

Florence Mondeguer
Gilberte Mestres
Caroline Rouland
Monique Montagu
Hélène Maillols

RST.DEL/0/PN


Validation d'un procédé automatisé¹ d'extraction sur phase solide de glandes digestives de moules pour l'identification et la quantification des dinophysistoxines en LC/ESI/SM² par piégeage d'ions quadripolaire²

¹* (Aspec XLI Gilson)

²* (LCQ™ ThermoFinnigan Corporation)

Marque déposée d'un détecteur de masse pour chromatographie liquide

Marque déposée d'un détecteur de masse pour chromatographie liquide



OKADAIC ACID
CAS Reg. No. : 78111-17-8
Polyether derivative of C-38 fatty acid, C₄₄H₆₈O₁₃, from the microorganism *Prorocentrum* sp.
Molecular Weight : 805.0.
Biological Activity : Very potent inhibitor of protein phosphatases-1 (PP1) and -2A (PP2A) that also stimulates the phosphorylation of many proteins.
Causes a durable contraction of isolated vascular smooth muscles from human umbilical arteries (0.1-100 μM) and rabbit aorta (10 μM), indicating that myosin P-light chain phosphorylation is increased.
Causes Diarrhetic Shell fish Poisoning (DSP), probably by stimulating the phosphorylation of proteins that control sodium secretion by intestinal cells. Powerful tumour promoter. In two-stage carcinogenesis experiments on mouse skin, is of comparable potency to agents like phorbol esters, which exert their effects by activating protein kinase C.
It reproduces the effects of insulin on glucose transport in adipocytes.
Diffuses through the cell membrane....

Remerciement :

Merci à Hélène Maillols (Laboratoire de Technique Pharmaceutique Industrielle – Faculté de Pharmacie. Université de Montpellier) pour m’ avoir soutenue dans cette validation, aid  e, orient  e et tant appris sur les statistiques et le référentiel normatif.

Merci aussi à Monique Montagu (laboratoire de Chimie analytique - Faculté de pharmacie. Université de Nantes) pour sa fidélité et l’ attention qu’ elle a cette année encore, bien voulu accorder, à mes protocoles et développements chimiques.

Fiche documentaire

Numéro d'identification du rapport : RST. DEL/03.01/PN Diffusion : libre : <input checked="" type="checkbox"/> restreinte : <input type="checkbox"/> interdite : <input type="checkbox"/> Validé par : Patrick Lassus ¹ et Jean-Claude Tabet ² Adresse électronique : ¹ Patrick.Lassus@ifremer.fr ; ² Jean-Claude.Tabet@ipcm.upmc.fr	date de publication : avril 2003 nombre de pages : 51 bibliographie : Oui illustration(s) : Oui langue du rapport : Français Impression : L.Charrieau DACN/STL
Validation d'un procédé automatisé¹ d'extraction pour l'identification et la quantification des dinophysistoxines en LC/ESI/SM² par piégeage d'ions quadripolaire² ¹ (Aspec XLI Gilson) ² (LCQ TM ThermoFinnigan Corporation)	
Validation of an automated procedure of solid phase extraction of mussels digestive glands for identification and quantification of dinophysistoxines in LC/ESI/MS² by quadrupole ion trap	
Contrat n° Rapport intermédiaire <input type="checkbox"/> Rapport définitif <input checked="" type="checkbox"/> N°	
Auteur(s) principal (aux) : Florence Mondeguer : Gilberte Mestre : Caroline Rouland : stage ingénieur du 01/07 au 31/12/20 Monique Montagu Hélène Maillols	Ifremer, Département Environnement, Microbiologie et Phycotoxines. Laboratoire Phycotoxines et Nuisances Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Techniques Pharmaceutiques Industrielles. 15 Av C. Flahault – BP 14491 – 34093 Montpellier Cedex 3 Ecole Nationale Supérieure de Chimie et de Physique Université Bordeaux I. 16 avenue de Pey Berland – 33607 Peyssac Cedex Université de Nantes, Groupe SMAB-EA 2160, Faculté de pharmacie, BP 53508, 44035 Nantes Cedex 1, France Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Techniques Pharmaceutiques Industrielles 15 Av C. Flahault – BP 14491 – 34093 Montpellier Cedex 3
Collaborateurs : Secrétariat : M. Vrignaud	Ifremer/DELMP/Phycotoxines et Nuisances
Cadre de la recherche : Projet : B13003 – Contamination/ décontamination DSP	

Résumé :

Ce rapport est une présentation d'une nouvelle méthode pour l'identification et la quantification confirmée des dinophysistoxines (DTX_s) utilisant la Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse à piégeage d'ions via une interface d'électro-nébulisation – ou électrospray - (CLHP/ESI/SM²).

Les paramètres de la source ESI et de l'analyseur à piège d'ions ont été optimisés pour fournir une détection des DTX_s avec un maximum de sensibilité. Ces améliorations ont été effectuées après une séparation en phase inverse sur une colonne C₁₈ avec une première élution sans diviseur de débit en mode isocratique d'acétonitrile/eau à 0,1 % TFA (75 :25, v/v) à 200 µl/min pendant 15 min. Une deuxième étape d'élution en mode gradient a ensuite été ajoutée, elle permet un traitement optimisé de longues séries d'analyses, sans qu'il en résulte un encombrement du signal.

Cette méthode a fait l'objet d'une validation (spécificité, seuil de détection et de quantification, linéarité, exactitude) sur deux matrices différentes : des glandes digestives de moules analysées après une procédure classique d'extraction liquide/liquide et du phytoplancton naturel analysé après extraction en phase solide sur des cartouches de silice.

En comparaison avec la CLHP par détection spectrofluorescence (CLHP/F) la sensibilité de cette méthode nous a permis de passer d'un seuil de quantification de 0,5 ng injecté à 0,05 ng ce qui revient à pouvoir détecter à partir de 4 g de glandes digestives de moules une quantité d'acide okadaïque (AO) de 0,011 µg.g⁻¹. De même, pour un extrait brut phytoplanctonique à 50 cellules/litre de *Dinophysis sp* nous avons pu détecter une quantité d'AO de 2 pg.cellule⁻¹.

Abstract :

This report presents a new method for detection and confirmed quantification of dinophysistoxins (DTXs) using high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with an ion trap and electro-spray interface (HPLC/ESI/MS²).

The parameters of the ESI source and ion trap spectrum analyser were optimised to provide detection of DTXs with maximum sensitivity. These improvements were obtained after reverse-phase separation on a C₁₈ column, with a first elution to 0.1% TFA (75:25, v/v) in isocratic acetonitrile/water mode without flow split at a column flow rate of 200 µl/min for 15 min. A second elution gradient step was added to allow optimised processing of long series of analyses without signal obstruction.

This method was validated (specificity, detection and quantitation limits, linearity, accuracy) on two different matrices: mussel digestive glands analysed after a classical liquid/liquid extraction procedure and natural phytoplankton analysed after extraction in solid phase on silica cartridges. In comparison with HPLC by spectrofluorescence detection (HPLC/F), the sensitivity of this method reduced quantification limits from 0.5 to 0.05 injected ng, i.e. allowing detection of 0.011 µg.g⁻¹ okadaic acid (OA) from 4 g of crude mussel digestive gland extract. For a crude phytoplankton extract of *Dinophysis spp* at 50 cells/litre, 2 pg.cell⁻¹ OA can be detected.

Mots-clés :

Intoxication par les coquillages ; Dinophysistoxines ; Acide okadaïque ; Dinophysistoxine-1 ; Couplage CLHP-électro-nébulisation-SM² par piège d'ions ; Toxines.

Words keys :

Shellfish poisoning ; Dinophysistoxines ; Okadaïque Acid ; Dinophysistoxine-1 ; Liquid Chromatography coupled Ion Trap ; Toxins.

Direction de l'Environnement et de l'Aménagement Littoral
Département Microbiologie et Phycotoxines
Laboratoire Phycotoxines et Nuisances

Florence Mondeguer
Gilberte Mestres
Caroline Rouland

RST.DEL/03.01/PN

Validation d'un procédé automatisé¹ d'extraction sur phase solide de glandes digestives de moules pour l'identification et la quantification des dinophysistoxines en LC/ESI/SM² par piégeage d'ions quadripolaire²

¹* (Aspec XLI Gilson)

²* (LCQ™ ThermoFinnigan Corporation)

Marque déposée d'un détecteur de masse pour chromatographie liquide

Direction de l'Environnement et de l'Aménagement Littoral
Département Microbiologie et Phycotoxines
Laboratoire Phycotoxines et Nuisances

Florence Mondeguer
Caroline Rouland
Gilberte Mestres

RST.DEL/03.01/PN

Validation d'un procédé automatisé¹ d'extraction sur phase solide de glandes digestives de moules pour l'identification et la quantification des dinophysistoxines en LC/ESI/SM² par piégeage d'ions quadripolaire²



sommaire

Introduction	5
1. Domaine de validation du système d'extraction automatisé	5
1.1. Réglementation	5
1.2. Les dinophysistoxines DTXs : inventaire	5
1.2.1. AO/DTX1/DTX2	6
1.2.2. DTX3	6
2. Extraction et détection des dinophysistoxines DTX	7
2.1. Méthode Biologique Réglementaire (MBR)	7
2.2. Méthodes de détection alternatives	8
2.3. Matériel de référence (annexe I)	8
2.4. Les échantillons	8
2.5. L'extraction liquide / liquide des DTXs	8
2.6. Un nouvel outil dans l'extraction des DTXs	9
2.6.1. Outil et caractéristiques instrumentales	9
2.6.2. Utilisation de l'ASPEC™ XLI sous <i>735 Sampler</i>	10
2.6.3. Principe général de la SPE automatisé	11
2.6.4. Particularité de la SPE automatisé : le mode multi-collectes ..	12
2.7. La détection par CLHP/ESI/SM des DTXs	12
2.7.1. Caractéristiques instrumentales	12
2.7.2. Application à l'acide okadaïque et ses dérivés esters	13
2.7.3. Caractéristiques instrumentales et les conditions expérimentales de la détection de l'AO/DTX1 par CLHP/ESI/SM ²	15
3. Plan de robustesse	
3.1. Définition et objectifs	16
3.2. Mode opératoire	17
4. Résultats et discussion	
4.1. Les références normatives	21
4.2. La linéarité	21
4.2.1. Etalonnage	21
4.2.2. Seuil de détection et de quantification	24
4.3. Les effets matrices	27
4.4. L'exactitude	28
4.5. La fidélité	29
5. Perspectives	31
6. Conclusion	31
Références bibliographiques	34
Annexe I	37
Annexe II	38
Annexe III	39
Annexe IV	40
Annexe V	41
Annexe VI	42
Annexe VII	43
Annexe VIII	46



Préambule

Malgré leur richesse minérale et vitaminique les coquillages peuvent être dangereux pour la consommation.

En effet des contaminations saisonnières sont reliées au principal aliment des coquillages filtreurs : le phytoplancton. Cette nourriture indispensable à leur croissance et contribuant à leur engraissement est constituée de milliers d'espèces dont quelques-unes (2 %) sont responsables de la toxicité des coquillages. C'est par exemple le cas des dinoflagellés qui sont des algues unicellulaires. Constituantes habituelles du phytoplancton, ces algues microscopiques prolifèrent selon la combinaison encore mal appréhendée, d'un certain nombre de facteurs physiques et biologiques (salinité, température de l'eau, présence d'éléments nutritifs ...). L'absorption continue de grandes quantités d'algues toxiques par les mollusques qui s'alimentent par filtrage de l'eau, aboutit à la concentration de toxines dangereuses pour la santé humaine dans les glandes digestives des mollusques.

Les risques sont principalement associés en France, au développement de trois genres phytoplanctoniques : *Dinophysis spp*, *Alexandrium spp* et *Pseudo-nitzschia spp* qui produisent respectivement des toxines diarrhéiques (*dites toxines DSP ou Diarrheic Shellfish Poison*), des toxines paralysantes (*dites toxines PSP ou Paralytic Shellfish Poison*) et des toxines amnésiantes (*dites toxines ASP ou Amnesic Shellfish Poison*).

En France, la mission de surveillance des coquillages repose sur deux organismes :

- **la Direction Générale de l'Alimentation du ministère de l'Agriculture** qui organise des plans nationaux de surveillance et de contrôle **pour les coquillages sortis du milieu marin** (c'est-à-dire dans les établissements d'expédition conchylicoles, sur les marchés, avant l'exportation). Les analyses sont effectuées par les laboratoires départementaux vétérinaires agréés, qui sont encadrés par le Laboratoire National de Référence, de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) ;
- **l'Ifremer** qui surveille **les coquillages dans leur milieu naturel** (parcs, gisements). Depuis 1983, sur l'ensemble du littoral, un réseau de surveillance : le **REPHY**, créé à la suite d'un événement d'intoxication majeur, assure la protection des consommateurs. Ce réseau est constitué d'une soixantaine de zones qui font l'objet de prélèvements réguliers d'eau de mer.

Le suivi des différents points renseignent sur l'apparition des espèces phytoplanctoniques toxiques. Comme l'apparence, l'odeur, le goût ou la couleur ne permettent pas de distinguer un mollusque sain d'un autre qui est toxique, la détection des toxines s'effectue sur des prélèvements de coquillages par le biais d'analyses biologiques (tests sur souris) réalisées en laboratoire.

Si les résultats d'analyse le justifient, le préfet (sur proposition de la Direction des Affaires Maritimes, et consultation des services sanitaires et vétérinaires) décide d'interdire temporairement la pêche et la récolte des coquillages d'élevage sur un ou plusieurs secteurs du littoral.

Après disparition de la microalgue toxique, le coquillage s'auto-épure en quelques semaines. La réouverture des secteurs est prononcée après deux semaines de tests de toxicité négatif.

En France, la cause la plus fréquente des fermetures des bassins conchylicoles est due au genre *Dinophysis*. Ces fermetures répétées s'accompagnent d'une diminution, voire d'une cessation d'activité pour les établissements d'expédition. De plus, l'interdiction des ventes de coquillages fait perdre aux établissements affectés, une clientèle fidélisée.

Une solution permettant d'isoler des mollusques sains d'une quelconque zone de contamination consisterait donc à maintenir les coquillages dans une eau ne contenant pas d'algues toxiques, le temps de leur mise sur le marché.

Or, les établissements des professionnels situés dans une zone provisoirement fermée possèdent souvent **des bassins insubmersibles aquacoles (BIA)** permettant la conservation des coquillages dans de bonnes conditions pendant plusieurs jours. Ces bassins conchylicoles agréés par les services vétérinaires pour la purification bactériologique sont le plus souvent des bassins en ciment, équipés d'un bullage et pour certains, d'un filtre à sable, et/ou de systèmes ultra-violet.

Dans le cadre d'un projet d'étude commandée, par la **Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture** du **Ministère de l'Agriculture et de la Pêche**, il a été demandé d'étudier l'efficacité des systèmes de filtration utilisés dans les BIA pour la rétention des algues toxiques, en particulier *Dinophysis spp.*

La démonstration de l'efficacité de ce dispositif, où l'eau de mer pompée, chargée en phytoplancton toxique et filtrée, continuerait d'alimenter les coquillages sans les contaminer, répond à un enjeu économique important. En effet, la validation scientifique de l'efficacité des filtres des BIA permettrait aux professionnels de la conchyliculture de solliciter un agrément pour leurs installations : ils pourraient ainsi maintenir leur activité commerciale de vente malgré l'interdiction de pêche ou de récolte des coquillages d'élevage frappant leurs secteurs.

Le projet BIA est constitué d'un ensemble d'études dont le contrôle de l'absence de toxines dans les coquillages par analyse chimique (plus spécifique et surtout plus quantifiable que le test sur souris). En effet, un suivi éventuel de la contamination sera réalisé sur différentes espèces de coquillages immergés dans deux bassins :

- l'un rempli d'eau de mer non filtrée (**témoin positif**),
- l'autre rempli d'eau de mer filtrée (**bassin d'essai**),

et ce dans une installation professionnelle, durant une période où *Dinophysis spp* prolifère.



Introduction

Le laboratoire DEL/MP/PN laboratoire possède des outils puissants, rapides et très sensibles pour la détection des phycotoxines (en particulier les phycotoxines diarrhéiques). Cependant l'extraction des toxines à partir de la matrice biologique [glandes digestives (GD) des coquillages], restait à ce jour une étape longue et fastidieuse.

L'urgence de l'étude BIA¹, sa courte durée (2 ans) et le grand nombre d'analyses requis par les référentiels normatifs de l'assurance qualité, a conduit le laboratoire à s'équiper d'un système d'extraction automatisé : l'automate ASPEC Xli.

Une nouvelle méthode d'Extraction sur Phase Solide (SPE) des toxines diarrhéiques, plus appropriée à l'automatisation que la traditionnelle méthode d'extraction liquide/liquide, a été développée sur cet appareil.

L'exactitude et la fiabilité de cette procédure d'extraction automatisée ont été démontrées statistiquement.

La validation de cette méthode d'extraction automatisée des toxines, détectées par spectrométrie de masse, selon les référentiels normatifs des industriels de la pharmacie (SFSTP, guide de validation analytique 92) et de l'Association Française de Normalisation (AFNOR 1998) fait l'objet du travail présenté ici.

1. Domaine de validation du système d'extraction automatisé

1.1. Réglementation

Les règles sanitaires qui régissent la production et l'autorisation de mise sur le marché des coquillages² vivants destinés à la consommation (directe ou après transformation) relève de la décision communautaire 2002/225/CE du 15/03/02 (JOCE – 16/03/02). Cette décision fixe les limites maximales pour les biotoxines marines du **complexe polyéthers « AO, DTXst, yessotoxines, pecténotoxines et azaspiracides »**, ainsi que les méthodes d'analyse à employer pour leur détection.

Nous avons, dans un premier temps, limité l'utilisation de l'automate à l'extraction des toxines impliquées dans les intoxications diarrhéiques : les dinophysistoxines (DTXs).

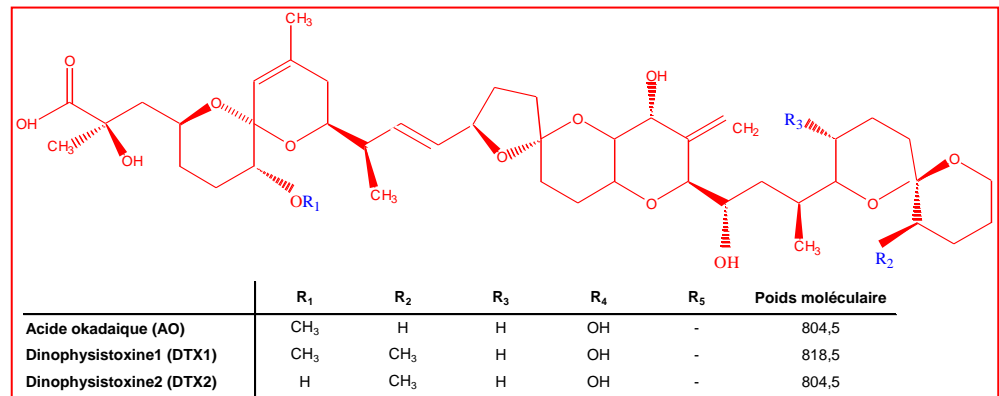
1.2. Les dinophysistoxines DTXs : inventaire

La complexité de ces molécules n'est pas le fait d'une seule substance mais d'une famille de dérivés qui s'articule autour du squelette moléculaire de l'acide okadaïque AO (Tachibana *et al.*, 1981). Toutes ces toxines moyennement polaires sont de nature non protéique et forment une classe de polyéthers polycycliques comprenant au moins huit composés dont l'AO est le composé de base.

¹ Efficacité de filtres pour prévenir la contamination de Bassins Insubmersibles Aérés (BIA) par des microalgues toxiques.

² Coquillages : mollusques bivalves, échinodermes, tuniciers, gastéropodes marins au sens de la directive.

1.2.1. AO/DTX1/DTX2



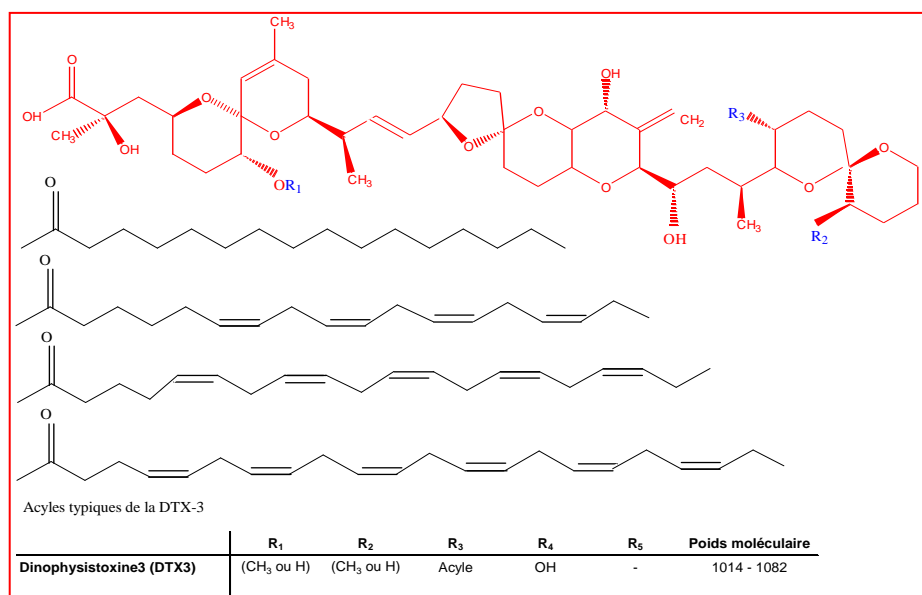
Parmi les dérivés liposolubles de l'AO on trouve : la DTX1, dérivé méthylé de l'AO (35-méthyl AO) et la DTX2, isomère de l'AO.

L'AO est un polyéther d'acides gras de formule brute C₄₄H₆₈O₁₃ qui n'est pas dégradé par la chaleur ni par la congélation (Edebo *et al.*, 1988). L'AO et ses substitués DTX1 et DTX2 sont des inhibiteurs des protéines phosphatases (PP) à sérine/thréonine des eucaryotes. De ce fait, elles se sont révélées être des promoteurs tumoraux (Bialojan et Takay, 1988) et on leur attribue aussi une activité génotoxique.

L'extraction des toxines diarrhéiques : AO, DTX1 et DTX2 se fait traditionnellement sur la base d'un partage liquide/liquide (Yasumoto *et al.*, 1985) qui diffère légèrement selon la nature de l'extrait brut : glandes digestive de moules (Lee *et al.*, 1986) ou concentrat phytoplanctonique (Suzuki 1996).

Les protocoles détaillés de ces extractions figurent en annexe III, IV et V.

1.2.2. DTX3



L'AO et ses dérivés (DTX1, DTX2) peuvent faire l'objet d'une acylation au niveau de l'hydroxyle du carbone 7 (7-O-A.O/DTXs). Cette acylation qui se traduit par la fixation de chaînes d'acides gras saturés ou insaturés, donne un groupe de dérivés toxiques appelés acyles-esters (Yasumoto *et al.*, 1985) ou DTX3.

Ces esters n'ayant jamais été détectés dans le phytoplancton, on pense qu'ils sont formés dans les coquillages (Suzuki *et al.*, 1999).

La toxicité de cet ensemble d'esters acylés au niveau du carbone 7 est fonction à la fois de la longueur et de la saturation de l'acide gras fixé.

Leur activité biologique (exprimée en terme de létalité souris) est 3 à 30 fois moindre que celle de l'AO et de la DTX1 (selon le degré d'insaturation de l'acide gras). En revanche, dans les expériences d'intoxication par voie orale, on a pu constater une action diarrhéique semblable et de fait ces composés sont susceptibles de redonner des formes libres toxiques (AO, DTX1, DTX2) lors des processus de la digestion.

Il est donc important de les prendre en compte pour ne pas sous-estimer la toxicité globale des coquillages.

L'instabilité des acyles-esters, la difficulté à individualiser les différents homologues, du fait de leur masse moléculaire élevée, ainsi que l'absence de standard, rendent les DTX3 difficiles à quantifier (Marr *et al.*, 1992). De plus, comme les 7-O-AO/DTXs sont des composés apolaires, ils sont majoritairement éliminés dans les phases hexane de l'extraction sélective de l'AO (fig. 1) (Fernandez *et al.*, 1996). Leur dosage est donc réalisé indirectement par différence de la teneur en AO obtenue avant et après hydrolyse des phases hexane.

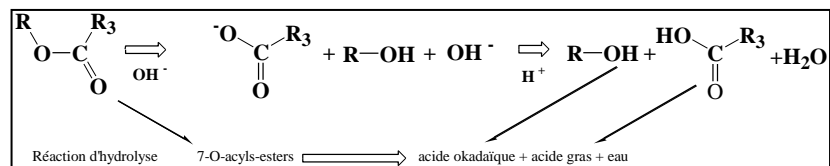


Figure 1 : Schéma de la réaction d'hydrolyse des 7-O-acyls-esters en AO.

2. Extraction et détection des dinophysistoxines DTX

L'analyse officielle des phycotoxines diarrhéiques peut être réalisée selon deux types de méthodes (biologiques ou analytiques) mais en cas d'écart entre les différentes méthodes, seul le dosage biologique sur souris est considéré comme la méthode de référence (2002/225/CE du 15/03/02).

2.1. Méthode Biologique Réglementaire (MBR)

La MBR utilise un test sur souris pour la détection de l'ensemble des toxines liposolubles (AO, DTX, yessotoxines, pecténotoxines). Le principe consiste à extraire par trois fois les composés liposolubles contenus dans 20 g d'un broyat de glandes digestives (GD)³ de coquillages. Après évaporation le résidu obtenu est repris dans une solution aqueuse de Tween à 1 % et un équivalent de 5 g de GD/mL est injecté par voie intrapéritonéale sur trois souris.

³ Les GD sont considérées comme le principal tissu cible accumulateur des toxines.



Le résultat est déclaré positif si on observe la mort de deux souris sur trois dans un délai de 24 h.

Les limites maximales autorisées dans les coquillages sont les suivantes :

- pour l'AO : 0,8 µg/g GD ou 0,16 µg/g de chair de coquillages,
- pour la DTX1 : 0,72 µg/g GD ou 0,144 µg/g de chair de coquillages.

2.2. Méthodes de détection alternatives

Toujours selon la directive officielle des méthodes alternatives «... La chromatographie liquide haute performance, en détection fluorimétrique (CLHP/F), la CLHP couplée spectrométrie de masse (CLHP/SM)... peuvent être utilisées à condition que seules ou combinées ces méthodes permettent de détecter au moins les quatre analogues suivants : DTXs, pecténonotoxines (PTXs) yessotoxines (YTXs) et azaspiracides (AZPs) ».

On comprend que face à la réponse spécifique des méthodes alternatives seul le test sur souris permet d'obtenir en une seule étape, un rendu rapide de la toxicité globale de l'ensemble des complexes polyéthers précités.

Cependant dans l'étude « BIA », l'objectif étant de démontrer une absence de contamination en DTXs, l'outil analytique le plus adapté est la CLHP/SM, le test biologique ne pouvant satisfaire cette fois aux critères de sensibilité et de spécificité requis.

2.3. Matériel de référence (annexe I)

Les matériels utilisés pour valider la méthode d'extraction de l'AO/DTX1 par SPE sont nombreux. La liste complète des références utilisées dans cette étude figure à l'annexe II. Seuls sont détaillés ici les matériels certifiés :

- Standards certifiés d'acide okadaïque (**OACS-1** IBM, CNRC, Canada) correspondant à 25,3 µg/mL dans 0,5 mL de méthanol.
- Echantillons de moules de référence (**MUS-2** IBM, CNRC, Canada) correspondant à un homogénat de glandes digestives (GD) de moules mélangé à une petite quantité de culture de *Prorocentrum lima*.

MUS-2 est commercialisé sous la forme de quatre petites bouteilles en polypropylène contenant chacune quatre grammes d'homogénat toxique en AO et DTX1 respectivement à hauteur de 11 et 1 µg/g de standard de toxines.

2.4. Les échantillons

Pour valider la méthode d'extraction de l'AO/DTX1 par SPE, les analyses ont été effectuées sur deux types d'échantillons :

- des moules saines qui ont été utilisées en guise de témoin,
- des coquillages présumés toxiques prélevés en Bretagne à Camaret le 16/07/2002 et pour lesquels la réponse positive du bioessai réalisé au laboratoire Ifremer de Concarneau indiquait un temps de mortalité des souris inférieur à 4 h.

2.5. L'extraction liquide/liquide des DTXs

Le protocole d'extraction utilisé jusqu'à présent au laboratoire a sensiblement la même configuration que celui distribué par le National Research Council (Halifax,



Canada) pour l'analyse des Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) certifiés appelés MUS-2. Le protocole détaillé figure en annexe III.

Afin d'avoir un échantillon représentatif, on effectue l'extraction à partir d'environ 30 g de GD. Les échantillons sont broyés à l'aide d'un ultra-turrax.

- La prise d'essai est de 4 g pesés au milligramme près dans un tube gradué pour centrifugeuse.
- Ces 4 g sont soigneusement extraits 3 fois avec successivement 10, 8, et 6 mL de méthanol aqueux (80/20) complétés à 25 mL.
- Sur une fraction de 5 mL on procède ensuite à des séparations par partage liquide/liquide avec dans un premier temps un double lavage à l'hexane volume à volume. Cette opération élimine les composés apolaires comme les acides gras mais aussi les dérivés acyles (DTX3) de l'AO.
- La récupération de l'AO/DTX1 dans la phase méthanolique se fait après addition d'un mL d'eau et extraction de la phase sous-nageante avec deux fois 6 mL de chloroforme. Les phases chloroformiques sont réunies et mises à sec (par évaporation centrifuge, à basse température et sous vide). Les résidus secs des phases organiques (hexane et chloroforme) sont repris dans 200 μ L de méthanol soit pour être dérivés et analysés en CLHP/F, soit pour être directement analysés en CLHP/SM².

Pour la recherche de DTX3 les phases hexane sont conservées pour être hydrolysées.

Comme on peut le constater pour de grandes séries d'analyses ce protocole représente une série de procédures lourde en terme de manipulations.

Une nouvelle méthode d'Extraction sur Phase Solide (SPE), plus appropriée à l'automatisation que la traditionnelle méthode d'extraction liquide/liquide manuelle, a donc été développée.

2.6. Un nouvel outil dans l'extraction des DTXs

2.6.1. Outil et caractéristiques instrumentales



Figure 2 : Ensemble d'extraction automatisée / CLHP, ASPEC XLI, Gilson (photo O Barbaroux, Ifremer, Nantes).



Le développement méthodologique de l'extraction automatisée sur phase solide des toxines diarrhéiques a été réalisé sur la chaîne instrumentale composée des unités suivantes :

- Un diluteur de précision (1/500^e), « 402 Syringe Pump », *Gilson*, équipée de deux seringues de 10 mL et 0.5 mL.
La configuration « double seringue - jonction en T », permet une distribution simultanée et très reproductible de plusieurs solvants et réactifs pour :
 - des volumes importants (x 10 mL), rapidement,
 - des volumes plus petits avec une grande précision (µL).
 Avant chaque prélèvement de solvant, l'aiguille aspire un volume d'air créant une bulle qui évite toute contamination avec le solvant précédemment transféré.
- Un dégazeur « 864 Degasser » *Gilson*.
- Un préparateur d'échantillons ASPEC™ XL, *Gilson*, constitué :
 - d'un plateau relié à un système d'évacuation permettant la récupération des solvants et supportant des portoirs divers (flacons, tubes, microplaques...);
 - d'un pont métallique sur lequel on trouve deux stations de rinçage pour l'aiguille et quatre puits de transfert qui permettent de multiplier le nombre et la quantité des mélanges de solvants ;
 - d'un bras mobile muni d'une aiguille, qui reproduit le déplacement dans l'espace (x, y, z) d'un opérateur effectuant les manipulations habituelles du pipetage ;
 - d'une valve Rhéodyne 7010, *Gilson*, compatible avec tout système HPLC, pour injecter en ligne les échantillons.
- Une pompe haute pression à gradient, « 307 Piston Pump », *Gilson*, utilisée pour l'enrichissement de traces des échantillons.
- Un générateur d'azote (CLAIND) pour l'évaporation des échantillons.
- Un micro-ordinateur équipé du logiciel « 735 Sampler Controller », *Gilson*, pour la programmation et le contrôle de l'automate.

2.6.2. Utilisation de l'ASPEC™ XLI sous 735 Sampler (logiciel GILSON)

La réalisation du procédé d'automatisation de l'extraction sur phase solide utilise l'enchaînement des étapes suivantes :

La définition des zones composant le plateau détermine :

- le type et l'emplacement des différents portoirs utilisés,
- la nature et la position des solvants disposés sur le plateau ou reliés aux puits de transfert,
- la numérotation des échantillons, des colonnes et collectes associées.

La rédaction de la méthode sous la forme d'un inventaire des différentes tâches réalisables par l'automate. Pour chacune d'entre elles, un certain nombre de paramètres est à définir. Par exemple pour l'étape Elution : on pourra faire varier l'identification et la quantité de solvant prélevé, les vitesses d'aspiration et de dépôt, les lieux de transfert, les quantités et débits d'air expulsé.

La réalisation d'une séquence sélectionnant le plateau utilisé, les échantillons et la méthode à appliquer.



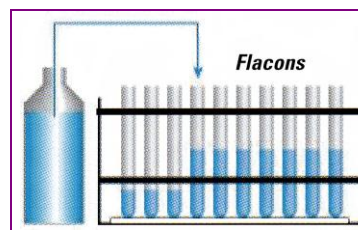
La Simulation permettant de détecter les erreurs et donnant une estimation de la durée de l'analyse.

Le Contrôle manuel qui vérifie, d'une part, le fonctionnement des vannes électroniques, et d'autre part, la purge des systèmes rattachés aux solvants (puits de transfert et réservoir).

Le « Run » ou Démarrage visualisable selon la nature de l'opération en cours ou selon une représentation graphique en temps réel.

2.6.3. Principe général de la SPE automatisé

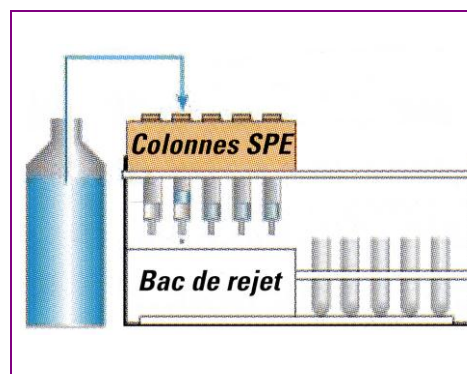
L'ASPEC™ XLI a été conçu pour automatiser aisément un grand nombre de tâches manuelles utilisées tant pour la préparation que l'extraction des échantillons.



- dilutions
- ajouts de réactif
- agitations
- transferts de solutions
- procédures de dérivation
- procédures d'hydrolyse

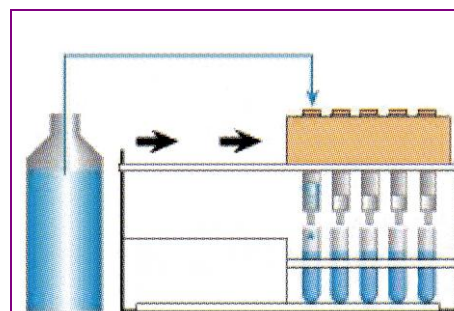
Dans le cas d'une extraction en phase solide, l'automatisation est basée sur la configuration dynamique d'un plateau spécifique à ce type d'analyse (support pour colonnes, bac de rejet, portoir pour les tubes de collectes).

Le déroulement des différentes étapes proposées par l'automate est illustré par les graphiques suivants :



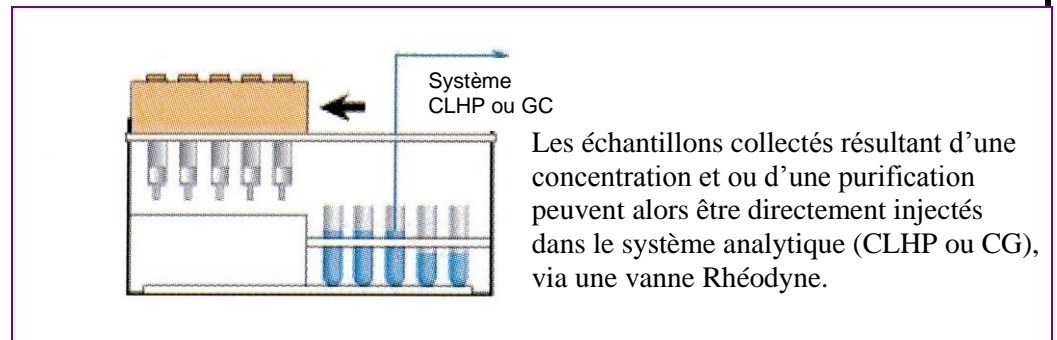
Les colonnes SPE sont tout d'abord placées au-dessus d'un bac de rejet, où s'effectuent les opérations suivantes :

- conditionnement des colonnes, activées après solvotation complète de la phase stationnaire,
- dépôt de l'échantillon permettant la rétention quantitative du composé à extraire et l'élimination du solvant,
- lavage permettant d'éliminer de manière sélective les molécules interférentes, tout en laissant fixés à la phase solide, les analytes.



Les colonnes sont ensuite positionnées au-dessus des tubes de collectes. L'éluion qui vise à récupérer quantitativement les solutés à analyser peut alors être réalisée.

A la différence d'une méthode manuelle, où les solvants migrent à travers la phase stationnaire sous l'effet de la force gravitationnelle, l'automate utilise une technique de pression positive qui permet de contrôler les interactions entre phases mobile et stationnaire. Ce système nous met à la frontière des performances de la CLHP.



2.6.4. Particularité de la SPE automatisé : le mode multi-collectes

Le mode multi-collectes permet une élution séquentielle sur une même colonne, avec récupération des diverses fractions dans des tubes de collectes différents. Cette configuration, particularité d'un grand intérêt de l'ASPEC XLI, permet d'optimiser les protocoles d'analyse lors de leur phase de développement.

2.7. La détection par CLHP/ESI/SM des DTXs

2.7.1. Caractéristiques instrumentales

Les échantillons sont analysés à l'aide d'un ensemble de couplage CLHP/(SM)ⁿ *ThermoFinnigan* comprenant :



Figure 3 : Ensemble de couplage CLHP/SM)ⁿ, ThermoFinnigan (F. Mondeguer, DEL/PN, Ifremer, Nantes).

- ⊗ un module de conditionnement des solvants avec dagazage à membrane (4 voies),
- ⊗ une pompe HPLC Spectra P (P2000-30) à gradient binaire,
- ⊗ un passeur automatique d'échantillons avec four de colonne Spectra P (AS100XR),
- ⊗ un détecteur à piège d'ions équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI) à pression atmosphérique *ThermoFinnigan* LCQ (MS)ⁿ,
- ⊗ un module de commande et de retraitement des données avec le logiciel *Xcalibur*.

2.7.2. Application à l'acide okadaïque et ses dérivés esters

2.7.2.1. CLHP : la technique de séparation

La chromatographie liquide haute performance est une technique physico-chimique qui permet d'isoler les toxines recherchées des autres molécules environnantes de la matrice du produit (tabl. 1).

Colonne	Kromasil C18 (250*2.0mm I.D.) 5 µm (modulo-cart expert)
Pré-colonne	Kromasil C18 (10*2.0mm, 2UM) 5µm, (modulo-cart)
Température	40°C
Phase mobile	Acétonitrile/eau +0.1% TFA (75 : 25)
Débit	0.2 mL/min
Mode d'élution	3 modes successifs :isocratique/gradient/isocratique

Tableau 1 : Les conditions expérimentales en HPLC.

2.7.2.2. ESI/SM² : la technique de détection et de quantification

Après séparation, les toxines sont détectées et quantifiées grâce à un détecteur universel, le spectromètre de masse.

Il permet de déterminer la masse d'une molécule en mesurant son rapport m/z (m , masse de la molécule ; z , nombre de charge).

Cela nécessite un système d'introduction de l'échantillon, liquide, solide ou gazeux, à analyser, une source pour ioniser les molécules de cet échantillon, un analyseur de masse (quadripôle, piège d'ion, temps de vol, etc...) pour séparer les différents ions en fonction de leur rapport m/z ; un détecteur pour compter ces ions et enfin un système informatique pour afficher les spectres de masse. Le premier intérêt de la spectrométrie est de permettre l'identification de molécules nouvelles mais elle est aussi très utile pour rechercher des composés organiques connus dans des matrices. Cependant les informations obtenues dépendent quelque peu du mode d'ionisation et du type d'analyseur utilisé. On distingue essentiellement :

- **Les Quadripôles** où selon le principe d'un analyseur SM/SM triple-quadripolaire en mode « daughter scan », l'ion « parent » préalablement choisi par l'utilisateur [(MH⁺ ou (M-H)⁻] est focalisé par le premier quadripôle vers une chambre centrale où il se fragmente par collision avec un gaz inerte, les ions fragments produits sont filtrés par le dernier quadripôle et le spectre « daughter » est enregistré.

A la fois sélectifs (dans le choix d'un ion parent et l'exclusion de toute autre interférence), spécifiques (dans l'empreinte formée par le spectre de fragmentation), quantitatifs, sensibles, rapides et pouvant être automatisés, les triple quadripôles sont très largement utilisés pour le suivi et dosage de métabolites dans des extraits organiques.

- **Les Pièges d'ions** qui suivent le même principe mais où cette fois le dernier quadripôle est remplacé par un piège d'ion où les ions fragments produits sont capturés. Le caractère unique du quadripôle à piège d'ion concerne sa capacité à enchaîner les étapes de piégeage sélectif et d'activation d'ion, autrement dit de balayages SMⁿ ($n=1$ à 10).

Tout ceci en fait en instrument qui, bien que voué au dosage en routine, déborde très largement sur l'identification de molécules nouvelles et sur la biologie structurale comme le séquençage de peptides de haut poids moléculaire.

Dans la mise au point et la validation de la SPE automatisée, la détection et la quantification des toxines ont été réalisées avec un couplage HPLC/SMⁿ à piège d'ions ThermoFinnigan.

La méthode d'acquisition, réalisée en mode positif, repose sur l'alternance de deux balayages (fig. 4) :

- **Le Mode full SM** : qui permet de détecter les ions moléculaires selon son rapport masse sur charge (m/z) ;
- **Le Mode full SM²** : où les ions correspondants aux toxines recherchées, sont piégés, fragmentés et analysés comme ions fils.

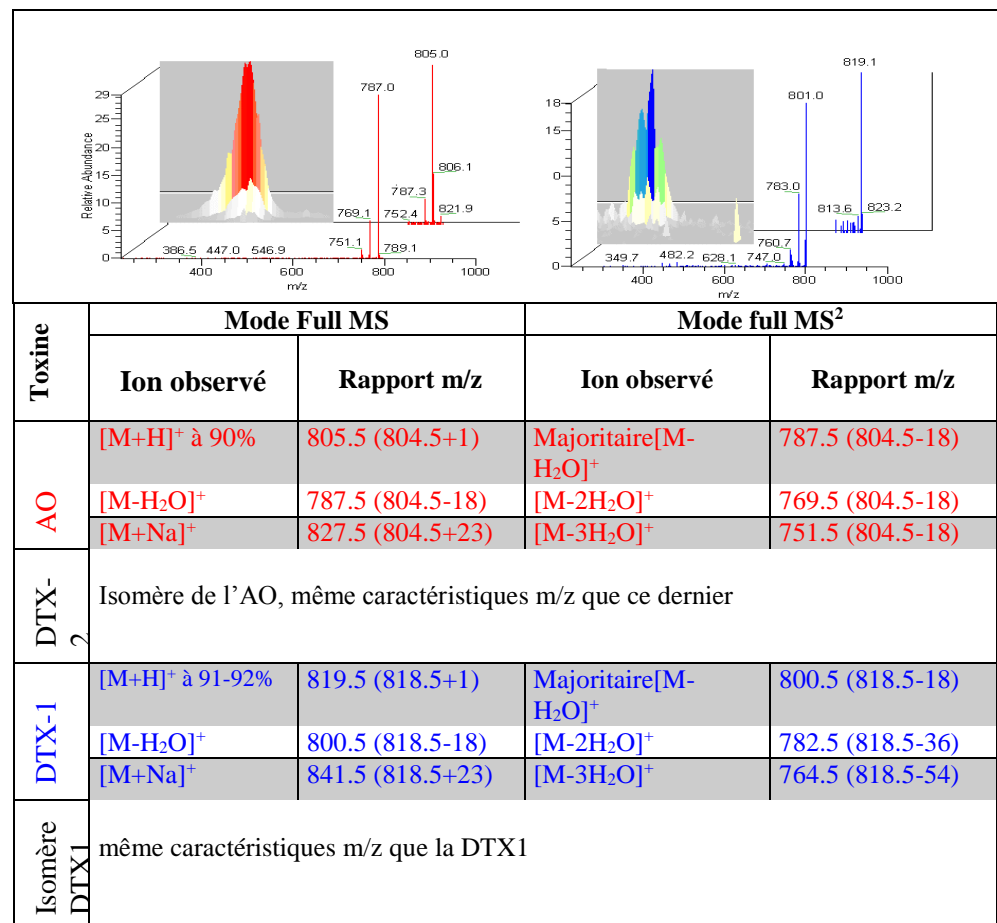


Figure 4: Pics chromatographiques, spectres de masse et Rapports m/z caractéristiques de l'AO et de la DTX1 en détection SM/SM²

L'alternance des modes d'acquisition full SM et full SM² fournit deux spectres de masse permettant une identification formelle de la toxine sur la base de l'ion moléculaire [M+H]⁺, d'une part, et d'ions, fragments moléculaires, d'autre part. Ainsi, pour l'acide okadaïque les ions fragments résultent de pertes de molécules d'eau [M+H-H₂O]⁺, [M+H-2H₂O]⁺ et [M+H-3H₂O]⁺ et les rapports m/z sont respectivement : 805 – 787 – 769 – 751.



L'avantage de cette alternance est donc de cumuler, sur une injection, le caractère universel de la détection full-SM et la très grande sélectivité et spécificité de la détection full-MS². La quantification se fait sur les ions fils, fragments caractéristiques résultant ici de la fragmentation de l'ion parent par les pertes successives de quatre molécules d'eau.

Cette technique génère ainsi un gain de sensibilité qui se traduit par une augmentation du rapport signal /bruit S/N.

2.7.3. Caractéristiques instrumentales et les conditions expérimentales de la détection de l'AO/DTX1 par CLHP/ESI/MS²

La sensibilité de la détection CLHP/ESI/MS² dépend de l'optimisation des paramètres : de la source électrospray, de l'optique de transmission des ions, du piège d'ions. Les conditions de détection les plus appropriées à la réception d'un signal spécifique et intense ont été obtenues par une série d'analyses issues d'un montage dit en « T » permettant de réunir, vers la source ESI via la phase mobile CLHP (200 µL/min) et la perfusion liquide continue (3µL/min) :

- les valeurs optimisées liées à la chromatographie,
- les valeurs optimisées liées à la structure moléculaire de divers standards.

La méthode de détection par spectrométrie de masse (SM) utilise les conditions expérimentales et instrumentales mis au point par le laboratoire (Mondeguer, 2002) et figurant dans le tableau ci-dessous.

La source électrospray ESI	L'analyseur de masse à Piège d'ion
Mode d'Ionisation : Polarité positive	Alternance Full-MS/Full-MS ²
Flux du gaz vecteur (N ₂) : 75 unités	Gamme de masse : 750 à 825 uma en Full-MS
Flux du gaz auxiliaire (N ₂) : 26 unités	Gamme de masse : 220 à 799 en Full-MS ² AO
Spray Voltage : 4,50 kV	Gamme de masse : 225 à 802 /Full-MS ² DTX1
Spray Current : 6,10 µA	Nombre total de Microscans : 2
Température Capillaire : 183°C –	Temps maximum d'injection : 200 x ms
Voltage Capillaire :32	Energie collision : AO = 22 %-q _z : 0,250
	Energie collision DTX1 = 20 %-q _z : 0,250
L'optique de transmission des ions	Temps d'activation : 30 msec x ms
Lens voltage: -16 V	Largeur d'isolement : 10 = maximum
Octapôle 1 offset: -4 V	Full MS Target : 5.10 ⁷
Octapôle 2 offset: -7,50V	Full MS Target : 2.10 ⁷
Octapôle RF Amplitude: 710 Vpp U (peak to peak)	Electron Multiplier Voltage (set point) : -1100

Tableau 2 : Les conditions expérimentales en ESI/MS²

3. Plan de robustesse

3.1. Définition et objectifs

On définit la robustesse d'une méthode par sa capacité à rester non affectée par des variations faibles mais délibérées, introduites dans les facteurs.

Ainsi la robustesse permet de mesurer l'effet provoqué par un changement de **niveau** dans l'un des **facteurs** testés.

Facteur : cause possible de variation de la réponse ;

Niveau : valeur attribuée à un facteur au cours de l'expérimentation ;

Effet : changement dans la réponse quand le facteur change de niveau.

Pour dépister les facteurs critiques pouvant affecter les résultats et obtenir des informations supplémentaires sur les interactions tout en économisant le nombre d'expériences, nous avons défini un plan d'expérience. Il s'appuie sur :

- une analyse critique de la bibliographie (cf. références bibliographiques),
- le guide d'utilisation de l'automate ASPEC XLi,
- l'expérience instrumentale acquise lors de la mise au point d'un protocole de purification manuelle sur SPE (annexe IV) réalisé auparavant au laboratoire Phycotoxines et Nuisances pour l'analyse des DTXs par HPLC/Fluorescence (Mondeguer, 2002).

Les facteurs sélectionnés et leurs différents niveaux (solvants, nature de la phase solide des colonnes SPE...) ont été testés au cours des différentes étapes de l'expérimentation : solubilisation de l'échantillon et conditionnement, lavage, élution des colonnes SPE, sur le rendement la reproductibilité et le signal (fig. 5).

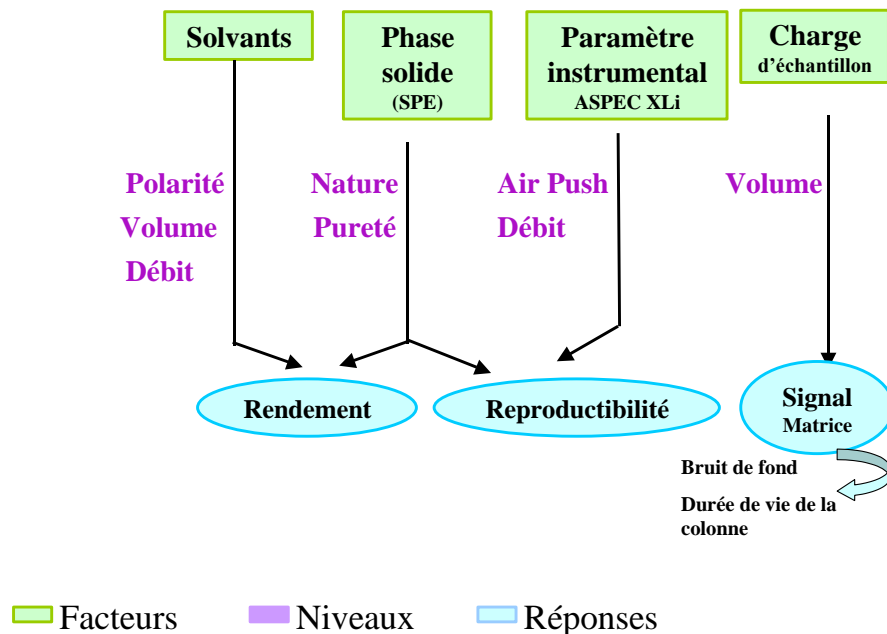


Figure 5 : Plan d'expérience : représentation graphique des facteurs testés ayant un effet sur le rendement la reproductibilité, la matrice.

L'analyse des différentes fractions obtenues par l'utilisation du mode multi-collectes à chaque étape de l'expérimentation, a permis de détecter les pertes, de cibler le décrochage des toxines et d'évaluer le rendement.

L'interprétation des résultats obtenus a finalisé la mise au point du procédé et permis l'optimisation des paramètres significatifs.

3.2. Mode opératoire

Cependant pour ne pas déséquilibrer la partie technique opératoire du plan d'expérience par rapport aux résultats de la robustesse, nous ne détaillerons pas plus en avant les effets résultant d'un changement de niveau parmi les facteurs.

Seuls seront présentés ici les niveaux ayant eu un effet positif ou tout au moins significatif dans la définition du futur protocole.

L'ensemble des essais a donc permis de définir une base de protocole qui est la suivante :

A partir de 4 g de GD broyées :

1. Solubilisation des DTXs avec 25 mL d'un solvant X,
2. Evaporation de l'extrait,
3. Reprise dans un volume V d'hexane/chloroforme (50/50),
4. SPE automatisée : avec comme facteur « Phase solide » une cartouche SPE de 500 mg de silice, des valeurs de niveaux Air Push et Débit définis en annexe VII, un facteur « Solvant » de niveau 3 mL, une charge équivalent à 0,24g de GD,
5. Evaporation des collectes d'élution,
6. Reprises des résidus dans 1 mL de méthanol,
7. Injection de 5 µL dans le système LC/SM.

3.2.1. Mise au point du protocole d'extraction SPE automatisée

Pour la mise au point du protocole d'extraction automatisée sur phase solide, les facteurs pré-cités (fig. 5) du plan d'expérience ont été développés dans un premier temps sur un échantillon naturel homogène (fig. 6) puis confirmé sur un échantillon certifié (fig. 7).

3.2.1.1. Sur l'échantillon naturel (cycle I)

Cette série de tests a déterminé en parallèle :

- * Le meilleur solvant de solubilisation à utiliser lors de la préparation des échantillons. Lors de cette phase, nous avons comparé quatre niveaux :
 - MeOH/H₂O (80/20) (*cf protocole du NRC - Halifax, Canada*),
 - MeOH (essai d'élimination de l'eau afin de réduire le temps d'évaporation),
 - acétone (*cf protocole Croci et al., 1995*),
 - isopropanol (*cf protocole Akasaka et al., 1996*).
- * Les volumes des trois étapes (conditionnement, lavage, élution) après dissolution des solutés dans une solution d'hexane/chloroforme (50/50). Lors de cette phase, nous avons comparé deux niveaux :
 - des « grands volumes » de solvant (3, 5 et 7 mL),
 - des « petits volumes » de solvants (0.5, 1, 1.5 mL) préconisés par le guide d'utilisation de l'ASPEC XLi.



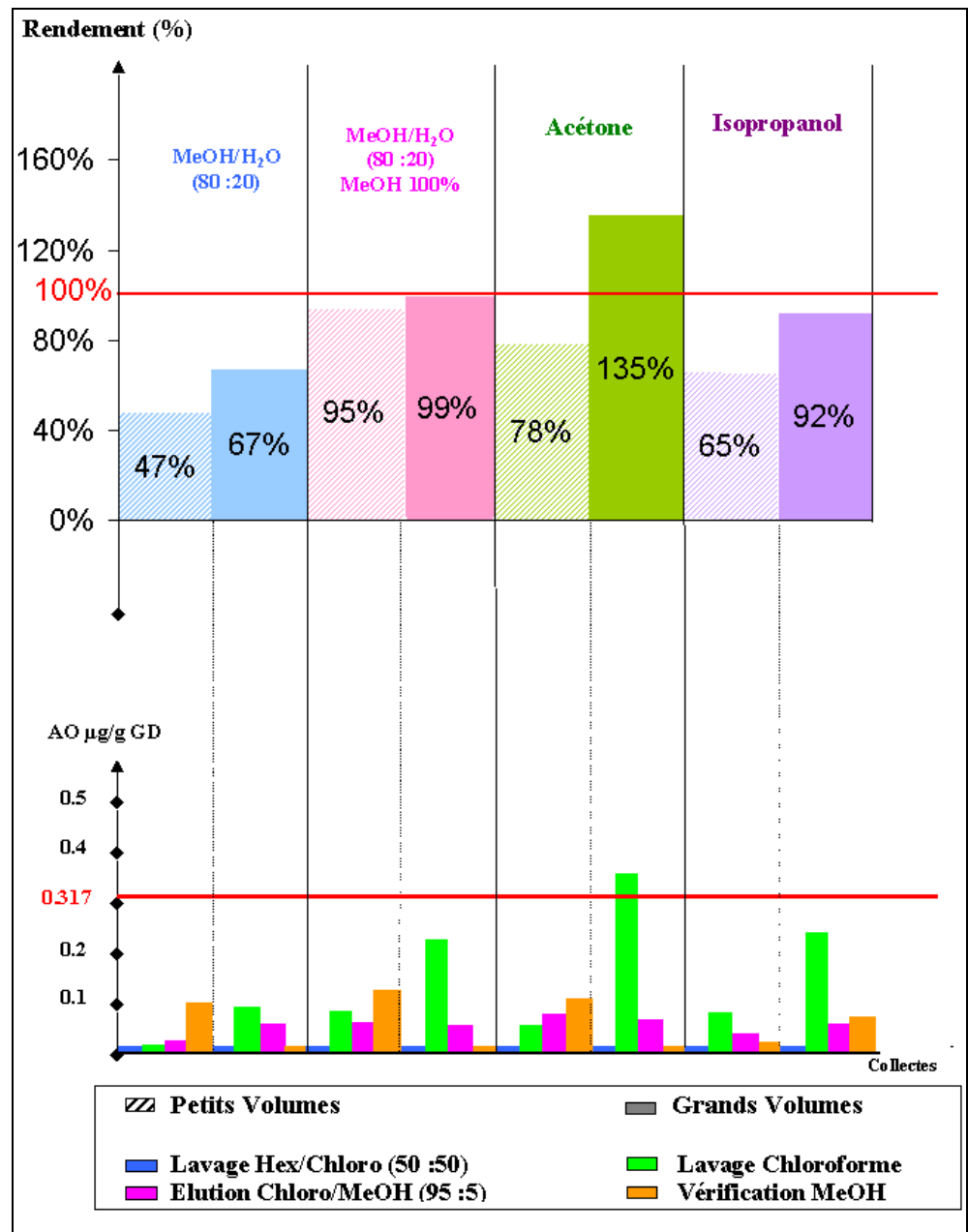


Figure 6 : Cycle 1 - Détermination du solvant d'extraction et développement du protocole SPE.

La présentation complète de tous les facteurs étudiés étant complexe seuls sont représentés sur la première moitié de la figure 6 les facteurs ayant obtenus des résultats significatifs, soit 5 mL pour les grands volumes et 1,5 mL pour les petits volumes pour des cartouches SPE Lichrolut VWR de 500 mg de silice ayant reçue une charge équivalant à 0,24g de GD. (La liste des différentes SPE testées figure en annexe II).

La référence, indiquée en rouge, correspond à l'analyse de l'échantillon réalisée selon la méthode traditionnelle : extraction liquide/liquide manuelle.

La comparaison des rendements obtenus font apparaître les « grands volumes » et l'acétone comme les meilleurs facteurs d'extraction ($\eta = 135\%$).

Cette constatation a aussi été observée lors de l'analyse de l'échantillon certifié. La deuxième moitié de la figure 6 détaille l'analyse « multi-collectes » des différents essais. On constate que le meilleur rendement (extraction acétone) met en évidence un décrochage de l'AO dispersé entre le lavage au chloroforme et l'élution au chloroforme/ méthanol (95/5). Nous avons donc poursuivi cette étape du développement en recherchant des volumes et une nature de solvants adaptés à une récupération ciblée et totale de l'AO. Un deuxième cycle d'essais a donc été réalisé.

3.2.1.2. Sur l'échantillon certifié (cycle II)

La deuxième série d'essai (devant aboutir à la mise en place du protocole final) a été réalisée, cette fois, sur un échantillon certifié. Pour l'ensemble du plan opératoire, (fig. 7), on a reporté les pertes mesurées en AO dans les collectes issues du lavage et du rinçage et le rendement obtenu (en %) en ne considérant que la collecte issue de l'élution.

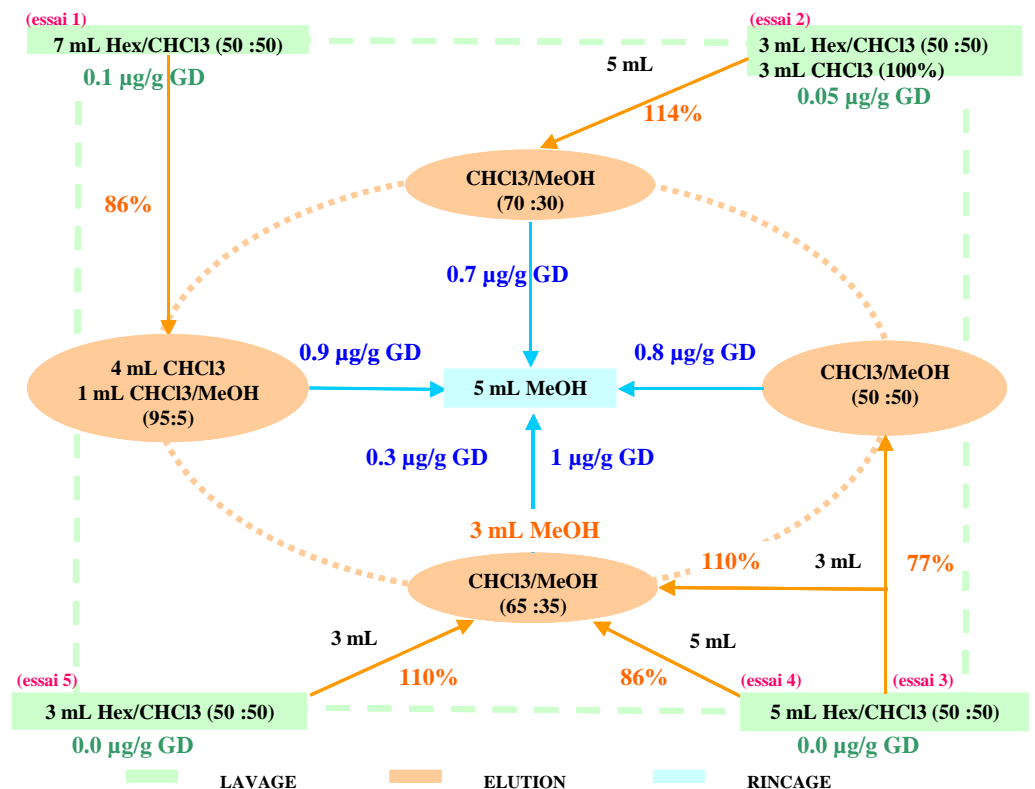


Figure 7 : Cycle 2 – Mise au point du procédé SPE automatisé des DTXs dans des GD de coquillages.

Essai 1 : A partir des résultats obtenus lors de l'extraction *acétonique* (rendement= 135 % du cycle I), les volumes du lavage au chloroforme et de l'élution au chloroforme/méthanol (95/5) (v/v, 4/1) sont regroupés pour cibler le décrochage de l'AO en une seule fraction. Mais le rendement obtenu (86 %) est en dessous de nos attentes et les pertes au cours du rinçage (0,9 µg/g GD) montrent que la récupération de l'AO est incomplète.



Essai 2 : Cette fois les deux lavages (hexane/chloroforme (50/50) et chloroforme 100 %) sont conservés mais on diminue les volumes (3 mL) pour éviter un décrochage prématuré de l'AO. La phase d'éluion est également modifiée en augmentant ϵ^0 , à savoir un rapport de volume à volume de (70/30) pour le mélange chloroforme/méthanol. Le rendement obtenu est nettement meilleur (114 %), les pertes au cours du lavage sont négligeables. Toutefois, l'AO n'a pas encore été récupéré dans sa totalité (perte de 0,7 μ g/g GD).

Essai 3 : Pour limiter les deux lavages de l'essai 2 à un seul transfert un troisième type de lavage est testé. Pour cela on s'appuie sur l'essai 1 en diminuant uniquement le volume et on abaisse de nouveau le rapport volume à volume du solvant d'éluion chloroforme/méthanol, pour tenter un décrochage total. Les résultats sont peu concluants (faible rendement, pertes lors du rinçage), excepté pour l'étape de lavage où cette fois aucune trace d'AO n'a été détectée.

Essai 4 : On garde le schéma général de l'essai précédent, en modifiant uniquement la polarité du solvant d'éluion : un ϵ^0 plus faible semblant mieux convenir (65/35). Les résultats sont relativement satisfaisants pour un volume d'éluion de 3 mL (un rendement de 110 %), malgré le problème persistant de perte d'AO (1 μ g/g GD) du rinçage.

Essai 5 : Pour minimiser les coûts d'analyse le volume du lavage est diminué. La nature et le volume (3 mL) du solvant d'éluion de l'essai précédent sont conservés mais on ajoute à la suite 3 mL de méthanol 100 %. Les résultats sont concluants :

- aucune perte détectée lors du lavage,
- un rendement de 110 %,
- pertes minimales lors du rinçage (0,3 μ g/g GD).

3.2.1.3. Développement méthodologique sur colonne DPE C 18

Parallèlement aux séries de tests précédentes, nous avons réalisé un ensemble d'essais sur phase C18. Pour ce second axe de recherche, nous nous sommes basées sur le protocole SPE des DTXs dans le phytoplancton, mis au point par le laboratoire (Mondeguer, 2002) ainsi que sur les conditions instrumentales usuellement utilisées en détection CLHP/F ou CLHP/MS.

Les tests ont été menés sur un échantillon certifié. Nous avons cherché dans un premier temps à vérifier le choix du solvant d'extraction (acétone ou méthanol) puis à comparer différentes polarités pour l'éluion.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 3.

Pré-traitement	SPE					
	Solvant d'extraction	Solvant de dissolution	Volume charge	Elution		Rendement %
				Solvant	Volume	
Acétone	MeOH/H ₂ O (80:20)	1.5 mL	MeOH*	5 mL	60	
			MeOH/H ₂ O (80:20)		27	
MeOH*			67			
MeOH/H ₂ O (80:20)			84			
MeOH 100 %						

Tableau 3 : Développement SPE sur C18.



Contrairement au développement méthodologique sur Si, il apparaît que le méthanol est un meilleur solvant d'extraction si l'on utilise une phase C18.

En effet l'acétone ayant un spectre de solubilisation beaucoup plus large que celui du méthanol, on récupère dans l'extrait un ensemble de composés de polarité très variée. Comme le solvant d'élution est polaire, les composés interférents les plus polaires sont élevés en priorité.

Dans le cas où l'on extrait avec du méthanol, on diminue la quantité d'interférents. L'AO et la DTX1 étant moyennement polaires, l'élution est favorisée par l'emploi d'un solvant de polarité plus élevée, comme le mélange MeOH/H₂O (80/20) utilisé ici. A ce stade de développement, les résultats ne permettent pas de conclure, mais ils orientent la mise au point du procédé en particulier vers l'optimisation de la polarité et du volume du solvant d'élution.

4. Résultats et discussion

4.1. Les références normatives

Le protocole expérimental et l'exploitation statistiques des données brutes, optimisant le nombre d'essais à réaliser pour satisfaire les critères de validation ont été définis à partir du référentiel normatif suivant :

AFNOR, 1998. NF V 03-110 – Procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence. *AFNOR 1998*, 1^{er} tirage 98-12-F.

La validation de la procédure analytique a été vérifiée à travers cinq critères de validation. Les détails des données brutes utilisées pour l'étude statistique figure en annexe VIII.

4.2. La linéarité

Selon la note explicative CEE III/844/87-FR : « La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité (à l'intérieur d'un certain intervalle) à obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance à quantifier dans l'échantillon. ».

4.2.1. Etalonnage

Dans un premier temps l'étude de la linéarité portait sur une large étendue de concentrations, soit huit concentrations et six résultats indépendants par concentration à partir d'un standard externe d'AO/DTX1 (fig. 8).

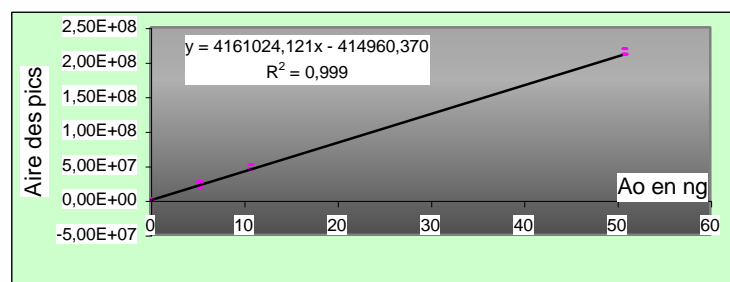


Figure 8 : Domaine de linéarité pour l'AO/DTX1 en MS² (n=6 ; p=8).

Linéarité

Présentation des Résultats :

Désignation	Unité	Gamme	Valeur observée	Valeur critique $\alpha=5\%$	Conclusion
Linéarité AO Standart					
test d'homogénéité des variances	Test Cochran	AO	0,4633	0,4775	Non Significatif
tests de comparaison des ord. Origine avec 0		AO	0,62	2,06	Non Significatif
pentés des droites d'ajustement	ng-1	AO	370864,80		
ordonnées à l'origine des droites d'ajustement		AO	4047,80		
Coef. Détermination		AO	0,9996		
F du test de régression		□	78543,27	4,414	Acceptable
F du test d'erreur de modèle		□	2,22	2,577	Acceptable
Etalonnage AO Standart					
Nbre de niveaux			9		
Nbre total de mesures			27		
Sensibilité	réponse	370864,80	0,989	ng	x=y-b/a
Blanc	réponse	4047,80	2,59E-15	ng	
Ecart-type de la sensibilité	réponse	1532,19	0,007	ng	
Ecart-type du blanc	réponse	6482,53	0,007	ng	
Limites de détection et de quantification AO Standart					
Ecart-type expérimental	réponse	28561,57269	0,066	ng	
Limite de détection	ng		0,063	ng	
Limite de quantification	ng		0,186	ng	

Tableau 4: Test de la linéarité, étude de l'étalonnage – n=3 ; p=9

Pour chacune des gammes, l'intervalle de concentration à valider allait de 0,05 à 50 ng selon une série de **huit** concentrations régulièrement espacées (n = 6 ; p = 8).

Sans qu'aucune pondération n'ait été appliquée, les résultats obtenus montraient que l'ensemble du domaine choisi était linéaire :

	Valeur calculée	Valeur critique	
F du test de régression	43024,63	7,314	acceptable
F du test d'erreur de modèle	0,35	3,291	acceptable

Cependant la non-homogénéité des dispersions des différents groupes nous a conduit à redéfinir notre domaine avec une gamme d'étalonnage plus courte, allant de 0,05ng à 11,5ng (n=3 ; p=9). Cela nous a aussi permis de diminuer les limites inférieures des domaines de détection et de quantification.

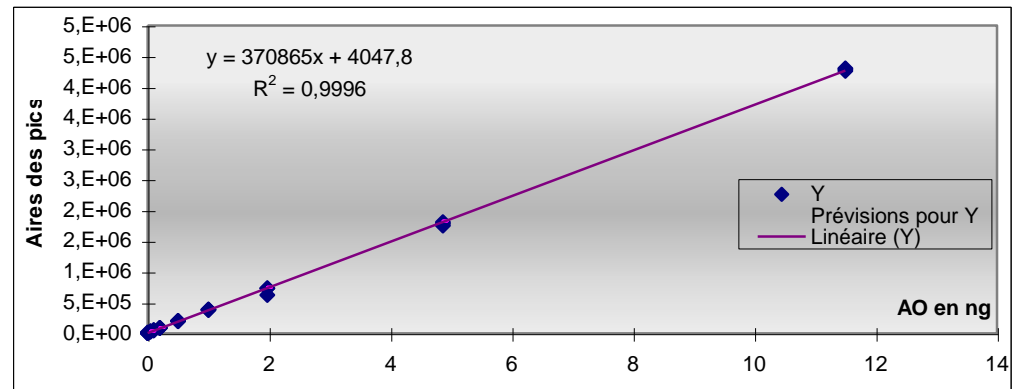


Figure 9 : Droite de quantification de l'ion fils de l'AO (MS²) pour n=3 ; p=9.

Les conclusions ci-dessous sont tirées des résultats présentés dans le tableau 4.

- 1- **Test d'homogénéité des variances** : la valeur calculée est inférieure à la valeur critique donnée par les tables au seuil de 5 %. Le test de Cochran n'est pas significatif, l'ensemble des variances peut être considéré homogène et on peut passer à l'analyse de la régression.
- 2- **Test de régression** : la valeur calculée est supérieure à la valeur critique donnée par les tables au seuil de 1 %. Le modèle de régression est donc considéré comme acceptable.
- 3- **Test d'erreur du modèle** : la valeur calculée est inférieure à la valeur donnée par les tables de Fisher au seuil de 1 %. Le domaine de linéarité choisi peut être validé.

Pour la suite de l'étude, la droite de régression obtenue avec un échantillon standard d'AO/DTX1, sera notre référence pour déterminer la quantité d'AO contenue dans les échantillons.

4.2.2. Seuil de détection et de quantification

Pour déterminer ces deux paramètres, deux méthodes seront appliquées :

- Une procédure s'appuyant sur les enregistrements graphiques, où les seuils de détection et de quantification sont estimés selon un rapport quantité/signal à partir du bruit de fond de l'enregistrement d'une petite concentration d'AO.
- Une seconde procédure reposant sur l'exploitation des mesures collectées lors de la régression linéaire de la droite d'étalonnage.

4.2.2.1 Limite de détection

Selon la note explicative CEE III/844/87-FR : « C'est la plus petite quantité d'une substance à examiner dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte. Le seuil de détection est généralement un paramètre des essais limites ».

Pour la résolution graphique, on définit le seuil de détection comme étant la concentration en toxine donnant un rapport signal sur bruit S/N égal à trois.

Comme le montre la figure 11, il faut diluer mille fois un échantillon de MUS-2 certifié à 11 µg/g d'AO, pour obtenir un rapport S/N = 3.

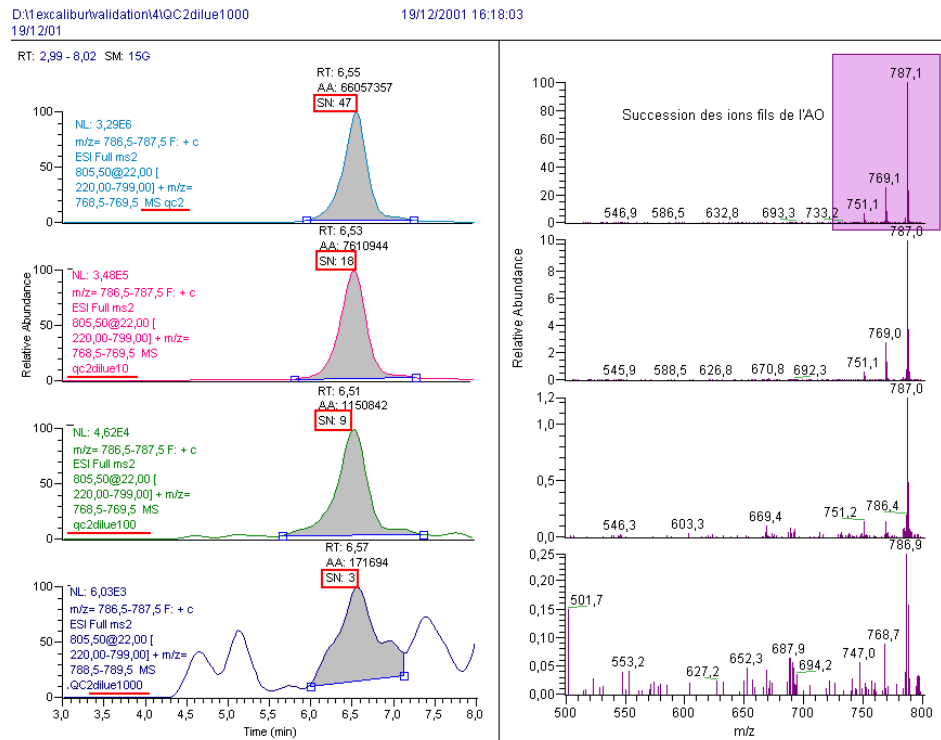


Figure 10 : Evolution du rapport S/N lors du calcul du seuil de détection de l'AO dans un échantillon certifié MUS-2.

Dans la méthode graphique, on peut remarquer qu'il est encore possible d'intégrer le pic d'AO correspondant au seuil de détection (fig. 10).

Pendant si l'on se réfère à la figure 11, on remarque qu'il serait illusoire de poursuivre les dilutions puisque pour l'échantillon dilué au millième on observe que la quantité d'AO contenue dans le MUS-2 à partir de l'étalonnage donne 40 µg/g de GD, soit un résultat très supérieur à la valeur certifiée de 11 µg/g de GD.



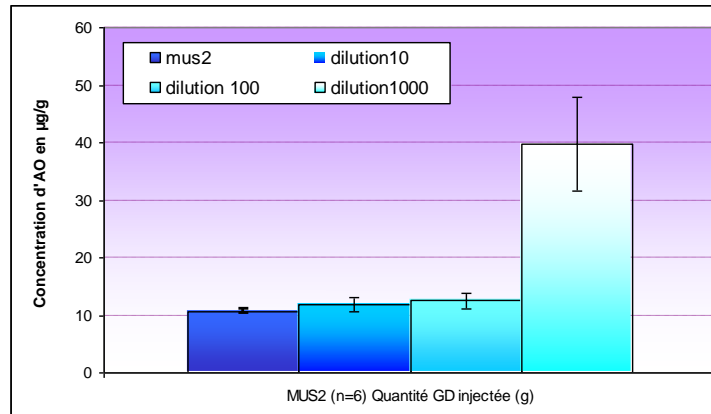


Figure 11 : Détermination du seuil de détection en CLHP/SM² à partir d'un échantillon certifié MUS-2 (n=6).

Dans la seconde procédure, le seuil de détection a été calculé à partir des variations enregistrées sur les 24 mesures de la courbe d'étalonnage (sensibilité), de trois fois la réponse du blanc et de l'écart type du blanc.

Cette méthode plus sévère rehausse les seuils précédemment calculés, ainsi :

	Résolution graphique (ng/5µL) n = 6	Résolution statistique (ng/5µL) n = 3
Seuil de détection	0,044 ng ± 0,006	0.063 ng ± 0,007

4.2.2.2. Limite de quantification

Selon la note explicative CEE III/844/87-FR : « C'est la plus petite quantité d'une substance à examiner dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une fidélité et une exactitude définies.

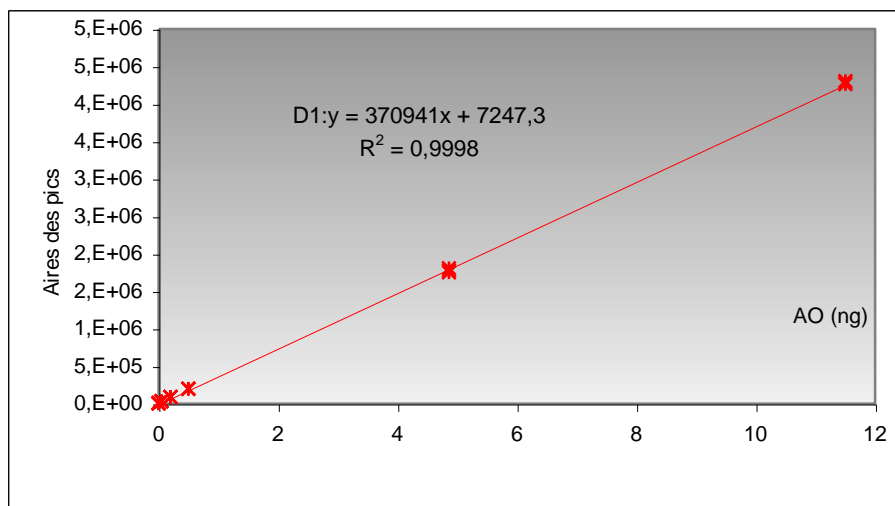
On définit la limite de quantification comme étant dix fois supérieure à la limite de détection ou comme l'obtention d'un rapport S/N égal à dix.

Dans le calcul des limites de quantification, on observe cette fois une plus grande tolérance du modèle statistique puisque la limite inférieure du domaine de quantification est de 0,186ng contre seulement 0,5 ng en résolution graphique (S/N = 10,88 ± 2,25 (n=6)). L'abaissement du seuil de quantification est à lier à l'optimisation apportée à la plage de la gamme car en effet pour une gamme plus large (comme définie initialement) allant de 0,5ng à 50ng le seuil de quantification n'est que de 0,84 ng !

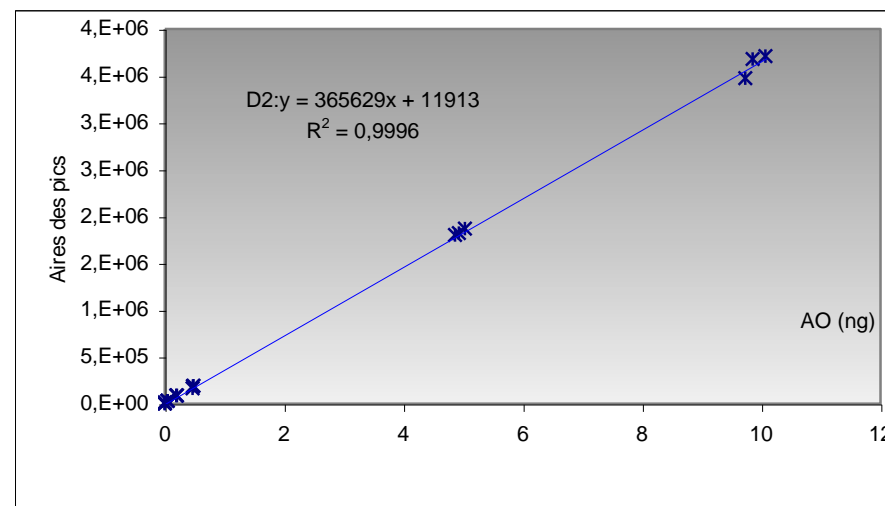
	Résolution graphique (ng/5µL) n=6	Résolution statistique (ng/5µL) n=3
Seuil de quantification	0,50ng ± 0,010	0,186 ng ± 0,007

Linéarité-Effet matrice

Désignation	Gamme	Test	Risque	Valeur observée	Valeur critique	Conclusion
Pentes des droites d'ajustement	Standard			370940,50		
	MUS-2			365629,279		
Ordonnées à l'origine des droites d'ajustement	Standard			7247,253		
	MUS-2			11912,852		
Coefficient de détermination	Standard			0,9998		
	MUS-2			0,9996		
Comparaison des ordonnées à l'origine avec 0	Standard	Student	1 %	1,23	2,91	NS
	MUS-2			1.40		
Comparaison des ordonnées à l'origine de D ₁ , D ₂				0.45		
Test de comparaison des pentes		Student	1 %	2.40	2,75	NS



Linéarité de la méthode sur une gamme d'étalonnage d'un standard AO/DTX1
 3 gammes de six niveaux



Linéarité de la méthode sur une matrice de glandes digestives de moules issue d'un échantillon
 MUS-2 certifié - 3 gammes de six niveaux

Tableau 5 : Etude de l'effet matrice – n=3 ; p=6

4.3. L'effet matrice

Les résultats ont été obtenus sur 3 lots de MUS2 indépendants (Numéro du lot - Date d'extraction - Masse de GD transférée : 118-15-oct-02-3,5848g / 308-12-nov-02-3,6615g / 118-22-nov-02-3,5388g) et 3 ampoules de standard certifiés.

A partir de deux droites (ng) à six niveaux (0,00 - 0,05 - 0,2 - 0,5 - 4,865 - 11,5), l'une issue d'échantillons certifiés (MUS-2), la seconde issue de standards AO/DTX1. On note (D_1): $y=b_1*x+a_1$ et (D_2): $y=b_2*x+a_2$ les droites de régression acquises respectivement avec les gammes du standard et du MUS-2 (n=3).

Au vu des résultats recensés dans le tableau ci-contre (Tableau 5 : Etude de l'effet matrice – n=3 ; p=6), les conclusions sont les suivantes :

- (1) Test de comparaison des ordonnées à l'origine avec 0 : donne des valeurs calculées inférieures à la valeur donnée par les tables de Student au seuil 1% pour le standard et le MUS-2. On peut donc affirmer que les ordonnées à l'origine a_1 et a_2 ne sont pas significativement différentes de zéro au seuil de probabilité $p = 1 \%$.
- (2) le Test de comparaison des ordonnées à l'origine des droites D_1 et D_2 : indique que le critère calculé est inférieur à la valeur donnée par les tables de Student au seuil 1%. On peut donc conclure que les ordonnées à l'origine a_1 et a_2 ne sont pas significativement différentes au risque 1 %.
- (3) Test de comparaison des pentes des droites D_1 et D_2 : ici aussi le critère calculé est inférieur à la valeur donnée par les tables de Student au seuil 1%. On peut donc conclure que les pentes b_1 et b_2 ne sont pas significativement différentes au risque 1 %.

Le processus d'extraction mis au point permet de comparer les pentes et les ordonnées à l'origine des droites D_1 et D_2 et l'on voit que les différences ne sont pas significatives. Cela nous autorise donc à utiliser un étalonnage externe, solution beaucoup plus confortable et beaucoup moins coûteuse qu'une quantification au sein de la matrice, par dopage, comme c'est souvent le cas dans le dosage des échantillons biologiques.

Nb : Bien que la NF V 0,3-110 ne le requière pas, nous avons testé l'homogénéité des variances. Ce test montre qu'au risque 5 % l'effet dispersif des réponses sur les standards (droite D_1) est acceptable. Pour D_2 , par contre le test montre qu'au sein des 3 lots de MUS2 traités, il existe une différence très significative d'un échantillon à l'autre. Cette hétérogénéité est relative au fait que chaque échantillon a été extrait de manière indépendante et l'on visualise ainsi à la fois l'effet matrice l'erreur expérimentale globale que subi chaque échantillon lors d'un processus d'extraction.

En regard à l'hétérogénéité des variances obtenues sur le MUS2, on peut dire qu'il existe bien un effet matrice.

Cependant, on peut supposer que si l'étude de l'effet matrice avait portée sur des valeurs plus proches du seuil de quantification on aurait obtenu une homogénéité des variances. D'autant que l'analyse de l'homogénéité des variance à partir d'un même échantillon donne une valeur calculée bien inférieure à la valeur critique.

C calculé	0,4508
C(a; k;p-1)	0,05
C(5; 6;2)	0,6161

4.4. L'exactitude

Selon la note explicative CEE III/844/87-FR : « l'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée comme une valeur de référence (standard international) et la valeur trouvée (valeur moyenne) obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois.

Sur trois lots de MUS-2 certifiés, les résultats ont été obtenus à partir de trois séries indépendantes de six concentrations allant de 0,3 ng à 10 ng.

En se référant à l'exploitation statistique des résultats obtenus à partir des calculs des recouvrements présentée en annexe VIII les conclusions sont les suivantes :

Désignation Pour n=3 – p=6	Test	Risque	Valeur observée	Unité	Valeur critique	Conclusion
Test d'homogénéité des variances intra-groupe	Cochran	1%	0,3702		0,7218	Non Significatif
Test de validité des moyennes	Fisher	1%	0,81		5,06	Non Significatif
Intervalle de confiance du recouvrement moyen	Student	1%	[97 - 105]	%		

(1) Test d'homogénéité des variances : une anomalie a été détectée lors de ce test sur l'échantillon certifié. De fait malgré une valeur suspecte ayant pu être considérée comme aberrante et éliminée, la valeur calculée (0,8527) restait supérieure à la valeur critique (0,6152) donnée par les tables de Cochran au seuil de 1%.

(2) Test de validité des moyennes : Dans la plage allant de 0,3ng à 11,5ng le test permet de mettre en évidence qu'au risque considéré de 1%, la valeur calculée est inférieure à la valeur donnée par les tables de Fisher

On peut alors dire que dans ces concentrations les variations obtenues entre les différents groupes sont seulement dues aux erreurs expérimentales.

(3) Estimation de l'intervalle de confiance du recouvrement moyen : le test de validité des moyennes étant vérifié, il est alors possible de déterminer, selon un niveau de confiance de 99 %, les valeurs maximales et minimales du recouvrement moyen. L'intervalle de confiance occupe une plage allant de 97 à 105 %.

La méthode d'analyse est donc considérée comme exacte dans un intervalle de linéarité de 0,3 ng à 11,5 ng pour un rendement de 101 %. On remarque que la méthode reste exacte pour des valeurs de 0,2ng mais pour un rendement de seulement 96 %.

Nb : Si l'on ne remet pas en cause la qualité de MUS2, l'hétérogénéité observée sur l'exactitude de la méthode est due à la plage des concentrations choisies, trop basses comparativement aux limites imposées par le seuil de quantification.

En effet comme le montre le tableau suivant, pour une plage débutant au seuil de quantification défini par la résolution statistique la valeur observée est bien inférieure à la valeur critique.



Cochran					
Etude de l'exactitude	Plage (ng)	Risque	Valeur observée	Valeur critique	Conclusion
Test d'homogénéité des variances intra-groupe pour n=8 et p=3	0,05-11,5	1%	0,8527	0,6152	S
Test d'homogénéité des variances intra-groupe pour n=7 et p=3	0,2-11,5	1%	0,6412	0,6644	NS
Test d'homogénéité des variances intra-groupe pour n=6 et p=3	0,3-11,5	1%	0,3702	0,7218	NS

4.5. La fidélité

Selon la note explicative CEE III/844/87-FR : « la fidélité de la procédure d'analyse exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites.

Elle s'exprime par la mesure de la répétabilité et de la reproductibilité interne (ou nommée fidélité intermédiaire dans la norme NF 5625).

La répétabilité représente l'accord entre les essais d'une même grandeur effectués dans des conditions aussi stable que possible et à de courts intervalles de temps, dans un même laboratoire, par un même opérateur employant le même équipement tandis que la reproductibilité interne à trait à des essais effectués dans des conditions fortement variables, à des jours différents, dans un même laboratoire, avec des opérateurs différents et un équipement différent.

Avec les conditions expérimentales suivantes : même laboratoire, deux opérateurs différents, même équipement, - un intervalle de temps établi pour 3 périodes (Lot 118 = 15-oct-02 / Lot 308 = 12-nov-02 / Lot 118 = 22-nov-02), nous avons mesuré la répétabilité et la reproductibilité interne ou fidélité intermédiaire.

Pour étudier ces deux critères, le plan expérimental a nécessité la réalisation de trois groupes indépendants de même grandeur (2,957 – 3,021 – 2,920 ng), chacun pour un nombre de cinq (groupe 1 une donnée manquante, groupe 2 une valeur aberrante) ou six réplicats. Ces trois groupes d'essais ont été effectués sur trois lots de MUS-2.

D'après les résultats obtenus (tableaux 6 et 7), les conclusions sont les suivantes :

Désignation	Test	Risque	Valeur observée	Unité	Valeur critique	Conclusion
Test d'homogénéité des variances intra-groupe	Cochran		0.622		0.793	NS
Paramètres de			CV _r =1.29	%		



fidélité		CV _R =2.08	
----------	--	-----------------------	--

Tableau 6 : Etude de la fidélité – n=3 ; p=6.

Désignation	Test	Risque	Valeur observée	Unité	Valeur critique	Conclusion
Vérification de la cohérence des erreurs de fidélité et d'exactitude	Fisher	1%	0,14		[0,44 - 2,35]	Var (fidélité) > Var (linéarité)

Tableau 7 : Vérification de la cohérence des erreurs de fidélité et d'exactitude.

- (1) Test d'homogénéité des variances intra-groupe: Après avoir éliminé une valeur aberrante, le test de Cochran n'est plus significatif pour un risque d'erreur de 1%, l'ensemble des variances peut être considéré comme homogène puisque $0,622 < 0,793$ ($C_{calculé} < C_{critique}$)
- (2) Paramètres de fidélité : les coefficients de variation de répétabilité (CV_r) et de reproductibilité (CV_R) étant respectivement de 1,3 % et 2,1 %, on peut affirmer que la variation des résultats est acceptable.
- (3) Vérification de la cohérence des erreurs de fidélité et de linéarité : le coefficient calculé étant inférieur à la valeur critique donnée par les tables de Fisher au seuil (1- α) avec $\alpha=0.01$, on doit admettre que la variance provenant du modèle fidélité est plus petite que la variance provenant du modèle linéarité.

En conclusion on peut considérer le procédé comme répétable et reproductible (dans le même laboratoire, avec le même équipement) pour la gamme d'étalonnage choisie dans le modèle de linéarité (0,186 à 11,5 ng) avec une exactitude donnant un rendement de 101 %.

5. Perspectives

Comme nous l'avons précisé précédemment, nous avons choisi de privilégier la validation du protocole d'extraction automatisée sur les glandes digestives (phase Silice) pour des raisons stratégiques. Cependant, pour une complémentarité évidente, il est important pour le laboratoire d'étendre l'utilisation de notre station automatisée de retraitement des échantillons à l'analyse des extraits phytoplanctoniques.

En effet si dans le cadre de la santé, il est important de déterminer la toxicité des coquillages, l'étude de la toxicité du phytoplancton reste une des pierres angulaires des processus de contamination.



L'analyse des différents profils toxiques du phytoplancton est une source de nouvelles données pour comprendre les processus de contamination et de décontamination des coquillages

Lors de l'élaboration du plan expérimental, la sélection des différents paramètres du protocole d'analyse nous a conduit à étudier différentes phases : la Silice mais aussi une phase greffée, inverse et apolaire (C18). En raison du caractère moins sélectif de cette phase et des résultats obtenus, le développement d'une méthode multi-toxines apparaît comme voie intéressante.

6. Conclusion

L'automate ASPEC-Xli, contrôle de nombreuses applications et a de grands avantages. Comme nous l'avons vu il permet une reproductibilité maximale des extractions en phase solide par le contrôle du débit à travers les diverses cartouches (Si, C18...)

La station d'extraction automatisée dont s'est doté le laboratoire utilise des colonnes standard de 1, 3, ou 6mL mais aussi des plaques 96 puits, proposées par de nombreux fabricants.

Ce large éventail de possibilités est un réel avantage dans la mise au point de protocoles d'analyses physico-chimiques. Cet atout est renforcé par une caractéristique spécifique de l'ASPEC-Xli qui est actuellement le seul automate pouvant gérer la collecte de fractions multiples. L'ASPEC-Xli peut en effet collecter des fractions multiples et complexes à partir de microplaques, de tubes ou même de ballons dans le cas des collectes à grand débit et ce quels que soient le nombre et la nature des échantillons.

Un autre avantage de cette technique, est qu'elle utilise de plus petits volumes de solvants et cela permet de diminuer significativement le coût d'une extraction.

Sur l'automate l'injection de l'extrait peut se faire soit directement en ligne dans l'analyseur soit par l'intermédiaire des flacons placés dans le passeur automatique d'échantillons du système HPLC.

Dans les protocoles d'extraction et de purification des molécules organiques, l'ASPEC-Xli automatise les étapes de conditionnement de la colonne, du dépôt de l'échantillon et d'élution avec un risque de contamination inter-échantillon < à 0,005 %.

Enfin sa programmation par micro-ordinateur permet de mettre au point, d'exécuter puis de modifier facilement les divers protocoles sauvegardés.

Pour cette adaptation du protocole d'extraction liquide/liquide à l'extraction sur cartouche solide et l'optimisation des divers paramètres de l'automatisation, nous avons vérifié notre aptitude à obtenir des valeurs similaires à celles d'un échantillon de moules de référence contaminées en AO à la concentration certifiée de 11.0 ± 0.3 $\mu\text{g/g}$ de GD, en s'appuyant sur la quantification par HPLC/ESI/MS².

La spécificité et la qualité des résultats obtenus sur cartouche Silice notamment un rendement de 110% (cf cycle II), nous ont conduit à élaborer une validation de notre procédure.

Sur la base de deux documents spécifiques de validation (SFTP, AFNOR), l'exploitation statistique des données nous a permis de valider le procédé automatisé de l'extraction sur phase solide de l'AO/DTX1 dans les coquillages selon un certain nombre de critères (linéarité, exactitude, fidélité).

Ainsi pour un risque d'erreur de 1 % nous avons validé notre méthode pour :

- détecter jusqu'à 63 pg soit 2540 fois la limite légale maximale, d'équivalent AO pouvant être contenue dans les coquillages,
- quantifier jusqu'à 0,186ng soit 860 fois la limite légale maximale, d'équivalent AO pouvant être contenue dans les coquillages.

Grâce à la validation de notre procédé nous avons pu mettre à l'épreuve la sensibilité de notre méthode capable d'enregistrer comme significatives les variances intra-groupe existant entre trois extraits de moules pourtant identiquement certifiés respectivement à 11 et 1 µg d'AO et de DTX1. Cette hétérogénéité n'a cependant pas été un frein dans le dosage des toxines par rapport à une quantification sur des standards puisque nous avons montré que la méthode était exacte avec un intervalle de confiance du recouvrement moyen allant de 97 à 105%, pour un niveau de confiance de 99 %

La validation de notre méthode analytique nous a permis de définir la fidélité de notre méthode. On peut ainsi dire que dans le laboratoire, avec notre équipement la répétabilité et la reproductibilité de la méthode ont donné respectivement des coefficients 1,3 % et 2,1 %.

L'analyse de l'AO/DTX1 par extraction automatisée SPE des dinophysistoxines (DTXs), quantifiées par HPLC/ESI/MS² est donc une technique qui permet de répondre à un surcroît d'analyses dans de très bonnes conditions.

Cette méthode présente un gain, non pas tant en terme de temps d'analyse (le temps de réalisation d'une extraction par l'automate n'est pas plus court que celui mis par un opérateur), qu'en allègement de la charge de travail imposée par les protocoles manuels. On peut également envisager que dans le cadre de procédures fixes l'automate qui existe aussi dans une version privée de l'option développement de méthodes (moins coûteux), soit transféré au profit des laboratoires côtiers.

Par sa justesse et sa fiabilité, cette automatisation pourra répondre à la charge analytique requise dans la démonstration de l'efficacité du dispositif de filtration sur *Dinophysis spp*, pour les BIA. De plus pour l'obtention d'un éventuel agrément de leurs installations, les professionnels de la conchyliculture pourront aussi s'appuyer sur des résultats acquis selon les exigences réglementaires et normatives en vigueur.



Références bibliographiques

- AFNOR, 1998. NF V 03-110 – Procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence. *AFNOR 1998*, 1^{er} tirage 98-12-F.
- AKASAKA K., OHRUI H., MEGURO H., YASUMOTO T., 1996. Fluorimetric determination of diarrhetic shellfish toxins in scallops and mussels by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 729, 381-386.
- ALGRANTI P., GUILLOTEAU M., HISTE M., LALLIER M., N'GUYEN-HUU J.J., RUSSOTO R., 1992. Guide de validation analytique, rapport d'une commission SFSTP-Méthodologie et Exemple d'application. *S.T.P. PHARMA Pratiques 2*, 205-226.
- BIALOJAN C., TAKAY A., 1988. Inhibitory effect of a marine sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J.*, 256, 283-290
- CIMINIELLO P., DELL' AVERSANO C., FATTORUSSO E., FORINO M., MAGNO S., POLETTI R., 2002. Direct detection of yessotoxin and its analogues by liquid chromatography coupled with electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 968, 61-69.
- CROCI L., DRAISCI R., LUCENTINI L., COZZI L., GIANNETTI L., TOTI L., STACCHINI A., 1995. Influence of the extraction procedure on recovery of okadaic acid from experimentally contaminated mussels. *Toxicon* 33, 1511-1518
- DRAISCI R., GIANNETTI L., LUCENTINI L., MARCHIAFAVA C., JAMES K.J., BISHOP A.G., HEALY B.M., KELLY S.S., 1998. Isolation of a new okadaic acid analogue from phytoplankton implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Journal of Chromatography A*, 798, 137-145.
- DRAISCI R., PALLESCHI L., GIANNETTI L., LUCENTINI L., JAMES K.J., BISHOP A.G., SATAKE M., YASUMOTO T., 1999. New approach to the direct detection of known and new diarrhetic shellfish toxins in mussels and phytoplankton by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 847, 213-221.
- EDEBO L., LANGES S., LI X.P., ALLENMARK S., 1988. Hepatopancreas tissue homogenate from DSP-mussels and okadaic acid induce rapid hypersecretion and anti-secretory peptides in ratsmall intestine. *7th Int. IUPAC Symp. on Mycotoxins and Phycotoxins*, Tokyo.
- FENN J.B., MANN M., MENG C.K., WONG S.K., WHITEHOUSE C., 1989. Electrospray ionisation for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246 : 64.
- FERNANDEZ M.L., MIGUEZ A., CACHO E., MARTINEZ A., 1996. Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels. *Toxicon* 34, 381-387.
- FREMY J.M., LASSUS P., 2001. Toxines d'algues dans l'alimentation. *Ed. IFREMER*, 560 p.
- FREMY J.M., PUECH L., KRYS S., DRAGACCI S., 1999. Recent advances in analytical procedures for the detection of diarrhetic phycotoxins: a review. *Journal of Applied Phycology*, 11, 377-384.
- FUREY A., LEHANE M., GILLMAN M., FERNANDEZ-PUENTE P., JAMES K.J., 2001. Determination of domoic acid in shellfish by liquid chromatography with electrospray ionization and multiple tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 938, 167-174.
- GOTO H., IGARASHI T., YAMAMOTO M., YASUDA M., SEKIGUCHI R., WATAI M., TANNO K., YASUMOTO T., 2000. Quantitative determination of marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 907, 181-189.
- HOLMES M.J., TEO S.L.M., LEE F.C., KHOO H.W., 1999. 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. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 181, 257-268.



- HOLMES M.J., TEO S.L.M., KHOO H.W., 1999. Detection of diarrhetic shellfish poisoning toxins from tropical shellfish using liquid chromatography-selected reaction monitoring mass spectrometry. *Nat. Toxins* 7, 361-364.
- HU T., CURTIS J.M., WALTER J.A., WRIGHT J.L.C., 1995. Identification of DTX 4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *Prorocentrum Lima*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 597-599.
- ITO S., TSUKADA K., 2001. Matrix effect and correction by standard addition in quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins. *Journal of Chromatography A*, 943, 39-46.
- JAMES K.J., BISHOP A.G., DRAISCI R., PALLESCHI L., MARCHIAFAVA C., FERRETI E., SATAKE M., YASUMOTO T., 1999. Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin-2 analogues from marine phytoplankton and shellfish. *Journal of Chromatography A*, 844, 53-65.
- JAMES K.J., BISHOP A.G., HEALY B.M., RODEN C., SHERLOCK I.R., TWOHIG M., DRAISCI R., GIANNETTI L., LUCENTINI L., 1998. Efficient isolation of the rare diarrhoeic shellfish toxin, dinophysistoxin-2, from marine phytoplankton. *Toxicon* 37, 343-357.
- JAMES K.J., FUREY A., LEHANE M., RAMSTAD H., AUNE T., HOVGAARD P., MORRIS S., HIGMAN W., SATAKE M., YASUMOTO T., 2001. First evidence of an extensive northern European distribution of azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish. *Toxicon* 40, 909-915.
- LEE J.S., IGARASHI T., FRAGA S., DAHL E., HOVGAARD P., YASUMOTO T., 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *Journal of Applied Phycology* 1, 147-152.
- LEE J.S., YANAGI T., KENMA R., YASUMOTO T., 1986. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, 51(3), 877-881
- 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* 40, 1321-1330.
- MARR J.C., HU T., PLEASANCE S., QUILLIAM M.A., WRIGHT J.L.C., 1992. Detection of new 7-O-acyl derivatives of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* 30, n° 12, 1621-1630.
- MONDEGUER F., 2002. Un nouvel outil dans l'identification et la quantification des dinophysistoxines (DTX_s): le couplage chromatographie liquide haute performance / spectrométrie de masse par piégeage d'ions quadripolaire et interface d'électro-nébulisation (CLHP/SM²). *IFREMER Nantes, DEL/PN*.
- PAUL W., 1990. Electromagnetic traps for charged and neutral particles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 29.
- PEREIRA A., KLEIN D., SOHET K., HOUVENAGHEL G., BRAEKMAN J.C., 1995. Improvement to the HPLC-fluorescence analysis method for the determination of acid DSP toxins. *Technique et Documentation – Lavoisier, Intercept Ltd*, 333-338.
- PUECH L., DRAGACCI S., GLEIZES E. & FREMY J.M., 1999. Use of immunoaffinity columns for clean up of diarrhetic toxins (okadaic acid and dinophysistoxins) extracts from shellfish prior to their analysis by HPLC/fluorimetry. *Food Additives and Contaminants* 16, n° 6, 239-251.
- QUILLIAM M.A., 1995. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection. *Journal of AOAC International* 78, n° 2, 555-569.
- QUILLIAM M.A., HARDSTAFF W.R., ISHIDA N., McLACHLAN J., REEVES A.R., ROSS N.W., WINDUST A.J., 1996. Production of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum Lima* in culture and development of analytical methods. *Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO* 1996, 289-292.



- QUILLIAM M.A., ROSS N.W., 1996. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins and metabolites in plankton and shellfish by ion-spray liquid chromatography-mass spectrometry. *In: Application of LC-MS in environmental chemistry*. Barcelo (ed.); Elsevier, Amsterdam, 351-364.
- SECHET V., QUILLIAM M., ROCHER G., 1997. Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) toxins in *Prorocentrum lima* in axenic and non-axenic batch culture : detection of new compounds and kinetics of production. *In: Proc. 8th Int. Conf. Harmful algal blooms*. June 25-29, Vigo, Espagne, 485-488.
- SUZUKI T., MITSUYA T., IMAI M. & YAMASAKI M., 1996. DSP toxin contents in *Dinophysis fortii* and scallops collected at Mutsu bay, Japan. *Journal of Applied Phycology* 8, 509-515.
- SUZUKI T., OTA H., YAMASAKI M., 1998. Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallops *Patinopecten yessoensis*. *Toxicon* 37, 187-198.
- SUZUKI T., MACKENZIE L., STIRLING D., ADAMSON J., 1999. Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxicon*, 39, 507-514.
- SUZUKI T., YASUMOTO T., 2000. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of the diarrhetic shellfish-poisoning toxins okadaic acid, dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-6 in bivalves. *Journal of Chromatography A*, 874, 199-206.
- STAFFORD G.C., Jr., KELLEY P.E., SYKA J.E.P., Reynolds W.E., TODD J.F.J., 1984. Recent improvements in and analytical applications of advanced ion trap. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 60, 85-98.
- TACHIBANA K., SCHEUER P.J., TSUKITANI Y., KIKUCHI, H., VAN ENGEN, D., CLARDY, J., GOPICHAND, Y., SCHMITZ F.J.J., 1981. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two sponges of the genus *Halichondria*. *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 2469-2471.
- VALE P., DE M. SAMPAYO M.A., 2001. Esterification of DSP toxins by Portuguese bivalves from the Northwest coast determined by LC-MS – a widespread phenomenon. *Toxicon* 40, 33-42.
- VALE P., DE M. SAMPAYO M.A., 2001. Evaluation of marine biotoxin's accumulation by *Acanthocardia tuberculatum* from Algarve, Portugal. *Toxicon* 40, 511-517.
- VALE P., DE M. SAMPAYO M.A., 2002. First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (*Solen marginatus*) and green crabs (*Carcinus maenas*) in Aveiro lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton. *Toxicon* 40, 989-996.
- WRIGHT J.L.C., CEMBELLA A.D., 1998. Ecophysiology and Biosynthesis of polyether marine biotoxins. NATO ASI Ser. G, 41, 427-451.
- YASUMOTO T., MURATA M., OSHIMA Y., SANO M., MATSUMOTO G.K., CLARDY J., 1985. Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*, 41, 1019-1025.

ANNEXE I

Estimation financière du Développement méthodologique de l'extraction automatisée



DEPENSES D'INVESTISSEMENT

<i>Objet de la dépense</i>	<i>Montant HT</i>
AUTOMATE D'EXTRACTION COMPLET	42391,31
GENERATEUR AZOTE POUR AUTOMATE	10185,19
Total en Euros HT.	52576,50

DEPENSES DE FONCTIONNEMENT(estimation sur une période de six mois)

Solvants	807,73
Colonnes HPLC et SPE	3064,92
Matériel certifié,	779,13
Matériel LC/MS, Matériel APEXLi, Matériel laboratoire	8563,19
Total en Euros HT.	13124,97

Déplacements : 3 x 2 agents	55,00
Prélèvements St Jean de Monts - Réunions/Manip Concarneau	
Total en Euros HT.	55,00

SALAIRES ET CHARGES DE STRUCTURE

Technicien/Assistant	40816,00
Ingénieur de Recherches	60288,00
Total en Euros HT.	101104,00

ANNEXE II

Matériels certifiés

Société	Utilisation	Produit et référence	Unité
CNRC-NRC Conseil national de recherches Halifax – Nova Scotia Canada B3H B128Z1	Etalonnage	Acide okadaïque free acid OACS-1	4*0.5 mL=101.2 µg
	Validation	AO/DTX1 – MUS-2	4*4 g
SIGMA Chimie	Calibration LC/MS	Reserpine 97% Réf. 200-047-9	1 g
		Cafféine Réf. 200-362-1	1 mL
		MET-ARG-PHE-ALA Réf. 40061-60002	



Solvants

Société	Utilisation	Produit et référence	Unité
FISHER	Analyse LC/MS	Méthanol Réf. 8402	2.5 L
		Acétonitrile Réf. 9017	2.5 L
		TFA Réf. 9470	10*1 mL
V.W.R S.A	Extraction	Méthanol Hypersolv Réf. 15250	2.5 L
		Acétone « Analar » Réf. 10003	2.5 L
		2-propanol Lichrosolv Réf. 1040-2500	2.5 L
		Chloroforme stabilisé en éthanol Réf. 2445-2500	2.5 L
		n-hexane 95% « Analar » Réf. 104446G	2.5 L
		Acide formique 98-100% pour analyse, ACS Réf. 264.0100	100 mL
		Acétate de sodium cristallisé p.a pour analyse Réf. 0096581	500 g
		Acide acétique Réf. 100063.1	1 L
	Chloroforme Normapur pour analyse, Prolabo Réf. 22711290	1 L	

Colonnes

Société	Utilisation	Produit et référence	Unité
International Sorbent Technology	Extraction phytoplancton	C18 - 3 mL, 500 mg Réf. 220-0050-B	50
		ENV+ - 3 mL, 500mg Réf. 915-0050-B	50
ALLTECH		C18 high capacity, Extract clean – 8 mL, 500mg Réf. 255350	30
WATERS	Extraction coquillages	Oasis Max - 3 cc Réf. 186000367	10
		Oasis HLB - 3 cc Réf. WAT094226	10
V.W.R S.A		Lichrolut Si - 3 mL, 500 mg Réf. 1020240001	50
INTERCHIM Division INTERBIOTECH	HPLC	Kromasil C18 (250*2.0 mm I.D.) 5 µm 100 Å en Si modulocart expert Réf. KR5C18#25QS	1
		cartouche de garde Kromasil C18 – 5µm Réf. CH980671	3

ANNEXE III

Méthode classique d'extraction des DTXs dans les coquillages

Moules

Ecoquillage des moules.

Dissection : Prélèvement des glandes digestives de moules (GD-environ 30 g).

Broyage

Broyer à l'ultra turrax (8 000 tr/min), les glandes digestives.

Pesée

Peser 4 g de glandes digestives dans un tube (au milligramme près).

Extraction

Homogénéiser au MeOH/H₂O (80/20) et extraire successivement avec respectivement 10, 8 et 6 mL.

Après centrifugation pendant 10 min à 3000 tr/min, (3 fois) récupérer les phases surnageantes.

Rassembler les 3 extraits et Compléter à 25 mL MeOH/H₂O.

Elimination du culot.

Partage liquide/liquide

Prélever 5 mL de la phase MeOH/H₂O. (→ 0,8 g GD).

Méthanol/Hexane (séparation des composés apolaires)

Ajouter 5 mL de C₆H₁₄.

Agitation.

Centrifugation - Centrifuger pendant 10 min à 3000 tr/min et récupérer la phase supérieure (C₆H₁₄) (pour une analyse ultérieure des DTX3 – diviser en deux avant évaporation pour comparer phases hexane hydrolysées/phases hexane non-hydrolysées).

Modification de la polarité de la phase méthanolique

Ajouter 1 mL H₂O.

Méthanol/Chloroforme (séparation des composés moyennement polaires)

Ajouter 6 mL CHCl₃.

Centrifugation - Centrifuger pendant 10 min à 3 000 tr/min et récupérer la phase (inférieure) (CHCl₃) (dans la phase méthanolique (supérieure) il reste les composés fortement polaires).

Evaporation

Evaporation à sec (évaporation centrifuge /basse température/sous vide) des phases organiques "hexane" et chloroforme".

Extrait

Chaque extrait contient l'équivalent de 0.8 g de glande digestive.

Le résidu sec est repris dans 1 mL de méthanol

- Deux fois 40 µL (réplicats) sont dédiés à l'analyse CLHP/F avec dérivation préalable soit :

$$40\mu\text{L}/1000\mu\text{L} * 0,8 \text{ g de GD} = 0,032 \text{ g soit } \underline{0,00064 \text{ g de GD injectés}} \\ (\underline{0,032/500*10}).$$

- Les 920 µL restants sont analysés en LC/SM (0,8/1000*920 = 0,736 g) soit 0,004 g de GD injectés (0,736/920*5).

ANNEXE IV

La purification :

Protocole d'extraction manuelle en phase solide utilisée dans l'analyse HPLC/F des DTXs

Une fois la dérivation effectuée, une étape de chromatographie sur cartouche est réalisée dans le but de purifier l'ester obtenu.

Pour cela, on utilise une colonne d'extraction (SPE) Lichrolut Si* (500 mg) Merck-Clevenot 2024-001, montée sur une cuve à chromatographie permettant de traiter 24 échantillons à la fois.

Solvant I → Chloroforme [*stabilisé en ethanol. Iso Merck 2445-2500*]

Solvants II → Mélange 50/50 d'Hexane/Chloroforme [*n-Hexane 95 % "ANALAR" 152496G /Chloroforme stabilisé en ethanol. Iso Merck 2445-2500*]



Solvant III → Chloroforme [*Chloroforme stabilisé à 0,6 % d'ethanol*
Cofralab/Prolabo Ref 22711290]

Solvants IV → Mélange 95/5 de Chloroforme/Méthanol [*Chloroforme stabilisé en*
ethanol. Iso Merck 2445-2500 / Methanol hypersolv 152506X]

Conditionner les cartouches avec le solvant n° I (jusqu'à obtenir une phase transparente).

Equilibrer les cartouches avec les solvants II.

Evaporer les échantillons estérifiés.

Ajouter 200 µl (en 2 fois pour rincer) de solvants II dans chaque vial ambré et agiter.

Prélever et déposer les 2 fois 100 µl sur la cartouche.

Eluer par 5 mL de solvants II.

Eluer par 5 mL de solvant III.

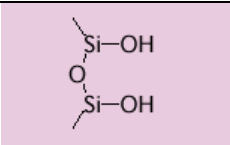
Installer dans la cuve à SPE les tubes à hémolyse pour collecter la phase IV.

Eluer avec 5 mL de solvants IV.

Evaporer les échantillons recueillis dans les tubes à hémolyse.

Reprendre les échantillons avec 2 fois 100 µl de CH₃CN/H₂O à 80/20 (agiter au vortex) et déposer dans des vials coniques de 200 µL. Fermer les vials.

L'échantillon est prêt pour l'analyse chromatographique CLHP/F.

 <p>Structure chimique des groupes silanols à la surface d'une particule de Silice Catalogue IST,2001</p>	<p>*La Silice est une phase dite adsorbante et polaire ; sa surface est active par nature. Les composés, moyennement polaires (AO), dissous dans un solvant d'une force éluante ϵ° faible, sont essentiellement retenus par adsorption sur les sites polaires du gel de Silice. L'élué de ces composés (via la création de liaisons hydrogène entre soluté et phase mobile), requière alors des solvants ayant un ϵ° élevé.</p>
--	---

ANNEXE V

Méthode classique d'extraction manuelle des DTXs dans phytoplancton

Sonication

Plonger la sonde à ultrasons dans le tube contenant les 40 mL d'échantillon à analyser (entouré de glace afin d'éviter les échauffements).

Mettre l'appareil sous tension (ON), le Timer sur 5 minutes et la puissance à 1,5.

Centrifugation

Centrifuger pendant 20 minutes à 3 000 tr/min et 0 °C (programme 5).

Extraction sur Phase Solide (SPE)

Equilibrer la veille une colonne greffée C18* avec 20 mL de méthanol puis 20 mL d'eau.

Déposer 20 mL de surnageant sur la colonne (les composés apolaires et moyennement polaires seront retenus tandis que les produits polaires seront élués).

Eluer les toxines avec 10 mL de méthanol.

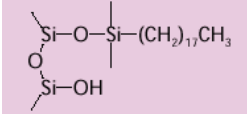
La fraction méthanolique (10 mL) est évaporée et constitue le résidu I (ce résidu est le plus chargé en acide okadaïque).

Eventuellement rincer la colonne avec 10 mL d'eau.
 Regrouper le surnageant non retenu sur la colonne avec les 10 mL d'eau de rinçage.
 On obtient ainsi un aliquote **A** de 30 mL.
 Conserver cet aliquote au congélateur. (- 20 °C).

Partage liquide/liquide

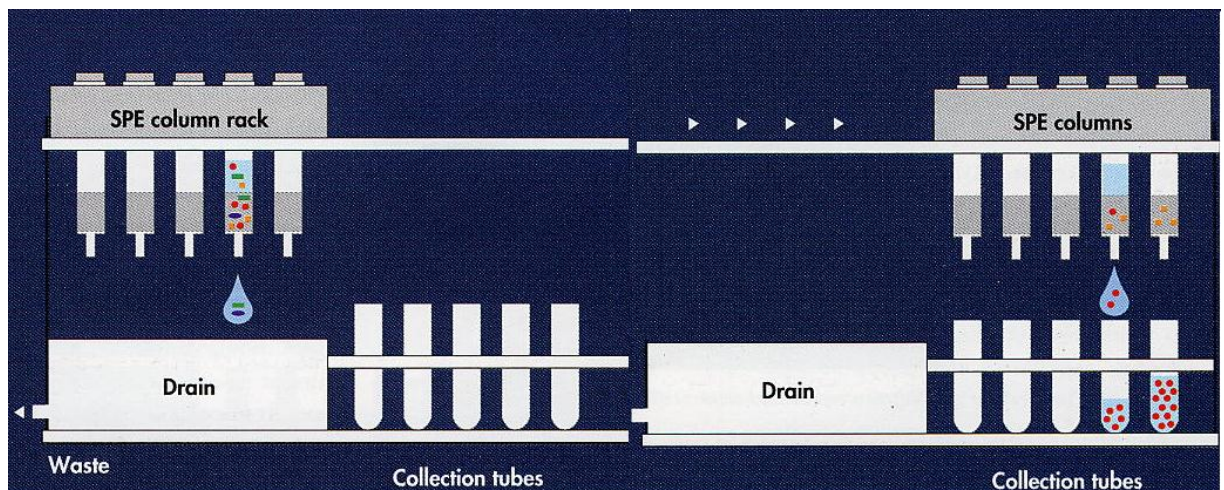
Prendre le résidu **I** dans 5 mL de méthanol à 80 %.
 Laver 2 fois avec 5 mL d'hexane (C₆H₁₄) afin d'éliminer les résidus lipidiques, puis centrifuger (10 min à 4 000 tr/min à - 8 °C) et jeter la phase organique surnageante.
 Ajouter 1 mL d'acide acétique à 0,2 %.
 Extraire les toxines avec 2 fois 6 mL de chloroforme (c.à.d. ajouter deux fois 6 mL de chloroforme, agiter pendant 5 mn, puis centrifuger (10 min à 4 000 tr/min et - 8 °C).
 Récupérer la phase chloroformique et la transférer dans un tube gradué (environ 12 mL).
 Evaporer la phase chloroformique.

Le résidu sec est prêt à être dérivé et analysé en CLHP/F, ou bien il est repris dans 200 µL de méthanol pour être directement analysé en CLHP-MS².

 <p>Structure chimique d'une silane C18, greffée par liaison covalente à la surface d'une particule de Silice Catalogue IST.2001</p>	<p>*La phase C18 est une phase greffée, inverse, apolaire. Cette phase est obtenue par greffe de groupements actifs sur un noyau inerte vis à vis des solutés à séparer. La séparation est fondée sur un partage des solutés entre la phase stationnaire et la phase mobile, via des interactions dipolaires ou de type liaisons de Van Der Waals et hydrogène. Les solutés sont dissous dans un solvant de force éluante élevée. Selon la nature des solutés (polaire ou apolaire), on élueira avec un solvant de force éluante respectivement élevée ou faible.</p>
---	---

ANNEXE VI

Unités et Caractéristiques instrumentales de la chaîne d'automatisation



Pincipe d'extraction sur ASPEC XLi, (Gilson)

- ◆ Une pompe seringue à faible pression « 02 Syringe Pump », *Gilson*, équipée de deux seringues de 10 mL et 0.5 mL.



La configuration « double seringue - jonction en T » permet de distribuer :

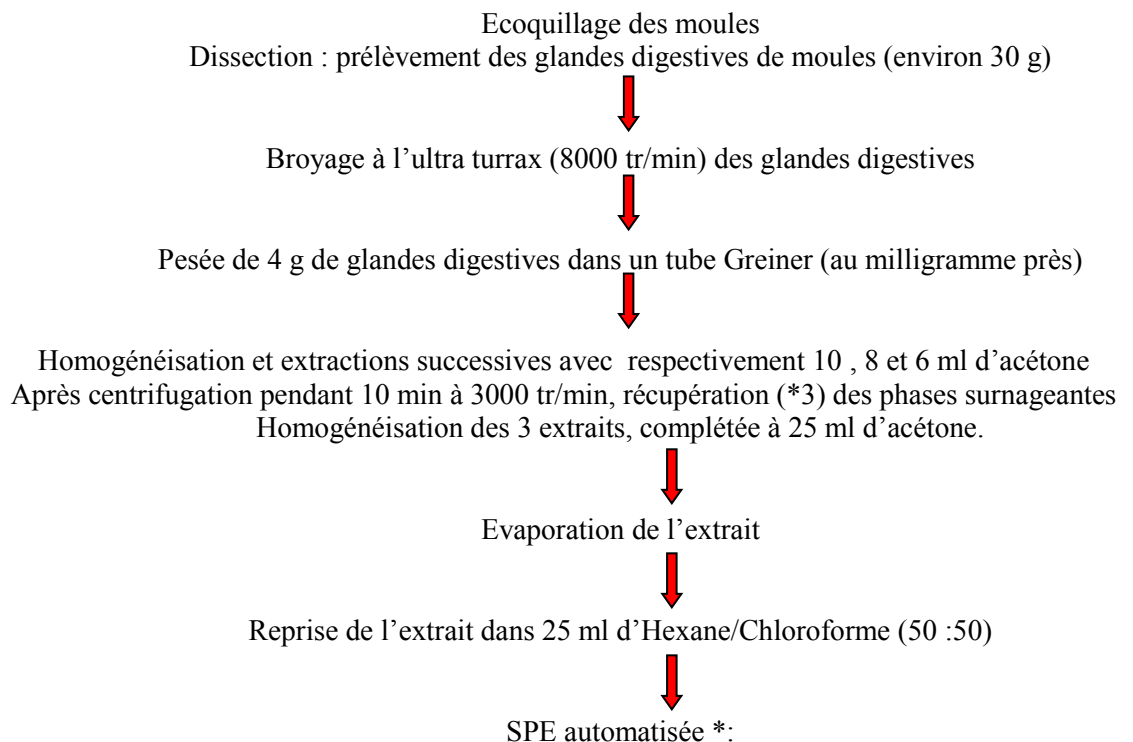
- des volumes importants (x 10 mL), rapidement,
- des volumes plus petits avec une grande précision (μL).

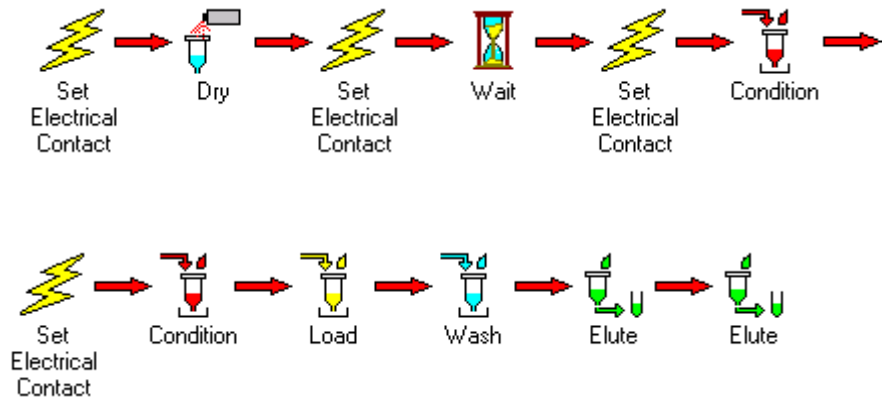
Avant chaque prélèvement de solvant, l'aiguille aspire un volume d'air, créant une bulle qui évite toute contamination avec le solvant précédemment transféré.

- ◆ Un dégazeur « 864 Degasser », *Gilson*.
- ◆ Un préparateur d'échantillons ASPECTM XL, *Gilson*, constitué de :
 - * un plateau relié à un système d'évacuation permettant la récupération des solvants et supportant des portoirs divers (flacons, tubes, μ plaques...),
 - * un pont métallique, sur lequel on trouve deux stations de rinçage pour l'aiguille et 9 puits de transferts qui permettent de démultiplier le nombre et la quantité des mélanges de solvants,
 - * un bras mobile muni d'une l'aiguille, qui reproduit le déplacement dans l'espace (x, y, z) d'un opérateur effectuant les manipulations habituelles du pipetage,
 - * une valve Rhéodyne 7010, *Gilson*, compatible avec tout système HPLC, pour injecter en ligne les échantillons.
- ◆ Une pompe haute pression à gradient, « 307 Piston Pump », *Gilson*, utilisée pour l'enrichissement de traces des échantillons.
- ◆ Un générateur d'azote (CLAIND), pour l'évaporation des échantillons.
- ◆ Un micro-ordinateur équipé du logiciel « 735 Sampler Controller », *Gilson*, pour la programmation et le contrôle de l'automate.

ANNEXE VII

Protocole d'extraction automatisée en phase solide pour l'analyse des DTXs dans les GD de moules
















Evaporation de l'extrait collecté

Reprise dans 1 mL de méthanol LC/SM

Injection de 5 µl de l'échantillon dans la chaîne HPLC/SM

***paramètres instrumentaux de l'automatisation**

 <p>1 Set Electrical Contact Task Parameters: -- Contact Number = 4 -- State = CLOSE</p>  <p>2 Dry Task Parameters: -- Dec Name = DEC -- Drying duration = 4 min -- Needle Height = 0 mm -- Purge Time = 0.3 min -- Reset Mobile Rack = False</p> <p>3 Set Electrical Contact Task Parameters: -- Contact Number = 4 -- State = OPEN</p> <p>On sèche les colonnes sous N2 pour éliminer toute trace d'humidité et tasser les particules de Silice</p>	 <p>9 Load Task Parameters: -- Dec Name = DEC</p> <p>SOURCE: -- Select = From Tray -- Name = ECHANTILLONS -- Volume = 1.50 ml -- Disp Flow Rate = 2.50 ml/min -- Asp Flow Rate = 4 ml/min</p> <p>AIR PUSH: -- Method = Using Syringe -- Air Push Volume = 0.1 ml --Disp Flow Rate = 6 ml/min</p>
 <p>4 Wait Task Parameters: -- Wait For = Time Time = 0.1 min</p> <p>Pour éviter tout problème électronique, lors d'un changement de vanne</p>	 <p>10 Wash Task Parameters: -- Dec Name = DEC</p> <p>Solvent: -- Select = From Tray -- Name = Hexane/Chloroforme (50 :50) -- Volume = 3 ml -- Disp Flow Rate = 3 ml/min -- Asp Flow Rate = 6 ml/min</p> <p>AIR PUSH: -- Method = Using Syringe -- Air Push Volume = 0.1 ml -- Air Push Disp Flow Rate = 6 ml/min</p>
 <p>5 Set Electrical Contact Task Parameters: -- Contact Number = 3 -- State = CLOSE</p>	

 <p>6 Condition Task Parameters: -- Dec Name = DEC Solvent: -- Select = From Tray -- Name = Chloroforme (V.W.R) -- Volume = 20 ml -- Disp Flow Rate = 8 ml/min -- Asp Flow Rate = 8 ml/min AIR PUSH: -- Method = Using Syringe -- Air Push Volume = 0.1 ml -- Disp Flow Rate = 6 ml/min Le chloroforme, par fermeture de la vanne 3 est récupéré pour une réutilisation</p>	 <p>11 Elute Task Parameters: -- Dec Name = DEC -- Collect Name = COLLECT1 Solvent: -- Select = From Tray -- Name = Chloroforme/MeOH (65 :35) -- Volume = 3 ml -- Disp Flow Rate = 3 ml/min -- Asp Flow Rate = 6 ml/min AIR PUSH: -- Method = Using Syringe -- Air Push Volume = 0.1 ml -- Disp Flow Rate = 6 ml/min -- Reset Mobile Rack = False</p>
 <p>7 Set Electrical Contact Task Parameters: -- Contact Number = 3 -- State = OPEN 3 Condition Task Parameters: -- Dec Name = DEC Solvent: -- Select = From Tray -- Name = Hexane/CHCl3 (50 :50) -- Volume = 10 ml -- Disp Flow Rate = 8 ml/min -- Asp Flow Rate = 8 ml/min AIR PUSH: -- Method = Using Syringe -- Air Push Volume = 0.3 ml -- Disp Flow Rate = 6 ml/min Le solvant par ouverture de la vanne 3, est récupéré dans un bac déchet pour le retraitement</p> 	 <p>12 Elute Task Parameters: -- Dec Name = DEC -- Collect Name = COLLECT1 Solvent: -- Select = From Reservoir (méthanol) -- Volume = 3 ml -- Disp Flow Rate = 3 ml/min AIR PUSH: -- Method = Using Syringe -- Air Push Volume = 0.3 ml -- Air Push Disp Flow Rate = 6 ml/min -- Reset Mobile Rack = True</p>

ANNEXE 8



Etude statistique

TABLEAUX DES DONNEES BRUTES UTILISEES DANS LA VALIDATION STATISTIQUE I - LINEARITE – Recherche du domaine (Norme SFSTP, 1992).p=8 ;n=6)

Etalon (ng) (xi)	Réponses instrumentales (Yij)	Désignation	Unité	Echantillons	Valeur observée	Valeur critique	Conclusion
0,00	55102,61538	pentes des droites d'ajustement ordonnées à l'origine des droites d'ajustement	ng-1	AO Standart	4161024,12		
0,00	72517,77059						
0,00	68197,10766			AO Standart	-414960,37		
0,00	0						
0,00	216769,6262						
0,00	0						
0,50	872735,8198	Coef. Corrélation		AO Standart	0,9990		
0,50	1336911,471						
0,50	928467,5694	tests de comparaison des ord. Origine avec 0		AO Standart	1,06	2,69	Non Significatif
0,50	1362075,317						
0,50	1384477,218						
0,50	1385997,65						
1,01	3546324,427	test d'homogénéité des variances		AO Standart	0,4259	0,4226	Significatif
1,01	3904653,26						
1,01	3459209,513						
1,01	3714097,326						
1,01	3501391,406						
1,01	3904625,759	F du test de régression			4,302E+04	7,314	Acceptable
2,07	6960403,88	F du test d'erreur de modèle		AO Standart	3,496E-01	3,291	Acceptable
2,07	9086768,488						
2,07	6940091,167						
2,07	9252969,056						
2,07	6549609,643						
2,07	8714642,096						
5,06	15455115,79	Nbre de niveaux			8		
5,06	23447200,13	Nbre total de mesures			48		
5,06	17180174,34	Sensibilité		4161024,12	1,100		
5,06	24323438,74	Blanc	réponse - ng	-414960,37	6,85E-16		
5,06	17707621,85	Ecart-type de la sensibilité	x=y-b/a	19190,6653	0,104		
5,06	25344909,19	Ecart-type du blanc	réponse - ng	392278,78	0,194		
10,54	40123153,95						
10,54	49726209,49						
10,54	43263200,95						
10,54	44392697,94						
10,54	44500706,88						
10,54	44303748,92						
10,54	44392697,94	Ecart-type expérimental	réponse - ng	2211130,44	0,631		
25,30	103896723,7	Limite de détection	ng		0,183		
25,30	103311830,8	Limite de quantification	ng		0,843		
25,30	105180130,2						
25,30	103557663,4						
25,30	105154222,8						
25,30	104206963,9						
50,60	208239159,2						
50,60	207455835,5						
50,60	209573133,5						
50,60	209512146						
50,60	217334971,9						
50,60	209578776,5						

II - LINEARITE – VALIDATION DU DOMAINE (NORME SFSTP, 1992).P=9 ;N=3

Niveaux	Etalon (ng) (xi)	Réponses instrumentales (Yij)
1	0,00	3173,68
	0,00	0,00
	0,00	14102,03
2	0,05	32627,70
	0,05	31710,26
	0,05	32521,29
3	0,10	52157,77
	0,10	48863,84
	0,10	50768,35
4	0,20	89204,09
	0,20	89264,44
	0,20	88279,21
5	0,50	197608,50
	0,50	201228,18
	0,50	200094,80
6	1,00	385378,25
	1,00	378684,98
	1,00	388179,98
7	1,97	733731,86
	1,97	732452,50
	1,97	621510,90
8	4,87	1807310,92
	4,87	1778319,44
	4,87	1751450,11
9	11,50	4305817,69
	11,50	4290268,90
	11,50	4263411,87



III - LINEARITE - EFFET MATRICE (NORME SFSTP, 1992)

A) MUS-2

Essai i/j sur trois MUS2 indépendants extractions indépendantes	Quantité introduite (ng) Xij	Surface Yij	Essai i/j sur un MUS2 - cinq extractions indépendantes	Quantité introduite (ng) Xij	Surface Yij
1/1	0,00	3173,68	1/1	0,00	4788,22
2/1	0,00	0,00	2/1	0,00	0,00
3/1	0,00	14102,03	3/1	0,00	4788,22
1/2	0,047	31851,592	1/2	35,147	17127270,946
2/2	0,048	31717,653	2/2	33,624	16794221,773
3/2	0,047	31083,919	3/2	33,790	18175316,586
1/3	0,197	85834,631	1/3	35,815	15938649,720
2/3	0,201	89305,942	2/3	37,035	16295699,122
3/3	0,195	88562,256	3/3	44,716	17920060,065
1/4	0,473	188122,075	1/4	42,495	17120157,541
2/4	0,483	191017,931	2/4	42,561	16556066,419
3/4	0,467	163054,355	3/4	39,790	15842363,125
1/5	4,929	1821936,377	1/5	36,119	16021029,817
2/5	5,035	1868437,297	2/5	36,659	16101092,001
3/5	4,866	1799114,875	3/5	37,280	15603135,767
1/6	9,858	3678291,417	1/6	43,762	18196925,356
1/6	10,069	3708446,899	1/6	39,492	16507454,387
1/6	9,732	3476148,616	1/6	39,038	16040738,045

B) AO STANDART

Essai i/j	Quantité introduite (ng) Xij	Surface Yij
1/1	0,050	32627,699
2/1	0,050	31710,256
3/1	0,050	32521,285
1/2	0,200	89204,092
2/2	0,200	89264,437
3/2	0,200	88279,211
1/3	0,500	197608,505
2/3	0,500	201228,184
3/3	0,500	200094,798
1/4	4,865	1807310,918
2/4	4,865	1778319,438
3/4	4,865	1751450,106
1/5	11,500	4305817,695
2/5	11,500	4290268,901
3/5	11,500	4263411,871



VI - EXACTITUDE SUR MUS2(NORME SFSTP, 1992)

NOMBRE DE GROUPES (K) 8
 NOMBRE DE REPLICATS (P) 3
 NOMBRE TOTAL DE MESURE (N) 24

Essai i/j	Quantité introduite Xij (ng)	Quantité retrouvée (ng)	Recouvrement Yij (%)	SCE(Yj)
1/1	0,047	-0,003	6,2	6129,91082
2/1	0,048	0,048	99,4	
3/1	0,047	0,049	104,5	679,108372
1/2	0,197	0,089	45,2	
2/2	0,201	0,120	59,6	69,537932
3/2	0,195	0,159	81,7	
1/3	0,334	0,304	91,2	28,3014365
3/3	0,345	0,334	96,7	
2/3	0,338	0,348	103,0	35,2687432
3/4	0,467	0,452	96,7	
2/4	0,483	0,484	100,0	23,6173561
1/4	0,473	0,493	104,2	
3/5	3,021	2,968	98,2	140,657994
1/5	2,920	2,975	101,9	
2/5	2,957	3,153	106,6	82,5613598
2/6	5,035	4,737	94,1	
1/6	4,929	4,930	100,0	111,1
3/6	4,866	4,868	100,1	
3/7	7,552	7,299	96,7	111,1
2/7	7,394	7,556	102,2	
1/7	7,299	8,257	113,1	111,1
2/8	10,069	10,037	99,7	
3/8	9,732	9,751	100,2	111,1
1/8	9,858	10,948	111,1	

V - FIDELITE SUR MUS2(NORME SFSTP, 1992)

NOMBRE DE GROUPES (K) 3
 NOMBRE DE REPLICATS (P) 6
 NOMBRE TOTAL DE MESURE (N) 18

Groupe	Essai i/j	Quantité introduite Xij (ng)	Quantité retrouvée (ng)	Recouvrement Yij (%)
1	1/1	2,957	2,979	100,738
	2/1	2,957	3,095	104,648
	3/1	2,957	2,962	100,153
	4/1	2,957	2,975	100,578
	5/1	2,957	2,978	100,682
	6/1	---	---	---
	2	1/2	3,021	3,199
2/2		3,021	3,113	103,055
3/2		3,021	3,169	104,912
4/2		3,021	3,104	102,753
5/2		3,021	3,520	116,513
6/2		3,021	3,153	104,391
3	1/3	2,920	2,952	101,104
	2/3	2,920	2,924	100,151
	3/3	2,920	2,965	101,558
	4/3	2,920	2,932	100,436
	5/3	2,920	2,942	100,763
	6/3	2,920	2,968	101,657



RAPPORT DÉTAILLÉ

Statistiques de la régression

Coefficient de détermination multiple	0,99978671
Coefficient de détermination R ²	0,99957347
Coefficient de détermination R ²	0,99955641
Erreur-type	28561,5727
Observations	27

ANALYSE DE VARIANCE

	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Valeur critique de F
Régression	1	4,7793E+13	4,7793E+13	58587,4146	1,1833E-43
Résidus	25	2,0394E+10	815763434		
Total	26	4,7814E+13			

	Coefficients	Erreur-type	Statistique t	Probabilité	Limite inférieure pour seuil de confiance = 95%	Limite supérieure pour seuil de confiance = 95%
				0,5380111		
Constante	4047,80357	6482,53479	0,62441679	7	-9303,2174	17398,8245
Variable X 1	370864,804	1532,19293	242,048372	43	367709,196	374020,413

ANALYSE DES RÉSIDUS

RÉPARTITION DES PROBABILITÉS

Observation	Prévisions pour Y	Résidus	Résidus normalisés	Centile	Y
1	4047,80357	-874,122195	-0,03121093	1,85185185	0
2	4047,80357	-4047,80357	-0,14452866	5,55555556	3173,68138
3	4047,80357	10054,2267	0,35899072	9,25925926	14102,0303
4	22591,0438	10036,6553	0,35836333	12,962963	31710,2561
5	22591,0438	9119,21231	0,32560561	16,6666667	32521,285
6	22591,0438	9930,24123	0,35456377	20,3703704	32627,6991
7	41134,284	11023,4864	0,39359858	24,0740741	48863,8397
8	41134,284	7729,5557	0,27598729	27,7777778	50768,3498
9	41134,284	9634,0658	0,34398869	31,4814815	52157,7704
10	78220,7645	10983,3275	0,39216469	35,1851852	88279,2113
11	78220,7645	11043,6721	0,39431932	38,8888889	89204,092
12	78220,7645	10058,4469	0,35914141	42,5925926	89264,4365
13	189480,206	8128,299	0,2902246	46,2962963	197608,505
14	189480,206	11747,9785	0,4194669	50	200094,798
15	189480,206	10614,5923	0,37899883	53,7037037	201228,184
16	375283,473	10094,7794	0,36043868	57,4074074	378684,976
17	375283,473	3401,50302	0,12145221	61,1111111	385378,252
18	375283,473	12896,5047	0,46047555	64,8148148	388179,978
19	734651,468	-919,613144	-0,0328352	68,5185185	621510,898
20	734651,468	-2198,96836	-0,07851516	72,2222222	732452,5
21	734651,468	-113140,571	-4,03973538	75,9259259	733731,855
22	1808305,08	-994,15961	-0,03549692	79,6296296	1751450,11
23	1808305,08	-29985,6393	-1,07065085	83,3333333	1778319,44
24	1808305,08	-56854,9712	-2,03003252	87,037037	1807310,92
25	4268993,06	36824,6398	1,31484046	90,7407407	4263411,87
26	4268993,06	21275,8459	0,75966372	94,4444444	4290268,9
27	4268993,06	-5581,18419	-0,19927871	98,1481481	4305817,69

