivalve molluscs, Oslo, Norway, Sept. 26-30, 2004, in, 2005.
- [3] K.J. James, A.G. Bishop, R. Draisci, L. Palleschi, C. Marchiafava, E. Ferretti, M. Satake, T. Yasumoto, Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin-2 analogues from marine phytoplankton and shellfish, *Journal of Chromatography A*, 844 (1999) 53-65.
- [4] P. McCarron, W.A. Rourke, W. Hardstaff, B. Pooley, M.A. Quilliam, Identification of Pinnatoxins and Discovery of Their Fatty Acid Ester Metabolites in Mussels (*Mytilus edulis*) from Eastern Canada, *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (2012) 1437-1446.
- [5] M.A. Quilliam, N.W. Ross, Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins and metabolites in plankton and shellfish by ion-spray liquid chromatography mass spectrometry, in: A.P. Snyder (Ed.) *Symposium on Biochemical and Biotechnological Applications of Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, at the 209th National Meeting of the American-Chemical-Society, Anaheim, Ca, 1995, pp. 351-364.
- [6] K.J. James, M.D. Sierra, M. Lehané, A.B. Magdalena, A. Furey, Detection of five new hydroxyl analogues of azaspiracids in shellfish using multiple tandem mass spectrometry, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 41 (2003) 277-283.

- [7] P. McCarron, J. Kilcoyne, C.O. Miles, P. Hess, Formation of azaspiracids-3, -4, -6, and -9 via decarboxylation of carboxyazaspiracid metabolites from shellfish, *J. Agric. Food. Chem.*, 57 (2009) 160-169.
- [8] B. Berland, D. Grzebyk, B.A. Thomassin, Benthic dinoflagellates from the coral reef lagoon of Mayotte Island (S-W Indian Ocean); identification, toxicity and preliminary ecophysiological study, *Bulletin de la Societe de pathologie exotique* (1990), 85 (1992) 453-456.
- [9] M.A. Faust, Morphological details of 6 benthic species of *Prorocentrum* (Pyrrophyta) from a mangrove island, twin cays, Belize, including 2 new species *Journal of Phycology*, 26 (1990) 548-558.
- [10] A.I. Selwood, A.L. Wilkins, R. Munday, F. Shi, L.L. Rhodes, P.T. Holland, Portimine: a bioactive metabolite from the benthic dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*, *Tetrahedron Letters*, 54 (2013) 4705-4707.
- [11] L. MacKenzie, V. Beuzenberg, P. Holland, P. McNabb, A. Selwood, Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): a new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 44 (2004) 901-918.
- [12] E. Fux, R. Bire, P. Hess, Comparative accumulation and composition of lipophilic marine biotoxins in passive samplers and in mussels (*M. edulis*) on the West Coast of Ireland, *Harmful Algae*, 8 (2009) 523-537.
- [13] R.M. Kudela, Characterization and deployment of Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) resin for monitoring of microcystins in fresh and saltwater, *Harmful Algae*, 11 (2011) 117-125.
- [14] E. Fux, C. Marcaillou, F. Mondeguer, R. Bire, P. Hess, Field and mesocosm trials on passive sampling for the study of adsorption and desorption behaviour of lipophilic toxins with a focus on OA and DTX1, *Harmful Algae*, 7 (2008) 574-583.
- [15] M. McCarthy, F.N.A.M. van Pelt, V. Bane, J. O'Halloran, A. Furey, Application of passive (SPATT) and active sampling methods in the profiling and monitoring of marine biotoxins, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 89 (2014) 77-86.
- [16] T. Rundberget, E. Gustad, I.A. Samdal, M. Sandvik, C.O. Miles, A convenient and cost-effective method for monitoring marine algal toxins with passive samplers, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 53 (2009) 543-550.

- [17] J.Q. Lane, C.M. Roddam, G.W. Langlois, R.M. Kudela, Application of Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) for field detection of the hydrophilic phycotoxins domoic acid and saxitoxin in coastal California, *Limnology and Oceanography-Methods*, 8 (2010) 645-660.
- [18] L.A. MacKenzie, A.I. Selwood, P. McNabb, L. Rhodes, Benthic dinoflagellate toxins in two warm-temperate estuaries: Rangaunu and Parengarenga Harbours, Northland, New Zealand, *Harmful Algae*, 10 (2011) 559-566.
- [19] Z. Zendong, C. Herrenknecht, E. Abadie, C. Brissard, C. Tixier, F. Mondeguer, V. Sechet, Z. Amzil, P. Hess, Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 91 (2014) 57-68.
- [20] T. Rundberget, J.A. Aasen, A.I. Selwood, C.O. Miles, Pinnatoxins and spirolides in Norwegian blue mussels and seawater, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 58 (2011) 700-711.
- [21] A. Caillaud, P. de la Iglesia, E. Barber, H. Eixarch, N. Mohammad-Noor, T. Yasumoto, J. Diogène, Monitoring of dissolved ciguatoxin and maitotoxin using solid-phase adsorption toxin tracking devices: Application to *Gambierdiscus pacificus* in culture, *Harmful Algae*, 10 (2011) 433-446.
- [22] Z. Zendong, P. McCarron, C. Herrenknecht, M. Sibat, Z. Amzil, R.B. Cole, P. Hess, High resolution mass spectrometry for quantitative analysis and untargeted screening of algal toxins in mussels and passive samplers, *Journal of Chromatography A*, 1416 (2015) 10-21.
- [23] A. Gerssen, M.A. McElhinney, P.P.J. Mulder, R. Bire, P. Hess, J. de Boer, Solid phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 394 (2009) 1213-1226.
- [24] J. Kilcoyne, E. Fux, Strategies for the elimination of matrix effects in the liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of the lipophilic toxins okadaic acid and azaspiracid-1 in molluscan shellfish, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 7123-7130.
- [25] E. Fux, D. Rode, R. Bire, P. Hess, Approaches to the evaluation of matrix effects in the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis of three regulated lipophilic toxin

groups in mussel matrix (*Mytilus edulis*), Food Addit. Contam. Part A-Chem., 25 (2008) 1024-1032.

[26] J. Diogene, P. de la Iglesia, M. Fernandez, M. Campas, A. Caillaud, M. Garcia Altares, O. Carnicer, L. Solino, G. Gimenez, A. Casanova, Emerging marine toxins: Interaction between management & research for the survey of emerging toxins, Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology, 75 (2013) 205-205.

[27] J.G. Bundy, M.P. Davey, M.R. Viant, Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives, Metabolomics, 5 (2009) 3-21.

[28] M.R. Viant, Recent developments in environmental metabolomics, Molecular Biosystems, 4 (2008) 980-986.

[29] S. Huseby, M. Degerlund, A. Zingone, E. Hansen, Metabolic fingerprinting reveals differences between northern and southern strains of the cryptic diatom *Chaetoceros socialis*, European Journal of Phycology, 47 (2012) 480-489.

[30] N. Cachet, G. Genta-Jouve, J. Ivanisevic, P. Chevaldonne, F. Sinniger, G. Culioli, T. Perez, O.P. Thomas, Metabolomic profiling reveals deep chemical divergence between two morphotypes of the zoanthid *Parazoanthus axinellae*, Scientific Reports, 5 (2015).

[31] Z. Zendong, P. McCarron, C. Herrenknecht, M. Sibat, Z. Amzil, R.B. Cole, P. Hess, High resolution mass spectrometry for quantitative analysis and untargeted screening of algal toxins in mussels and passive samplers, Journal of Chromatography A.

[32] J.W. Blunt, M.H. Munro, Dictionary of Marine Natural Products, with CD-ROM, Chapman & Hall, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, London, New York, (2008).

[33] J.-L. Wolfender, G. Marti, A. Thomas, S. Bertrand, Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts, Journal of Chromatography A, 1382 (2015) 136-164.

[34] G. Pizarro, A. Morono, B. Paz, J.M. Franco, Y. Pazos, B. Reguera, Evaluation of passive samplers as a monitoring tool for early warning of dinophysis toxins in shellfish, Marine drugs, 11 (2013) 3823-3845.

[35] Y. Murakami, Y. Oshima, T. Yasumoto, Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum-lima*, Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 48 (1982) 69-72. Murakami, Y., Oshima, Y., Yasumoto, T., 1982.. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 48, 69-72.

- [36] L. Rhodes, K. Smith, A. Selwood, P. McNabb, R. Munday, S. Suda, S. Molenaar, G. Hallegraeff, Dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* identified as the causative organism of pinnatoxins in Australia, New Zealand and Japan, *Phycologia*, 50 (2011) 624-628.
- [37] P. Hess, E. Abadie, F. Herve, T. Berteaux, V. Sechet, R. Araoz, J. Molgo, A. Zakarian, M. Sibat, T. Rundberget, C.O. Miles, Z. Amzil, Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 75 (2013) 16-26.
- [38] A.D. Cembella, N.I. Lewis, M.A. Quilliam, The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins, *Phycologia*, 39 (2000) 67-74.
- [39] M. Falk, I.W. Burton, T.M. Hu, J.A. Walter, J.L.C. Wright, Assignment of the relative stereochemistry of the spirolides, macrocyclic toxins isolated from shellfish and from the cultured dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*, *Tetrahedron*, 57 (2001) 8659-8665.
- [40] T. Suzuki, L. Mackenzie, D. Stirling, J. Adamson, Pectenotoxin-2 seco acid: a toxin converted from pectenotoxin-2 by the New Zealand Greenshell mussel, *Perna canaliculus*, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 39 (2001) 507-514.
- [41] K.H. Soanes, J.C. Achenbach, I.W. Burton, J.P.M. Hui, S.L. Penny, T.K. Karakach, Molecular Characterization of Zebrafish Embryogenesis via DNA Microarrays and Multiplatform Time Course Metabolomics Studies, *Journal of Proteome Research*, 10 (2011) 5102-5117.
- [42] D.J. Creek, W.B. Dunn, O. Fiehn, J.L. Griffin, R.D. Hall, Z. Lei, R. Mistrik, S. Neumann, E.L. Schymanski, L.W. Sumner, R. Trengove, J.-L. Wolfender, Metabolite identification: are you sure? And how do your peers gauge your confidence?, *Metabolomics*, 10 (2014) 350-353.
- [43] M.H. Hsia, S.L. Morton, L.L. Smith, K.R. Beauchesne, K.M. Huncik, P.D.R. Moeller, Production of goniodomin A by the planktonic, chain-forming dinoflagellate *Alexandrium monilatum* (Howell) Balech isolated from the Gulf Coast of the United States, *Harmful Algae*, 5 (2006) 290-299.
- [44] M. Murakami, Y. Okita, H. Matsuda, T. Okino, K. Yamaguchi, From the dinoflagellate *Alexandrium hiranoi*, *Phytochemistry*, 48 (1998) 85-88.

[45] M. Murakami, K. Makabe, K. Yamaguchi, S. Konosu, M.R. Walchli, Goniodomin A, a novel polyether macrolide from the dinoflagellate *Goniodoma pseudogoniaulax* Tetrahedron Letters, 29 (1988) 1149-1152.

Supporting Information

Seawater memory: passive sampling for targeted screening of biotoxins and chemical differential profiling of French coastal areas

S1: Detailed source parameters for acquisition on the QToF system

Figure S1. Map of sampling sites: (a) France in Europe; (b) Atlantic Ocean sites: Concarneau Vivier and Scoré; Mediterranean Sea sites: (c) Ingril and (d) Villefranche.

Figure S2. Passive sampler deployment devices.

Table S1. Accurate mass and retention times (RT in min) of lipophilic toxins with indication on ionization mode.

Table S2. Lowest levels of toxins (ng $\pm$ RSD (%), n=3) detected with deployed SPATs containing different amounts of HP20 resin (0.3 g, 3 g and 10 g).

Table S3. Features specific of each location as determined from PCA loadings and tentative identification using the Dictionary of Marine Natural Products (DMNP), with 2 ppm tolerance and mass spectral accuracy.

Figure S3. PCA scores for 3 g-passive samplers deployed at Ingril in 2014 from week 37 to week 40.

Table S4. Monitoring of chemical profile evolution throughout the deployment weeks using PTX2 for Scoré, Villefranche and Ingril, OA for Vivier and DTX1 for Scoré. Fold change and regulation are issued from comparison between week 1 of deployment and the following deployment weeks. (w) stands for week.

Table S5. List of 65 out of 345 features characteristic of week 30 compared to weeks 35 to 37, at Scoré. Tentative identification was carried out using the Dictionary of Marine Natural Products (DMNP), with 2 ppm tolerance and mass spectral accuracy. Filtering parameter were *p-value* > 0.05 and *fold change* (FC) > 2.

MATERIAL AND METHODS

S1: Detailed source parameters for acquisition on the QToF system

The temperature of the Jet Stream Technologies™ source was set at 205°C with the drying gas and sheath gas flow-rate at 5 L/min and 12 L/min, respectively. The sheath gas temperature was 355°C. Other parameters were as follows: capillary voltage, 2000 V; fragmentor voltage, 200 V; skimmer voltage, 50 V; octopole 1 rf voltage, 400 V.

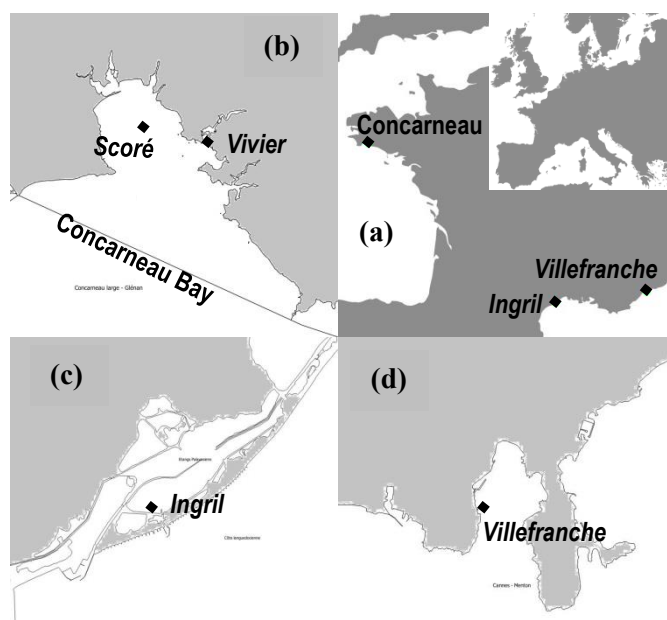


Figure S1. Map of sampling sites: (a) France in Europe; (b) Atlantic Ocean sites: Concarneau Vivier and Scoré; Mediterranean Sea sites: (c) Ingril and (d) Villefranche.



Figure S2. Passive sampler deployment devices.

Table S1. Accurate mass and retention times (RT in min) of lipophilic toxins with indication on ionization mode.

<i>Toxin</i>	<i>Detected ion</i>	<i>Accurate mass (m/z)</i>	<i>RT (min)</i>
13-desMe-C	[M+H] ⁺	692.4521	3.73
PnTX-G	[M+H] ⁺	694.4677	4.12
OA	[M-H] ⁻	803.4587	6.13
DTX2	[M-H] ⁻	803.4587	6.41
PTX2	[M+NH ₄] ⁺	876.5104	6.71
DTX1	[M-H] ⁻	817.4744	7.13

RESULTS AND DISCUSSION

Table S2. Lowest levels of toxins (ng/mL $\pm$ RSD (%), n=3) detected with deployed SPATTs containing different amounts of HP20 resin (0.3 g, 3 g and 10 g). *Nota bene*: all extracts (irrespective of resin weight) have been taken up in a final volume of 0.5 mL and 3 μ L were injected.

	Amount of resin (g)	Lowest detected concentrations (ng/mL final extract)				
		OA	DTX1	PTX2	PnTX-G	13-desMe-C
Ingril week 36	0.3	50.1 $\pm$ 16.9	47.1 $\pm$ 7.7	22.8 $\pm$ 9.4	4.1 $\pm$ 2.7	n.d.
	3	48.7 $\pm$ 7.1	38.4 $\pm$ 2.1	11.2 $\pm$ 2.0	1.0 $\pm$ 1.6	n.d.
Vivier week 33	3	17.7 $\pm$ 4.9	12.5 $\pm$ 4.5	7.1 $\pm$ 1.4	n.d.	3.0 $\pm$ 0.1
	10	32.8 $\pm$ 2.1	26.1 $\pm$ 5.1	11.5 $\pm$ 2.8	n.d.	4.0 $\pm$ 0.1
Instrument LoD (ng/mL)		5.29	5.11	3.75	0.34	0.27

n.d : not detected.

Table S3. Features specific of each location as determined from PCA loadings and tentative identification using the Dictionary of Marine Natural Products (DMNP), with 2 ppm mass tolerance.

	Compound Name	Mass	RT (min)	MFG or Db score (%)
Ingril	C ₃₁ H ₅₈ N ₄ O ₁₂	678.402	2.606	99.53
	C ₁₇ H ₃₂ N ₇ O	350.2647	5.509	84.13
	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₂	226.1678	1.695	98.97
	6-Heptyl-3-hexyl-4-hydroxy-2H - pyran-2-one	294.2196	6.016	99.92
	C ₂₉ H ₆₀ O ₉	552.4251	8.137	97.52
	C ₂₄ H ₄₂ N ₄ O ₃	434.3262	2.433	97.39
	4-Hydroxybenzaldehyde; Pentyl ether	175.0881	6.019	99.01
	C ₂₇ H ₃₂ N ₃ O ₄	462.2359	6.677	94.88
	C ₈ H ₁₈ O ₅	194.1153	8.215	87.16
	C ₁₆ H ₁₆ N O ₂	254.1147	5.144	84.63
Vivier	C ₃₈ H ₅₄ N ₄ S ₂	630.382	3.266	81.09
	C ₂₆ H ₅₆ N ₃ O ₁₃	618.3815	3.133	99.31
	C ₁₃ H ₂₉ N ₁₁ O ₄	403.243	3.460	77.5
	<none> + 3.4179995	762.4612	3.418	
	Fucose; ct-D-Pyranose-form, 2,3, 4-Tribenzyl	434.209	5.518	99.46
	C ₁₉ H ₃₄ N ₁₂ O ₃	478.287	3.205	96.13
	C ₂₉ H ₆₄ N ₆ O ₂ S ₂	592.4538	7.518	91.82
	<none> + 3.5390007	447.2689	3.539	

	<i>Compound Name</i>	<i>Mass</i>	<i>RT (min)</i>	<i>MFG or Db score (%)</i>
Score	C ₂₂ H ₄₄ N ₅ O ₉	522.3129	3.280	94.1
	<none> + 3.3499992	566.3384	3.350	
	C ₂₃ H ₃₄ N ₇ O	424.2837	6.510	94.23
	C ₁₃ H ₂₅ N O ₃	243.1832	4.088	92.59
	C ₂₈ H ₂₁ N ₃ O ₂	431.1638	5.278	76.5
	10-Methoxybenzimidazo[6,7, 1-def][1,6]naphthyridine	223.0745	2.330	99.96
	C ₂₀ H ₁₉ N ₉ O ₃	433.1608	5.275	80.22
	C ₁₅ H ₂₁ N ₉ O ₂ S	391.1545	3.603	76.27
	C ₁₅ H ₂₅ N ₄	261.2089	4.224	80.82
	4-Oxopentanoic acid; Nitrile	97.0529	4.560	99.93
Villefranche	<none> + 2.3149996 :480	680.21	2.315	
	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₇	682.2122	2.318	89.53
	C ₃₄ H ₆₄ N ₉ O ₅	678.5041	2.799	98.99
	C ₁₅ H ₄₄ N ₁₄ O ₅ S	532.3326	3.027	87.95
	<none> + 2.2709994	264.2209	2.271	
	C ₂₅ H ₄₆ N ₄ O ₉	546.3245	2.381	97.53
	<none> + 3.4179995 :494	504.6731	3.418	
	<none> + 3.5339987	583.0056	3.534	
	C ₃₁ H ₁₃ N ₁₄ O ₉	725.0988	3.677	89.93
	<none> + 3.592001 :495	627.0314	3.592	
	<none> + 3.657999	706.1382	3.658	
	<none> + 2.132	546.4119	2.132	

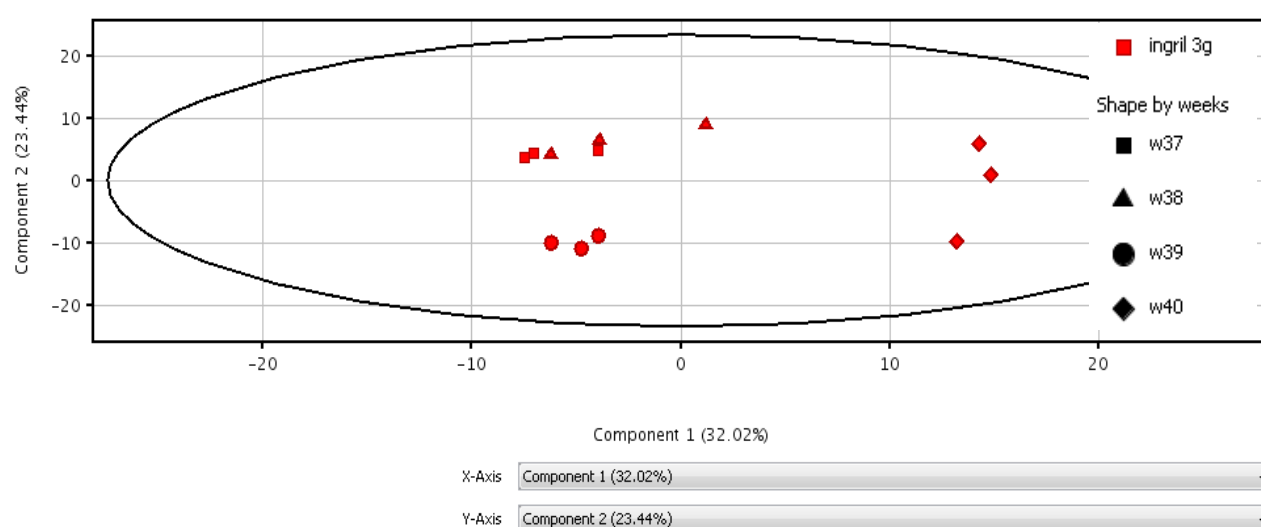


Figure S3. PCA scores for 3 g-passive samplers deployed at Ingril in 2014 from week 37 to week 40.

Table S4. Monitoring of chemical profile evolution throughout the deployment weeks using PTX2 for Scoré, Villefranche and Ingril, OA for Vivier and DTX1 for Scoré. Fold change and regulation are issued from comparison between week 1 of deployment and the following deployment weeks. (w) stands for week.

		Vivier OA	Scoré DTX1	Scoré PTX2	Villefranche PTX2	Ingril PTX2
w2 vs w1	<i>Fold change</i>	1.113	3.17	5.89	1.51	2.62
	<i>Regulation</i>	down	up	up	down	up
w3 vs w1	<i>Fold change</i>	1.108	3.24	6	1.16	2.17
	<i>Regulation</i>	down	up	up	up	up
w4 vs w1	<i>Fold change</i>	2.17	2.04	4.79	1.72	3.63
	<i>Regulation</i>	down	up	up	down	up
w5 vs w1	<i>Fold change</i>				1.17	2.95
	<i>Regulation</i>				down	up
w6 vs w1	<i>Fold change</i>				2.04	9.02
	<i>Regulation</i>				down	up
w7 vs w1	<i>Fold change</i>					110
	<i>Regulation</i>					up

Table S5. List of 65 out of 345 features characteristic of week 30 compared to weeks 35 to 37, at Scoré. Tentative identification was carried out using the Dictionary of Marine Natural Products (DMNP), with 2 ppm tolerance and mass spectral accuracy. Filtering parameter were p-value > 0.05 and fold change (FC) > 2.

Compound	W35 vs W30		W36 vs W30		W37 vs W30	
	FC	Regulation	FC	Regulation	FC	Regulation
Amphiasterin C2	2351126	up	2364468	up	13770	up
Goniodomin A	405466	up	255103	up	215101	up
2-Amino-15-methyl-1,3,4- hexadecanetriol	7252.61	up	6332.19	up	363.22	up
Chabrolonaphthoquinone B	22.66	up	41.11	up	23.69	up
7,11-Dihydroxy-16-oxo-17- spongianal; (713,1113)-form, Di-Ac	19.07	up	15.99	up	7.10	up
3-Hydroxy-13-apo-3-caroten-13- one; (3R ,6R)-form	7.50	up	8.89	up	6.48	up
17,20-Epoxy-23-methylergostane- 3,22,25-triol; (3ct,5ct,1713,20S ,22 R ,23S)-form, 22,25-Di-Ac	7.40	up	8.13	up	6.23	up
9,11-Dihydro-22,25-oxido-11- oxoholothurinogenin	6.55	up	5.08	up	3.02	up
Pectenotoxin 1; 43-Deoxy + 7.2949986	5.90	up	6.01	up	4.79	up
Cochlioquinone A; 8-Epimer, 11-deoxy, 20-ketone, O -de-Ac	5.71	up	4.69	up	3.92	up

	W35 vs W30		W36 vs W30		W37 vs W30	
3-Hydroxy-13-apo-3-caroten-13-one; (3R,6R)-form + 4.7009997	5.65	up	6.04	up	6.82	up
14,15-Dihydroxy-1,2-dinor-6,10- phytadien-3-one; (6E,10E,14R)- form + 7.314001	4.66	up	1.54	up	2.19	up
Xestamine D	4.03	up	2.28	up	1.86	up
Ascosalipyrrolidinone B	3.57	up	3.86	up	2.35	up
26,27-Dinor-3-oxoergosta-1,4,22- trien-28-oic acid	3.36	up	1.81	up	1.37	up
Okadaic acid; Me ester=DTX1	3.17	up	3.24	up	2.20	up
Venustin; (3E,6S,7S,9Z,12Z)- form	3.11	up	1.99	up	1.88	up
2-Hydroxy-6,12,15-octadecatrien- 8-ynoic acid	3.09	up	3.11	up	3.13	up
12-Hydroxy-9-oxo-5,7,10,14- prostatetraenoic acid; (5E,7E,12Z,14Z)-form, Ac, Me ester	3.00	up	2.22	up	1.80	up
3,7,12(18)-Dolabellatrien-13-one; (3E,7E)-form	2.72	up	2.75	up	2.61	up
Pectenotoxin 1; 43-Deoxy = PTX2	2.57	up	1.87	up	1.05	up
5,10-Dihydroxy-1,3,5,7,10,12,14- amphilectaheptaen-9-one	2.54	up	1.04	up	1.83	up
14,15-Dihydroxy-1,2-dinor-6,10- phytadien-3-one; (6E,10E,14R)- form	2.50	up	3.20	up	1.42	up
Glanvillic acid A	2.42	up	2.51	up	1.55	up
Hemicalyculin A	2.37	up	3.40	up	1.95	up
Stigmasta-4,22-diene-3,6,8,15, 16,26-hexol; (3i3,63,15ct,16i3,22E,24R,25S)-form	2.34	up	1.63	up	1.17	up
4-Hydroxybenzaldehyde; Heptyl ether	2.30	up	1.96	up	2.50	up
12-Hydroxy-25-nor-15,17- scalaradien-24-al; 12ct-form	2.29	up	1.86	up	1.15	up
2-Aminophenol; N -Me, N - benzoyl	2.14	up	1.26	up	2.02	up
2,3,5,11,14,20,22- Heptahydroxycholest-7-en-6-one; (213,313,513,11ct,20R,22R)-form	1.92	up	2.51	up	1.98	up
19,20-Dichloro-1,9,6,7- diepoxy-14-hydroxy-10,12-xenicadien-17,18-olide	1.84	up	4.23	up	4.02	up
3,4-Dihydro-7,8-dihydroxy-3,5- dimethyl-1H -2-benzopyran-1-one; (?) -form	1.68	up	1.81	up	2.10	up
2-Amino-9-methyl-4,8- octadecadiene-1,3-diol; (2S,3R,4E,8E)-form + 5.4639993	1.66	up	7.85	up	4.53	up
Ergost-5-ene-3,25,26-triol	1.66	up	3.26	up	2.97	up
2-Amino-9-methyl-4,8- octadecadiene-1,3-diol; (2S,3R,4E,8E)-form	1.65	up	7.79	up	4.50	up
Cholest-4-ene-3,6,8,15,24- pentol; (313,6a,1513,24S)-form, 3-O -3-D-Xylopyranoside, 24- sulfate	1.64	up	2.18	up	1.51	up
Cytochalasin E; 4'-Hydroxy, 6, 7-deepoxy, 6,7-didehydro	1.61	up	2.24	up	1.27	up
5,8-Epidioxyergosta-6,22-dien-3- ol; (313,5ct,8x,22E,24R)-form, 3-O -3-D-Glucopyranoside	1.26	up	2.54	up	2.22	up
6-Bromo-5,9,13-docosatrienoic acid	3.05	up	1.49	up	-1.39	down
2,4-Octadien-1-amine; (E,E)-form, N -(2R -Hydroxyheptyl)	1.84	up	6.25	up	-2.02	down
18,20:22,25-Diepoxy-24- methylfurostane-3,11,18-triol	104.98	up	-1114	down	47.83	up
Uric acid; 1-Me, 3-Ph	7.23	up	-1235	down	2.99	up
12-Hydroxy-25-nor-15,17- scalaradien-24-al; 12ct-form, Ac	4.38	up	-1.16	down	-2.80	down
Contrunculin B	1.95	up	-29.63	down	-37791	down
Crambescin A*; Lower homologue (n = 4)	1.13	up	-1.01	down	-2.99	down
1,3,5-Cadinatriene; (7R,10S)- form, 3-Methoxy	1.06	up	-1.18	down	-2.05	down
10-Octadecenoic acid; (E)- form, Amide	-1.14	down	-1859	down	-1.11	down

	W35 vs W30		W36 vs W30		W37 vs W30	
Bufotenine; N b-Me, inner salt, O -sulfate	-1.38	down	-2.72	down	-1.26	down
Malyngamide H	-1.98	down	-2.12	down	-1.88	down
Theopederin E	-1.99	down	-3.57	down	-2.62	down
7,12-Epoxy-1(10)-nardosinene-2, 12-diol; (2ct,413,513,6a,713,1113,12ct)-form, 12-Me ether	-2.36	down	-1.62	down	-1.98	down
1-Vinyl-/3-carboline	-2.39	down	-4.19	down	-1.81	down
Cacoxanthene	-2.73	down	-2020	down	-67105	down
2-Dodecenoic acid; (E)-form, Et ester	-5.84	down	-6.11	down	-9.77	down
5-Hydroxy-2-methyl-4H-1- benzopyran-4-one	-22.34	down	-12390	down	-12390	down
3-Ethyl-4-(2-ethyl-4-methyl-6- phenyl-1,3,5- hexatrienyl)dihydro- 5-methyl-2(3H)-furanone	-3057	down	-2.70	down	-3057	down
Hexadecanoic acid; Dimethylamide	-12858	down	-531.17	down	-1.40	down
2-Amino-8-benzoyl-6-hydroxy- 3H -phenoxazin-3-one	-13053	down	-13053	down	-13053	down
Okadaic acid null = DTX2	-1.00	down	-1.00	down	1481.09	up
7-Ethyl-5-methyl-4,8-undecadien- 3-one; (4E ,7?,8E)-form	-3269	down	-1410	down	1.12	up
Cycloart-23-ene-3,25-diol; (3i, 23E)-form, 3-O -[13-D- Glucopyranosyl-(1↻*4)-3-Dglucopyranoside]	-1.06	down	3.46	up	1.58	up
Glycerol 1-alkyl ethers; Glycerol 1-(2R -methoxyhexadecyl) ether	-2290	down	1.82	up	2.23	up

III. Determination of the concentration of dissolved lipophilic algal toxins in seawater using pre-concentration with HP-20 resin and LC-MS/MS detection

Proceedings de la conférence “16th International Conference on Harmful Algae” Z. Zendong, E. Abadie, A. Mazzeo, F. Hervé, C. Herrenknecht, Z. Amzil, C. Dell’Aversano, P. Hess.

III.1.RESUME

Les toxines algales peuvent être détectées pendant les efflorescences de microalgues grâce à l’analyse directe de l’eau ou à l’échantillonnage passif. La connaissance de la quantité totale de toxines dissoutes est importante pour plusieurs raisons : (i) comprendre le rôle écologique des toxines d’algues, (ii) modéliser l’accumulation des toxines par les organismes aquatiques et (iii) estimer le risque potentiel que constituent les toxines dans l’eau de mer filtrée utilisée en l’aquaculture et dans les stations de dessalement d’eau de mer.

Des aliquotes de 30 L d’eau de mer ont été collectés et pré-concentrés par échantillonnage passif sur résine Diaion® HP-20, pendant une durée de 48 h. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem a été utilisée pour détecter les toxines lipophiles dans les extraits de résine HP-20. Les toxines lipophiles dissoutes dans l’eau de mer ont été détectées à des niveaux de concentration inférieurs au ppb (part per billion ou partie par milliard). La combinaison de l’échantillonnage passif à l’analyse CL-SM/SM des toxines dissoutes pourrait donc permettre, dans des études à venir, une meilleure modélisation des processus d’adsorption des toxines sur les échantillonneurs passifs.

Dans cette étude, les niveaux de concentration de l’acide okadaïque (AO), de la dinophysistoxine 1 (DTX1), de la pecténotoxine 2 (PTX2) et de la pinnatoxine G (PnTX-G) dans l’eau de mer, à l’étang d’Ingril, ont été déterminés. L’AO était présent en forte concentration (environ 8.6 ng.L⁻¹), suivi par la DTX1 (environ 1.4 ng.L⁻¹ et la PTX2 et la PnTX-G (de 0.2 à 0.3 ng.L⁻¹). A notre connaissance, cette étude est la première rapportant l’analyse directe de toxines lipophiles produites par des dinoflagellés dans la colonne d’eau.

Cependant, cette étude a été réalisée dans un étang et une étude similaire dans des environnements marins ouverts serait utile pour corroborer la présente étude.

III.2.ABSTRACT and KEYWORDS

Algal toxins are metabolites that can accumulate in fish or shellfish and render these foodstuffs unfit for human consumption. These toxins, released into seawater during algal occurrences, can be monitored through direct analysis of seawater or through passive sampling. Knowledge of the total and dissolved toxin contents is important for different reasons: (i) understanding the ecological role of toxic algae, (ii) modelling of toxin uptake by aquatic organisms and (iii) estimating the risk of toxins in filtered seawater for land-based aquaculture or desalination plants.

Seawater portions of 30 L were collected and pre-concentrated by passive sampling with HP-20 resin over a 48 h period. Detection of lipophilic toxins in the extracts of the resin was carried out using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. This combination allowed for the detection of sub-ppb levels of dissolved toxins and will permit future studies to more accurately model the adsorption behaviour of toxins by passive sampling devices.

In particular, we determined the levels of okadaic acid (OA), dinophysistoxin-1 (DTX1), pectenotoxin-2 (PTX2) and pinnatoxin G (PnTX-G) in seawater from Ingril lagoon. Okadaic acid was the most concentrated compound with ca. 8.6 ng L⁻¹, followed by DTX1 with ca. 1.4 ng L⁻¹, and both PTX2 and PnTX-G at ca. 0.2-0.3 ng L⁻¹. To our knowledge this is the first direct analysis of lipophilic dinoflagellate toxins in seawater. However, these concentrations were observed in a lagoon and should be confirmed in open coastal waters.

Keywords: SPATT, passive sampling, marine biotoxins, benthic microalgae, dissolved toxins

III.3.INTRODUCTION

A decade ago, passive sampling has been introduced as a tool to monitor algal toxins [1]. Since then, a number of field studies have shown the use of the technique to trace an array of algal or cyanobacterial toxins in algal cultures or marine and coastal environments, including hydrophilic toxins such as saxitoxins and domoic acid, and lipophilic toxins, e.g. azaspiracids, brevetoxins, ciguatoxins, microcystins and okadaic acid, [2-9].

In a previous study [10], we have shown the capability of passive samplers to capture toxins from both pelagic and benthic or epiphytic microalgae (Fig. III-1). In particular, PnTX-G and DTX1 had been accumulated in significant amounts, indicating the presence of both *Vulcanodinium rugosum* and *Prorocentrum lima* in Ingril lagoon.

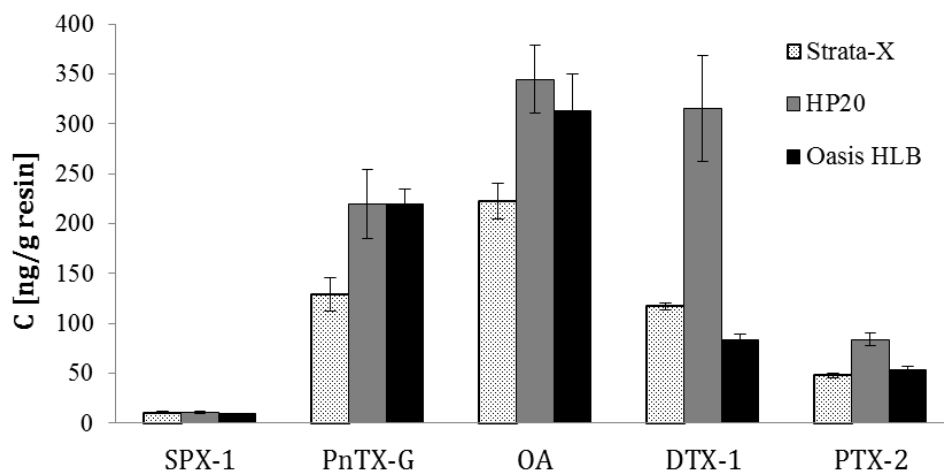


Figure III-1. Accumulation of SPX1, PnTX-G, OA, DTX1 and PTX2 on Oasis HLB, Strata-X and HP-20 SPATTs exposed in July at Ingril Lagoon on a weekly basis (expressed as [ng/g dry resin]).

However, very little is known about the quantitative relationship of the levels of dissolved toxins in seawater and either the levels in shellfish or the levels in the passive samplers. Only few studies have been able to determine the concentrations of dissolved toxins in the field [11-13]. Especially, no studies were known to us that have determined absolute concentrations of lipophilic toxins in seawater. Thus, we designed an experiment to quantitatively determine the concentrations of lipophilic toxins produced by dinoflagellates in seawater. Our approach consisted in the collection of large volumes of filtered seawater and concentration of the toxins on a lipophilic resin (HP-20), followed by analysis using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

III.4.MATERIAL and METHODS

III.4.1. Seawater sampling in Ingril Lagoon

Seawater samples (nine portions of 30 L) were collected from Ingril Lagoon on 2 September 2014. Raw seawater was pumped over two sieves in series of 125 μm and 20 μm phytoplankton mesh using a submersible electric galley pump (GP1352 13 L Whale, USA), operated with FD-7011 batteries (12 V, Lohuis, The Netherlands) into 30 L carboys (polyethylene). A total of nine carboys were filled in this way on the shore. Once in the laboratory, one carboy of filtered seawater was kept separately, while the other eight were combined into a 90 L portion and a 150 L portion. Portions of HP-20 resin (3 g) were prepared in embroidery frames and activated as previously described [8, 10]. Two, four and six portions of resin were placed into the 30 L, 90 L and 150 L portions of seawater, respectively. The 30 L portion of seawater was stirred using a stir bar with a magnetic stirrer (VCM-C7, VWR, France), while seawater in the two larger containers was circulated using peristaltic pumps equipped with 15 mm flexible plastic tubing (7549-40 Masterflex Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, Illinois, USA). Stirring or circulation of seawater was maintained for 48 h before replacing the resin portions with the same number of fresh frames which were deployed for a further 48 h.

III.4.2. Extraction and LC-MS/MS analysis of resins

The portions of HP-20 resin were extracted as previously described [8, 10]. All 3 g- portions were extracted on separate SPE cartridges for ease of handling. Subsequently, eluates were combined into single fractions for each of the three seawater portions, keeping the extracts from the first and second deployment separate. Thus a total of six final extracts were obtained for LC-MS/MS analysis (three different volumes of seawater each consecutively extracted twice). Final extract volume was kept to 1 mL of 50% aqueous methanol for all six fractions.

Analysis was performed on a UHPLC-system (UFLC, Shimadzu) coupled to a triple-quadrupole mass spectrometer (4000 Qtrap, ABSciex, Les Ulis, France). Chromatography was performed with a Hyperclone MOS C8 column (50 $\times$ 2.0 mm, 3 μm) with a C8 guard column (4 $\times$ 2.0 mm, 3 μm , Phenomenex). A binary mobile phase was used, phase A (100% aqueous) and phase B (95% aqueous acetonitrile), both containing 2 mM ammonium formate and 50 mM formic acid. The flow rate was 0.2 mL min⁻¹ and injection volume was 5 μL . The column and sample temperatures were 25°C and 4°C, respectively.

Two different gradients were employed, one for the negative mode (to analyse OA, DTX1 and dinophysistoxin-2 (DTX2)) starting with 30% B, rising to 95% B over 8 min, held for 2 min, then decreased to 30% B in 0.5 min and held for 4.5 min to equilibrate the system; and a second gradient for the positive mode (for PTX2, 13-desmethyl spirolide C, PnTX-G and pinnatoxin A (PnTX-A)) starting with 30% B, rising to 95% B over 2.5 min, held for 5 min, then decreased to 30% B in 0.1 min and held for 2.5 min to equilibrate the system.

Analytes were detected by negative or positive ion mode using multiple reaction monitoring (MRM). The following negative transitions (precursor ion→product ion) were used for quantification and confirmation (confirmatory ions shown in parentheses): OA and DTX2: m/z 803.4→255.1 (803.4→113.1); DTX1: m/z 817.5→254.9 (817.5→112.9). Positive ionization transitions were as follows, PTX2: m/z 876.6→823.5 (876.6→805.6); 13-desmethyl spirolide C m/z 692.6→164.2 (692.6→444.3); PnTX-G m/z 694.4→164.1 (694.4→458.3); PnTX-A m/z 712.4→164.1 (712.4→458.3).

PnTX-A and -G were quantified against a well characterised standard of PnTX-G from NRCC (Halifax, CA), assuming that PnTX-A had the same response factor as PnTX-G. All other toxins were quantified against certified calibrants (NRCC, Canada).

The ESI interface was operated using the following parameters, in negative mode: curtain gas 20 psi, temperature: 550°C, gas1: 40 psi; gas2: 50 psi, ion spray voltage: -4500 V; in positive mode: curtain gas: 30 psi, temperature: 450°C, gas1: 50 psi; gas2: 50 psi, ion spray voltage: 5500 V.

III.5.RESULTS and DISCUSSION

Four toxins were quantifiable in at least one of the portions of seawater: OA, DTX1, PTX2 and PnTX-G. Traces of 13-desmethyl spirolide C were also detected. This profile is coherent with our previous results obtained with passive sampling directly in this lagoon [10]. Okadaic acid was the most concentrated toxin, with a maximum of ca. 6.9 ng L⁻¹ determined in the first extraction (S1-30L) of the 30 L portion (Table III-1). The second extraction (S2, Table III-1) yielded typically around 20% of the cumulative total for all toxins but DTX1, for which slightly higher proportions were detected in the second extraction. The other toxins were less abundant but all were above limit of quantification (LoQ), except PTX2 in the second extraction of the two larger seawater portions. The highest LoQs were those for OA and DTX1, *i.e.* both ca. 5 ng mL⁻¹ of injected solution (or ca. 0.2 ng L⁻¹ seawater), and the

lowest LoQ was the one for PnTX-G, *i.e.* 0.5 ng mL⁻¹ injected solution (or ca. 0.02 ng L⁻¹ seawater).

The concentrations of all of the toxins were lower in the larger water portions, typically by ca. 50%, than those in the 30 L portion. We believe that this is due to an artefact of adsorption of the dissolved toxins to the container wall of the polyethylene carboys, and subsequent loss when the 30 L portions were combined into the larger containers of 90 and 150 L, respectively. The fact that both the 90 L and the 150 L portion yielded the same toxin concentration also suggests that container adsorption may be a dominant factor in the losses observed.

Therefore, future exercises should attempt extraction of the water portions directly in the sampling container, as was done with the 30 L portion in this experiment. Seawater collection in transportable containers of 20 to 30 L is practical and as several portions were deployed in each of the containers anyhow, and extracted separately to pre-concentrate the toxins from seawater, such a procedure would not constitute a major obstacle.

Table III-1. Concentrations of toxins in seawater of Ingril Lagoon, September 2nd 2014 (in [ng L⁻¹ of seawater]); S1-volume refers to the seawater concentration as determined by the first resin portion (T₀ to 48 h), S2-volume refers to the seawater concentration as determined by the second resin portion (48 h – 96 h); n.d. = not detected.

Sample	OA	DTX1	PTX2	PnTX-G
S1-30L	6.9	1.0	0.2	0.2
S1-90L	3.5	0.7	0.1	0.1
S1-150L	3.5	0.9	0.1	0.1
S2-30L	1.7	0.4	0.1	0.05
S2-90L	1.1	0.5	<i>n.d</i>	0.02
S2-150L	0.9	0.5	<i>n.d</i>	0.02
Total-30L	8.6	1.4	0.3	0.25
Total-90L	4.6	1.2	0.1	0.12
Total-150L	4.4	1.4	0.1	0.12

The fact that 20% of the toxins were still recovered in the second extraction suggests that both adsorption dynamics and kinetics may play a significant role for this experimental design. This is consistent with the observations mentioned above for the losses in transferring the seawater from several 30 L carboys to larger containers. As previously shown, salinity

also appears to affect adsorption kinetics of lipophilic toxins on HP-20 resin [14]. Seawater salinity at Ingril Lagoon during the present study was quite elevated (ca. 40). Therefore, future studies should also take this factor into consideration.

This experiment has overcome the typical limitations of classical solid-phase extraction (SPE) of seawater which is known to suffer from break-through phenomena for volumes greater than 1 L.

Overall, these results are encouraging to apply a similar design to the analysis of coastal seawater from open bays, since the limits of quantitation were surpassed by ca. 10 to 15-fold in the first extraction, even for the smallest volume of seawater used here (30 L).

Acknowledgements

This study was carried out under the COSELMAR-project led by Ifremer and Nantes University and funded by the Regional Council of the “Pays de la Loire”. The visit of AM at Ifremer was funded by Programme STAR Linea 1, financially supported by UniNA and Compagnia di San Paolo (VALTOX project n° Napoli_call2013_08). The authors would like to thank all the members of the Phycotoxins laboratory at the Atlantic Centre of Ifremer for their help and advice during this study.

References

- [1] L. MacKenzie, V. Beuzenberg, P. Holland, P. McNabb, A. Selwood, Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): a new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves, *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology, 44 (2004) 901-918.
- [2] D. Shea, P. Tester, J. Cohen, S. Kibler, S. Varnam, Accumulation of brevetoxins by passive sampling devices, *African Journal of Marine Science*, 28 (2006) 379-381.
- [3] L.A. Stobo, J.P.C.L. Lacaze, A.C. Scott, J. Petrie, E.A. Turrell, Surveillance of algal toxins in shellfish from Scottish waters, *Toxicon*, 51 (2008) 635-648.
- [4] E. Fux, S. Gonzalez-Gil, M. Lunven, P. Gentien, P. Hess, Production of diarrhetic shellfish poisoning toxins and pectenotoxins at depths within and below the euphotic zone, *Toxicon*, 56 (2010) 1487-1496.
- [5] J.Q. Lane, C.M. Roddam, G.W. Langlois, R.M. Kudela, Application of Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) for field detection of the hydrophilic phycotoxins

domoic acid and saxitoxin in coastal California, *Limnology and Oceanography-Methods*, 8 (2010) 645-660.

[6] R.M. Kudela, Characterization and deployment of Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) resin for monitoring of microcystins in fresh and saltwater, *Harmful Algae*, 11 (2011) 117-125.

[7] E. Fux, C. Marcaillou, F. Mondeguer, R. Bire, P. Hess, Field and mesocosm trials on passive sampling for the study of adsorption and desorption behaviour of lipophilic toxins with a focus on OA and DTX1, *Harmful Algae*, 7 (2008) 574-583.

[8] E. Fux, R. Bire, P. Hess, Comparative accumulation and composition of lipophilic marine biotoxins in passive samplers and in mussels (*M. edulis*) on the West Coast of Ireland, *Harmful Algae*, 8 (2009) 523-537.

[9] A. Caillaud, P. de la Iglesia, E. Barber, H. Eixarch, N. Mohammad-Noor, T. Yasumoto, J. Diogène, Monitoring of dissolved ciguatoxin and maitotoxin using solid-phase adsorption toxin tracking devices: Application to *Gambierdiscus pacificus* in culture, *Harmful Algae*, 10 (2011) 433-446.

[10] Z. Zendong, C. Herrenknecht, E. Abadie, C. Brissard, C. Tixier, F. Mondeguer, V. Sechet, Z. Amzil, P. Hess, Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 91 (2014) 57-68.

[11] K.A. Lefebvre, B.D. Bill, A. Erickson, K.A. Baugh, L. O'Rourke, P.R. Costa, S. Nance, V.L. Trainer, Characterization of intracellular and extracellular saxitoxin levels in both field and cultured *Alexandrium* spp. samples from Sequim Bay, Washington, *Mar. Drugs*, 6 (2008) 103-116.

[12] V.L. Trainer, M.L. Wells, W.P. Cochlan, C.G. Trick, B.D. Bill, K.A. Baugh, B.F. Beall, J. Herndon, N. Lundholm, An ecological study of a massive bloom of toxigenic *Pseudo-nitzschia cuspidata* off the Washington State coast, *Limnol. Oceanogr.*, 54 (2009) 1461-1474.

[13] J.D. Liefer, A. Robertson, H.L. MacIntyre, W.L. Smith, C.P. Dorsey, Characterization of a toxic *Pseudo-nitzschia* spp. bloom in the Northern Gulf of Mexico associated with domoic acid accumulation in fish, *Harmful Algae*, 26 (2013) 20-32.

[14] L. Fan, G. Sun, J. Qiu, Q. Ma, P. Hess, A. Li, Effect of seawater salinity on pore-size distribution on a poly(styrene)-based HP20 resin and its adsorption of diarrhetic shellfish toxins, *Journal of Chromatography A*, 1373 (2014) 1-8.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les mollusques bivalves filtreurs sont capables de bio-accumuler les toxines produites par certaines microalgues. Cette accumulation peut provoquer une intoxication humaine lorsque les concentrations en toxines atteignent un certain seuil dans les coquillages. La protection des consommateurs de coquillages passe donc par la surveillance de leur salubrité. C'est ainsi que de nombreux pays ont mis en place des programmes de surveillance du phytoplancton toxique présent dans l'eau de mer mais aussi de détermination des concentrations en toxines dans les coquillages, et que des réglementations fixant les seuils réglementaires en toxines ont été adoptées. Le test souris, initialement proposé comme méthode de référence pour la détection des toxines lipophiles, a récemment, compte tenu de la controverse qui l'entoure, été remplacé par l'analyse chimique par LC-MS/MS. L'analyse ciblée par LC-MS/MS, généralement utilisée dans la majorité des programmes de surveillance, ne permet, comme son nom l'indique, « de trouver que ce que l'on cherche ». Cependant, compte tenu des changements climatiques, de l'eutrophisation de l'eau, de l'impact des eaux de ballast des navires sur les environnements marins, il devient de plus en plus compliqué de prédire quelles toxines seront présentes ou apparaîtront, et dans quels environnements marins. Ces « nouvelles » menaces, regroupées sous le terme de « toxines émergentes » constituent un enjeu tout aussi important pour la protection des consommateurs.

C'est dans ce contexte que cette thèse comportait trois objectifs principaux : (i) mettre au point l'échantillonnage passif afin de le proposer comme outil alternatif et/ou complémentaire aux méthodes traditionnelles de surveillance et de vigilance pour la salubrité des produits de la mer; (ii) développer des méthodes d'analyse LC-LRMS et LC-HRMS permettant d'élargir le spectre des toxines connues, détectables simultanément avec une méthode d'analyse unique et les appliquer au criblage des phycotoxines dans des échantillons environnementaux; (iii) utiliser la spectrométrie de masse haute résolution en approche non-ciblée pour le criblage de toxines émergentes, ou encore inconnues, dans des échantillons réels (échantillonneurs passifs et moules). Les travaux réalisés pour répondre à ces trois objectifs ont été développés dans les chapitres 1, 2 et 3 de ce manuscrit.

Mise au point de l'échantillonnage passif

Les toxines d'intérêt pour ce sujet de thèse ont des propriétés physico-chimiques très différentes. Dans l'optique de mettre au point l'échantillonnage passif de ces toxines, nous avons tout d'abord comparé l'affinité de différentes phases, utilisées tout d'abord en mode SPE, pour le plus grand nombre de toxines étudiées. Les résines Oasis HLB, Strata-X et

HP-20 ont ainsi été sélectionnées puis testées en laboratoire, comme phases constitutives d'échantillonneurs passifs, en les plongeant dans de l'eau de mer dopée, de même que les membranes LDPE et PDMS. Les résultats obtenus ont permis de montrer que, bien que les résines HP-20 et Strata-X permettent d'obtenir des rendements d'adsorption et de récupération légèrement meilleurs que la résine Oasis HLB, on pouvait cependant sélectionner les SPATTs contenant les trois phases pour les essais terrains. Par ailleurs la membrane PDMS s'est avérée plus performante que la membrane LDPE pour l'accumulation des toxines, mais les rendements de récupération des toxines avec les membranes étaient nettement inférieurs à ceux obtenus pour les résines Strata-X, Oasis HLB et HP-20.

Nous avons donc, par ce développement, élargi la gamme des adsorbants utilisables pour l'échantillonnage passif, établissant par ailleurs, pour la première fois, la possibilité d'utiliser les résines Strata-X et Oasis HLB pour l'échantillonnage passif des toxines lipophiles de microalgues. Les résultats des premiers essais de ces phases dans des SPATTs positionnés en mer ont pu démontrer, pour la première fois en France, la possibilité de capter les toxines de microalgues benthiques, en l'occurrence DTX1 et PnTX-G, produites par *P. lima* et *V. rugosum*.

Les adsorbants testés ont présenté différentes capacités et vitesses d'absorption : alors que les résines Strata-X et Oasis HLB, qui accumulent plus rapidement les toxines, seraient adaptées pour des expositions ponctuelles (journalières), la résine HP-20, qui a une vitesse d'adsorption plus lente, est, quant à elle, plus adaptée pour des expositions de plus longue durée (sept jours).

LC-MS pour le criblage des phycotoxines

Les travaux réalisés dans le cadre de ce chapitre concernaient le développement de méthodes d'analyse multi-toxines par spectrométrie de masse basse et haute résolution.

Dans une **première partie** les méthodes d'analyse par LC-LRMS et LC-HRMS ont été mises au point et évaluées pour le criblage quantitatif et qualitatif de toxines dans des moules et des échantillonneurs passifs. La comparaison des effets matrices obtenus sur l'ensemble des spectromètres de masse utilisés (HRMS et LRMSR) a montré qu'ils étaient similaires (augmentation ou suppression du signal) et cohérents avec les résultats obtenus dans la littérature. Les échantillonneurs passifs ont donné lieu à des effets matrices moins importants que ceux observés avec les moules, indépendamment de la toxine ou de l'instrument utilisé,

ce qui démontre l'utilité de ces systèmes de surveillance. Les effets matrices étant similaires en SMHR et SMBR, nous en avons donc conclu qu'ils n'étaient pas dus à des interférences de masses. En effet, les spectres de masses haute résolution acquis ont permis de visualiser les composés co-élus en même temps que les toxines et de clarifier l'absence d'interférences massiques.

Lors de l'évaluation des effets matrice, à l'aide de solutions de calibration dans la matrice, nous avons pu démontrer l'importance du choix de l'ion utilisé pour la quantification, mais aussi l'utilité de diluer l'échantillon, pour diminuer les effets matrice. Un point important à noter est le fait, que lors de la quantification, l'utilisation d'une courbe de calibration dans la matrice ne permet qu'une correction partielle des effets matrices, à moins que la matrice utilisée soit exactement de même nature et de même provenance que les échantillons à analyser. Ces travaux ont, par ailleurs, permis de démontrer la possibilité d'effectuer des analyses quantitatives à l'aide de la HRMS, cette dernière présentant un atout supplémentaire par rapport à la LRMS : la possibilité de réaliser une analyse non-ciblée des échantillons, grâce à l'obtention de spectres en mode « full-scan », avec une grande précision de masse, et la possibilité d'une analyse rétrospective des données.

De même que les effets matrices, le manque de disponibilité d'étalons est un des problèmes pour l'analyse des toxines par LC-MS/MS. La **deuxième partie** de ce chapitre a donc consisté à évaluer les facteurs de réponse d'analogues d'une même famille de toxines par comparaison aux analogues principaux (pour lesquels des standards sont généralement disponibles). Ces travaux, réalisés sur des instruments LC-MS basse et haute résolution, avaient pour but de déterminer si les analogues d'une même famille de toxines répondraient de manière similaire, dans des conditions d'analyse similaires. Les résultats obtenus ont permis de conclure que les facteurs de réponses sont dépendants non seulement du mode d'acquisition (SIM, SRM, All-ion *etc.*), mais aussi des conditions chromatographiques (gradient, isocratique), confirmant les résultats obtenus précédemment par d'autres chercheurs (en l'occurrence pour les toxines appartenant au groupe des azaspiracides). Cependant, d'une manière générale, et à quelques exceptions près (*e.g.* PnTX-G comparée à 13-desMe-C qui ne sont pas des toxines de la même famille), les réponses obtenues pour les différents analogues, dans les mêmes conditions chromatographiques et de détection, étaient comparables et ne différaient que d'un facteur inférieur à deux. Le fait que les facteurs de réponse des différentes toxines, comparés aux étalons de la même famille, soient compris entre 0,5 et 2,

reste rassurant dans l'optique de détecter et de quantifier, en analyse non-ciblée, des analogues de toxines.

Criblage des échantillons environnementaux et biologiques : analyse ciblée et non-ciblée

Les travaux présentés dans ce chapitre ont été consacrés à l'application des méthodes développées (échantillonnage passif et analyse LC-MS) à des études terrain. Des échantillonneurs passifs (SPATTs) ont été déployés pendant les étés 2013 et 2014 en France (Villefranche-sur-Mer, Concarneau, Ingril) et au Nigéria. Ces échantillonneurs passifs ont permis d'évaluer les méthodes développées pour l'analyse ciblée des toxines mais aussi de mettre en place une approche d'analyse non-ciblée de ces échantillons.

Le déploiement de SPATTs dans les eaux de mer nigérianes, proches du delta du Niger, a permis de confirmer la présence, soupçonnée, de microalgues toxiques, en l'occurrence *Dinophysis caudata* et des espèces de *Prorocentrum*, dans cette région. Cette étude a permis d'identifier, pour la première fois, des toxines lipophiles dans les eaux de mer du Nigéria. La présence de PTX2 et d'OA, en quantités quantifiables dans les SPATTs déployés a été attribuée à la présence d'espèces de *Dinophysis*, mais aussi à la présence d'espèces de *Prorocentrum*. Le criblage de la présence des « suspects » dans les échantillons, grâce à l'interrogation d'une base de donnée (Dictionnaire des produits naturels marins : DMNP), à partir des données obtenues en spectrométrie de masse haute résolution, a permis, par ailleurs, la mise en évidence de la présence supposée de métabolites d'espèces de cyanobactéries. Ces résultats ont donc mis en lumière la nécessité d'études ultérieures pour évaluer le risque que pourraient poser, non seulement les microalgues, mais aussi les cyanobactéries, pour l'aquaculture et la santé humaine sur les côtes nigériennes.

Les travaux présentés dans la *deuxième partie* de ce chapitre avaient pour objectif l'utilisation de l'échantillonnage passif en combinaison avec l'analyse en HRMS, pour le criblage, ciblé, non-ciblé, et des « suspects ». Dans ces travaux, les SPATTs ont une fois de plus prouvé leur utilité pour la détection de toxines de microalgues pélagiques mais aussi benthiques. Alors qu'une partie de l'information contenue dans les SPATTs est disponible via l'analyse ciblée et le criblage des « suspects », grâce à l'analyse non ciblée, une vue d'ensemble des données est aussi possible. Ainsi, a-t-il été possible d'avoir une vue

d'ensemble du profil chimique de différents environnements côtiers français pendant les périodes d'étude. Les analyses statistiques uni- et multi-variées, à partir des données non-ciblées, ont ainsi permis de différencier les sites géographiques, de même que les semaines de déploiement. Ces différenciations spatiales et temporelles pourront être des informations utiles pour des études sur les évolutions des systèmes environnementaux à plus ou moins long terme. De plus, parmi les composés caractérisant chacun des sites géographiques, ou chacune des semaines de déploiement, seuls quelques-uns ont pu être identifiés de manière supposée. Ces propositions d'identifications, ont pointé du doigt la nécessité d'études à plus large échelle, dans le but d'aboutir à une meilleure connaissance de la chimie marine et de permettre une augmentation des taux d'identification.

Perspectives

Plusieurs perspectives peuvent être dégagées à la suite des résultats obtenus lors de ces travaux de thèse :

- Le développement d'une stratégie d'**échantillonnage passif** pour la détection de **toxines** et de **composés hydrophiles**. En effet, l'échantillonnage passif des toxines hydrophiles représente un challenge et très peu de données sont disponibles, à l'heure actuelle, sur les moyens d'effectuer l'échantillonnage passif de ces composés.
- **L'évaluation des effets matrices liés aux échantillonneurs passifs contenant 3 g de résine** au lieu de 300 mg. Les premiers travaux de mise au point de l'échantillonnage passif nous ont orienté vers des échantillonneurs passifs contenant 300 mg de résine (pour des raisons plutôt économiques). Cependant, la quantité de résine utilisée de manière consensuelle dans la majorité des échantillonneurs est de 3 g. Il apparaît donc nécessaire d'évaluer également les effets matrices liés aux échantillons de moules et de SPATTs de 3 g. Cette évaluation permettra de statuer, de manière définitive, sur l'influence de nature et de la complexité des extraits (SPATTs par rapport moules) sur les résultats des analyses.
- Le degré de complexité de l'échantillon pouvant avoir un impact sur les résultats obtenus, particulièrement en spectrométrie de masse haute résolution, il serait donc intéressant de comparer les résultats obtenus en approche non-ciblée, sur des

échantillons de moules et de SPATTs déployés simultanément dans les mêmes sites géographiques. Cette comparaison sera effectuée sur la base du nombre de composés inconnus et de toxines connues identifiés, grâce à l'utilisation de bases de données disponibles. Cela permettra de statuer sur la nécessité d'avoir une matrice moins complexe (l'échantillonneur passif en comparaison à la moule) lors de l'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution pour l'identification de composés inconnus.

- **L'utilisation combinée de l'échantillonnage passif et de l'analyse par HRMS** pour élucider les toxicités atypiques.

Pour finir, la possibilité de combiner échantillonnage passif et analyse par HRMS, la démonstration que les facteurs de réponses molaires des toxines étudiées ne sont pas significativement différents au sein d'une même famille de toxines, sont des résultats offrant des perspectives intéressantes pour leur analyse semi-quantitative, en approche non-ciblée et, pour répondre aux problèmes concernant les toxicités atypiques, d'une part, et les toxines émergentes, d'autre part.

VALORISATION SCIENTIFIQUE

Publications dans des revues à comité de lecture – Peer reviewed publications:

Zendong. Z., McCarron P., Herrenknecht. C., Sibat. M., Amzil. Z., Hess. P.. Relative Molar Response (RMR) factors of lipophilic algal toxins in mass spectrometry. (en preparation pour soumission dans RCMS)

Zendong. Z., Bertrand. S., Herrenknecht. C., Abadie. E., Jauzein. C., Lemée. R., Gouriou. J., Amzil. Z., Hess. P. Passive sampling and high resolution mass spectrometry for chemical profiling of French coastal areas with a focus on marine biotoxins. (soumis dans Environmental Science and Technology).

Z. Zendong., M. Kadiri, C. Herrenknecht, E. Nézan, A. Mazzeo, P. Hess. Algal toxin profiles in Nigerian coastal waters (Gulf of Guinea) using passive sampling and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. (soumis dans Toxicon).

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.

Zendong. Z., Herrenknecht. C., Abadie. E., Brissard. C., Tixier. C., Mondeguer. F., Séchet. V., Amzil. Z., Hess. P. (2014) Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins. *Toxicon* 91, 57-68.

Compte-rendus de colloques – Conference Proceedings:

Zendong Z., Abadie E., Mazzeo A., Hervé F., Herrenknecht C., Amzil Z., Dell'Aversano C., Hess P. (2015) Determination of the concentration of dissolved lipophilic algal toxins in seawater using pre-concentration with HP-20 resin and LC-MS/MS detection. A. Lincoln MacKenzie [Ed]. *Marine and Freshwater Harmful Algae*. Proceedings of the 16th International Conference on Harmful Algae, Wellington New Zealand 27th – 31st October 2014. Pp. 210-213.

Présentations orales - Oral presentations:

Zendong, Z., McCarron, P., Herrenknecht, C., Sibat, M., Amzil, Z., Cole, R.B., Hess, P. **(2015)** Comparison of matrix effects for mussels and passive samplers using low and high resolution mass spectrometry. Fifth Joint Symposium and AOAC Task Force Meeting, Marine & Freshwater Toxins Analysis, June 14th-17th 2015, Baiona (Spain).

<http://tv.campusdomar.es/serial/index/id/498>

Zendong, Z., Herrenknecht, C., Abadie, E., Jauzein, C., Lemée, R., Gouriou, J., Mazzeo A., Amzil, Z., Hess, P. **(2015)**. The memory of seawater: passive sampling for the profiling of algal toxins in lagoons and open coastal seas. GdR (Groupe de Recherche) PHYCOTOX. 31 Mars – 02 Avril 2015, Brest, France.

Mazzeo, A., **Zendong, Z.**, Hess, P., Tartaglione, L., Forino, M., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C. **(2015)**. Extraction of palytoxins from seawater and preliminary stability studies. GdR (Groupe de Recherche) PHYCOTOX. 31 Mars – 02 Avril 2015, Brest, France.

Hess P., Wüst B., Glauner T., Guitton Y., Mondeguer F., Sibat M., **Zendong Z.**, Séchet V., Jauffrais T., Geiger M., Herrenknecht C. and Amzil Z. Recent advances in non-targeted screening of phycotoxins. Séminaire invité 12 mars **2014**, Università de Federico II, Naples, Italie

Hess P., Glauner T., Wüst B., Guitton Y., Mondeguer F., Sibat M., **Zendong Z.**, Séchet V., Jauffrais T., Geiger M., Herrenknecht C. and Amzil Z. **(2014)** Latest developments in quantitative target screening and unknown profiling for comprehensive analysis of marine biotoxins using the Agilent Q-ToF instrumentation 6540 & 6550. Présentation orale invitée lors du “Environmental Food MS meeting Agilent” 30 September – 2nd October 2014, Liverpool, England.

Hess P., Geiger M., Glauner T., Wüst B., Guitton Y., Mondeguer F., Antignac J.-P., Sibat M., **Zendong Z.**, Séchet V., Dussud C., Fessard V., Herrenknecht C., Pouchus Y.-F. and Amzil Z **(2014)** Criblage non-ciblé des toxines émergentes - fractionnement bioguidé. Présentation orale lors des Journées REPHY 1st-2nd October, Nantes, France.

Zendong Z., Herrenknecht C., Abadie E., Séchet V., Amzil Z., Hess P. (2014) Algal toxins in seawater: recent developments in detection techniques with a focus on passive sampling to trace pelagic and benthic microalgae. Oral presentation at the 16th International Conference on Harmful Algae, 27-31 October 2014, Wellington, New Zealand.

Zendong Z., Herrenknecht C., Brissard C., Séchet V., Abadie E., Mondeguer F., Tixier C., Amzil Z., Hess P. (2013) Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins. Oral presentation at the 21st Annual Meeting of the “Société Française d’Etudes sur les Toxines” SFET. 8 – 9 December 2013, Institut Pasteur, Paris, France.

Hess P., Wüst B., Glauner T., Guitton Y., Mondeguer F., Sibat M., **Zendong Z.**, Séchet V., Jauffrais T., Geiger M., Herrenknecht C. and Amzil Z. (2013) High resolution mass spectrometry and biological tools for screening of marine biotoxins and discovery of marine natural products via dereplication. Oral presentation at the 14th Intl. Symp. Marine Natural Products & the 8th Europ. Conf. Marine Natural Products, September 15 – 20th, 2013, La Toja Island, Galicia, Spain.

Hess P., Mondeguer F., Glauner T., Wüst B., Sibat M., **Zendong Z.**, Herrenknecht C., Séchet V. (2013) Liquid Chromatography Coupled to High Resolution Mass Spectrometry (Agilent 6540 Q-TOF) for Quantitative Analysis Marine Biotoxins and Metabolomic Profiling of Marine Environmental Samples. Invited oral presentation at the Agilent Annual Meeting, 8 June 2013, Minneapolis, MA, US (American Society of Mass Spectrometry Satellite Conference).

Hess P., Glauner T., Wüst B., Sibat M., Mondeguer F., Geiger M., **Zendong Z.** (2013) Specific, quantitative and metabolomic techniques for the analysis of marine biotoxins. Key-note presentation at the 4th Intl. Symp. on Marine & Freshwater Toxin Analysis and AOAC Task Force Meeting, 5-9 May 2013, Baiona, Spain.

Hess P., Glauner T., Wüst B., Sibat M., Mondeguer F., Hervé F., Geiger M., **Zendong Z.** (2013) Target quantitation and metabolomic studies of marine biotoxins in algae and shellfish using Q-ToF technology. Webinar held on 9th April 2013 on 15h00 and 19h00 CET (<http://view6.workcast.net/?pak=8718440540155734>).

Hess P., Glauner T., Wüst B., Sibat M., Mondeguer F., Hervé F., **Zendong Z.** (2013) Spezifische, quantitative und metabolomische Analysentechniken für Marine Biotoxine mit dem Agilent Q-ToF 6540. Invited lecture at the “Forum für Lebensmittelsicherheit” (Forum for Food Safety), 30-31 Jan 2013 Waldbronn, Germany.

Résumés publiés – Published abstracts:

Zendong Z., Brissard C., Herrenknecht C., Tixier C., Abadie E., Mondeguer F., Sechet V., Amzil Z., Hess P., **2014**. 10. Extended evaluation of mixed-mode and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins. *Toxicon* 91, 168-169.

Présentations par affiches - Poster presentations:

Zendong, Z., Bertrand, S., Herrenknecht, C., Abadie, E., Jauzein, C., Lemée, R., Gouriou, J., Amzil, Z., Hess, P. (2015) Differential metabolomics profiling of mussel and passive samplers for untargeted screening of algal toxins in seafood and coastal marine environments. 11th International Conference of the Metabolomics Society, June 29th - July 2nd 2015, San Francisco, California, US.

Mazzeo M., Tartaglione L., **Zendong Z.**, Forino M., Hess P., Ciminiello P., Dell’Aversano C. (2015). Towards quantitative isolation of palytoxins: Preliminary stability and purification studies. Fifth Joint Symposium and AOAC Task Force Meeting, Marine & Freshwater Toxins Analysis, June 14th-17th 2015, Baiona (Spain).

Hess P., Mondeguer F., Glauner T., Wüst B., Sibat M., **Zendong Z.**, Herrenknecht C., Séchet V. (2013) Metabolomic analysis of marine microalgae using high resolution mass spectrometry for taxonomic comparisons and screening of marine biotoxins. Poster presentation at 61st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 9-13, 2013, Minneapolis, Minnesota, US.

Zendong Z., Herrenknecht C., Mondeguer F., Hess P. (2013) Metabolomic approach for the analysis of micro-algae: direct analysis versus passive sampling. Poster presentation at the 4th Intl. Symp. On Marine & Freshwater Toxin Analysis and AOAC Task Force Meeting, 5-9 May 2013, Baiona, Spain.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

Adachi, R., Fukuyo, Y., **1979**. The thecal structure of a toxic marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* gen. et spec. nov. collected in a ciguatera-endemic area. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 45, 67-71.

Adams, W.N., Miescier, J.J., **1980**. Commentary on AOAC method for paralytic shellfish poisoning. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 63, 1336-1343.

AFSSA, **2006**. Saisine n° 2009-SA-0254 - Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation du dispositif de surveillance du milieu et à l'évaluation du risque lié à la consommation des coquillages, notamment dans la situation du bassin d'Arcachon., 13.

Aligizaki, K., Katikou, P., Nikolaidis, G., Panou, A., **2008**. First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece). Toxicon 51, 418-427.

Aligizaki, K., Nikolaidis, G., **2006**. The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the north Aegean sea, Greece. Harmful Algae 5, 717-730.

Aligizaki, K., Nikolaidis, G., **2008**. Morphological identification of two tropical dinoflagellates of the genera *Gambierdiscus* and *Dinophysis* in the Mediterranean Sea. J. Biol. Res., Thessaloniki 9, 75-82.

Allen, J., Davey, H.M., Broadhurst, D., Heald, J.K., Rowland, J.J., Oliver, S.G., Kell, D.B., **2003**. High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. Nature Biotechnology 21, 692-696.

Alvarez, D.A., Petty, J.D., Huckins, J.N., Jones-Lepp, T.L., Getting, D.T., Goddard, J.P., Manahan, S.E., **2004**. Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. Environmental Toxicology and Chemistry 23, 1640-1648.

Amzil, Z., Sibat, M., Chomerat, N., Grossel, H., Marco-Miralles, F., Lemee, R., Nezan, E., Sechet, V., **2012**. Ovatoxin-a and palytoxin accumulation in seafood in relation to *Ostreopsis cf. ovata* blooms on the french mediterranean coast. Mar. Drugs 10, 477-496.

Anderson, D.M., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., **2002**. Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. Estuaries 25, 704-726.

Anonymous, **1986**. Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. . Official Journal L358, 1-29.

Anonymous, **2005**. Commission Regulation (EC) No 2074/2005 of 5 December 2005 laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the organisation of official controls under Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, derogating from Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) No 853/2004 and (EC) No 854/2004 Official Journal L338, 27-59.

AOAC, 2005a. Official method 959.08. paralytic shellfish poison, biological method mouse bioassay for PSP toxins, in: AOAC (Ed.), AOAC Official Methods of Analysis, 18th Edition ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, USA, pp. 79-80.

AOAC, 2005b. Official method 2005.06. Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescent detection, in: AOAC (Ed.), AOAC Official Methods of Analysis, 18th Edition ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, USA, pp. 81-82.

-B-

Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., Zucco, F., **1995**. Practical aspects of the validation of toxicity test procedures - The report and recommendations of ECVAM workshop-5. ATLA-Altern. Lab. Anim. 23, 129-147.

Beisken, S., Eiden, M., Salek, R.M., **2015**. Getting the right answers: understanding metabolomics challenges. Expert Review of Molecular Diagnostics 15, 97-109.

Belin, C., Soudant, D., Amzil, Z., **2009**. Surveillance des toxines lipophiles dans les coquillages - Analyse statistique et comparaison des résultats obtenus par deux méthodes d'analyses: les bio-essais sur souris et les analyses chimiques par CL-SM/SM. Ifremer Archimer, 98 pages.

Besada, E.G., Loeblich, L.A., Loeblich, A.R., **1982**. Observations on tropical, benthic dinoflagellates from ciguatera-endemic areas - Coolia, Gambierdiscus, and Ostreopsis Bulletin of Marine Science 32, 723-735.

Blanco, J., Acosta, C.P., de la Puente, M.B., Salgado, C., **2002**. Depuration and anatomical distribution of the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin domoic acid in the King scallop *Pecten maximus*. Aquat. Toxicol. 60, 111-121.

Blay, P., Hui, J.P., Chang, J., Melanson, J.E., **2011**. Screening for multiple classes of marine biotoxins by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. Analytical and bioanalytical chemistry 400, 577-585.

Bolten, C.J., Kiefer, P., Letisse, F., Portais, J.C., Wittmann, C., **2007**. Sampling for metabolome analysis of microorganisms. Analytical chemistry 79, 3843-3849.

Brana-Magdalena, A., Manuel Leao-Martins, J., Glauner, T., Gago-Martinez, A., **2014**. Infra laboratory Validation of a Fast and Sensitive UHPLC/MS/MS Method with Fast

Polarity Switching for the Analysis of Lipophilic Shellfish Toxins. Journal of Aoac International 97, 285-292.

Brissard, C., Herrenknecht, C., Sechet, V., Herve, F., Pisapia, F., Harcouet, J., Lemee, R., Chomerat, N., Hess, P., Amzil, Z., **2014**. Complex Toxin Profile of French Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* Strains, Seafood Accumulation and Ovatoxins Prepurification. Marine drugs 12, 2851-2876.

-C-

Caillaud, A., de la Iglesia, P., Barber, E., Eixarch, H., Mohammad-Noor, N., Yasumoto, T., Diogène, J., **2011**. Monitoring of dissolved ciguatoxin and maitotoxin using solid-phase adsorption toxin tracking devices: Application to *Gambierdiscus pacificus* in culture. Harmful Algae 10, 433-446.

Caillaud, A., de la Iglesia, P., Darius, H.T., Pauillac, S., Aligizaki, K., Fraga, S., Chinain, M., Diogene, J., **2010**. Update on Methodologies Available for Ciguatoxin Determination: Perspectives to Confront the Onset of Ciguatera Fish Poisoning in Europe. Mar. Drugs 8, 1838-1907.

Campbell, K., Vilarino, N., Botana, L.M., Elliott, C.T., **2011**. A European perspective on progress in moving away from the mouse bioassay for marine-toxin analysis. Trac-Trends in Analytical Chemistry 30, 239-253.

Cech, N.B., Enke, C.G., **2001**. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. Mass spectrometry reviews 20, 362-387.

Cembella, A.D., Lewis, N.I., Quilliam, M.A., **2000**. The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins. Phycologia 39, 67-74.

Chapela, M.J., Reboreda, A., Vieites, J.M., Cabado, A.G., **2008**. Lipophilic toxins analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry and comparison with mouse bioassay in fresh, frozen, and processed molluscs. Journal of agricultural and food chemistry 56, 8979-8986.

Chateau-Degat, M.L., Chinain, M., Cerf, N., Gingras, S., Hubert, B., Dewailly, E., **2005**. Seawater temperature, *Gambierdiscus* spp. variability and incidence of ciguatera poisoning in French Polynesia. Harmful Algae 4, 1053-1062.

Chou, T., Haino, T., Kuramoto, M., Uemura, D., **1996**. Isolation and structure of pinnatoxin D, a new shellfish poison from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. Tetrahedron Letters 37, 4027-4030.

Christian, B., Luckas, B., **2008**. Determination of marine biotoxins relevant for regulations: from the mouse bioassay to coupled LC-MS methods. Analytical and bioanalytical chemistry 391, 117-134.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F., Pistocchi, R., **2010**. Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 24, 2735-2744.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., **2008**. Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 19, 111-120.

Combes, R.D., **2003**. The mouse bioassay for diarrhetic shellfish poisoning: A gross misuse of laboratory animals and of scientific methodology. ATLA-Altern. Lab. Anim. 31, 595-610.

Comerton, A.M., Andrews, R.C., Bagley, D.M., **2009**. Practical overview of analytical methods for endocrine-disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in water and wastewater. Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences 367, 3923-3939.

-D-

Daigo, K., **1959**. Studies on the constituents of *Chondria armata*. II. Isolation of an anthelmintical constituent. Yakugaku Zasshi (J. Pharm Soc Jpn) 79, 353-356.

Daneshian, M., Botana, L.M., Bottein, M.-Y.D., Buckland, G., Campas, M., Dennison, N., Dickey, R.W., Diogene, J., Fessard, V., Hartung, T., Humpage, A., Leist, M., Molgo, J., Quilliam, M.A., Rovida, C., Suarez-Isla, B.A., Tubaro, A., Wagner, K., Zoller, O., Dietrich, D., **2013**. A Roadmap for Hazard Monitoring and Risk Assessment of Marine Biotoxins on the Basis of Chemical and Biological Test Systems. Altex-Alternatives to Animal Experimentation 30, 487-545.

Daranas, A.H., Norte, M., Fernandez, J.J., **2001**. Toxic marine microalgae. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 39, 1101-1132.

De.Hoffmann, E., Stroobant, V., 1999. Spectrométrie de masse. , 3^{ème} édition ed. Dunod.

Dell'Aversano, C., Walter, J.A., Burton, I.W., Stirling, D.J., Fattorusso, E., Quilliam, M.A., **2008**. Isolation and structure elucidation of new and unusual saxitoxin analogues from mussels. J. Nat. Prod. 71, 1518-1523.

Dell'Aversano, E.G.K., Quilliam M A., **2004**. Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1028, 155-164.

Diaz, R., Ibanez, M., Sancho, J.V., Hernandez, F., **2012**. Target and non-target screening strategies for organic contaminants, residues and illicit substances in food, environmental and human biological samples by UHPLC-QTOF-MS. Analytical Methods 4, 196-209.

Domenech, A., Cortes-Francisco, N., Palacios, O., Franco, J.M., Riobo, P., Llerena, J.J., Vichi, S., Caixach, J., **2014**. Determination of lipophilic marine toxins in mussels. Quantification and confirmation criteria using high resolution mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1328, 16-25.

Dominguez, H.J., Paz, B., Daranas, A.H., Norte, M., Franco, J.M., Fernandez, J.J., **2010**. Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: Characterization, analysis and human health implications. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 56, 191-217.

-E-

EFSA, **2008**. Marine biotoxins in shellfish - Okadaic acid and analogues, scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain, adopted on 27 November 2007. EFSA Journal 589, 1-62.

EFSA, **2009a**. Marine biotoxins in shellfish - Domoic acid group, Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain; adopted on 2 July 2009. EFSA Journal 1181, 1-61.

EFSA, **2009b**. Marine biotoxins in shellfish - Summary on regulated marine biotoxins, scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain; adopted on 13 August 2009. EFSA Journal 1306, 1-23.

EFSA, **2009c**. Marine biotoxins in shellfish - Yessotoxin group, Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain, adopted on the 2 December 2008. EFSA Journal 907, 1-62.

EU-RL-MB, **2011**. EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS. EU-RL-MB.

EU.Commission, **2011**. Commission Regulation (EU) No 15/2011 of 10 January 2011 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs. Official Journal of the European Union.

-F-

FAO, **2004**. Report of the joint FAO/IOC/WHO *ad hoc* expert consultation on biotoxins in bivalve molluscs, Oslo, Norway.

FAO/IOC/WHO, **2005**. Report of the FAO/IOC/WHO *ad hoc* expert consultation on biotoxins in bivalve molluscs, Oslo, Norway, Sept. 26-30, 2004.

Faust, M.A., **1990**. Morphological details of 6 benthic species of *Prorocentrum* (Pyrrophyta) from a mangrove island, twin cays, Belize, including 2 new species Journal of Phycology 26, 548-558.

Ferrer, I., Thurman, E.M., **2012**. Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1259, 148-157.

Furey, A., O'Doherty, S., O'Callaghan, K., Lehane, M., James, K.J., **2010**. Azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish: toxicological and health considerations. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 56, 173-190.

Fux, E., Bire, R., Hess, P., **2009**. Comparative accumulation and composition of lipophilic marine biotoxins in passive samplers and in mussels (*M. edulis*) on the West Coast of Ireland. Harmful Algae 8, 523-537.

Fux, E., Marcaillou, C., Mondeguer, F., Bire, R., Hess, P., **2008a**. Field and mesocosm trials on passive sampling for the study of adsorption and desorption behaviour of lipophilic toxins with a focus on OA and DTX1. Harmful Algae 7, 574-583.

Fux, E., McMillan, D., Bire, R., Hess, P., **2007**. Development of an ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins. Journal of chromatography. A 1157, 273-280.

Fux, E., Rode, D., Bire, R., Hess, P., **2008b**. Approaches to the evaluation of matrix effects in the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis of three regulated

lipophilic toxin groups in mussel matrix (*Mytilus edulis*). Food Addit. Contam. Part A-Chem. 25, 1024-1032.

-G-

Garcia-Altares, M., Casanova, A., Bane, V., Diogene, J., Furey, A., de la Iglesia, P., **2014**. Confirmation of Pinnatoxins and Spirolides in Shellfish and Passive Samplers from Catalonia (Spain) by Liquid Chromatography Coupled with Triple Quadrupole and High-Resolution Hybrid Tandem Mass Spectrometry. Marine drugs 12, 3706-3732.

Garcia-Altares, M., Diogene, J., de la Iglesia, P., **2013**. The implementation of liquid chromatography tandem mass spectrometry for the official control of lipophilic toxins in seafood: Single-laboratory validation under four chromatographic conditions. Journal of Chromatography A 1275, 48-60.

Gates, P., **2014**. Electrospray ionisation. University of Bristol, School of Chemistry-Mass Spectrometry Facility. Website. Last accessed 7th October 2015. <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/esi-ionisation.xhtml>.

Geiger, T., Cox, J., Mann, M., **2010**. Proteomics on an Orbitrap Benchtop Mass Spectrometer Using All-ion Fragmentation. Molecular & Cellular Proteomics 9, 2252-2261.

Gerssen, A., McElhinney, M.A., Mulder, P.P.J., Bire, R., Hess, P., de Boer, J., **2009a**. Solid phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Analytical and bioanalytical chemistry 394, 1213-1226.

Gerssen, A., Mulder, P., van Rhijn, H., de Boer, J., **2008**. Mass spectrometric analysis of the marine lipophilic biotoxins pectenotoxin-2 and okadaic acid by four different types of mass spectrometers. Journal of Mass Spectrometry 43, 1140-1147.

Gerssen, A., Mulder, P.P.J., McElhinney, M.A., de Boer, J., **2009b**. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions. Journal of Chromatography A 1216, 1421-1430.

Godejohann, M., Heintz, L., Daolio, C., Berset, J.-D., Muff, D., **2009**. Comprehensive Non-Targeted Analysis of Contaminated Groundwater of a Former Ammunition Destruction

Site using ^1H -NMR and HPLC-SPE-NMR/TOF-MS. Environmental science & technology 43, 7055-7061.

Gorecki, T., Namiesnik, J., **2002**. Passive sampling. Trac-Trends in Analytical Chemistry 21, 276-291.

Gosetti, F., Mazzucco, E., Zampieri, D., Gennaro, M.C., **2010**. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1217, 3929-3937.

Goulitquer, S., Potin, P., Tonon, T., **2012**. Mass spectrometry-based metabolomics to elucidate functions in marine organisms and ecosystems. Marine drugs 10, 849-880.

-H-

Hallegraeff, G.M., **2010**. Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge. Journal of Phycology 46, 220-235.

Harman, C., Thomas, K.V., Tollefsen, K.E., Meier, S., Boyum, O., Grung, M., **2009**. Monitoring the freely dissolved concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and alkylphenols (AP) around a Norwegian oil platform by holistic passive sampling. Marine pollution bulletin 58, 1671-1679.

Henriksen, T., Juhler, R.K., Svensmark, B., Cech, N.B., **2005**. The relative influences of acidity and polarity on responsiveness of small organic molecules to analysis with negative ion electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). Journal of the American Society for Mass Spectrometry 16, 446-455.

Hernandez, F., Ibanez, M., Bade, R., Bijlsma, L., Sancho, J.V., **2014**. Investigation of pharmaceuticals and illicit drugs in waters by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. Trac-Trends in Analytical Chemistry 63, 140-157.

Hernandez, F., Sancho, J.V., Ibanez, M., Abad, E., Portoles, T., Mattioli, L., **2012**. Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. Analytical and bioanalytical chemistry 403, 1251-1264.

Hess, P., **2010**. Requirements for screening and confirmatory methods for the detection and quantification of marine biotoxins in end-product and official control. Analytical and bioanalytical chemistry 397, 1683-1694.

Hess, P., Aasen, J.B., 2007. Chemistry, origins and distribution of yessotoxin and its analogues, in: Botana, L.M. (Ed.), Chemistry and pharmacology of marine toxins. blackwell publishing, Oxford, pp. 187-2002.

Hess, P., Abadie, E., Herve, F., Berteaux, T., Sechet, V., Araoz, R., Molgo, J., Zakarian, A., Sibat, M., Rundberget, T., Miles, C.O., Amzil, Z., **2013**. Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 75, 16-26.

Hess, P., Butter, T., Petersen, A., Silke, J., McMahon, T., **2009**. Performance of the EU-harmonised mouse bioassay for lipophilic toxins for the detection of azaspiracids in naturally contaminated mussel (*Mytilus edulis*) hepatopancreas tissue homogenates characterised by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 53, 713-722.

Hess, P., Grune, B., Anderson, D.B., Aune, T., Botana, L.M., Caricato, P., van Egmond, H.P., Halder, M., Hall, S., Lawrence, J.F., Moffat, C., Poletti, R., Richmond, J., Rossini, G.P., Seamer, C., Vilageliu, J.S., **2006**. Three Rs approaches in marine biotoxin testing - The report and recommendations of a joint ECVAM/DG SANCO workshop (ECVAM workshop 55). ATLA-Altern. Lab. Anim. 34, 193-224.

Hess, P., McCarron, P., Krock, B., Kilcoyne, J., Miles, C., O., 2014. Azaspiracids: Chemistry, Biosynthesis, Metabolism, and Detection, Seafood and Freshwater Toxins. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 799-822.

Hess, P., Morris, S., Stobo, L.A., Brown, N.A., McEvoy, J.D.G., Kennedy, G., Young, P.B., Slattery, D., McGovern, E., McMahon, T., Gallacher, S., **2005**. LC-UV and LC-MS methods for the determination of domoic acid. Trends Anal. Chem. 24, 358-367.

Holland, P.T., Selwood, A.I., Mountfort, D.O., Wilkins, A.L., McNabb, P., Rhodes, L.L., Doucette, G.J., Mikulski, C.M., King, K.L., **2005**. Isodomoic acid C, an unusual amnesic shellfish poisoning toxin from *Pseudo-nitzschia australis*. Chem. Res. Toxicol. 18, 814-816.

Hu, T., Curtis, J.M., Walter, J.A., Wright, J.L.C., **1996**. Characterization of biologically inactive spirolides E and F: identification of the spirolide pharmacophore. Tetrahedron Lett. 37, 7671-7674.

Hu, T.M., Curtis, J.M., Oshima, Y., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Watsonwright, W.M., Wright, J.L.C., **1995**. Spirolide-B and spirolide-D, 2 novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish. J. Chem. Soc., Chem. Commun., 2159-2161.

Hu, T.M., Doyle, J., Jackson, D., Marr, J., Nixon, E., Pleasance, S., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Wright, J.L.C., **1992**. Isolation of a new diarrhetic shellfish poison from mussels J. Chem. Soc., Chem. Commun., 39-41.

Huckins, J.N., Manuweera, G.K., Petty, J.D., Mackay, D., Lebo, J.A., **1993**. Lipid-containing semipermeable-membrane devices for monitoring organic contaminants in water. Environmental science & technology 27, 2489-2496.

Huckins, J.N., Tubergen, M.W., Manuweera, G.K., **1990**. Semipermeable-membrane devices containing model lipid- A new approach to monitoring the bioavailability of lipophilic contaminants and estimating their bioconcentration potential. Chemosphere 20, 533-552.

Huckins., J.N., Petty, J.D., Lebo, J.A., Orazio, C.E., Clark, R.C., Gibson, V.L., **2002**. SPMD Technology Tutorial (3rd Edition). Updated January 03, 2002., in USGS website, last accessed 7th October 2015. http://wwwaux.cerc.cr.usgs.gov/spmd/SPMD-Tech_Tutorial.htm.

-I-

Ibanez, M., Sancho, J.V., Pozo, O.J., Niessen, W., Hernandez, F., **2005**. Use of quadrupole time-of-flight mass spectrometry in the elucidation of unknown compounds present in environmental water. Rapid Communications in Mass Spectrometry 19, 169-178.

Ifremer, **2009**. Document de prescription. Cahier de procédures et de programmation REPHY 2009.

International, A., 1995. Paralytic shellfish poison, biological method, 14th Edition ed. AOAC International, Arlington, VA.

Iverson, F., Truelove, J., Nera, E., Tryphonas, L., Campbell, J., Lok, E., **1989**. Domoic acid poisoning and mussel-associated intoxication - Preliminary investigations into the response of mice and rats to toxic mussel extract. Food and Chemical Toxicology 27, 377-&.

-J-

James, K.J., Carey, B., O'Halloran, J., van Pelt, F.N.A.M., Skrabakova, Z., **2010**. Shellfish toxicity: human health implications of marine algal toxins. Epidemiology and Infection 138, 927-940.

James, K.J., Saez, M.J.F., Furey, A., Lehane, M., **2004**. Azaspiracid poisoning, the food-borne illness associated with shellfish consumption. Food Additives and Contaminants 21, 879-892.

Jauffrais, T., Herrenknecht, C., Sechet, V., Sibat, M., Tillmann, U., Krock, B., Kilcoyne, J., Miles, C.O., McCarron, P., Amzil, Z., Hess, P., **2012a**. Quantitative analysis of azaspiracids in *Azadinium spinosum* cultures. Analytical and bioanalytical chemistry 403, 833-846.

Jauffrais, T., Marcaillou, C., Herrenknecht, C., Truquet, P., Séchet, V., Nicolau, E., Tillmann, U., Hess, P., **2012b**. Azaspiracid accumulation, detoxification and

biotransformation in blue mussels (*Mytilus edulis*) experimentally fed *Azadinium spinosum*. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 60, 582-595.

-K-

Kaserzon, S.L., Kennedy, K., Hawker, D.W., Thompson, J., Carter, S., Roach, A.C., Booi, K., Mueller, J.F., **2012**. Development and calibration of a passive sampler for perfluorinated alkyl carboxylates and sulfonates in water. Environmental science & technology 46, 4985-4993.

Kilcoyne, J., Fux, E., **2010**. Strategies for the elimination of matrix effects in the liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of the lipophilic toxins okadaic acid and azaspiracid-1 in molluscan shellfish. Journal of Chromatography A 1217, 7123-7130.

Kilcoyne, J., McCarron, P., Twiner, M.J., Nulty, C., Crain, S., Quilliam, M.A., Rise, F., Wilkins, A.L., Miles, C.O., **2014**. Epimers of Azaspiracids: Isolation, Structural Elucidation, Relative LC-MS Response, and in Vitro Toxicity of 37-epi-Azaspiracid-1. Chemical Research in Toxicology 27, 587-600.

Kilcoyne, J., Twiner, M.J., McCarron, P., Crain, S., Giddings, S.D., Foley, B., Rise, F., Hess, P., Wilkins, A.L., Miles, C.O., **2015**. Structure Elucidation, Relative LC-MS Response and In Vitro Toxicity of Azaspiracids 7-10 Isolated from Mussels (*Mytilus edulis*). Journal of agricultural and food chemistry 63, 5083-5091.

Kimura, S., Hashimoto, Y., Yamazato, K., **1972**. Toxicity of the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. Toxicon 10, 611.

King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C., Olah, T., **2000**. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 11, 942-950.

Klontz, K.C., Abraham, A., Plakas, S.M., Dickey, R.W., **2009**. Mussel-associated azaspiracid intoxication in the United States. Ann. Intern. Med. 150, 361.

Kluender, C., Sans-Piché, F., Riedl, J., Altenburger, R., Härtig, C., Laue, G., Schmitt-Jansen, M., **2008**. A metabolomics approach to assessing phytotoxic effects on the green alga *Scenedesmus vacuolatus*. Metabolomics 5, 59-71.

Kohoutek, J., Babica, P., Blaha, L., Marsalek, B., **2008**. A novel approach for monitoring of cyanobacterial toxins: development and evaluation of the passive sampler for microcystins. Analytical and bioanalytical chemistry 390, 1167-1172.

Krauss, M., Singer, H., Hollender, J., **2010**. LC–high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. Analytical and bioanalytical chemistry 397, 943-951.

Krogh, P., **1979**. Measurements of paralytic shellfish poisons - Review of biological and chemical procedures. Nordisk Veterinaer Medicin 31, 302-308.

-L-

Lacaze, J.-P., 2012. New trends in Marine Freshwater Toxins. Nova Science Publishers, Inc.

Lane, J.Q., Roddam, C.M., Langlois, G.W., Kudela, R.M., **2010**. Application of Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) for field detection of the hydrophilic phycotoxins domoic acid and saxitoxin in coastal California. Limnology and Oceanography-Methods 8, 645-660.

Larsen, K., Petersen, D., Wilkins, A.L., Samdal, I.A., Sandvik, M., Rundberget, T., Goldstone, D., Arcus, V., Hovgaard, P., Rise, F., Rehmann, N., Hess, P., Miles, C.O., **2007**. Clarification of the C-35 stereochemistries of dinophysistoxin-1 and dinophysistoxin-2 and its consequences for binding to protein phosphatase (vol 20, pg 868, 2007). Chem. Res. Toxicol. 20, 2020-2020.

Law, K.P., Lim, Y.P., **2013**. Recent advances in mass spectrometry: data independent analysis and hyper reaction monitoring. Expert Review of Proteomics 10, 551-566.

Lawrence, J.F., Niedzwiadek, B., Menard, C., **2004**. Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: Interlaboratory study. J. AOAC Int. 87, 83-100.

Ledreux, A., Serandour, A.-L., Morin, B., Derick, S., Lanceleur, R., Hamlaoui, S., Furger, C., Bire, R., Kryszewski, S., Fessard, V., Troussellier, M., Bernard, C., **2012**. Collaborative study for the detection of toxic compounds in shellfish extracts using cell-based assays. Part II: application to shellfish extracts spiked with lipophilic marine toxins. Analytical and bioanalytical chemistry 403, 1995-2007.

Lefebvre, K.A., Bargu, S., Kieckhefer, T., Silver, M.W., **2002**. From sanddabs to blue whales: the pervasiveness of domoic acid. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 40, 971-977.

Lefebvre, K.A., Bill, B.D., Erickson, A., Baugh, K.A., O'Rourke, L., Costa, P.R., Nance, S., Trainer, V.L., **2008**. Characterization of intracellular and extracellular saxitoxin levels in both field and cultured *Alexandrium* spp. samples from Sequim Bay, Washington. Marine drugs 6, 103-116.

Lefebvre, K.A., Robertson, A., **2010**. Domoic acid and human exposure risks: A review. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 56, 218-230.

Lei, Z., Huhman, D.V., Sumner, L.W., **2011**. Mass spectrometry strategies in metabolomics. The Journal of biological chemistry 286, 25435-25442.

Lenoir, S., Ten-Hage, L., Turquet, J., Quod, J.P., Bernard, C., Hennion, M.C., **2004**. First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in Southwestern Indian Ocean. J. Phycol. 40, 1042-1051.

Lewis, R.J., Sellin, M., Poli, M.A., Norton, R.S., MacLeod, J.K., Sheil, M.M., **1991**. Purification and characterization of ciguatoxins from moray eel (*Lycodontis javanicus*, Muraenidae). Toxicon 29, 1115-1127.

Li, A., Ma, F., Song, X., Yu, R., **2011**. Dynamic adsorption of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in passive sampling relates to pore size distribution of aromatic adsorbent. Journal of chromatography. A 1218, 1437-1442.

Li, Z., Mengmeng, G., Shouguo, Y., Qingyin, W., Zhijun, T., **2010**. Investigation of pectenotoxin profiles in the Yellow Sea (China) using a passive sampling technique. Marine drugs 8, 1263-1272.

Lopez-Rivera, A., O'Callaghan, K., Moriarty, M., O'Driscoll, D., Hamilton, B., Lehane, M., James, K.J., Furey, A., **2009**. First evidence of azaspiracids (AZAs): A family of lipophilic polyether marine toxins in scallops (*Argopecten purpuratus*) and mussels (*Mytilus chilensis*) collected in two regions of Chile. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 55, 692-701.

Lu, C.K., Lee, G.H., Huang, R., Chou, H.N., **2001**. Spiro-prorocentrimine, a novel macrocyclic lactone from a benthic *Prorocentrum* sp. of Taiwan. Tetrahedron Lett. 42, 1713-1716.

-M-

MacKenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P., McNabb, P., Selwood, A., **2004**. Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): a new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 44, 901-918.

MacKenzie, L., Holland, P., McNabb, P., Beuzenberg, V., Selwood, A., Suzuki, T., **2002**. Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 40, 1321-1330.

MacKenzie, L.A., **2010**. In situ passive solid-phase adsorption of micro-algal biotoxins as a monitoring tool. Current opinion in biotechnology 21, 326-331.

MacKenzie, L.A., Selwood, A.I., McNabb, P., Rhodes, L., **2011**. Benthic dinoflagellate toxins in two warm-temperate estuaries: Rangaunu and Parengarenga Harbours, Northland, New Zealand. Harmful Algae 10, 559-566.

Madalinski, G., Godat, E., Alves, S., Lesage, D., Genin, E., Levi, P., Labarre, J., Tabet, J.C., Ezan, E., Junot, C., **2008**. Direct introduction of biological samples into a LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer as a tool for fast metabolome analysis. Analytical chemistry 80, 3291-3303.

Maeda, M., Kodama, T., Tanaka, T., Yoshizumi, H., Takemoto, T., Nomoto, K., Fujita, T., **1986**. Structures of isodomoic acids A, B and C, novel insecticidal amino acids from the red alga *Chondria armata*. Chem. Pharm. Bull 34, 4892-4895.

Makarov, A., Muenster, H., **2006**. Application note: Breakthrough technology for bottom-up proteomics and small molecule research. American laboratory website. Last accessed 7th October 2015. <http://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/18815-Breakthrough-Technology-for-Bottom-Up-Proteomics-and-Small-Molecule-Research/>.

Maranda, L., Shimizu, Y., **1987**. Diarrhetic shellfish poisoning in Narragansett Bay. Estuaries 10, 298-302.

Marasigan, A.N., Sato, S., Fukuyo, Y., Kodama, M., **2001**. Accumulation of a high level of diarrhetic shellfish toxins in the green mussel *Perna viridis* during a bloom of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis miles* in Sapijan Bay, Panay Island, the Philippines. Fish. Sci. 67, 994-996.

Marchese, S., Perret, D., Gentili, A., Curini, R., Pastori, F., **2003**. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in surface water and wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Chromatographia 58, 263-269.

Marrouchi, R., Benoit, E., Le Caer, J.-P., Belayouni, N., Belghith, H., Molgo, J., Kharrat, R., **2013**. Toxic C17-Sphinganine Analogue Mycotoxin, Contaminating Tunisian Mussels, Causes Flaccid Paralysis in Rodents. Marine drugs 11, 4724-4740.

Martinez Bueno, M.J., Aguera, A., Jose Gomez, M., Dolores Hernando, M., Garcia-Reyes, J.F., Fernandez-Alba, A.R., **2007**. Application of liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry to the determination of pharmaceuticals and related contaminants in wastewater. Analytical chemistry 79, 9372-9384.

McCarron, P., Giddings, S.D., Quilliam, M.A., **2011**. A mussel tissue certified reference material for multiple phycotoxins. Part 2: liquid chromatography-mass spectrometry, sample extraction and quantitation procedures. Analytical and bioanalytical chemistry 400, 835-846.

McCarron, P., Kilcoyne, J., Miles, C.O., Hess, P., **2009**. Formation of azaspiracids-3, -4, -6, and -9 via decarboxylation of carboxyazaspiracid metabolites from shellfish. J. Agric. Food. Chem. 57, 160-169.

McCarron, P., Rourke, W.A., Hardstaff, W., Pooley, B., Quilliam, M.A., **2012**. Identification of Pinnatoxins and Discovery of Their Fatty Acid Ester Metabolites in Mussels (*Mytilus edulis*) from Eastern Canada. Journal of agricultural and food chemistry 60, 1437-1446.

McCarron, P., Wright, E., Quilliam, M.A., **2014**. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry of Domoic Acid and Lipophilic Shellfish Toxins with Selected Reaction Monitoring and Optional Confirmation by Library Searching of Product Ion Spectra. Journal of Aoac International 97, 316-324.

McCarthy, M., van Pelt, F.N.A.M., Bane, V., O'Halloran, J., Furey, A., **2014**. Application of passive (SPATT) and active sampling methods in the profiling and monitoring of marine biotoxins. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 89, 77-86.

McNabb, P., Selwood, A.I., Holland, P.T., **2005**. Multiresidue method for determination of algal toxins in shellfish: Single-laboratory validation and interlaboratory study. Journal of Aoac International 88, 761-772.

Meyer, H., Liebeke, M., Lalk, M., **2010**. A protocol for the investigation of the intracellular *Staphylococcus aureus* metabolome. Analytical biochemistry 401, 250-259.

Miege, C., Budzinski, H., Jacquet, R., Soulier, C., Pelte, T., Coquery, M., **2012**. Polar organic chemical integrative sampler (POCIS): application for monitoring organic micropollutants in wastewater effluent and surface water. Journal of Environmental Monitoring 14, 626-635.

Miles, C.O., Wilkins, A.L., Hawkes, A.D., Selwood, A.I., Jensen, D.J., Munday, R., Cooney, J.M., Beuzenberg, V., **2005**. Polyhydroxylated amide analogs of yessotoxin from *Protoceratium reticulatum*. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 45, 61-71.

Miles, C.O., Wilkins, A.L., Munday, R., Dines, M.H., Hawkes, A.D., Briggs, L.R., Sandvik, M., Jensen, D.J., Cooney, J.M., Holland, P.T., Quilliam, M.A., MacKenzie, A.L., Beuzenberg, V., Towers, N.R., **2004**. Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 43, 1-9.

Moffitt, C.M., Cajas-Cano, L., **2014**. Blue Growth: The 2014 FAO State of World Fisheries and Aquaculture. Fisheries 39, 552-553.

Molgo, J., Girard, B., Benoit, E., 2007. Cyclic imines: An insight into this emerging group of bioactive marine toxins, in: L., B. (Ed.), Phycotoxins, Chemistry and Biochemistry. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 319-335.

Moore, R.E., Bartolini, G., **1981**. Structure of palytoxin. J. Am. Chem. Soc. 103, 2491-2494.

Moore, R.E., Scheuer, P.J., **1971**. Palytoxin: A new marine toxin from a coelenterate. Science 172, 495-498.

Morohashi, A., Satake, M., Murata, K., Naoki, H., Kaspar, H.F., Yasumoto, T., **1995**. Brevetoxin B3, a new brevetoxin analog isolated from the greenshell mussel perna canaliculus involved in neurotoxic shellfish poisoning in new zealand. Tetrahedron Letters 36, 8995-8998.

Muñoz, P., Avaria, S., Sievers, H., Prado, R., **1992**. Presencia de dinoflagelados toxicos del genero *Dinophysis* en el seno Aysen, Chile. Rev. Biol. Mar. Valparaiso 27, 187-212.

Murata, M., Legrand, A.M., Ishibashi, Y., Fukui, M., Yasumoto, T., **1990**. Structures and configurations of ciguatoxin from the moray eel *Gymnothorax javanicus* and its likely precursor from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. J. Am. Chem. Soc. 112, 4380-4386.

Murata, M., Legrand, A.M., Ishibashi, Y., Yasumoto, T., **1989**. Structures of ciguatoxin and its congener. J. Am. Chem. Soc. 111, 8929-8931.

-N, O, P-

Nappo, M., Berkov, S., Codina, C., Avila, C., Messina, P., Zupo, V., Bastida, J., **2008**. Metabolite profiling of the benthic diatom *Cocconeis scutellum* by GC-MS. Journal of Applied Phycology 21, 295-306.

Nezan, E., Chomerat, N., **2011**. *Vulcanodinium rugosum* gen. nov., sp. nov. (Dinophyceae): a new marine dinoflagellate from the French Mediterranean coast. Cryptogamie Algologie 32, 3-18.

Onuma, Y., Satake, M., Ukena, T., Roux, J., Chanteau, S., Rasolofonirina, N., Ratsimaloto, M., Naoki, H., Yasumoto, T., **1999**. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. Toxicon 37, 55-65.

Orellana, G., Vanden Bussche, J., Van Meulebroek, L., Vandegheuchte, M., Janssen, C., Vanhaecke, L., **2014**. Validation of a confirmatory method for lipophilic marine toxins in shellfish using UHPLC-HR-Orbitrap MS. Analytical and bioanalytical chemistry 406, 5303-5312.

Oshima, Y., **1995**. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. J. AOAC Int. 78, 528-532.

Otero, A., Chapela, M.-J., Atanassova, M., Vieites, J.M., Cabado, A.G., **2011**. Cyclic Imines: Chemistry and Mechanism of Action: A Review. Chemical Research in Toxicology 24, 1817-1829.

Pardo, O., Yusà, V., León, N., Pastor, A., **2007**. Development of a pressurised liquid extraction and liquid chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for the determination of domoic acid in shellfish. Journal of Chromatography A 1154, 287-294.

Paredes, I., Rietjens, I.M.C.M., Vieites, J.M., Cabado, A.G., **2011**. Update of risk assessments of main marine biotoxins in the European Union. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 58, 336-354.

Paz, B., Riobo, P., Fernandez, A.L., Fraga, S., Franco, J.M., **2004**. Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 44, 251-258.

Penna, A., Vila, M., Fraga, S., Giacobbe, M.G., Andreoni, F., Riobo, P., Vernesi, C., **2005**. Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8s rDNA sequences. J. Phycol. 41, 212-225.

Petrovic, M., Farre, M., Lopez de Alda, M., Perez, S., Postigo, C., Koeck, M., Radjenovic, J., Gros, M., Barcelo, D., **2010**. Recent trends in the liquid chromatography-mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples. Journal of Chromatography A 1217, 4004-4017.

Pierce, R.H., Henry, M.S., Blum, P.C., Hamel, S.L., Kirkpatrick, B., Cheng, Y.S., Zhou, Y., Irvin, C.M., Naar, J., Weidner, A., Fleming, L.E., Backer, L.C., Baden, D.G., **2005**. Brevetoxin composition in water and marine aerosol along a Florida beach: Assessing potential human exposure to marine biotoxins. Harmful Algae 4, 965-972.

Pizarro, G., Morono, A., Paz, B., Franco, J.M., Pazos, Y., Reguera, B., **2013**. Evaluation of passive samplers as a monitoring tool for early warning of dinophysis toxins in shellfish. Marine drugs 11, 3823-3845.

Pizarro, G., Paz, B., Franco, J.M., Suzuki, T., Reguera, B., **2008**. First detection of Pectenotoxin-11 and confirmation of OA-D8 diol-ester in *Dinophysis acuta* from European waters by LC-MS/MS. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 52, 889-896.

Plakas, S.M., Wang, Z., El Said, K.R., Jester, E.L.E., Granade, H.R., Flewelling, L., Scott, P., Dickey, R.W., **2004**. Brevetoxin metabolism and elimination in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) after controlled exposures to *Karenia brevis*. Toxicon 44, 667-685.

Poli, M.A., Lewis, R.J., Dickey, R.W., Musser, S.M., Buckner, C.A., Carpenter, L.G., **1997**. Identification of Caribbean ciguatoxins as the cause of an outbreak of fish poisoning among US soldiers in Haiti. Toxicon 35, 733-741.

-Q, R, S-

Quilliam, M., **2001**. Analytical chemistry of phycotoxins in seafood and drinking water. J. AOAC Int. 84, 1615-1615.

Quilliam, M.A., Hess, P., Dell'Aversano, C., **2001**. Recent developments in the analysis of phycotoxins by liquid chromatography - mass spectrometry. Chapter 11 in "Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the turn of the Millenium", editors: Willem J. de Koe, Robert A. Samson, Hans P. van Egmond, John Gilbert and Myrna Sabino. Proceedings of the Xth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins - 21-25 May, 2000 Guaruja (Brazil), pages 383-391, ISBN: 390-9014801-9014809.

Quilliam, M.A., Sim, P.G., McCulloch, A.W., McInnes, A.G., **1989**. High-performance liquid chromatography of domoic acid, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton. International Journal of Environmental Analytical Chemistry [Int. J. Environ. Anal. Chem.] 36, 139-154.

Quilliam, M.A., Wright, J.L.C., **1989**. The amnesic shellfish poisoning mystery. Anal. Chem. 61, 1053-1060.

Rehmann, N., Hess, P., Quilliam, M.A., **2008**. Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels (*Mytilus edulis*) by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 22, 549-558.

Rhodes, L., McNabb, P., de Salas, M., Briggs, L., Beuzenberg, V., Gladstone, M., **2006**. Yessotoxin production by *Gonyaulax spinifera*. Harmful Algae 5, 148-155.

Rossini, G.P., Hess, P., **2010**. Phycotoxins: chemistry, mechanisms of action and shellfish poisoning. Exs 100, 65-122.

Roussary, A., Bouet, B., Salles, D., **2015**. Of Mice and Men: European Precautionary Standards Challenged by Uncertainty. J Agric Environ Ethics 28, 867-883.

Rundberget, T., Aasen, J.A., Selwood, A.I., Miles, C.O., **2011**. Pinnatoxins and spirolides in Norwegian blue mussels and seawater. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 58, 700-711.

Rundberget, T., Gustad, E., Samdal, I.A., Sandvik, M., Miles, C.O., **2009**. A convenient and cost-effective method for monitoring marine algal toxins with passive samplers. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 53, 543-550.

Satake, M., Fukui, M., Legrand, A.M., Cruchet, P., Yasumoto, T., **1998a**. Isolation and structures of new ciguatoxin analogs, 2,3-dihydroxyCTX3C and 51-hydroxyCTX3C, accumulated in tropical reef fish. Tetrahedron Lett. 39, 1197-1198.

Satake, M., MacKenzie, L., Yasumoto, T., **1997a**. Identification of Protoceratium reticulatum as the biogenetic origin of yessotoxin. Natural toxins 5, 164-167.

Satake, M., Morohashi, A., Oguri, H., Oishi, T., Hirma, M., Harada, N., Yasumoto, T., **1997b**. The absolute configuration of ciguatoxin. J. Am. Chem. Soc. 119, 11325-11326.

Satake, M., Murata, M., Yasumoto, T., **1993**. The structure of CTX3C, a ciguatoxin congener isolated from cultured *Gambierdiscus toxicus* Tetrahedron Lett. 34, 1975-1978.

Satake, M., Ofuji, K., Kevin, J., Furey, A., Yasumoto, T., **1998b**. New toxic event caused by Irish mussels, in: Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. IOC of UNESCO and Xunta de Galicia, Santiago de Compostela, Spain.

Schwartz, J.C., Senko, M.W., **2004**. Two-dimensional quadrupole ion trap operated as a mass spectrometer. Google Patents.

Seki, T., Satake, M., Mackenzie, L., Kaspar, H.F., Yasumoto, T., **1995**. Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New-Zealand oysters and the dinoflagellate, *Gymnodinium* sp Tetrahedron Letters 36, 7093-7096.

Selwood, A.I., Miles, C.O., Wilkins, A.L., van Ginkel, R., Munday, R., Rise, F., McNabb, P., **2010**. Isolation, structural determination and acute toxicity of pinnatoxins E, F and G. Journal of agricultural and food chemistry 58, 6532-6542.

Shea, D., Tester, P., Cohen, J., Kibler, S., Varnam, S., **2006**. Accumulation of brevetoxins by passive sampling devices. African Journal of Marine Science 28, 379-381.

Smayda, T.J., **2007**. Reflections on the ballast water dispersal - harmful algal bloom paradigm. Harmful Algae 6, 601-622.

Sommer, H., Meyer, K.F., **1937**. Paralytic Shellfish Poisoning. A.M.A. Arch. Path., 560-598.

Sournia, A., Chretiennotdinet, M.J., Ricard, M., **1991**. Marine phytoplankton - How many species in the world ocean. Journal of Plankton Research 13, 1093-1099.

Stabell, O.B., Steffenak, I., Aune, T., **1992**. An evaluation of the mouse bioassay applied to extracts of diarrhetic shellfish toxins. Food and Chemical Toxicology 30, 139-144.

Stobo, L.A., Lacaze, J.P.C.L., Scott, A.C., Gallacher, S., Smith, E.A., Quilliam, M.A., **2005**. Liquid chromatography with mass spectrometry-detection of lipophilic shellfish toxins. J. AOAC Int. 88, 1371-1382.

Sue, T., Obolonkin, V., Griffiths, H., Villas-Boas, S.G., **2011**. An exometabolomics approach to monitoring microbial contamination in microalgal fermentation processes by using metabolic footprint analysis. Applied and environmental microbiology 77, 7605-7610.

Suzuki, T., Walter, J.A., LeBlanc, P., MacKinnon, S., Miles, C.O., Wilkins, A.L., Munday, R., Beuzenberg, V., MacKenzie, A.L., Jensen, D.J., Cooney, J.M., Quilliam, M.A., **2006**. Identification of pectenotoxin-11 as 34S-hydroxypectenotoxin-2, a new pectenotoxin analogue in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand. Chemical Research in Toxicology 19, 310-318.

Suzuki, T., Igarashi, T., Ichimi, K., Watai, M., Suzuki, M., Ogiso, E., Yasumoto, T., **2005**. Kinetics of diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid, dinophysistoxin-1, pectenotoxin-6 and yessotoxin in scallops *Patinopecten yessoensis*. Fisheries Science 71, 948-955.

Suzuki, T., Mitsuya, T., Matsubara, H., Yamasaki, M., **1998**. Determination of pectenotoxin-2 after solid-phase extraction from seawater and from the dinoflagellate

Dinophysis fortii by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultraviolet detection - Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-6 in scallops. Journal of Chromatography A 815, 155-160.

Suzuki, T., Watanabe, R., 2012. Shellfish toxin monitoring system in Japan and some Asian countries, in: Cabado, A.G., Vieites, J.M. (Eds.), New Trends in Marine and Freshwater Toxins: Food Safety Concerns. Nova Science Publishers Inc.

-T-

Tachibana, K., Scheuer, P.J., Tsukitani, Y., Kikuchi, H., Van Engen, D., Clardy, J., Gopichand, Y., Schmitz, F.J., **1981**. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. J. Am. Chem. Soc 103, 2469-2471.

Tadano, K., Yasuda, K., Ushiyama, H., Nishima, T., **1991**. Effect of calcium on the mouse bioassay for paralytic shellfish poison (hygienic studies on health food (III)) Journal of the Food Hygienic Society of Japan 32, 402-407.

Takada, N., Umemura, N., Suenaga, K., Uemura, D., **2001**. Structural determination of pteriatoxins A, B and C, extremely potent toxins from the bivalve *Pteria penguin*. Tetrahedron Lett. 42, 3495-3497.

These, A., Klemm, C., Nausch, I., Uhlig, S., **2011**. Results of a European interlaboratory method validation study for the quantitative determination of lipophilic marine biotoxins in raw and cooked shellfish based on high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Part I: collaborative study. Analytical and bioanalytical chemistry 399, 1245-1256.

These, A., Scholz, J., Preiss-Weigert, A., **2009**. Sensitive method for the determination of lipophilic marine biotoxins in extracts of mussels and processed shellfish by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on enrichment by solid-phase extraction. Journal of Chromatography A 1216, 4529-4538.

Tibbetts, J., **1998**. Toxic tides. Environmental Health Perspectives 106, A326-A331.

Tillmann, U., Elbrachter, M., Krock, B., John, U., Cembella, A., **2009**. *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. Eur. J. Phycol. 44, 63-79.

Torigoe, K., Murata, M., Yasumoto, T., Iwashita, T., **1988**. Prorocentrolide, a toxic nitrogenous macrocycle from a marine dinoflagellate, *Prorocentrum-lima*. Journal of the American Chemical Society 110, 7876-7877.

Trainer, V.L., Bates, S.S., Lundholm, N., Thessen, A.E., Cochlan, W.P., Adams, N.G., Trick, C.G., **2012**. Pseudo-nitzschia physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. Harmful Algae 14, 271-300.

Tubaro, A., Sosa, S., Carbonatto, M., Altinier, G., Vita, F., Melato, M., Satake, M., Yasumoto, T., **2003**. Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 41, 783-792.

Turrell, E., Stobo, L., Lacaze, J.P., Piletsky, S., Piletska, E., **2008**. Optimization of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Development of Solid-Phase Extraction for the Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins. Journal of Aoac International 91, 1372-1386.

Twiner, M.J., Rehmann, N., Hess, P., Doucette, G.J., **2008**. Azaspiracid shellfish poisoning: a review on the chemistry, ecology, and toxicology with an emphasis on human health impacts. Mar. Drugs 6, 39-72.

-u, v-

Uemura, D., **2006**. Bioorganic studies on marine natural products - Diverse chemical structures and bioactivities. Chemical Record 6, 235-248.

Uemura, D., Chou, T., Haino, T., Nagatsu, A., Fukuzawa, S., Zheng, S., Chen, H., **1995**. Pinnatoxin A: a toxic amphoteric macrocycle from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. J. Am. Chem. Soc. 117, 1155-1156.

Uemura, D., Ueda, K., Hirata, Y., Naoki, H., Iwashita, T., **1981**. Further studies on Palytoxin. 2. Structure of Palytoxin. Tetrahedron Letters 22, 2781-2784.

van de Riet, J., Gibbs, R.S., Muggah, P.M., Rourke, W.A., MacNeil, J.D., Quilliam, M.A., **2011**. Liquid Chromatography Post-Column Oxidation (PCOX) method for the determination of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, oysters, and scallops: collaborative study. J. AOAC Int. 94, 1154-1176.

Van den Top, H.J., Gerssen, A., McCarron, P., van Egmond, H.P., **2011**. Quantitative determination of marine lipophilic toxins in mussels, oysters and cockles using liquid chromatography-mass spectrometry: inter-laboratory validation study. Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment 28, 1745-1757.

Van Dolah, F.M., **2000**. Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence. Environmental Health Perspectives 108, 133-141.

van Dolah, F.M., Fire, S.E., Leighfield, T.A., Mikulski, C.M., Doucette, G.J., **2012**. Determination of Paralytic Shellfish Toxins in Shellfish by Receptor Binding Assay: Collaborative Study. Journal of AOAC International 95, 795-812.

van Dolah, F.M., Leighfield, T.A., Doucette, G.J., Bean, L., Niedzwiadek, B., Rawn, D.F.K., **2009**. Single-laboratory validation of the microplate receptor binding assay for paralytic shellfish toxins in shellfish. J. AOAC Int. 92, 1705-1713.

Vidoudez, C., Pohnert, G., **2011**. Comparative metabolomics of the diatom *Skeletonema marinoi* in different growth phases. Metabolomics 8, 654-669.

Vilarino, N., Carmen Louzao, M., Fraga, M., Rodriguez, L.P., Botana, L.M., **2013**. Innovative detection methods for aquatic algal toxins and their presence in the food chain. Analytical and bioanalytical chemistry 405, 7719-7732.

Villar-Gonzalez, A., Luisa Rodriguez-Velasco, M., Gago-Martinez, A., **2011**. Determination of Lipophilic Toxins by LC/MS/MS: Single-Laboratory Validation. Journal of Aoac International 94, 909-922.

Villas-Boas, S.G., Mas, S., Akesson, M., Smedsgaard, J., Nielsen, J., **2005**. Mass spectrometry in metabolome analysis. Mass spectrometry reviews 24, 613-646.

Vlami, A., Katikou, P., Rodriguez, I., Rey, V., Alfonso, A., Papazachariou, A., Zacharaki, T., Botana, A.M., Botana, L.M., **2015**. First Detection of Tetrodotoxin in Greek Shellfish by UPLC-MS/MS Potentially Linked to the Presence of the Dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. Toxins 7, 1779-1807.

-W, Y, Z-

Walter, J.A., Falk, M., Wright, J.L.C., **1994**. Chemistry of the shellfish toxin domoic acid: characterization of related compounds. Can. J. Chem. 72, 430-436.

Wang, Z., Plakas, S.M., El Said, K.R., Jester, L.E., Granade, H.R., Dickey, R.W., **2004**. LC/MS analysis of brevetoxin metabolites in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Toxicon 43, 455-465.

Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C., Neilan, B.A., **2010**. Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs. Marine drugs 8, 2185-2211.

Wode, F., Reilich, C., van Baar, P., Dunnbier, U., Jekel, M., Reemtsma, T., **2012**. Multiresidue analytical method for the simultaneous determination of 72 micropollutants in aqueous samples with ultra high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. Journal of chromatography. A 1270, 118-126.

Wolfender, J.-L., Marti, G., Thomas, A., Bertrand, S., **2015**. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. Journal of Chromatography A 1382, 136-164.

Wu, H.Y., Guo, M.M., Tan, Z.J., Cheng, H.Y., Li, Z.X., Zhai, Y.X., **2014**. Liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry for multiclass screening and identification of lipophilic marine biotoxins in bivalve mollusks. Journal of Chromatography A 1358, 172-180.

Yasumoto, T., Murata, M., Lee, J.-S., Torigoe, K., **1989**. Polyether toxins produced by dinoflagellates. in: "Mycotoxins and Phycotoxins '88", eds.: Natori S., Hashimoto K./Ueno Y., 375-382.

Yasumoto, T., Nakajima, I., Bagnis, R., Adachi, R., **1977**. Finding of a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 43, 1021-1026.

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

Zaman, L., Arakawa, O., Shimosu, A., Onoue, Y., Nishio, S., Shida, Y., Noguchi, T., **1997**. Two new isomers of domoic acid from a red alga, *Chondria armata*. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 35, 205-212.

Zhao, H., Qiu, J., Fan, H., Li, A., **2013**. Mechanism and application of solid phase adsorption toxin tracking for monitoring microcystins. Journal of Chromatography A 1300, 159-164.

Thèse de Doctorat

Suzie Zita ZENDONG

Développement de méthodes de spectrométrie de masse haute résolution pour le criblage de phycotoxines dans les échantillons biologiques et environnementaux

High resolution mass spectrometry for the screening of phycotoxins in biological and environmental samples

Résumé

Les phycotoxines, métabolites de microalgues peuvent s'accumuler dans les mollusques bivalves qui consommés, peuvent être à l'origine d'intoxications humaines. L'objectif de ce travail était de développer des méthodes de spectrométrie de masse haute résolution pour l'analyse de phycotoxines dans différents échantillons environnementaux. Dans un premier temps, l'échantillonnage passif a été mis en place et permis de détecter les toxines de microalgues pélagiques (vivant dans la colonne d'eau) et benthiques (vivant accrochées à un substrat) en France. Des méthodes d'analyse par spectrométrie de masse basse (SMBR) et haute résolution (SMHR) ont par la suite été développées. L'analyse comparative ciblée d'échantillons de moules et d'échantillonneurs passifs, a permis de mettre en évidence la présence d'effets matrices, indépendamment de l'instrument utilisé. Ces effets matrices se sont néanmoins avérés significativement moins importants avec les échantillonneurs passifs comparé aux moules. Cette constatation a présenté un intérêt dans le cadre de l'analyse non-ciblée. L'analyse non-ciblée est l'un des avantages de la SMHR sur la SMBR. En effet, alors que l'analyse ciblée ne permet de détecter que les toxines connues et/ou réglementées spécifiquement recherchées, en analyse non-ciblée tous les composés ionisables présents dans un échantillon peuvent être détectés. Cette dernière approche a été mise en place à partir d'extrait d'échantillonneurs passifs déployés sur les côtes françaises et nigérianes, et permis, grâce à des outils statistiques une différenciation spatiale et temporelle de ces environnements marins selon leur profils chimiques.

Mots clés

Echantillonnage passif, Analyse ciblée, Coquillages, Profilage chimique, Effets matrices, Métabolomique environnementale, Spectrométrie de masse haute résolution, Analyse non-ciblée.

Abstract

Phycotoxins are algal metabolites that can accumulate in seafood and, following consumption, cause human intoxication. The purpose of this work was to develop high resolution mass spectrometry methods for the analysis of phycotoxins in several environmental samples. Firstly, passive sampling was developed and enabled the detection of toxins from pelagic (living in the water column) and benthic (living on substrate) microalgae in France. Low resolution (LRMS) and high resolution (HRMS) mass spectrometry methods were then developed. The comparative targeted analysis of mussels and passive samplers allowed for highlighting the presence of matrix effects, irrespective of the instrument used. These matrix effects were however less pronounced with passive samplers than with mussels. Hence, passive sampling in combination with HRMS appears to be a useful tool in untargeted analysis of the marine environment. The advantage of HRMS over LRMS is the possibility of doing both targeted and untargeted analyses. Indeed, while one can only detect known/regulated toxins that were looked for in targeted analysis, in the untargeted approach all ionisable compounds present in a sample can be detected. This latter approach was implemented using extracts from passive samplers that had been deployed in French and Nigerian coastal areas. Thanks to the use of statistical tools, spatial and temporal differentiation of chemical profiles was achieved in these marine environments.

Key Words

Passive sampling, Targeted analysis, Shellfish, Chemical profiling, Matrix effects, Environmental metabolomic, High resolution mass spectrometry, Untargeted analysis