

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Développement des approches ciblées et non-ciblées en LC-HRMS pour traquer les pesticides dans l'alimentation

**Mise en évidence de l'importance du choix de l'échantillon de
référence pour l'élucidation d'une TIAC**

Laboratoire Sécurité des Aliments

Julien PARINET

Colloque INERIS: Améliorer le diagnostic des polluants organiques environnementaux
Ministère de l'Agriculture 78 rue de Varennes – 75 007 Paris

6 Février 2018

Sommaire

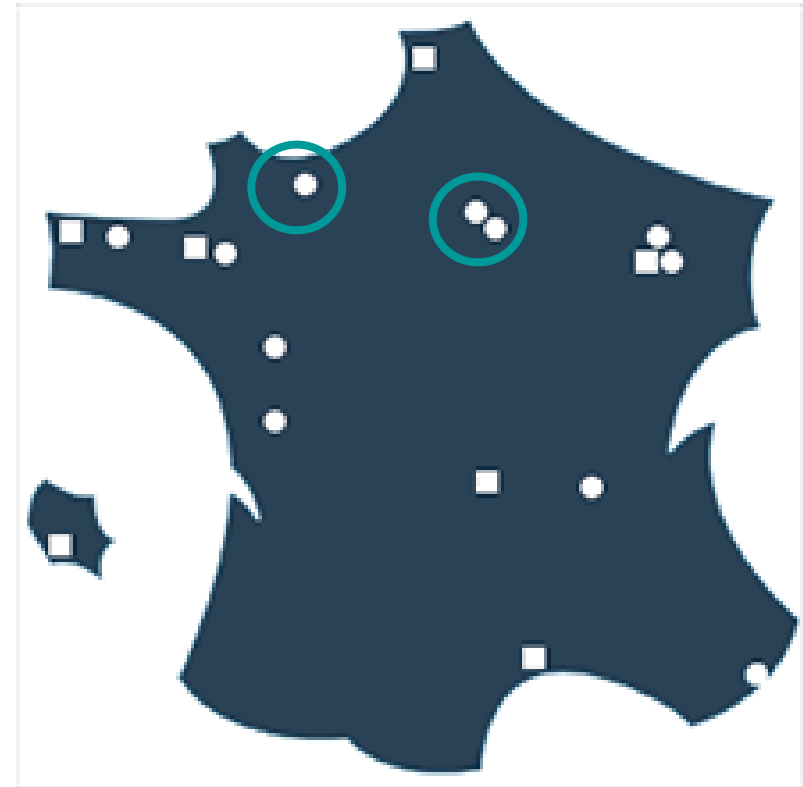
1. L'ANSES en quelques mots

2. Contexte général des approches ciblées et non-ciblées appliquées aux pesticides présents dans l'alimentation

3. Elucidation d'une TIAC et choix de la référence

Quelques chiffres

16 sites – 2 pour le Laboratoire de Sécurité des Aliments



Angers, Boulogne sur mer, Dozulé, Fougères, Lyon, Maisons Alfort, Nancy, Niort, Ploufragan, Plouzané, Sophia

Missions

L' ANSES contribue à assurer:

- la santé humaine et la sécurité dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation
- la protection de la santé et du bien-être animal
- la protection de la santé végétale



Éclairer les pouvoirs publics

Évaluer les risques
sur la santé et la nutrition humaine

Conduire des missions de surveillance
de la santé publique

Initier, coordonner des
projets de recherche



Assurer les missions de
laboratoire de référence

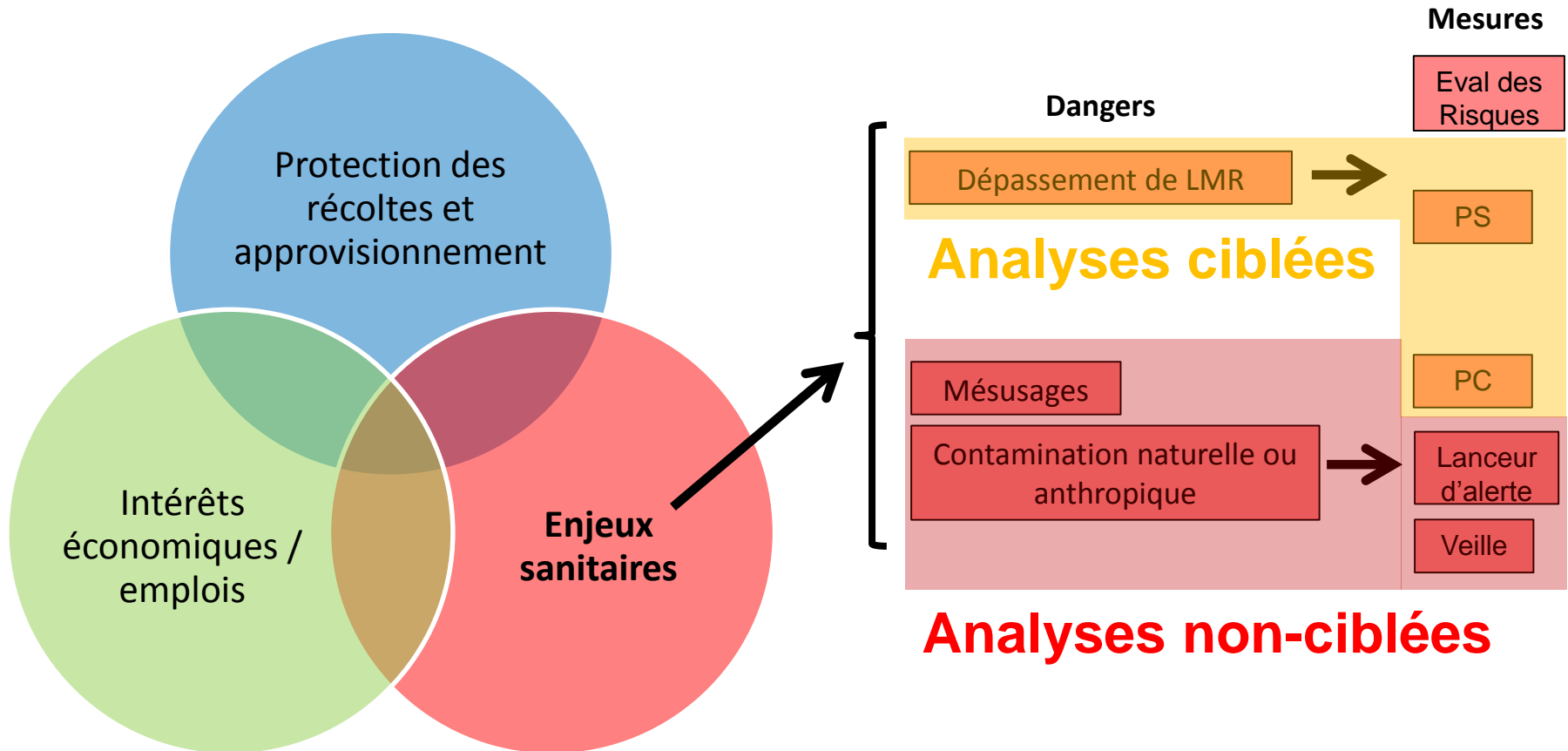
Organiser des ateliers et contribuer
aux débats publics

Autoriser la mise sur le marché de produits
pharmaceutiques vétérinaires,
phytopharmaceutiques, biocides

Collaborer avec les agences européennes et internationales (EFSA,
ECHA, EMA, EEA, EU-OSHA, and ECDC)

Contexte

Pesticides dans l'alimentation :



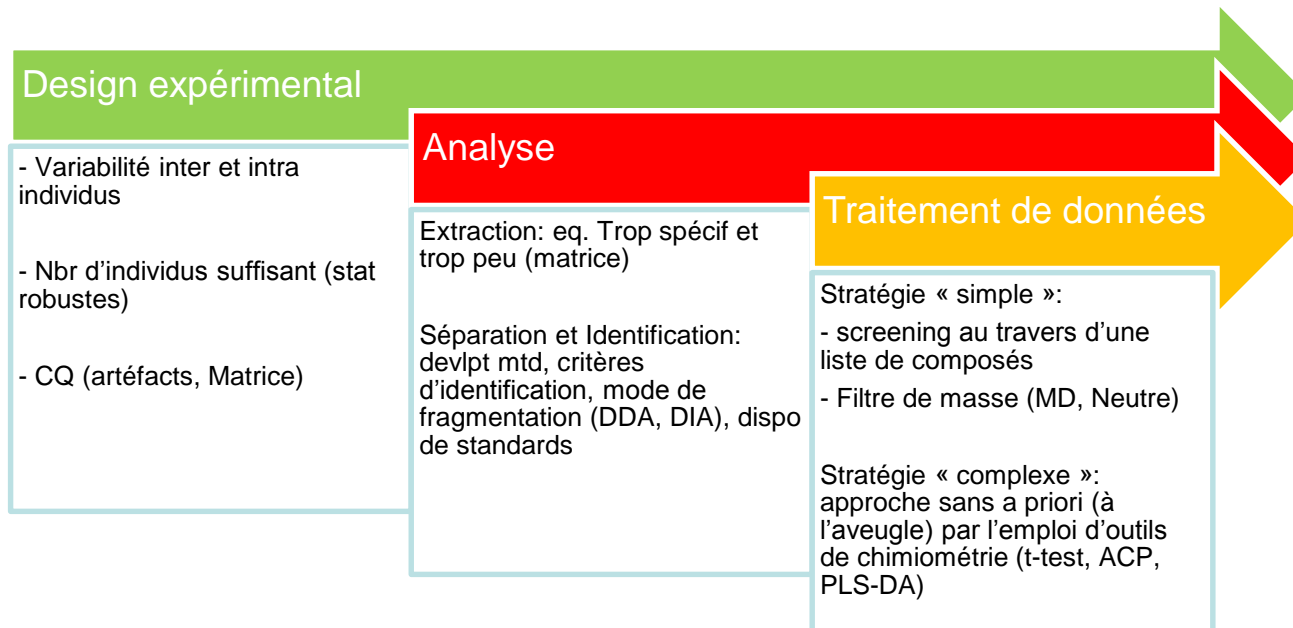
Contexte

Pesticides dans l'alimentation :

- Analyses ciblées: « On sait ce qu'on cherche et on ne cherche que ça »
LC-MS/MS en mode MRM
- Analyses non-ciblées: « On ne sait pas ce qu'on cherche mais on sait qu'il y a un problème... »
LC-HRMS/MS

Pesticides dans l'alimentation :

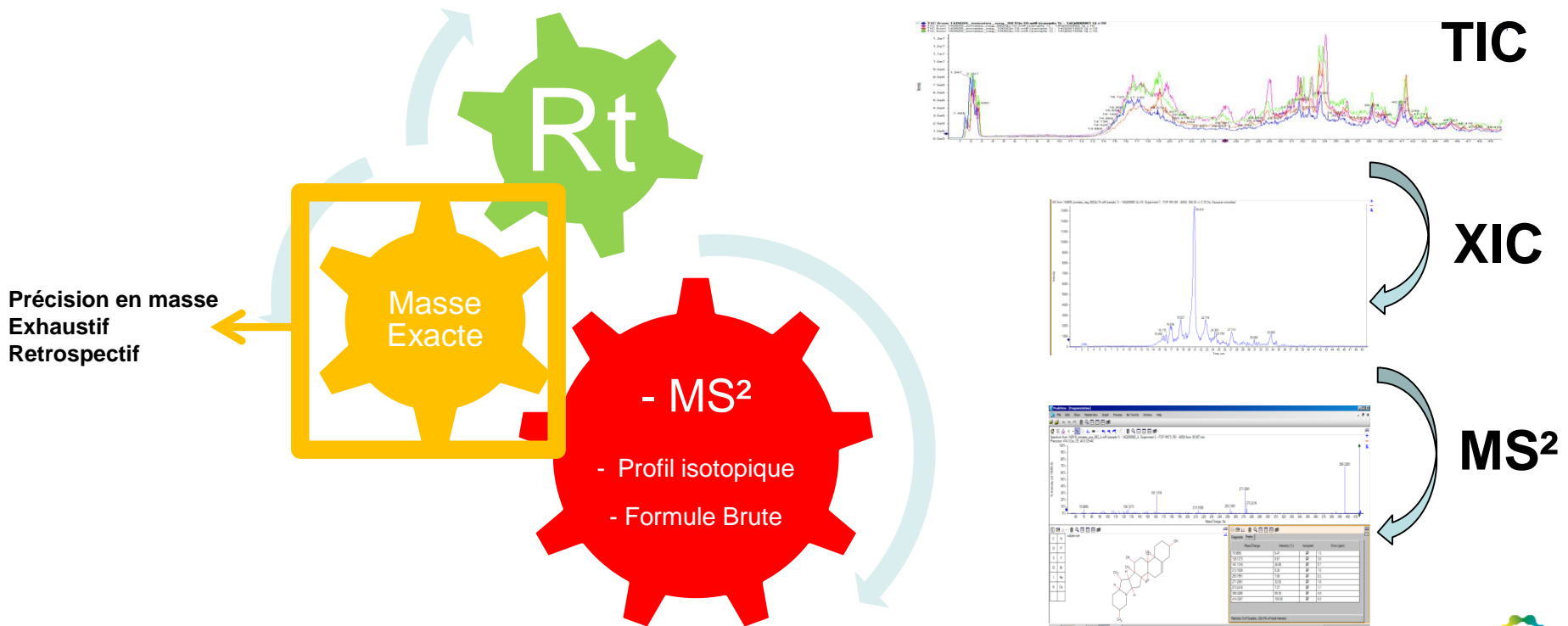
- Analyses non-ciblées: Problématiques



Contexte

Pesticides dans l'alimentation :

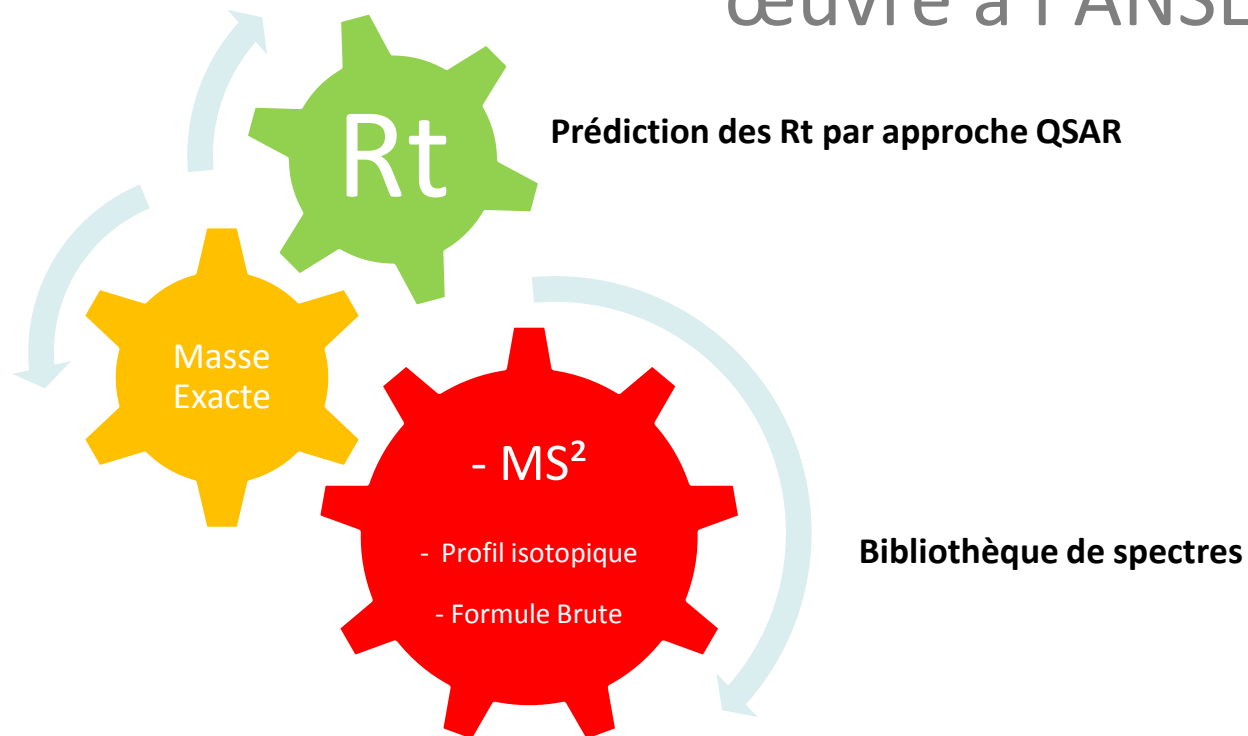
- Analyses non-ciblées: Critères d'identification



Contexte

Pesticides dans l'alimentation :

- Analyses non-ciblées: stratégies mises en œuvre à l'ANSES



Elucidation d'une TIAC et choix de la référence

Mise en situation (cas factice/ simulation):

- Toxico-infection alimentaire ayant touchée plusieurs personnes suite à l'ingestion d'huitres et de moules. Les symptômes laissent penser qu'il s'agit de pesticides (1 à 5 M de cas/ an, OMS)
- 1367 substances actives (EU Pesticides database) sont répertoriées
- LSAI dispose de 200 substances... **Résultats négatifs**

Non-ciblé « à l'aveugle »

Elucidation d'une TIAC et choix de la référence

Objectifs :

1. Se placer dans les conditions les plus difficiles mais potentiellement réelles
2. Tester un processus d'élucidation (« workflow »)
3. Mettre en évidence le rôle joué par la « pollution » matricielle dans la complexité de résolution d'un tel cas → POC
4. Sélectionner de manière optimale l'échantillon de référence (t-test) → faciliter l'élucidation et gagner du temps

Elucidation d'une TIAC et choix de la référence

Echantillons:

- Moules:

3 sites (France, Chili et inconnu)

10 g d'échantillon (>1 individu)

- huitres:

4 sites (France)

10 g d'échantillon (>1 individu)

Elucidation d'une TIAC et choix de la référence

Matériels et méthodes :

- 1) 10 g échantillons mixés homogénéisés
- 2) Extraction Hexane/ Acetone
- 3) Extraction Acétate d'Ethyle/ Cyclohexane
- 4) Regroupe les extraits et évapore sous Azote
- 5) Reconstitution dans 10 mL MeOH, filtration 0,45 μm
- 6) 1 mL d'extrait ajoute Std Int (Chlorpyriphos Ethyl d10)

POC: 1 extrait de moule est évaporé et supplémenté avec 1 mL d'une solution de 15 organophosphorés à 10 ng.mL^{-1} dans le MeOH.
Idem pour les huitres

Test en « faux aveugle »

Elucidation d'une TIAC et choix de la référence

Matériels et méthodes:

- LC Ultimate 3000 HPLC system (Thermo Dionex, Sunnyvale, CA, USA)

Eau/ MeOH avec 0,1% Formate d'ammonium

Colonne C18

- HRMS 5600 quadrupole-TOFMS (Sciex, Concord, Canada) (+)

Information-dependent acquisition (IDA) mode: TOF as a survey scan (accumulation time 250 ms) and eight MS-MS-dependent experiments

Echantillons injectés aléatoirement.

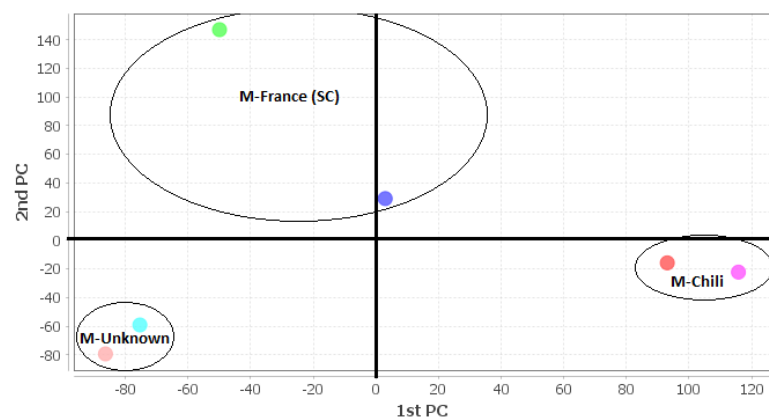
Contrôle du Rt et Erreur de masse du Std Int



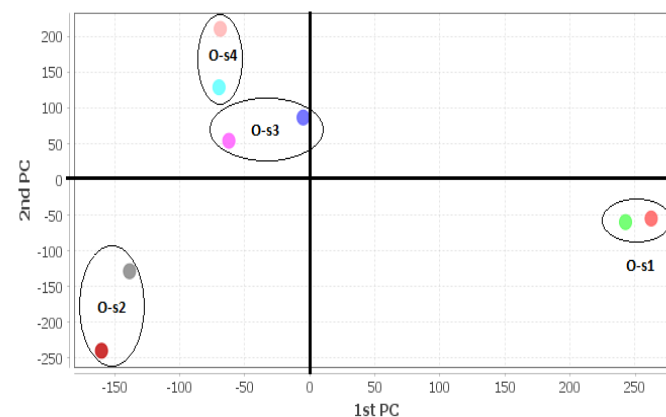
Elucidation d'une TIAC et choix de la référence

Résultats:

1. La variabilité matricielle



a



b

Figure 1. Score plot of mussel's (a) and oyster's (b) extracts analyzed by LC-HRMS

**Stratégie utile pour regrouper des individus similaires
+ PC1 et PC2 reflet de la matrice**

Elucidation d'une TIAC et choix de la référence

Résultats:

2. La variabilité matricielle et l'ajout d'un échantillon contaminé

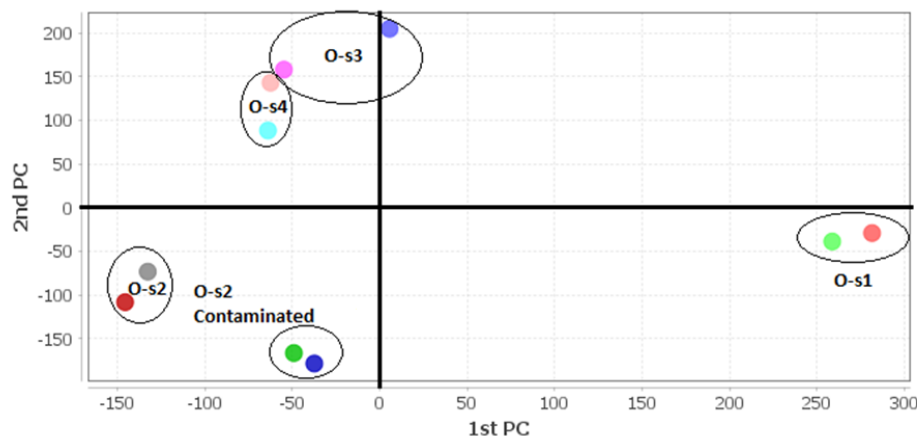


Figure 2. Score plot of uncontaminated (O-s1, O-s2, O-s3 and O-s4) and contaminated oyster's (O-s2 contaminated) extracts analyzed by LC-HRMS

PC1 et PC2 ne reflète pas l'opposition *contaminé* vs *non contaminé* mais plutôt la proximité matricielle

Elucidation d'une TIAC et choix de la référence

Résultats:

3. Choix de la référence

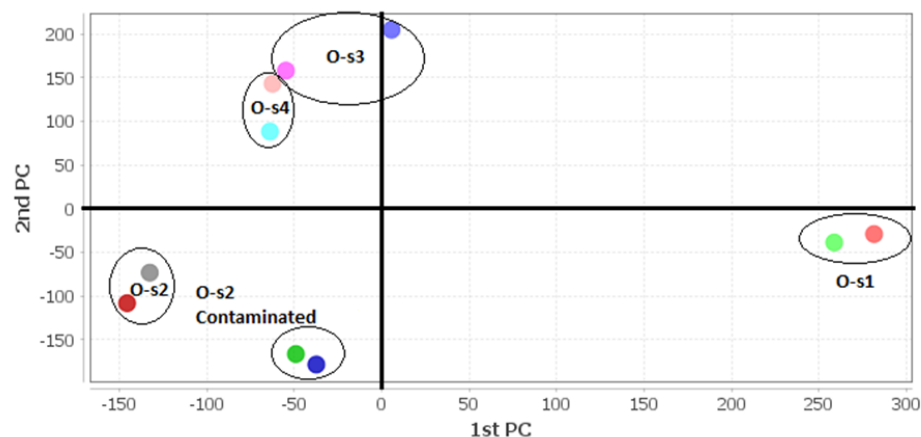


Figure 3. Score plot of uncontaminated (O-s1, O-s2, O-s3 and O-s4) and contaminated oyster's (O-s2 contaminated) extracts analyzed by LC-HRMS

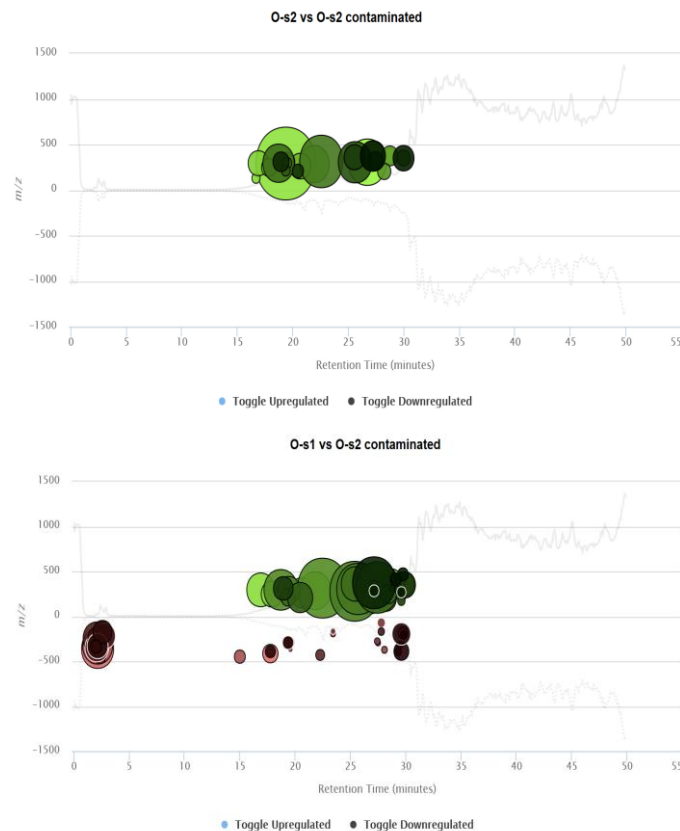


Figure 4: Cloud Plots and pairwise t-test comparison from XCMS®

O-s2 vs O-s2 contaminé : 24 signaux d'intérêts

O-s1 vs O-s2 contaminé : 50

Elucidation d'une TIAC et choix de la référence

Résultats:

3. Choix de la référence

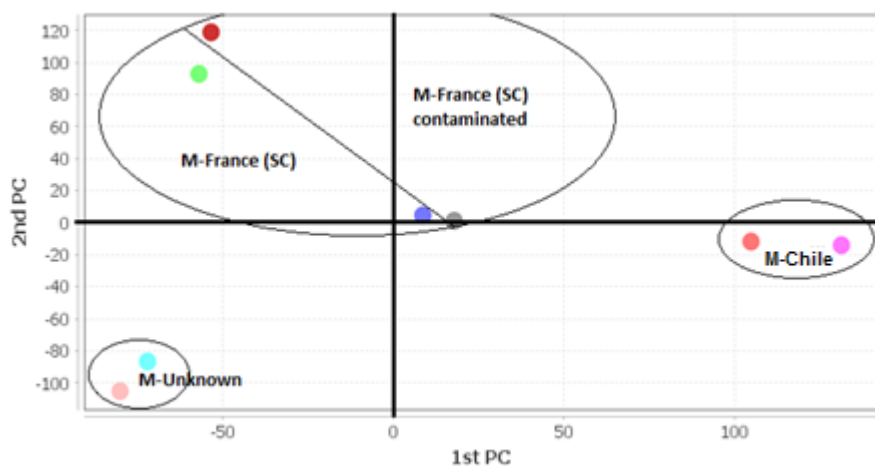


Figure 5. Score plot of uncontaminated (M-France (SC), M-Chile and M-Unknown) and contaminated (M-France (SC) contaminated) mussel extracts analyzed by LC-HRMS

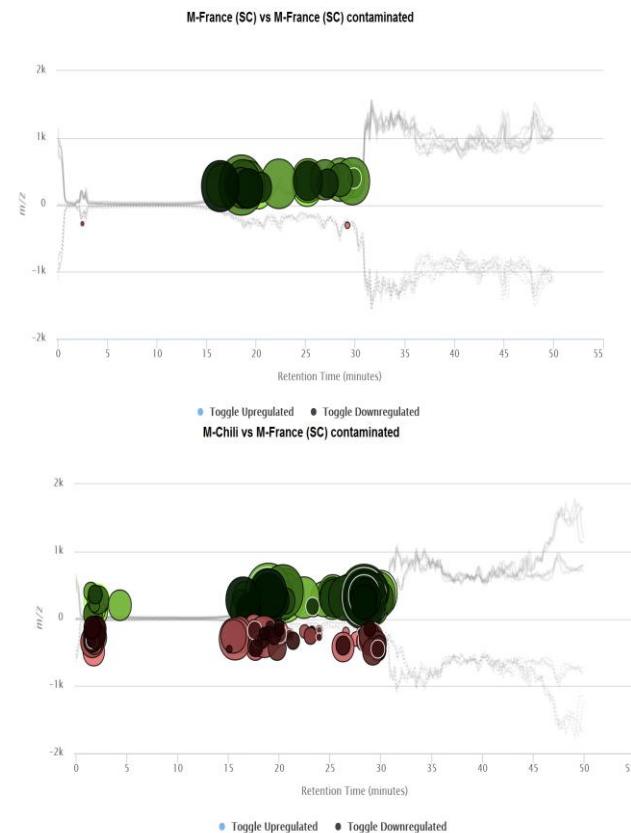


Figure 6: Cloud Plots and pairwise t-test comparison from XCMS®

M-France vs M-France contaminé : 28 signaux d'intérêts
M-Chili vs M-France contaminé : 148!



Elucidation d'une TIAC et choix de la référence

Conclusions:

- Echantillons sont « uniques » (matrice)
- Nécessite de bien choisir sa référence (travail amont), tous les échantillons ne sont pas égaux
- Les appareils de HRMS et les approches non-ciblées associées sont puissants mais triple coût (financier, technique et temps)

Conclusion Générale

- Non-ciblé : approche holistique
(échantillonnage → extraction → analyse → data mining)
- Non-ciblé avec liste de composés → onéreux, jamais exhaustif, prend beaucoup de temps malgré tout (Rt, M exacte, MS², Profil isotopique, FB)
- Non-ciblé à l'aveugle → approche universelle mais nécessite précautions (échantillonnage), demande un travail de chimiométrie et malgré tout nécessite Fact. Id.(Rt, M exacte, MS², Profil isotopique, FB) pour garantir l'identification