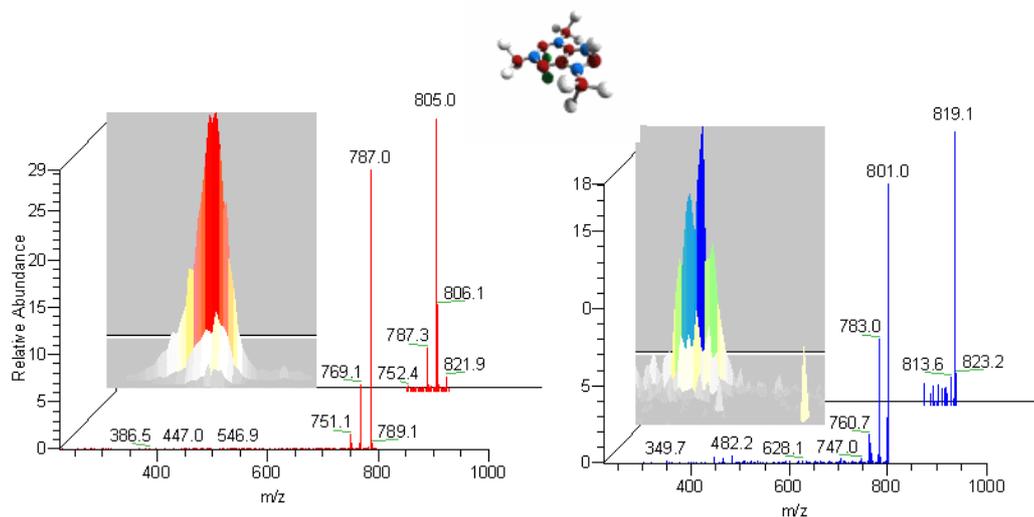


**Un nouvel outil dans l'identification et la quantification des dinophysistoxines (DTX<sub>s</sub>) : le couplage Chromatographie Liquide Haute Performance / Spectrométrie de Masse par piégeage d'ions quadripolaire\* et interface d'électro-nébulisation (CLHP/SM<sup>2</sup>)**

\* (LCQ™ ThermoFinnigan Corporation)

Marque déposée d'un détecteur de masse pour chromatographie liquide

**Florence Mondeguer**



## Fiche documentaire

<b>Numéro d'identification du rapport :</b> RST.DEL/02.01/PN <b>Diffusion :</b> libre : <input checked="" type="checkbox"/> restreinte : <input type="checkbox"/> interdite : <input type="checkbox"/> <b>Validé par :</b> Patrick Lassus  Adresse électronique : - chemin UNIX :  - adresse WWW :	<b>date de publication :</b> Juin 2002  <b>nombre de pages :</b> 35  <b>bibliographie :</b> Oui  <b>illustration(s) :</b> Oui  <b>langue du rapport :</b> Français
<b>Un nouvel outil dans l'identification et la quantification des dinophysistoxines (DTX<sub>s</sub>) : le couplage Chromatographie Liquide Haute Performance / Spectrométrie de Masse par piégeage d'ions quadripolaire* et interface d'électro-nébulisation (CLHP / SM<sup>2</sup>)</b> *(LCQ™ ThermoFinnigan Corporation) Marque déposée d'un détecteur de masse pour chromatographie liquide	
<b>A new tool for detection and the confirmed quantification of dinophysistoxines (DTX<sub>s</sub>) : High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry with quadruple ion trap* and electrospray interface (HPCL / SM<sup>2</sup>)</b> *(LCQ™ ThermoFinnigan Corporation) Trademark of a bench-top mass spectrometer detector for liquid chromatographs, featuring MS, MS <sup>2</sup> , MS <sup>n</sup> scan powers	
Contrat n° _____ Rapport intermédiaire <input type="checkbox"/> Rapport définitif <input checked="" type="checkbox"/> N° _____	
<b>Auteur(s) principal(aux) :</b> <b>Florence Mondeguer</b>	<b>Organisme / Direction / Service, laboratoire</b> Ifremer Direction de l'Environnement et de l'aménagement Littoral DEL/MP/PN
Collaborateur(s) :  Coordination - secrétariat : M. Vrignaud	Organisme / Direction / Service, laboratoire
Cadre de la recherche : Programme : _____ Convention : _____ Projet : _____ Autres (préciser) : _____ Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)	
<b>Résumé :</b> Ce rapport est une présentation d'une nouvelle méthode pour l'identification et la quantification confirmée des dinophysistoxines (DTX <sub>s</sub> ) 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/SM <sup>2</sup> ). Les paramètres de la source ESI et de l'analyseur à piège d'ions ont été optimisés pour fournir une détection des DTX <sub>s</sub> avec un maximum de sensibilité. Ces améliorations ont été effectuées après une séparation en phase inverse sur une colonne C <sub>18</sub> 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 <sup>-1</sup> . De même, pour un extrait brut phytoplanctonique à 50 cellules/litre de <i>Dinophysis sp</i> nous avons pu détecter une quantité d'AO de 2 pg.cellule <sup>-1</sup> .	

**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 électrospray interface (HPLC/ESI/MS<sup>2</sup>).

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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> OA can be detected.

**Mots-clés :**

Intoxication par les coquillages ; Dinophysistoxines ; Acide okadaïque ; Dinophysistoxine-1 ; Couplage CLHP-électro-nébulisation-SM<sup>2</sup> par piège d'ions ; Toxines.

**Words keys :**

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

Pour la relecture de ce rapport :

je tiens à remercier Eric Génin dont les critiques constructives m'ont permis de continuer à approfondir mes connaissances en spectrométrie de masse ;

je remercie aussi Monique Montagu pour l'attention qu'elle a bien voulu accorder aux protocoles et développements chimiques de ce travail.

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	4
<b>1. Les dinophysistoxines</b> .....	5
1.1. Inventaire des différentes DTXs .....	5
1.2. Caractéristiques et protocoles de mise en évidence des DTXs .....	6
1.2.1. AO/DTX1/DTX2 .....	6
1.2.2. DTX3 .....	6
1.2.3. Dérivés diols-esters et la DTX4 .....	7
<b>2. L'analyse des toxines AO/DTX1 par CLHP/ESI/SM<sup>2</sup></b> .....	7
2.1. Matériel (annexe I) .....	7
2.2. Les échantillons .....	8
2.3. Préparation des échantillons naturels et des échantillons de référence .....	8
2.3.1. Préparation des extraits de coquillages .....	8
2.3.2. Préparation des extraits de phytoplancton .....	9
2.4. Dérivation de l'AO/DTX1 pour une détection CLHP/F .....	9
2.5. Purification des dérivés fluorescents .....	9
<b>3. Un nouvel outil de détection des dinophysistoxines</b> .....	9
3.1. Les conditions CLHP/ESI-SM <sup>2</sup> .....	10
3.1.1. Principe de la détection par SM .....	10
3.1.2. Principe de la détection SM <sup>2</sup> par piège d'ions .....	11
3.1.3. Application à la détection des DTXs .....	14
3.1.3.1. Les rapports m/z caractéristiques des DTX <sub>S</sub> analysées en SM et SM <sup>2</sup> .....	14
3.1.3.2. Quantification de l'AO/DTX1 en balayage alterné SM-SM <sup>2</sup> .....	15
3.1.4. Les caractéristiques instrumentales et les conditions expérimentales de la détection de l'AO/DTX1 par CLHP/ ESI/SM <sup>2</sup> .....	16
3.1.4.1. Caractéristiques instrumentales .....	16
3.1.4.2. Les conditions CLHP .....	16
3.1.4.3. Caractéristiques ESI-SM <sup>2</sup> .....	16
<b>4. Résultats et Discussion</b> .....	18
4.1. Etalonnage .....	18
4.2. Exactitude sur une matrice de moules .....	19
4.3. Seuil de détection .....	20
4.4. Seuil de quantification .....	21
4.5. Mise en application sur une matrice phytoplanctonique .....	22
4.5.1. Proportionnalité de la procédure analytique de l'AO dans le phytoplancton .....	22
4.5.2. Justesse de la méthode .....	22
4.5.3. Les rendements d'extraction .....	24
4.6. Perspectives .....	24
<b>Conclusion</b> .....	25
<b>Références bibliographiques</b> .....	26
Annexe I : Matériels .....	27
Annexe IIa : Extraction des DTXs dans les coquillages .....	28
Annexe IIb : Extraction des DTXs dans le phytoplancton .....	29
Annexe III : Hydrolyse alcaline des phases hexane .....	30
Annexe IV : La dérivation .....	31
Annexe V : La purification - Extraction en phase solide (SPE) .....	32
Annexe VI : Matériels/appareils utilisés .....	33
Annexe VII : Mode de calcul de la quantité des toxines .....	34
Annexe VIII : Exemple de calculs pour l'évaluation de la quantité d'AO dans un échantillon certifié .....	35



## Introduction

Sous des conditions environnementales encore mal élucidées, on observe depuis plusieurs années des efflorescences de microalgues toxiques qui, en France, se produisent préférentiellement du printemps jusqu'à l'automne.

Ce phytoplancton toxique participe à la chaîne alimentaire et s'accumule dans les bivalves filtreurs (moules, huîtres...). Il en résulte donc une contamination des coquillages qui entraîne des risques pour la santé des consommateurs et des pertes économiques importantes pour les conchyliculteurs. En France, le risque le plus important de par son étendue géographique et sa durée est dû à un dinoflagellé du genre *Dinophysis*. Il est responsable des Intoxications Diarrhéiques par les Fruits de Mer (IDFM) ou Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP). Les toxines impliquées dans l'IDFM sont l'acide okadaïque (AO) et ses dérivés, les dinophysistoxines (DTXs).

En 1984, à la suite d'un recensement de plusieurs milliers de gastro-entérites chez des consommateurs de moules, un réseau de surveillance (REPHY) a été mis en place. Ce réseau surveille la flore phytoplanctonique et contrôle les coquillages avant leur mise sur le marché.

Dans ce cadre, notre laboratoire apporte son expertise au REPHY et mène en parallèle des études visant à la compréhension des processus de contamination et décontamination et à la description de la toxicité algale.

Pour répondre à ces missions, la mise en place de méthodes de détection et de quantification de ces composés toxiques est indispensable.

Actuellement l'évaluation réglementaire (directive européenne 1991) de la toxicité globale des coquillages repose sur un essai biologique sur souris (non validé), critiqué pour son manque de spécificité et sa faible sensibilité. Beaucoup de méthodes de dosage physico-chimique ont été publiées mais la plus utilisée reste la quantification par Chromatographie Liquide Haute Performance avec une détection par spectrofluorescence (CLHP/F). Pour être détecté par cette technique, l'AO, qui ne possède aucune propriété de fluorescence et un spectre UV aspécifique, doit être dérivé. L'étape de purification des toxines dérivées avant l'analyse chromatographique et l'instabilité du réactif de dérivation rendent cette analyse longue et délicate à mettre en œuvre.

De plus, dans certains échantillons de moules, il n'a pas été possible de confirmer la présence d'AO dans les extraits de ces glandes digestives par CLHP/F. En effet, l'intégration avec certitude des aires des pics d'AO n'a pu aboutir à cause d'interférences dues à une substance ayant un temps de rétention similaire à celui de l'AO.

Si la CLHP/F permet de détecter facilement les limites réglementaires de l'AO et de la DTX1 (respectivement 0,8 et 0,72  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), elle ne convient pas à l'analyse des faibles concentrations. Le bruit de fond de l'absorbance est trop fort pour permettre de détecter de faibles mais réelles variations de la quantité d'AO.

Pour ces raisons, nous avons mis au point une méthode usuelle pour la quantification et la détection confirmée des dinophysistoxines utilisant la Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse par ionisation électrospray (CLHP/ESI/SM<sup>2</sup>) avec un quadripôle à piégeage d'ions.



## 1. Les dinophysistoxines

### 1.1. Inventaire des différentes DTXs

La complexité des molécules de DTXs impliquées dans la toxicité des coquillages n'est pas le fait d'une seule substance mais d'une famille de dérivés (fig. 1) qui s'articule autour du squelette moléculaire de l'acide okadaïque (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. L'AO est un polyéther d'acides gras de formule brute  $C_{44}H_{68}O_{13}$  (MM =  $804\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) qui n'est pas dégradé par la chaleur ni par la congélation (Edebo *et al.*, 1988).

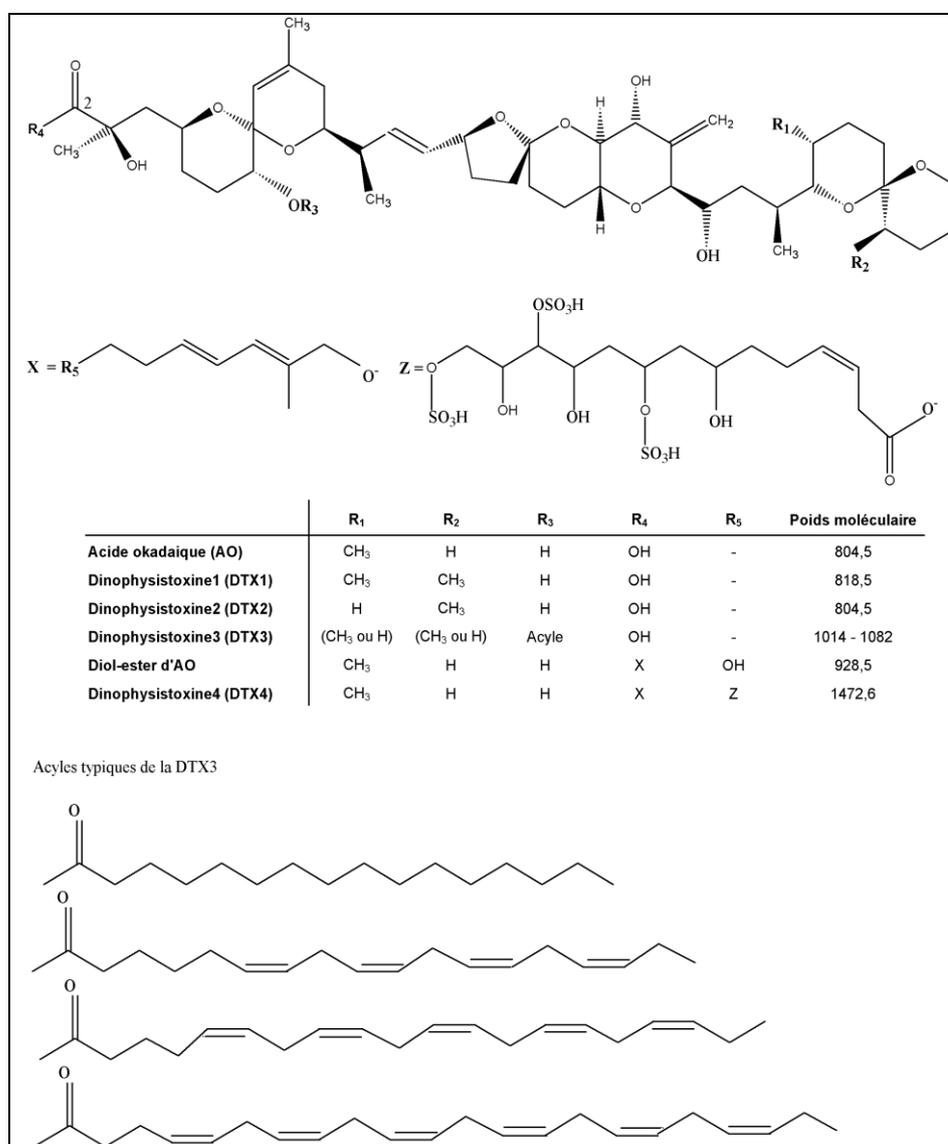


Figure 1 : Structures de l'acide okadaïque et de ses dérivés.



Parmi les dérivés de l'AO on trouve :

- ⊕ DTX1 : un dérivé méthylé de l'AO (35-methyl AO),
- ⊕ DTX2 : un isomère de l'AO,
- ⊕ DTX3 : le complexe DTX3, uniquement détecté chez les bivalves contaminés (Yasumoto *et al.*, 1985), regroupe l'ensemble des esters acylés au niveau de l'hydroxyle du carbone 7 (7-O-A.O/DTXs),
- ⊕ DTX4/5 : deux nouveaux dérivés de l'AO récemment identifiés à partir de culture de cellules phytoplanctoniques : la DTX4 et ses dérivés diol-esters (Hu *et al.*, 1995) et la DTX5 (Wright & Cembella, 1998). Ces toxines n'ont pour l'instant jamais été retrouvées dans les mollusques contaminés, mais elles ont été mises en évidence chez un dinoflagellé benthique producteur de toxines diarrhéiques : *Prorocentrum lima*.

L'AO, les DTX1 à 3 et les dérivés diol-esters sont liposolubles alors que les DTX4 et DTX5 sont hydrosolubles (dérivés esters de sulfate).

## 1.2. Caractéristiques et protocoles de mise en évidence des DTXs

### 1.2.1. AO/DTX1/DTX2

L'AO et ses substitués DTX1 et DTX2 sont des inhibiteurs des protéines phosphatases (PP) à sérine/thréonine des eucaryotes (inactives sur PP procaryotes). De ce fait, elles se sont révélées être des promoteurs tumoraux (Bialojan & Takay, 1988) et on leur attribue aussi une activité génotoxique.

Pour la recherche des toxines diarrhéiques : AO, DTX1 et DTX2 nous présenterons successivement deux méthodes d'extraction suivant la nature de l'extrait brut : glandes digestive de moules ou concentrat phytoplanctonique.

### 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. 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 ces dérivés 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.

Les dérivés acyles des 7-O-AO/DTXs sont des composés apolaires qui se retrouvent dans la phase hexane. L'instabilité des acyles-esters, la difficulté à les isoler, du fait de leur masse moléculaire élevée et de leur caractère lipophile, ainsi que l'absence de standard rendent les DTX3 difficiles à analyser. Leur dosage est réalisé indirectement par différence de la teneur en AO obtenue avant et après hydrolyse des phases hexane habituellement éliminées lors de l'extraction sélective de l'AO (fig. 2) (Fernandez *et al.*, 1996).



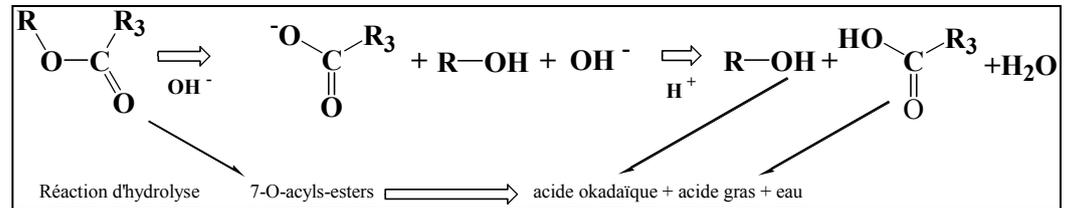


Figure 2 : Schéma de la réaction d'hydrolyse des 7-O-acyls-esters en AO.

### 1.2.3. Dérivés diols-esters et DTX4

Il semble que la fonction carboxylique libre soit nécessaire à l'activité inhibitrice des PP (Hu *et al.*, 1995). C'est pourquoi le dérivé diol-ester et les DTX4/5 sont considérés comme toxiquement inactifs ce qui permettrait d'expliquer l'absence d'autotoxicité chez les cellules productrices de toxines diarrhéiques.

La DTX4 ne possédant pas de propriétés spectrales UV spécifiques ni de fonction carboxylique libre pour une éventuelle dérivation en fluorescence, la molécule ne peut pas être analysée par CLHP/UV ou CLHP/F.

Les auteurs (Windust *et al.*, 2000) pensent que l'AO est séquestré dans la cellule sous une forme sulfatée inactive, la DTX4. Une hydrolyse enzymatique consécutive à la lyse des cellules, provoquée par la digestion ou une procédure d'extraction, transformerait rapidement la DTX4 en dérivés diols-esters à leur tour hydrolysés plus lentement en AO (Quilliam *et al.*, 1995) (fig. 3).

Pour libérer la totalité de l'AO et ou la DTX1 dans les échantillons de phytoplancton toxiques, on favorise cette activité enzymatique en provoquant la rupture de la paroi cellulaire par longue décongélation de l'échantillon à température ambiante (24 h).

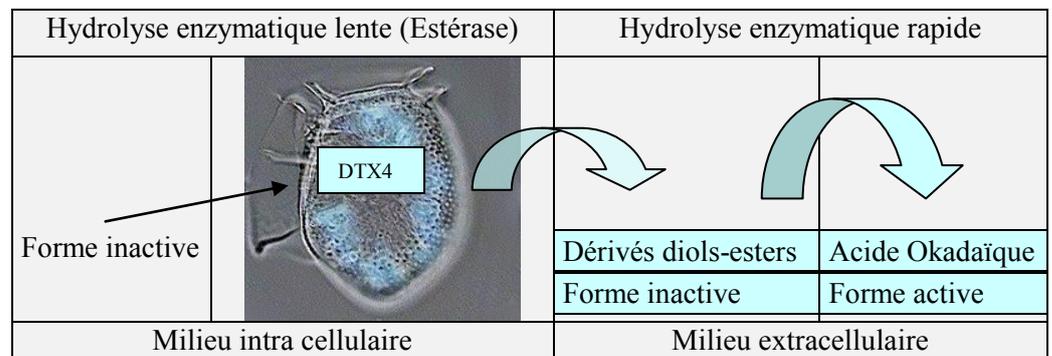


Figure 3 : Schéma de la biosynthèse de l'AO à partir de la DTX4.

## 2. L'analyse des toxines AO/DTX1 par CLHP/ESI/SM<sup>2</sup>

### 2.1. Matériel (annexe I)

Pour valider la méthode de détection de l'AO/DTX1 les matériels utilisés sont les suivants :

- Un standard certifié d'acide okadaïque (OACS-1 IBM, CNRC, Canada) correspondant à 25,3 µg/mL dans 0,5 mL de méthanol.



- Un échantillon 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 standards de toxines.
- Des standards AO et DTX1 commerciaux :
  - INTERCHIM**, Okadaïc acid free acid- Reference: MT-100 -100 µg,
  - CALBIOCHEM**, DTX1 Reference: 317480-25µg.
- D'un réactif de fluorescence pour la réaction de dérivation :
  - INTERCHIM**, 9-anthryldiazomethane (ADAM)-Molecular ProbeA-1400-25 mg.

## 2.2. Les échantillons

Les analyses ont été effectuées sur :

- des moules saines qui ont été utilisées en guise de témoin,
  - des coquillages présumés toxiques prélevés en divers points des côtes françaises,
  - des concentrats phytoplanctoniques, prélevés lors de blooms à *Dinophysis spp.*
- Les échantillons ont été conservés à - 80 °C avant d'être analysés.

## 2.3. Préparation des échantillons naturels et des échantillons de référence

### 2.3.1. Préparation des extraits de coquillages

Ce protocole d'extraction a 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. Les protocoles détaillés figurent dans les annexes IIa, IIb, III, IV et V.

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 µL de méthanol soit pour être dérivés et analysés en CLHP/F, soit pour être directement analysés en CLHP/SM<sup>2</sup>.

Pour la recherche de DTX3 les phases hexane sont conservées pour être hydrolysées (annexe III).



### 2.3.2. Préparation des extraits de phytoplancton

Les *Dinophysis* ne pouvant être cultivés, des concentrats d'eau brute ont été récoltés *in situ*. Au laboratoire les échantillons sont décongelés, soniqués et puis centrifugés. L'analyse répétée des culots ayant montré que ceux-ci ne contenaient pas de traces de toxines, seul le surnageant est récupéré. On procède alors à l'extraction (annexe IIb).

### 2.4. Dérivation de l'AO/DTX1 pour une détection CLHP/F

Cette étape consiste en une réaction d'estérification sur le groupement carboxylique (COOH) de l'AO pour obtenir un dérivé fluorescent.

Pour cette réaction, difficile à réaliser du fait de l'instabilité du réactif, on utilise une solution d'ADAM [9-Anthryldiazométhane à 0,1 % (en masse/volume)] dans l'acétone. On ajoute aux extraits secs purifiés de glandes digestives ou de phytoplancton, 200 µl de cette solution. La réaction se fait à l'obscurité à 37 °C et pendant une heure.

### 2.5. Purification des dérivés fluorescents

Pour éliminer l'excès d'ADAM on utilise une procédure d'extraction en phase solide (SPE). Pour cette technique qui permet de purifier et/ou de concentrer l'échantillon avant analyse, nous avons utilisé deux modules d'extraction SPE à 24 voies. Un module permet de traiter simultanément 24 échantillons à la fois. La procédure est alors la suivante : on équilibre des cartouches de 500 mg de silice au chloroforme. On prépare ensuite un mélange chloroforme/hexane (50/50) avec lequel on rince les cartouches et avec lequel on reprend les échantillons estérifiés et secs.

L'extrait estérifié (200 µl) est déposé en sommet de colonne et on élue avec 5 mL de chloroforme/hexane (50/50) puis 5 mL de chloroforme (100 %) stabilisé à 0,6 % d'éthanol. Dans cette étape le choix du chloroforme est important. En effet, Quilliam *et al.*, (1995) ont montré qu'en dehors d'un pourcentage allant de 0,5 à 1 le rendement des cartouches d'extraction devenait insuffisant.

Les 5 mL de chloroforme/méthanol 95/5 sont évaporés et repris dans 200 µl d'un mélange acétonitrile/eau 80/20. Cette solution (10 à 20 µl) pourra être directement injectée en CLHP.

## 3. Un nouvel outil de détection des dinophysistoxines

Comme il a été vu précédemment, la CLHP/SM comparée à la CLHP/F évite les étapes de dérivation et de purification. De plus l'analyse par SM permet de développer une multitude de méthodes que les moyens communs de détection (DAD\*, F) restreignent de part leur sensibilité ou le manque d'universalité, aux toxines ayant des sites libres pour la dérivation.

Apparues depuis peu, les interfaces CLHP/SM ont subi un grand développement : la 3<sup>ème</sup> génération d'interface aussi appelée ionisation à pression atmosphérique (API) comprend à la fois l'électrospray et l'ionspray mais aussi l'ionisation chimique à pression atmosphérique APCI.

Tous ces modes d'ionisation ont élargi le domaine d'application du couplage CLHP/SM. En effet, l'APCI permet l'analyse de composés moyennement et peu polaires de faible et moyenne masse moléculaire (100 à 1500 Da) tandis que l'électrospray et l'ionspray permettent eux l'analyse de composés moyennement à

<p>* Note : Diode Array Détection : Détecteur à barrettes diodes</p>
--



fortement polaires (ioniques) et de masse moléculaire faible à élevée (100 à 150 000 Da).

Les instruments SM sont aussi devenus moins encombrants, plus robustes, et compatibles avec les phases mobiles communément utilisées en CLHP, permettant un transfert direct de méthodes sans compromis dans la performance instrumentale.

Dans cette étude nous avons développé, pour la première fois, une méthode d'identification et de quantification de l'AO et la DTX1, présents dans différentes matrices d'échantillons naturels. Pour cela nous avons associé trois performances :

- la résolution chromatographique,
- la sélectivité  $SM^2$  grâce à l'isolement et à la fragmentation, au sein du piège quadripolaire, d'ions de rapport masse sur charge ( $m/z$ ) spécifiques,
- la confirmation moléculaire et la quantification réalisées sur les ions fragments issus de la perte d'une molécule d'eau des ions précurseurs AO et DTX1.

Nous présenterons donc le principe de cette détection, les paramètres instrumentaux influant sur la détection SM et nous discuterons des améliorations apportées par cette technique.

### 3.1. Les conditions CLHP/ESI- $SM^2$

#### 3.1.1. Principe de la détection par SM

Dans un spectromètre de masse, les opérations effectuées sont les suivantes : production d'ions (source), séparation des ions (analyseur n° 1), collisions induisant la fragmentation éventuelle des ions (chambre de collision), détection des rapports  $m/z$  des ions fragmentés ou non (analyseur n° 2). Les ions issus d'une fragmentation sont appelés « ions fils » et la détection est dite « SM/SM ou  $SM^2$  ».

Actuellement, deux types de spectromètres de masse sont utilisés au niveau mondial pour l'analyse des phycotoxines : les triples quadripôles et les pièges d'ions.

Ces deux types de détecteurs sont équipés d'une source d'ionisation à pression atmosphérique, chimique (APCI) ou par électrospray (IES).

L'IES est une méthode d'ionisation douce adaptée à la fragilité des phycotoxines dont certaines sont thermolabiles.

Le mode d'analyse des ions diffère par contre d'un appareil à l'autre.

Les triples quadripôles (Micromass UK, Quattro II ; Perkin Elmer, SCIEX API-III ; ThermoFinnigan Quantum...) sont particulièrement sensibles dans le mode de balayage permettant la détection d'un seul fils (mode SRM – Selected Reaction Monitoring). Par contre, et contrairement aux pièges d'ions, leur sensibilité diminue rapidement avec la largeur de la gamme de masse balayée (donc en mode Full Scan).

Ils possèdent également des modes de balayage qui leur sont propres permettant d'effectuer la recherche des pertes de neutre ou la recherche d'un ion parent.

Le spectromètre de masse sur lequel a été validée la méthode de détection et de quantification de l'AO/DTX1 est un quadripôle à piège d'ions. Le Finnigan MAT LCQ Ion Trap repose sur une technique qui permet d'effectuer plusieurs opérations échelonnées dans le temps mais dans un même espace, contrairement aux spectromètres de masse de type triple quadripôle qui réalisent les fragmentations successives en couplant plusieurs analyseurs. C'est la caractéristique fondamentale qui différencie les techniques de piégeage d'ions ( $SM^n$ ) de celles employant plusieurs analyseurs de masse, placées en tandem dans l'espace. De fait, il est possible de réaliser jusqu'à neuf étapes consécutives d'isolement/excitation avec le



piège ionique alors que l'emploi d'analyseurs successifs (trois) limite ce nombre d'étapes à deux.

Cela permet donc d'aller plus loin dans l'information structurale d'une molécule. L'acquisition de spectres de masses caractéristiques des toxines connues peut constituer un point de départ pour l'identification de nouveaux homologues. C'est le cas par exemple, des dérivés de dinophysistoxines qui appartiennent soit à la famille de l'acide okadaïque AO : l'isomère DTX1, la DTX2 (isomère de l'AO) soit au groupe de la DTX4 : DTX5.

### 3.1.2. Principe de la détection SM<sup>2</sup> par piège d'ions

#### 1- Une source d'ionisation externe

En mode ESI (Fenn *et al.*, 1989) les composés sont détectés sous la forme d'ions chargés positivement ou négativement selon le mode d'ionisation choisi :  $[M+H]^+$  ou  $[M-H]^+$ . Mais la molécule peut aussi être détectée sous forme d'adduits  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$  suivant la composition de la phase mobile de CLHP et les conditions générales de l'analyse. Afin de favoriser la formation des ions  $[M+H]^+$  ou  $[M-H]^+$  on pré-ionise les molécules dans le solvant en opérant en milieu acide (mode positif) ou en milieu basique (mode négatif).

L'échantillon en solution est amené dans la source par une aiguille métallique de faible diamètre interne (environ 200  $\mu\text{m}$ ). L'ionisation est initiée par l'application d'une tension électrique ( $\pm$  4-6 kV) à l'extrémité de cette aiguille. Le champ électrique intense ainsi créé conduit à la formation spontanée d'un aérosol (spray) constitué de micro-gouttelettes chargées (positivement ou négativement selon le mode de détection choisi). Ce processus se produit à pression atmosphérique et porte le nom d'électro-nébulisation. Comme la nébulisation est assistée par un flux continu d'azote, la taille des gouttelettes de solvant diminue par évaporation tandis que la densité des charges augmente. Lorsque les forces de répulsion coulombienne dépassent les forces de cohésion des gouttelettes le point critique est atteint (limite de stabilité de Rayleigh) et les gouttelettes explosent. D'explosion en explosion on assiste finalement à l'éjection des ions désolvatés en phase gazeuse.

En mode de détection des ions positifs les charges négatives sont neutralisées à la pointe de l'aiguille tandis que les gouttelettes chargées positivement sont dirigées, par différence de potentiel et grâce au flux continu du gaz vecteur coaxial, vers l'entrée d'un capillaire chauffé.

#### 2- Un capillaire de transfert

Le capillaire assure le transfert des ions depuis la zone de pression atmosphérique vers une zone de vide primaire ( $10^{-3}$  torr) assuré par une pompe à palettes. Chauffé à une température généralement fixée entre 150 à 300 °C, il permet de compléter la désolvatation des ions notamment à haut débit de phase mobile ( $> 100 \mu\text{l}/\text{min}$ ). En sortie du capillaire une lentille tubulaire, le Tube Lens, re-focalise les ions vers le cône d'écrémage - ou skimmer - chargé de compléter l'évacuation sélective du solvant.

#### 3- Un système optique

Constitué de deux octapôles séparés par une lentille, il sert à la transmission et à la focalisation des ions en route vers l'analyseur (piège d'ions) et la zone de vide secondaire (pompage turbo-moléculaire -  $2.10^{-5}$  torr).

#### 4- Un piège d'ions

Il est constitué de trois électrodes (fig. 4) : une électrode annulaire située entre deux électrodes chapeaux. Leur surface interne est hyperbolique et l'ensemble forme la



cavité dans laquelle est réalisée l'analyse des masses. La cavité du piège (volume de  $1 \text{ cm}^3$  environ) est alimentée par un flux continu d'Hélium qui confine les ions au centre avec une pression partielle maintenue à  $0.1 \text{ Pa}$  ( $10 \times 10^{-3} \text{ Torr}$ ).

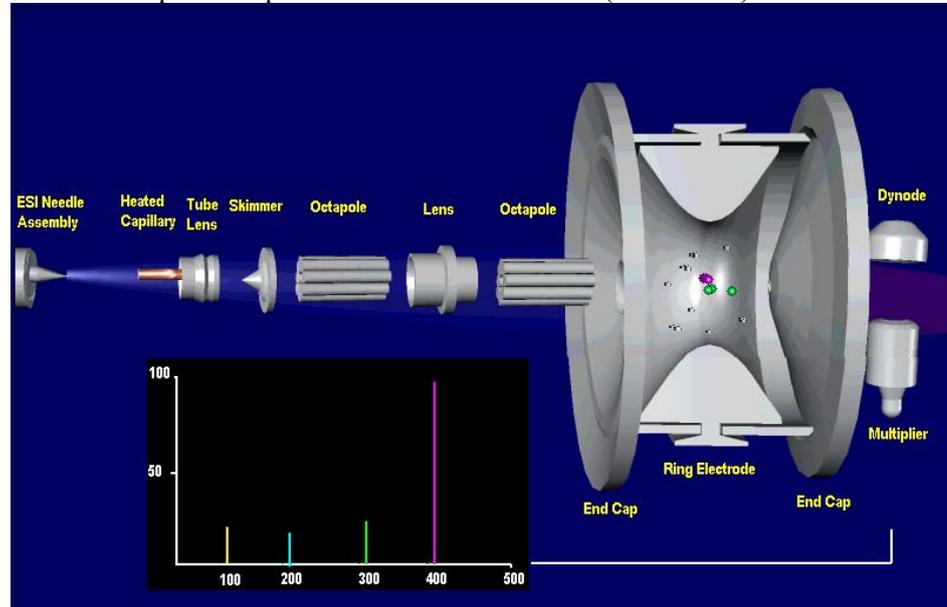


Figure 4 : Configuration explosée d'un piège à ions avec une source d'ionisation externe par électrospray (LCQ™ ThermoFinnigan Corporation).

Dans un instrument quadripolaire les tensions continues et alternatives sont réglées de telle façon que seuls les ions de rapport  $m/z$  choisis soient transmis. Par comparaison, l'application d'une seule tension alternative sur l'électrode annulaire du piège d'ions permet d'obtenir « un quadripôle à 3 dimensions » dans lequel des ions de différents rapports  $m/z$ , présents simultanément, sont retenus prisonniers (piégés) le long d'une trajectoire complexe (Paul, 1990) formant une sorte de huit en 3 dimensions (courbe de Lissajous, fig. 5).

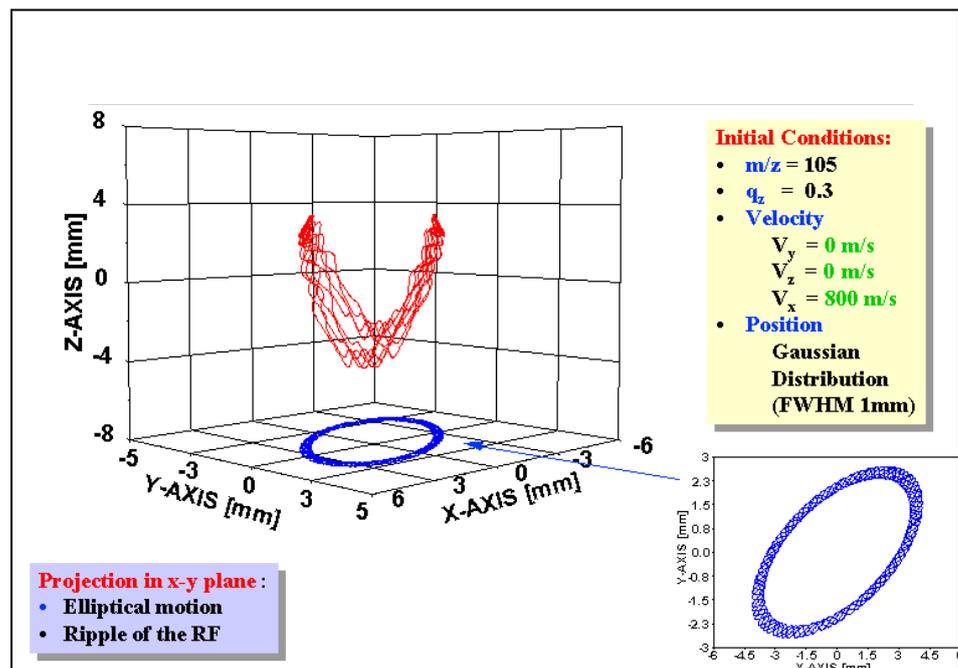


Figure 5 : Trajectoire en trois dimensions dans un quadripôle à piège d'ions (LCQ™ ThermoFinnigan Corporation).



La détection externe des ions repose sur le principe d'instabilité sélective de leur trajectoire : les ions de rapport  $m/z$  croissant sont séquentiellement éjectés du piège en conséquence de l'augmentation linéaire de l'amplitude de la tension alternative.

Le traitement mathématique des équations de Mathieu permet de déterminer les conditions de stabilité des ions en fonction de leur rapport  $m/z$ , des dimensions internes du piège et de la nature des tensions électriques appliquées sur les électrodes. On peut alors, sous la forme des diagrammes (fig. 6), représenter dans l'espace le domaine de stabilité des ions (zone bleue), lequel se situe à l'intersection des zones de stabilité axiale (zone rouge) et radiale (zone verte) du piège. En pratique et dans la mesure où aucune tension continue n'est appliquée sur l'électrode annulaire, la zone de stabilité (et donc d'instabilité) (Stafford *et al.*, 1984) est constituée du seul segment de droite central « $qz$ ».

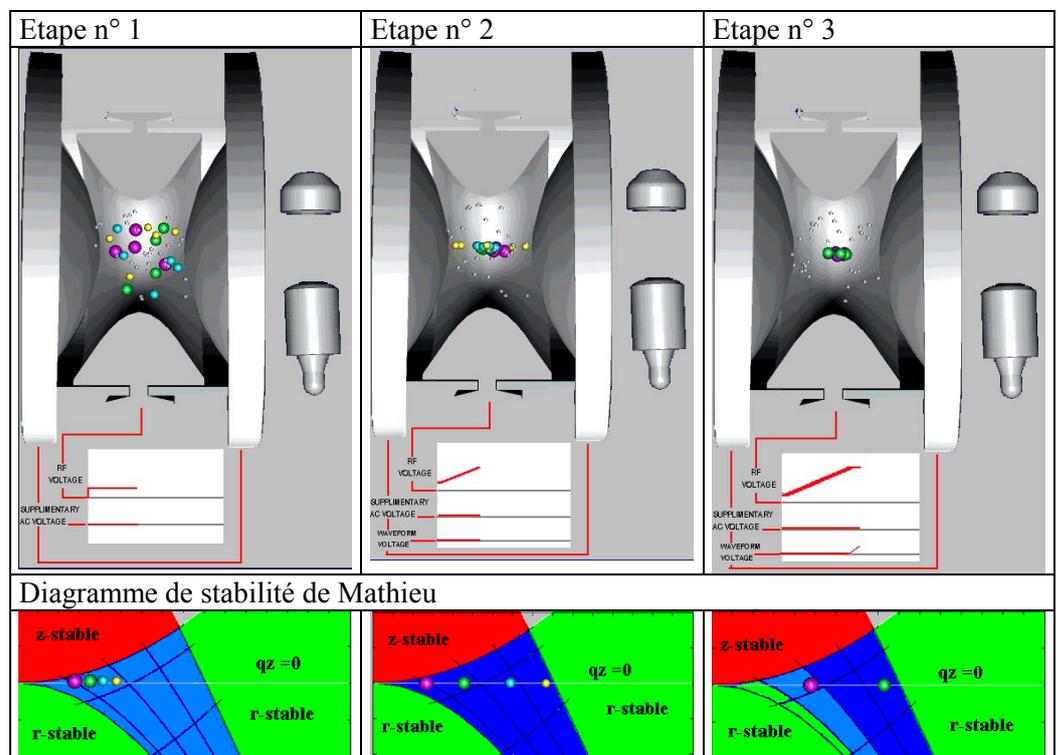


Figure 6 : Le piégeage des ions : leur trajectoire au sein du piège corrélée avec leur position dans le diagramme de stabilité de Mathieu (LCQ<sup>TM</sup> ThermoFinnigan Corporation).

Les figures ci-dessus (étapes 1, 2) montrent comment un balayage de l'amplitude de la tension RF (Radio-Fréquence), appliquée sur l'anode circulaire, permet de déplacer les points de fonctionnement de chaque espèce ionique jusqu'à ce qu'elles atteignent, une par une et par ordre croissant des rapports  $m/z$ , la limite droite de l'axe de stabilité. En ce point précis, l'amplitude d'oscillation des ions est telle qu'ils sortent du piège ; parmi eux, ceux traversant l'électrode chapeau inférieure atteignent le détecteur contrairement à ceux passant par l'électrode supérieure qui sont perdus. **En mode de balayage analytique, le spectre de masse est obtenu par l'augmentation de la rampe de l'amplitude RF jusqu'à éjection des ions de rapports  $m/z$  les plus élevés : c'est le principe d'instabilité sélective de masse.**

Dans le cas particulier des modes de balayage SIM et  $SM^n$  (étape 3), cette rampe doit bien sûr s'arrêter avant que l'ion SIM ou le précurseur  $SM^n$  ne soit éjecté. L'éjection



de tous les ions de rapports  $m/z$  différents de celui que l'on veut retenir se fait par mise en résonance de ces ions avec des tensions alternatives appliquées sur les électrodes chapeaux (ion isolation waveform). En mode SIM, l'ion ainsi isolé peut alors être éjecté en poursuivant, comme déjà vu pour le mode SM simple, la rampe de l'amplitude RF principale.

En mode  $SM^n$ , l'ion précurseur isolé est ensuite excité par application, sur les électrodes chapeaux, d'une tension alternative de fréquence calée sur la fréquence de résonance (ou fréquence cyclotronique) de l'ion précurseur ; l'amplitude de cette tension alternative (correspondant aussi à l'énergie de collision) est réglée, manuellement ou automatiquement, de telle façon que l'augmentation conséquente de l'amplitude d'oscillation de l'ion précurseur, induise, par collision avec les atomes d'hélium présents dans le piège, sa dissociation. Les fragments SM/SM ainsi générés seront alors séquentiellement éjectés vers le détecteur comme déjà vu pour le mode SM simple.

#### 5- Un détecteur

Le LCQ est équipé d'une dynode de conversion qui permet de détecter respectivement les ions positifs ou négatifs. Un multiplicateur d'électrons transforme et amplifie le courant ionique en un courant électrique qui induit un potentiel proportionnel à l'intensité du signal.

Les données sont enregistrées et traitées avec un logiciel approprié : Xcalibur™.

### 3.1.3. Application à la détection des DTXs

L'analyse des toxines AO/DTX1 par CLHP/SM a été réalisée dans un mode positif (d'après Quilliam, 1995) qui produit majoritairement des ions moléculaires sous forme  $[M + H]^+$ . Notre méthode d'acquisition consiste en une alternance de deux balayages permettant respectivement : d'analyser tous les ions présents (balayage full SM), de sélectionner les ions correspondants aux toxines recherchées puis de fragmenter et d'analyser les ions fils issus de ces fragmentations (balayage full  $SM^2$ ).

#### 3.1.3.1. Les rapports $m/z$ caractéristiques des DTX<sub>S</sub> analysées en SM et $SM^2$

##### - *Acide okadaïque (AO)* :

En mode full SM : on observe l'ion 805 en majorité  $[M+H]^+$  et en plus faible quantité (10%) les ions 787  $[M-H_2O]^+$  et 827  $[M+Na]^+$ .

En mode full  $SM^2$  : l'AO est représenté en majorité par l'ion fils 787  $[M-H_2O]^+$  et en plus faible quantité par les ions 769,1  $[M-2H_2O]^+$ , et 751,1  $[M-3H_2O]^+$ .

##### - *Dinophysistoxine-2 (DTX2)* : la DTX2 est un isomère de l'AO, les ions caractéristiques $m/z$ sont les mêmes que ceux de l'AO.

##### - *Dinophysistoxine-1 (DTX1)* :

En mode full SM : on observe l'ion 819 en majorité  $[M+H]^+$  et en plus faible quantité (de 8 à 9 %) les ions 801  $[M-H_2O]^+$ , 841  $[M+Na]^+$ .

En mode full  $SM^2$  : la DTX1 est représentée en majorité par l'ion fils 801,1  $[M-H_2O]^+$  et en plus faible quantité par les ions 783,1  $[M-2H_2O]^+$  et 765,1  $[M-3H_2O]^+$ .

##### - *Isomère de la DTX1* : les mêmes ions caractéristiques $m/z$ que ceux de la DTX1.

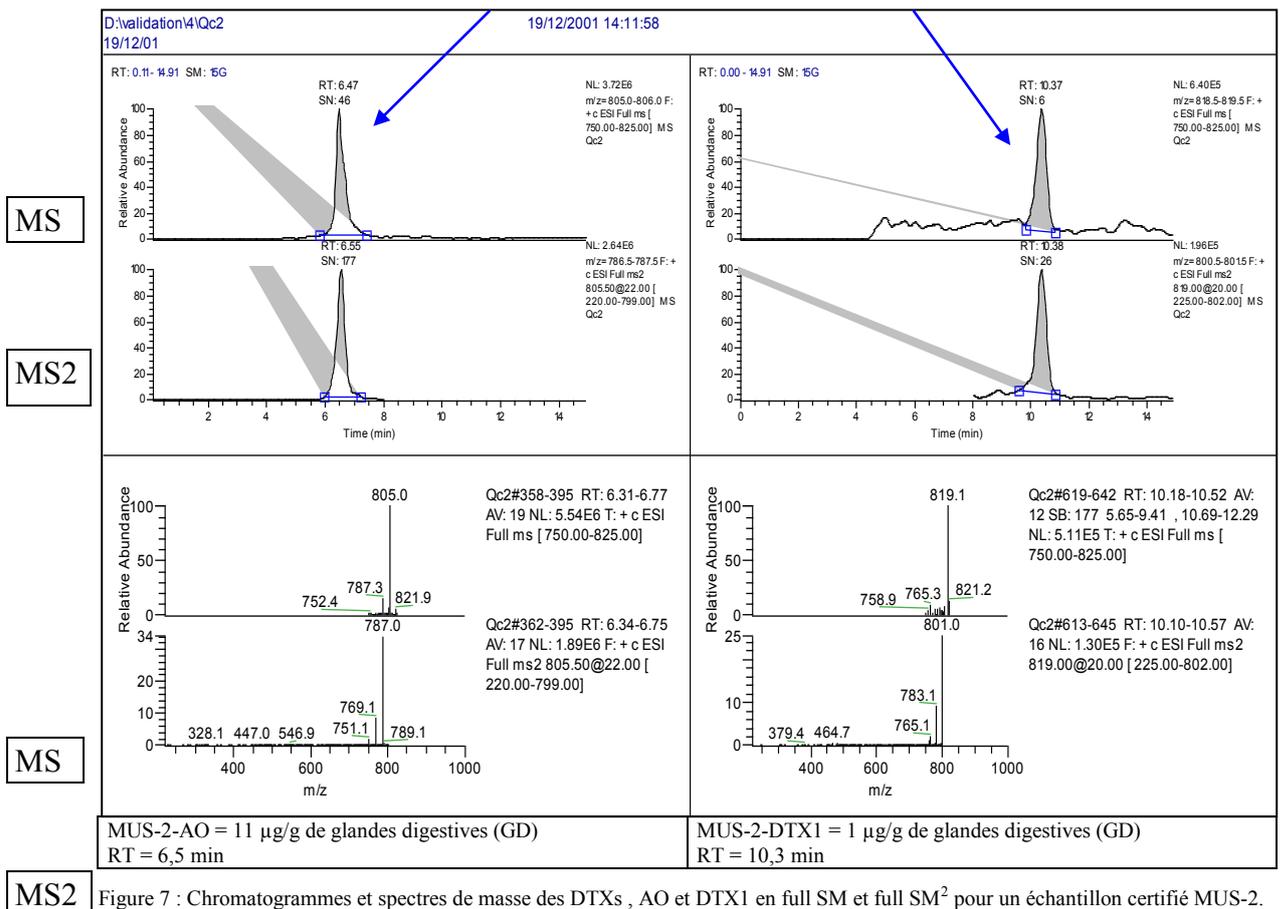


### 3.1.3.2. Quantification de l'AO/DTX1 en balayage alterné SM-SM<sup>2</sup>

L'alternance des modes d'acquisition full SM et full SM<sup>2</sup> 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 des ions fragments résultant des pertes de molécules d'eau  $[M+H-H_2O]^+$ ,  $[M+H-2H_2O]^+$  et  $[M+H-3H_2O]^+$ , d'autre part. Ainsi, pour l'acide okadaïque, 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 SM<sup>2</sup>.

La quantification se fait sur les ions fils, fragments caractéristiques résultant de la fragmentation de l'ion parent par pertes successives de molécule d'eau.

Cette technique génère ainsi un gain de sensibilité qui se traduit par une augmentation du rapport signal /bruit S/N. Une représentation de ce gain S/N est illustrée dans la figure 7.



Il s'agit ici de l'analyse d'un échantillon certifié MUS-2 ou les teneurs en AO et DTX1 sont garanties respectivement à 11 et 1 µg/g de glandes digestives (GD). Comme on peut le constater sur la figure 7, si la différence entre le S/N de l'analyse en full SM et en full SM<sup>2</sup> est nette (46 à 177) pour une concentration en AO de 11 µg/g GD, elle devient encore plus significative (6 à 26) pour des concentrations



plus faibles comme dans l'exemple cité où la concentration en DTX1 n'est plus que de 1 µg/g GD.

### 3.1.4. Les caractéristiques instrumentales et les conditions expérimentales de la détection de l'AO/DTX1 par CLHP/ESI/SM<sup>2</sup>

#### 3.1.4.1. Caractéristiques instrumentales

Les échantillons ont été analysés à partir d'un ensemble de couplage CLHP/(SM)<sup>n</sup> ThermoFinnigan (annexe VI) comprenant :

- 1 pompe CLHP Spectra P (P2000-30) à gradient binaire,
- 1 passeur automatique d'échantillon avec four de colonne Spectra P (AS100XR),
- 1 module de conditionnement des solvants avec dégazage à membranes (4 voies),
- 1 détecteur à piège d'ions équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI) à pression atmosphérique *ThermoFinnigan* LCQ (SM)<sup>n</sup>.

#### 3.1.4.2. Les conditions CLHP

Les séparations chromatographiques ont été réalisées à partir :

- d'une colonne : colonne Kromasil C18 (250\*2,0mm I.D.) 5µm 100A° en SI modulocart expert Interchim, France,
- d'un débit de 200 µL/min à une pression de 55 Bar (mode isocratique) et à une température de 40 °C. Pour l'élution : la non reproductibilité quantitative d'un grand nombre d'échantillons faiblement concentrés à traiter en série, a été résolue par la mise en place d'un programme d'élution. Le programme d'élution (fig. 8) (40 mn/échantillon) enchaîne successivement trois modes : isocratique gradient/isocratique. A partir d'une utilisation d'acétonitrile/eau (75/25) utilisé classiquement pour la chromatographie en phase inverse, ce programme permet de ne pas être gêné par les composés faiblement polaires associés à l'AO et retenu sur la colonne (Holmes *et al.*, 1999). De plus, on obtient ainsi un retour signal sur bruit inférieur à 3 ainsi qu'un temps de rétention stable.

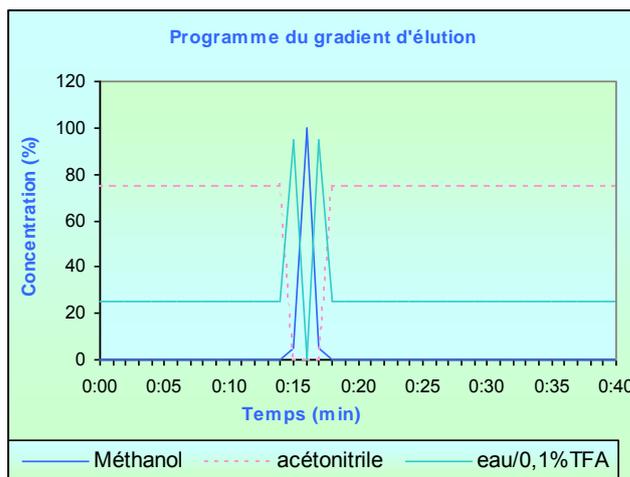


Figure 8 : Programme d'élution pour l'analyse des DTX<sub>s</sub> par CLHP/ESI/SM<sup>2</sup>.

#### 3.1.4.3. Caractéristiques ESI/SM<sup>2</sup>

La sensibilité de la détection CLHP/ESI/SM<sup>2</sup> dépend de l'optimisation des paramètres : de la source électrospray, de l'optique de transmission des ions, du piège



d'ion. 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, la phase mobile CLHP (200  $\mu$ L/min) et la perfusion liquide continue (3  $\mu$ L/min) des différents standards ou d'échantillons contaminés.

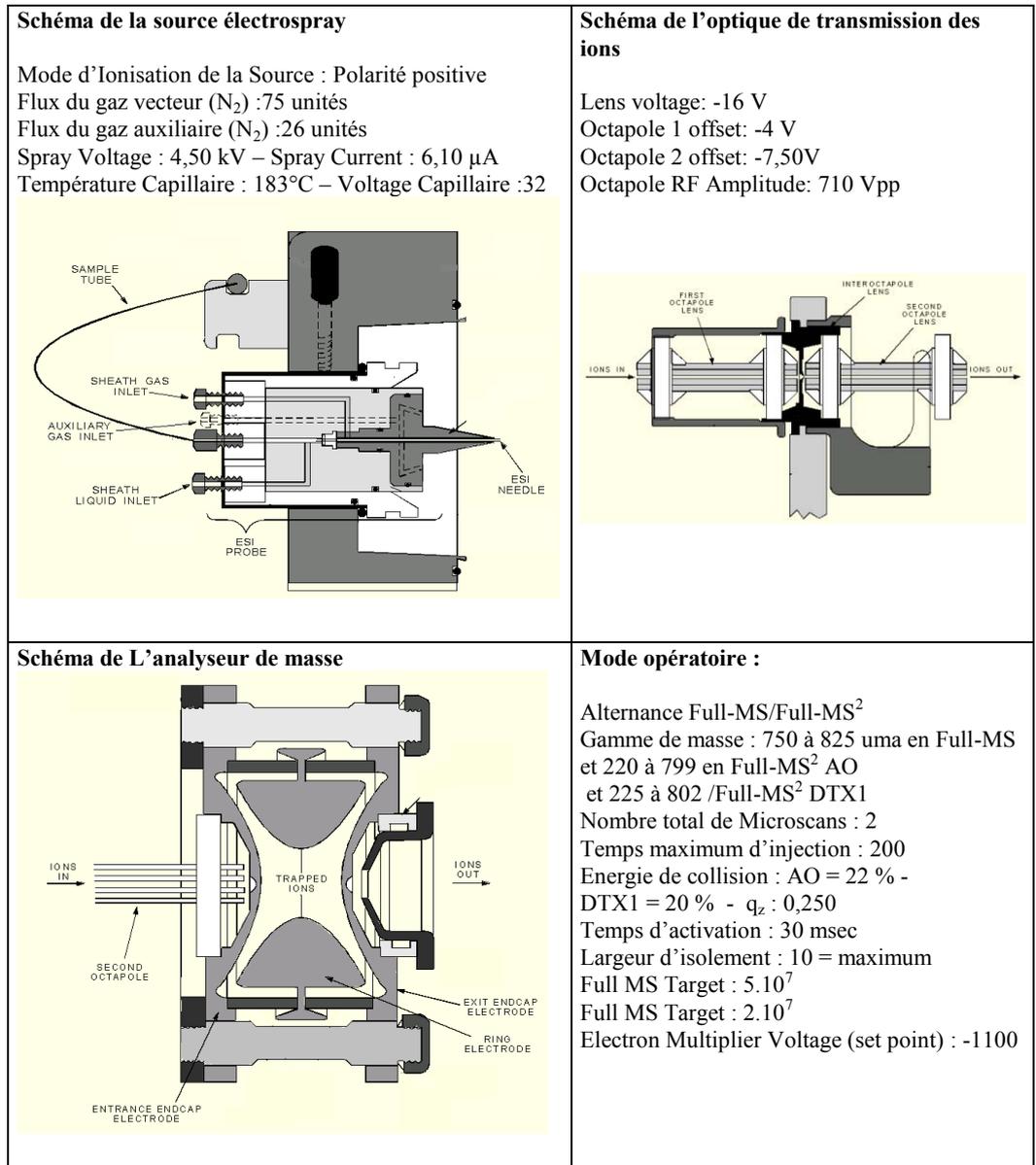


Figure 9 : Les caractéristiques ESI/SM<sup>2</sup> dans l'analyse de l'AO/DTX1.

L'optimisation de ces paramètres a fait apparaître que l'ion moléculaire  $[M + H]^+$  de AO ( $m/z=805$ ) est un ion très instable qui nécessite d'ouvrir une large fenêtre d'isolement pour le capturer avec le maximum d'efficacité.

La meilleure réponse a été obtenue avec une faible température de capillaire (183 °C). Au-dessus de cette valeur on isole majoritairement l'adduit Na<sup>+</sup> de l'AO ( $m/z=827$ ), ion très stable, avec une fenêtre d'isolement qui se réduit à deux unités de masse.

Les pourcentages d'énergie de collision à fournir pour la fragmentation de l'AO et de la DTX1 ont été fixés de manière à ce que l'ion parent reste présent à 20 % contre 100 % d'abondance de l'ion fils.



Dans le diagramme de stabilité de Mathieu les ions piégés sont reportés en coordonnées ( $a_z$ ,  $q_z$ ). Au moment de la mise au point de la méthode le logiciel d'exploitation du piège d'ion ne permettait pas encore de modifier la trajectoire des ions. La nouvelle version d'Xcalibur autorise désormais ces changements. De rapides essais montrent que la modification de la valeur du  $q_z$  d'activation permet de réduire la largeur de la fenêtre d'isolement de l'ion moléculaire  $[M + H]^+$  de AO et donc d'être encore plus sélectif dans l'isolement pour la fragmentation.

Les paramètres ESI/SM<sup>2</sup> permettant de séparer à la fois l'acide okadaïque, la DTX2, la DTX1 et son isomère qui ont fait l'objet d'une optimisation sont résumés dans les illustrations précédentes (fig. 9).

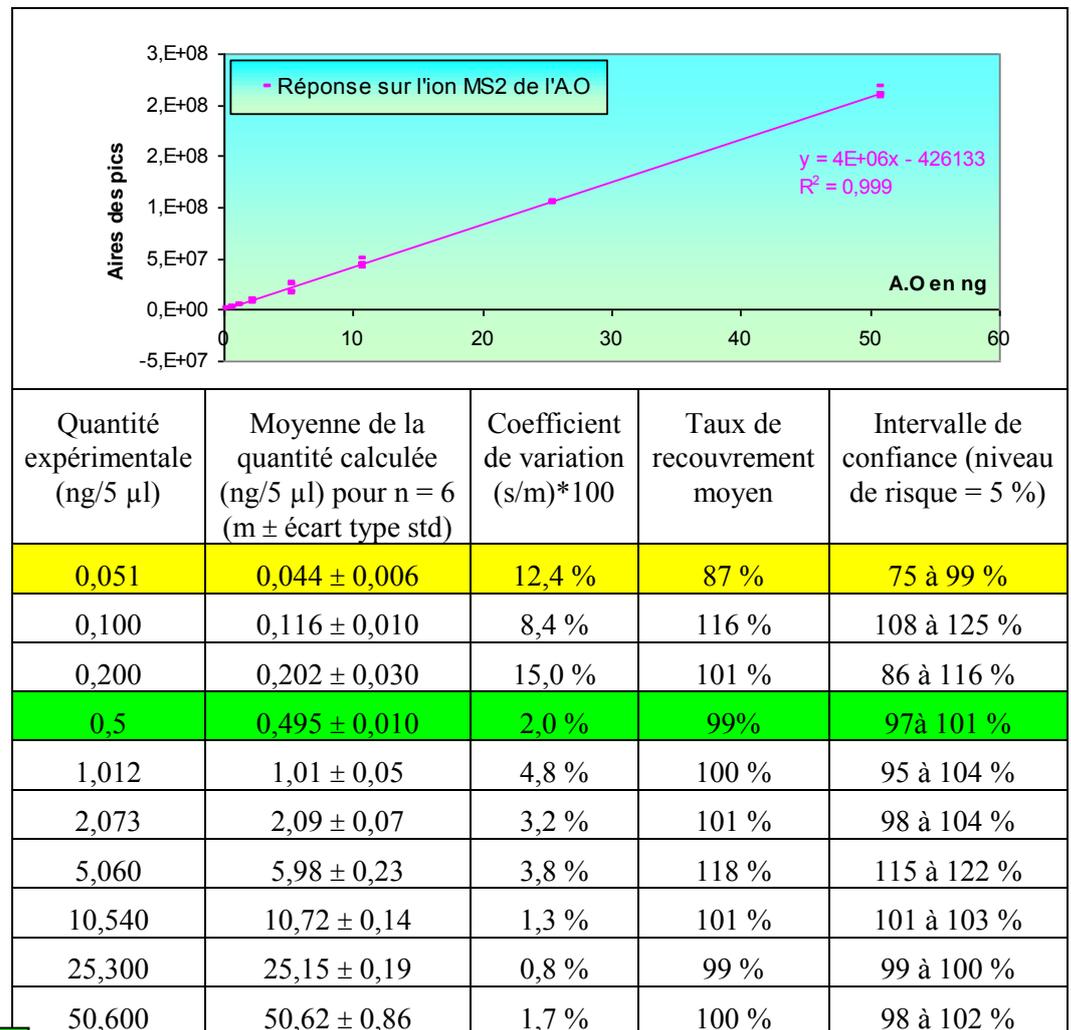
## 4. Résultats et Discussion

### 4.1. Etalonnage

Le dosage des toxines diarrhéiques par CLHP/SM<sup>2</sup> s'est fait en étalonnage externe à l'aide de standards certifiés des toxines recherchées (annexe VII).

L'étalon d'AO est à une concentration de 25,3 µg/mL. La droite d'étalonnage de l'acide okadaïque a été réalisée avec une gamme variant de 0,5 à 50 ng injectés à partir de sept niveaux de quantification et un total de 42 mesures (six réplicats) pour vérifier la reproductibilité de la méthode (tabl. 1). Aucune pondération n'a été appliquée.





■ Seuil de quantification

■ Limite de détection pour les glandes digestives de moules

Tableau 1 : Fidélité et exactitude sur la gamme d'étalonnage de l'AO n = 6  
(ex : intervalle de confiance pour 0,5 ng = 99 % ± (2,02 x 2,447) / √ 6 = 96,98 à 101,02 %).

La valeur du coefficient de corrélation de la droite de régression (proche de 1), les faibles écarts types associés à chaque niveau de calibration et les coefficients de variation tous inférieurs à 5 % (de 0,5 ng à 50 ng) expriment la fidélité et la répétabilité du dosage des toxines diarrhéiques, dans nos conditions expérimentales. De plus, l'exactitude de la procédure est vérifiée puisque pour un niveau de risque de 5 % nous remarquons que la valeur 100 % est comprise pour toute la gamme de quantification (0,5 - 50 ng) dans tous les intervalles de confiance.

#### 4.2. Exactitude sur une matrice de moules

« L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée soit comme valeur conventionnellement vraie (standard interne) soit comme une valeur de référence acceptée (standard international, par exemple standard d'une pharmacopée) et la valeur trouvée (valeur moyenne) » (note CEE III/844/87).



Avant de valider la méthode de détection de l'AO/DTX1 par CLHP/SM<sup>2</sup> nous avons vérifié l'identité des toxines par comparaison avec un échantillon certifié de glandes digestives (GD) de moules contaminés (MUS-2) provenant de l'IMB-CNRC (Halifax, Canada).

La vérification a été réalisée par deux techniques de détection (tabl. 2) :

- fluorescence après dérivation de l'acide okadaïque (CLHP/F) (méthode communément utilisée),
- spectrométrie de masse (CLHP/SM<sup>2</sup>).

Les résultats ont été obtenus sur les triplicats de cinq extractions indépendantes (annexe VIII). Comme le montre le tableau 2, quelle que soit la méthode de détection utilisée (CLHP/F ou CLHP/SM) nos résultats sont quasiment identiques à ceux de l'IBM.

Valeur certifiée IMB AO en µg/g GD	Résultats obtenus à l'IMB AO en µg/g GD pour n = 6		Résultats obtenus au labo PN AO en µg/g GD pour n = 15	
<b>11.00 ± 0.3</b>	CLHP/F	<b>CLHP/SM</b> (*1)	CLHP/F (*2)	<b>CLHP/SM<sup>2</sup></b> (*3)
	10,93 ± 0,26	<b>10,96 ± 0,19</b>	11,15 ± 0,9	<b>11,63 ± 0,29</b>

(\*1) : Détection par spectrométrie de masse Perking Elmer, SCIEX API-III.

(\*2) : Les conditions expérimentales retenues pour le dosage de l'acide okadaïque par CLHP/F sont : une colonne, Superspher 100 RP-18 (L=250mm x 4mmL.D). 4µm (Merck, France) placée dans un four thermostaté à 40 °C. Le solvant d'élution CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (80:20) est utilisé en mode isocratique avec un débit de 1.1mL/min. Le volume maximal injecté varie de 5 à 20 µL en fonction de l'état de contamination des échantillons à tester. La détection de l'AO est effectuée à la longueur d'onde λ<sub>excitation</sub> = 254 nm et λ<sub>émission</sub> = 412 nm Le temps d'analyse maximal par échantillon est de 30 min. L'AO présent dans les extraits est quantifié en duplicat à l'aide d'un étalon externe. Le principe de ce dosage fait référence à Lee *et al.*, 1987 ; Quilliam, 1995.

(\*3) : Détection par spectrométrie de masse, Finnigan Mat LCQ Ion Trap

Tableau 2 : Bilan de validation de quantification de l'acide okadaïque.

#### 4.3. Seuil de détection

Par définition le seuil de détection est la concentration en toxine donnant un signal égal à trois fois celui du bruit de fond. Des injections successives de solution de MUS-2 à des concentrations d'AO de plus en plus faibles ont été réalisées, jusqu'à obtenir un rapport signal/bruit (S/N) égal à 3.

Comme le montre les chromatogrammes suivants (fig. 10) pour obtenir un rapport S/N = 3, nous avons dilué mille fois un échantillon de MUS-2 certifié à 11 µg/g d'AO. Cela détermine le seuil de détection en CLHP/SM<sup>2</sup> à 11 ng/g de GD d'AO.



d:\validation\4\qc2dilue1000  
19/12/01

19/12/2001 16:18:03

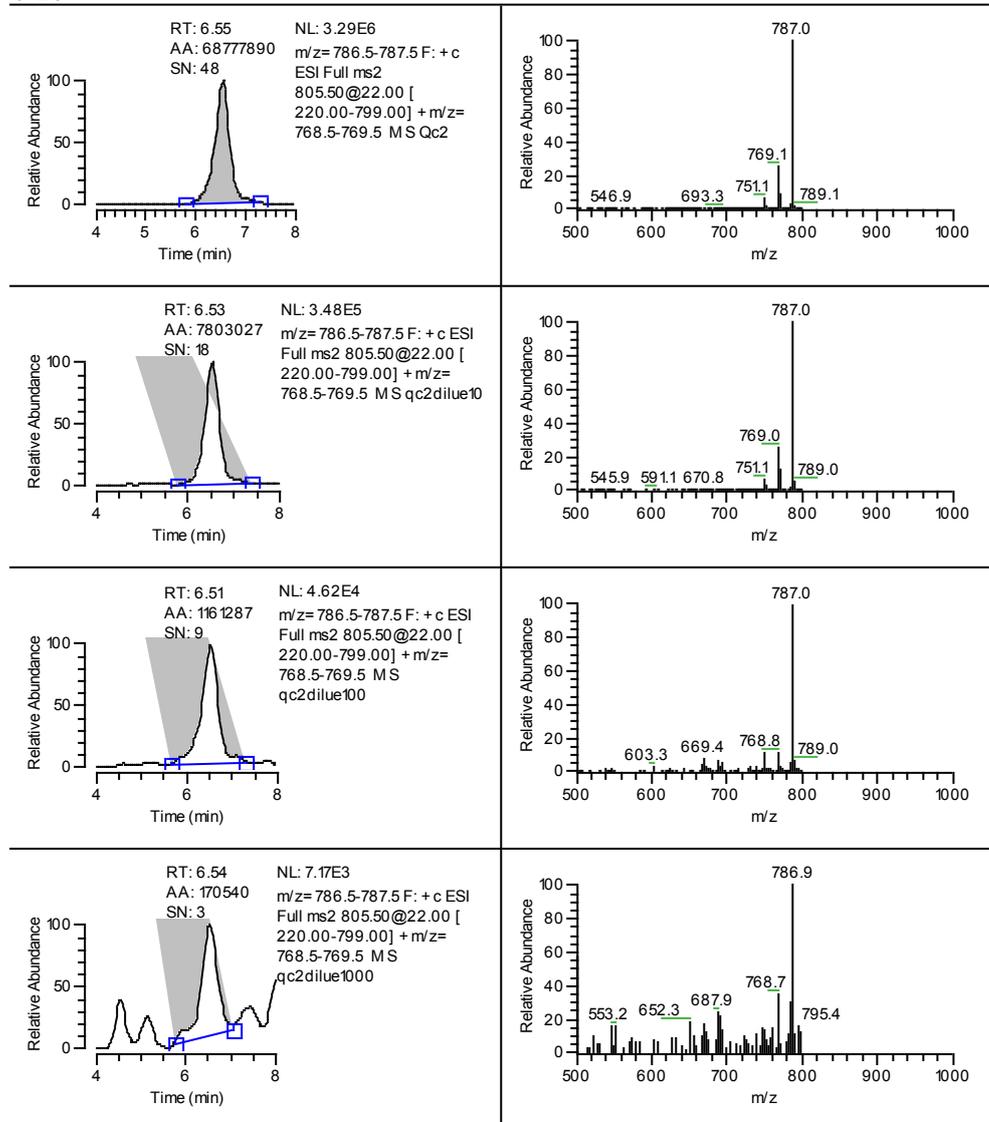


Figure 10 : Evolution du rapport S/N dans la mise en évidence du seuil de détection de l'AO dans un échantillon certifié MUS-2.

L'observation du dernier chromatogramme correspondant à la dilution au millième de l'échantillon permet de remarquer qu'il est encore aisé d'intégrer le pic d'AO correspondant au seuil de détection. Cependant, si l'on se réfère à la figure 11, on remarque qu'il serait illusoire de poursuivre puisque l'on observe que la quantité d'AO obtenue dans le MUS-2 à partir de l'étalonnage donne un résultat très supérieur à 11 µg/g de GD.

Il n'existe pas de matériel de référence en phytoplancton mais les différentes analyses d'extraits bruts de toxicité variable, effectuées tout au long de cette validation, ont permis de quantifier jusqu'à 2 pg d'AO.cellule<sup>-1</sup> pour un extrait brut phytoplanctonique contenant 50 cellules/litre de *Dinophysis* sp.



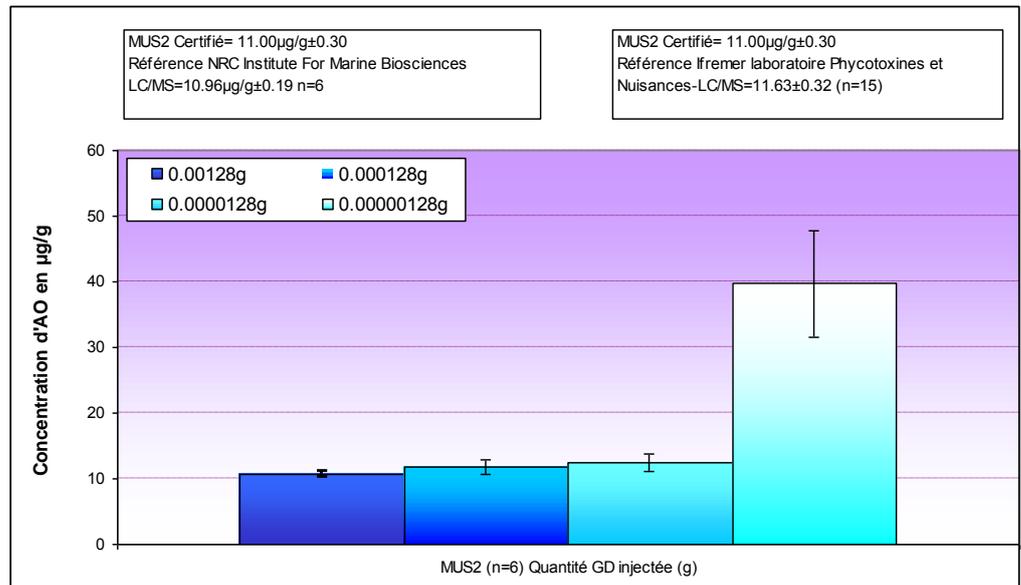


Figure 11 : Détermination du seuil de détection en CLHP/SM<sup>2</sup> à partir d'un échantillon certifié MUS-2 (n = 6).

#### 4.4. Seuil de quantification

La limite de quantification est définie comme étant trois fois supérieure à la limite de détection ou comme l'obtention d'un rapport signal/bruit égal à 10.

Selon cette définition la valeur de 0,5 ng d'AO injecté soit 0,1 µg/mL comme étant la limite inférieure du domaine de quantification pour l'analyse de l'AO par CLHP/SM<sup>2</sup> puisque pour cette quantité la toxine a été détectée avec un rapport de S/N de 10,88 ± 2,25 pour n = 6 (fig. 12).

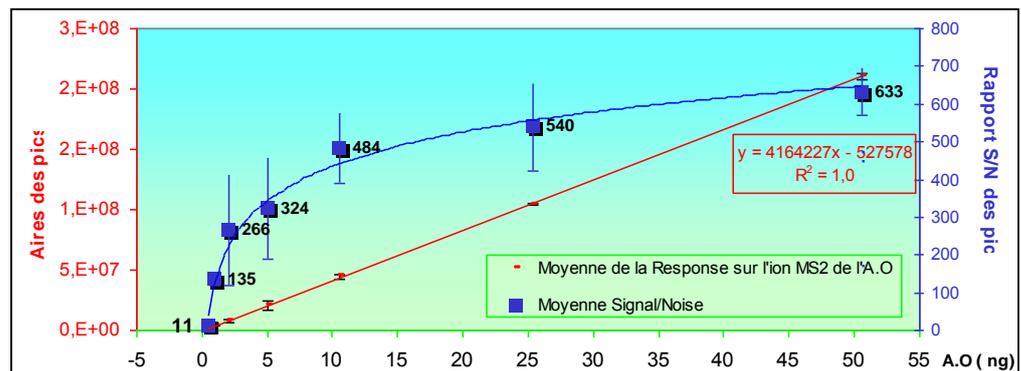


Figure 12 : Droite d'étalonnage de l'acide okadaïque comparée à l'évolution des rapports S/N pour chaque niveau de calibration (en détection full SM<sup>2</sup>).

#### 4.5. Mise en application sur une matrice phytoplanctonique

##### 4.5.1. Proportionnalité de la procédure analytique de l'AO dans le phytoplancton

« La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité (à l'intérieur d'un certain intervalle) de fournir des résultats directement proportionnels à la concentration ou à la quantité de substance à analyser. » (Note CEE III/844/87).



La linéarité de la méthode a été vérifiée sur une matrice phytoplanctonique. L'échantillon utilisé pour cette étude (E15) avait été prélevé le 25/05/00, en surface (- 2,5 m) et le comptage des cellules au microscope avait estimé la concentration moyenne de *Dinophysis sp* à  $258 \text{ } \phi \cdot \text{mL}^{-1}$  (deux comptages 220-296  $\phi \cdot \text{mL}^{-1}$ ). A partir de E15 toxique à  $44 \pm 4 \text{ pg}/\phi$ , des gammes ( $n = 3$ ), de volumes croissants (5, 10, 15, 20 mL), ont été préparées pour vérifier la linéarité de la méthode (fig. 13). Les résultats obtenus par CLHP/F et CLHP/SM<sup>2</sup> montrent que la quantité d'acide okadaïque récupérée est bien proportionnelle aux quantités traitées.

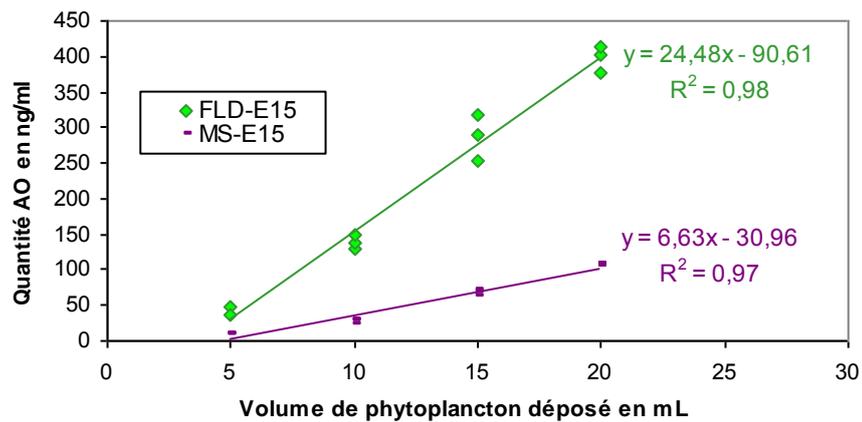


Figure 13 : Linéarité de la méthode sur une matrice phytoplanctonique en CLHP/F et CLHP/SM<sup>2</sup>.

#### 4.5.2 Justesse de la méthode

Pour la validation de notre technique de dosage dans le phytoplancton, nous ne disposons pas de système de référence (MUS-2 est un référentiel de glande digestive). Dans ces conditions, il n'est pas possible d'étudier l'exactitude de la procédure d'analyse, mais néanmoins, en prenant comme référence la droite d'étalonnage précédemment établie, il est possible d'étudier la justesse de la méthode en appliquant la méthode des ajouts dosés.

La justesse est : « L'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée. » (NF ISO 5725-1).

Trois échantillons phytoplanctoniques différents (ST433 - A - B) ont fait l'objet d'ajouts croissants d'acide okadaïque pur (20, 50, 100, 200, 400 ng) avant extraction. L'analyse des échantillons de départ non encore dopés, a donné pour ST433, A et B une concentration initiale en AO de respectivement 213  $\text{pg}/\phi$ , 34,5  $\text{pg}/\phi$ , 6  $\text{pg}/\phi$ . Ces valeurs ont été retranchées aux valeurs détectées après dopage. On a réalisé deux répliquats pour chaque ajout dosé de la gamme de dopage.

Pour chaque échantillon (fig. 14) on obtient une corrélation satisfaisante (majoritairement  $r$  est supérieur à 0,99) entre la quantité initiale ajoutée et la quantité extraite, et ce, quelle que soit la méthode de détection utilisée (CLHP/F ou CLHP/SM<sup>2</sup>).

Pour qu'une méthode soit juste, il faut retrouver la concentration initiale à  $\pm 20 \%$ .



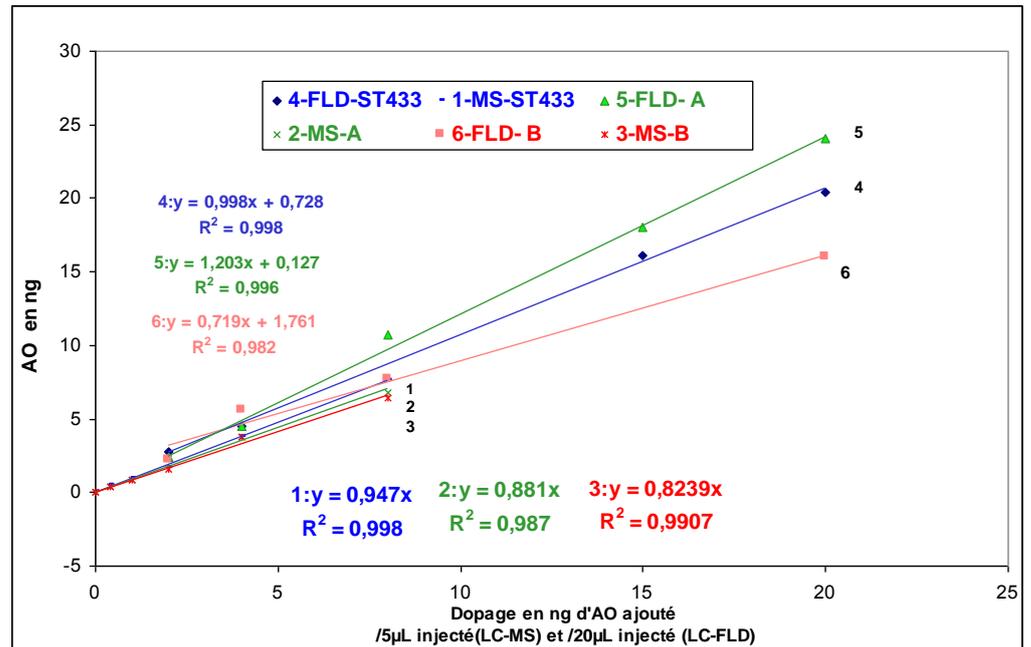


Figure 14 : Corrélation entre la quantité d'AO ajoutée et la quantité récupérée (méthode des ajouts dosés) selon deux modes de détection (LC/F et LC/SM) pour trois extraits phytoplanktoniques (n = 2) :

- ST433 \_ 13/06/97 à -16 m pour 11 cellules/mL-toxicité = 213 pg/cellules
- A \_ 05/05/99 -3,5 m pour 45 cellules/mL-toxicité = 34,5 pg/cellules
- B \_ 03/06/99 à -3 m pour 20 cellules/mL-toxicité = 6 pg/cellules

Les résultats du tableau 3 montrent que, quelle que soit la toxicité de l'échantillon traité (213 à 6 pg/ℓ), la méthode du dosage de l'AO par CLHP/ESI/SM<sup>2</sup> est juste à ± 20 % d'erreurs prêt (LC/F est juste à 23 %).

Ajout dosé d'AO en ng	Ajout dosé rapporté à la quantité injectée sur la colonne (* 5/250 µl)	Intervalle à ± 20%	Moyenne AO quantifié (ng injecté) ST433	Moyenne AO quantifié (ng injecté) A	Moyenne AO quantifié (ng injecté) B
Toxicité initiale des échantillons			0,76	0,49	0,17
20,00	0,40	0,32 à 0,48	0,49	0,39	0,36
50,00	1,00	0,8 à 1,20	0,92	0,81	0,82
100,00	2,00	1,6 à 2,60	1,66	2,33	1,54
200,00	4,00	3,2 à 4,80	3,78	3,74	3,77
400,00	8,00	6,4 à 9,60	7,63	6,80	6,38

Tableau 3 : Résultats de l'expérience de détermination du % de justesse de la méthode de détection de l'AO par CLHP/ESI/SM<sup>2</sup> pour trois extraits phytoplanktoniques (n = 2).

#### 4.5.3 Les rendements d'extraction

Sur la base de l'étude menée pour évaluer la justesse de la méthode de détection de l'AO en CLHP/ESI/SM<sup>2</sup>, nous avons également évalué le taux du rendement moyen d'extraction.



Dans cette étape qui permet de s'assurer qu'il n'y a pas de perte notable d'acide okadaïque lors de l'extraction, le rendement moyen d'extraction (fig. 15) en CLHP/ESI/SM<sup>2</sup> est de 92,27 % ± 7,2 % contre 96,05 % ± 25,84 % en CLHP/F.

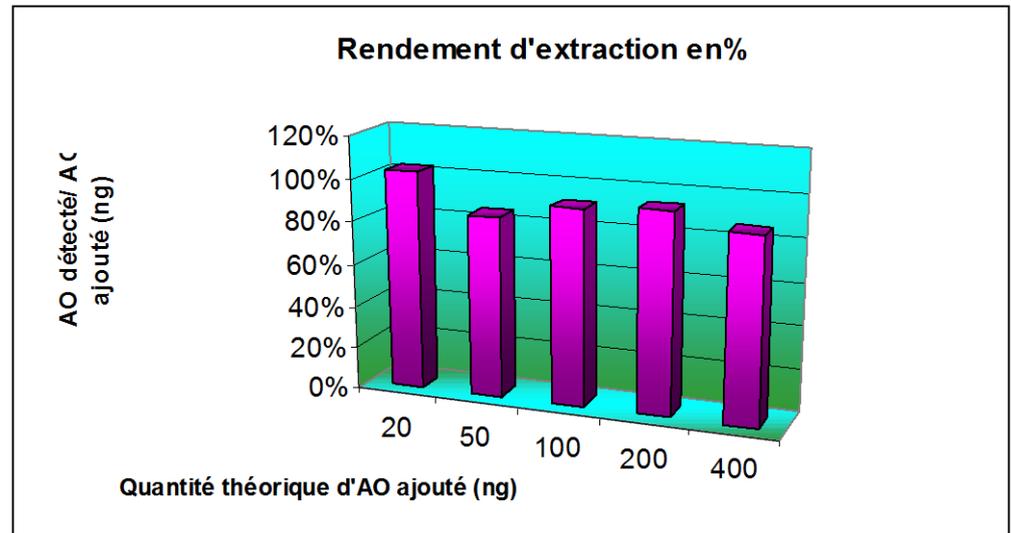


Figure 15 : Evolution du rendement moyen d'extraction d'extraits phytoplanktoniques en CLHP/ESI/SM<sup>2</sup>.

#### 4.6. Perspectives

Comme on a pu le constater, la détection par piégeage d'ions en mode MS<sup>2</sup> est une technique puissante et à haute spécificité.

De plus, comparativement à l'analyse par CLHP/F, cette technique est aussi plus rapide puisqu'elle permet de supprimer les étapes de dérivation et de purification de l'échantillon. Toutefois, il faut alors composer avec le temps d'une analyse chromatographique et l'utilisation obligatoire d'une pré-colonne qui devra être remplacée après environ 50 injections d'extraits bruts.

En deuxième approche, on pourrait diminuer le temps d'analyse en raccourcissant le temps de la séparation chromatographique. Cependant, si l'utilisation d'une colonne courte au lieu d'une longueur commune de 250 mm, réduit significativement le temps d'analyse, il ne faut pas oublier que la résolution chromatographique diminue avec le nombre de plateaux théoriques lorsque le diamètre de la colonne et/ou la taille des particules sont insuffisants. De plus, bien que l'effet matrice dans la détection de l'AO ait été résolu, l'analyse des échantillons très faiblement toxiques indique un biais vers une surestimation (fig. 11). Toutefois, ceci n'est pas significatif, puisqu'il est tout à fait envisageable de conserver ce gain de temps et de précision en procédant dans un premier temps à un balayage d'un grand nombre d'échantillons permettant d'exclure tous les échantillons négatifs, pour se concentrer ensuite sur les échantillons soupçonnés d'être contaminés en AO/DTX1. Les échantillons pourront alors être analysés plus tard en utilisant une séparation chromatographique standard pour confirmer et quantifier précisément l'AO.

Cependant, pour conserver simultanément rapidité et précision à tous les échantillons, la meilleure perspective consisterait en l'utilisation couplée d'un automate. Une



solution automatisée pour l'extraction en phase solide des molécules organiques est actuellement à l'étude. Avec cette technique, la préparation et la purification de l'échantillon pourraient être optimisées et ainsi le temps et l'effort nécessaires à une analyse seraient réduits sans compromission et de manière très significative.

## Conclusion

La CLHP/ESI/SM<sup>2</sup> par piège d'ions est une technique spécifique et sensible pour la détermination de certaines phycotoxines comme l'acide okadaïque, dans les extraits de coquillages et de phytoplancton.

Après une optimisation des conditions de détection basées sur la présence des ions parents et la quantification des ions fils, 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  $11,0 \pm 0,3$  µg par gramme de glandes digestives.

La spécificité et la qualité des résultats obtenus ( $11,6 \pm 0,3$  µg/g GD), nous ont conduit à élaborer une validation de notre procédure de quantification.

Sur la base de divers documents spécifiques de validation [Guide de la Validation Analytique - Rapport d'une commission SFTP – I. Méthodologie] et tout en respectant la directive 78/318/CEE, l'exploitation statistique des données nous a permis de valider la quantification de l'AO et de la DTX1 par CLHP/ESI/SM<sup>2</sup> selon un certain nombre de critères de qualité :

- La linéarité du dosage de l'AO a été vérifiée à partir d'un étalonnage externe d'AO certifié.

Pour une gamme allant de 0,5 ng (seuil de quantification) à 50 ng d'AO injectés, le coefficient de corrélation de la droite de régression obtenu est supérieur à 0,999 et l'exactitude des quantités calculées d'AO, est vérifiée pour un niveau de risque de 5 %.

- La limite inférieure du domaine de quantification définie selon un rapport de S/N de 10 est de 0,1 µg/mL.

- Les seuils de détection sont de 11 ng d'AO par gramme de glandes digestives de coquillages et de 2 pg d'AO par cellule de *Dinophysis sp* dans un extrait phytoplanctonique.

La linéarité des quantités d'AO extraites a été vérifiée sur différentes matrices phytoplanctoniques et les résultats obtenus montrent que la quantité d'acide okadaïque récupérée est bien proportionnelle au volume déposé.

Nous avons aussi démontré la justesse de la méthode de dosage de l'AO par CLHP/ESI/SM<sup>2</sup> et obtenu un rendement moyen d'extraction de  $92 \% \pm 7 \%$ .

L'analyse de l'AO et la DTX1 par piégeage d'ions en mode MS<sup>2</sup> est donc une technique rapide puissante et à haute spécificité. Enfin et surtout la séparation chromatographique en LC des phycotoxines, couplée à la détection ESI/SM<sup>n</sup> présente le grand avantage de permettre le développement de méthodes multi-toxines comme cela commence à être rapporté dans la littérature.



## Références bibliographiques

- 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.
- 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 rats small intestine. *7<sup>th</sup> Int. IUPAC Symp. on Mycotoxins and Phycotoxins*, Tokyo.
- Fernandez M.L., Miguez A., Cacho E., Martinez A., 1996. Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels. *Toxicon*, 34 (3), 381-387.
- 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.
- 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.
- Hu T., Curtis J.M., Walter J.A., Wright J.L.C., 1995. Identification of DTX4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 597-599.
- Lee J.S., Yangi T., Kenma R., Yasumoto T., 1987. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, 51(3), 877-881.
- Paul W., 1990. Electromagnetic traps for charged and neutral particles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 29.
- Quilliam M.A., 1995. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection. *J. of AOAC International*, 78, 2, 555-569.
- Quilliam M.A., Hardstaff W.R., Ishida N., McLachlan J.L., Reeves A.R., Ross, N.W., Windust A.J., 1995. Production of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods. *Presented at Sendai*, 1-4.
- 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.
- 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 yessensis*. *Toxicon*, 39, 507-514.
- 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.
- Windust J.A., Hu T., Wright J.L.C., Quilliam M.A., McLachlan J.L., 2000. Oxidative metabolism by *Thalassiora Weissflogii* (Bacillariophyceae) of a diol-ester of okadaic acid, the diarrhetic shellfish poisoning. *J. Phycology*, 36, 342-350.
- 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 : Matériels

### Matériels certifiés

<b>CNRC-NRC Conseil National de Recherches Halifax - Nova Scotia Canada B3H B128Z1</b>	Acide okadaïque free acid OACS-1 4*0,5 mL	101,2 µg
	AO/DTX1-MUS-2 4*4 g	16 g

### Standards

<b>INTERCHIM Division INTERBIOTECH</b>	Acide okadaïque free acid-MT-100	100 µg
<b>CALBIOCHEM France BIOCHEM</b>	DTX1 Ref 317480	25 µg

### Dérivation

<b>INTERCHIM Division INTERCHROM</b>	9 anthryldiazomethane (ADAM) Molecular ProbeA-1400	25 mg
--	---	-------

### Solvants

Société	Utilisation	Produit et Référence	Unité
<b>FISHER</b>	Analyse LC/MS	méthanol LC/MS 8402 Ref A4332993	2,5 L
		Acétonitrile LC/MS 9017 Ref A4333105	2,5 L
		TFA Ref A4333192	10*1 mL
<b>Merck- Eurolab S.A</b>	Analyse LC/F	Acétonitrile HPLC. Lichrosolv 14291-2500	2,5 L
	Extraction	Methanol hypersolv 152506X	2,5 L
	Extraction	Chloroforme stabilisé en ethanol. Iso 2445-2500	2,5 L
	Extraction	n-Hexane 95 % "ANALAR" 152496G	2,5 L
	Purification	chloroforme stabilisé à 0,6 % d'ethanol Cofralab/Prolabo Ref 22711290	1 L
	Hydrolyse : acide acétique 1 % acide acétique 0,2 %	Acide acétique Ref 100063.1	1 L



## ANNEXE IIa : 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/H<sub>2</sub>O (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/H<sub>2</sub>O.

Elimination du culot.

### Partage liquide/liquide

Prélever 5 mL de la phase MeOH/H<sub>2</sub>O. (→ 0,8 g GD).

### Méthanol/Hexane (séparation des composés apolaires)

Ajouter 5 mL de C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>.

Agitation.

Centrifugation - Centrifuger pendant 10 min à 3000 tr/min et récupérer la phase supérieure (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) (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 H<sub>2</sub>O.

### Méthanol/Chloroforme (séparation des composés moyennement polaires)

Ajouter 6 mL CHCl<sub>3</sub>.

Centrifugation - Centrifuger pendant 10 min à 3 000 tr/min et récupérer la phase (inférieure) (CHCl<sub>3</sub>) (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 :

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

- Les 920 µL restants sont analysés en LC/MS ( $0,8/1000 \cdot 920 = 0,736 \text{ g}$ ) soit 0,004 g de GD injectés ( $0,736/920 \cdot 5$ ).



## **A N N E X E IIb :** **Extraction des DTXs dans le 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**

Reprendre le résidu **I** dans 5 mL de méthanol à 80 %.

Laver 2 fois avec 5 mL d'hexane (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) afin d'éliminer les résidus lipidiques (c.à.d. ajouter 5 mL d'hexane et agiter pendant 5 min), 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-MS<sup>2</sup>.**



## **A N N E X E III : Hydrolyse alcaline des phases hexane**

### **Evaporation**

Evaporation à sec sous N<sub>2</sub> des phases hexane.

### **Hydrolyse**

Hydrolyse avec 2,5mL de NaOH 0,5 M dans MeOH à 90 %.

### **Agitation**

Agitation 1 heure à l'obscurité à température ambiante.

### **Neutralisation**

Neutralisation avec 5 mL d'HCl 0,25 M.

Vérifier le pH pour chaque échantillon et ajuster à pH ≈ 2,5.

### **Extraction (3 fois)**

Ajout de 5 mL de CHCl<sub>3</sub>.

Centrifugation(3 000 tr/min pendant 10 min).

Récupération de la phase chloroformique.

### **Evaporation**

Evaporation à sec (évaporation centrifuge/basse température/sous vide).

### **Extrait hydrolysé**

Des échantillons d'hexane non hydrolysés sont étudiés pour vérifier l'absence de l'acide okadaïque dans cette phase.

### **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 0,00064 g de GD injectés (0,032/500\*10).

- Les 920 µL restants sont analysés en LC/MS ( $0,8/1000*920 = 0,736 \text{ g}$ ) soit 0,004 g de GD injectés (0,736/920\*5).

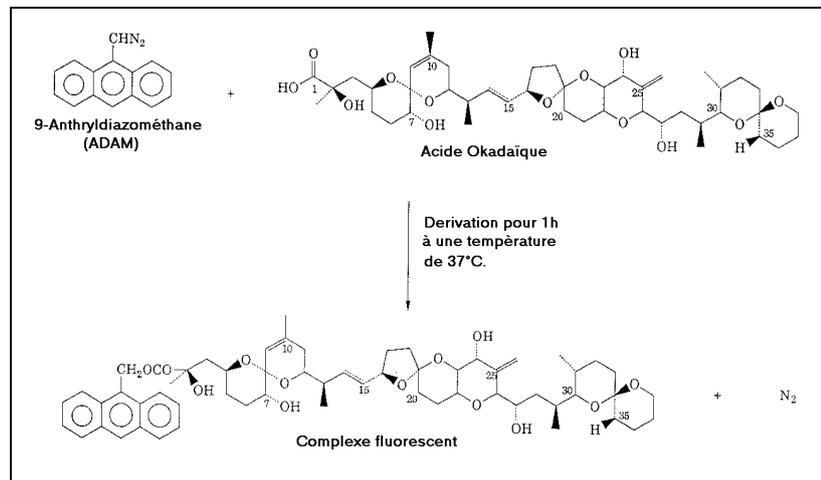


## ANNEXE IV : La dérivation

Après dérivation avec un réactif fluorophore, les dinophysistoxines sont chromatographiées et détectées par fluorescence CLHP/F (Lee *et al.*, 1987 ; Quilliam, 1995).

Cette dérivation est basée sur une réaction d'estérification des toxines en présence d'un composé fluorescent en excès : le 9-anthryldiazométhane (ADAM). De nombreuses précautions sont à prendre lors de la manipulation de l'ADAM car il s'agit d'un produit extrêmement dangereux. Le port des gants est obligatoire ainsi que l'utilisation de matériel spécifique à ce produit.

### La réaction



### Le protocole

Peser le réactif ADAM.

(pour x échantillons,  $y = (2x+5)/10\ 000$  et  $y = m_{\text{ADAM}}$  en g).

Dans un tube à hémolyse ajouter un volume d'acétone tel que  $V = (2x+5) \cdot 100$  en  $\mu\text{L}$  (Envelopper le tube dans du papier aluminium car réactif ADAM est photosensible - agiter au vortex pour homogénéiser).

Prélever 200  $\mu\text{L}$  de la solution d'ADAM préparée et les déposer dans un vial ambré contenant les toxines extraites (fermer hermétiquement les vials) et agiter au vortex pendant une minute).

Laisser une heure dans une l'étuve à 40 °C.



## A N N E X E V : La purification - Extraction en phase solide (SPE)

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 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 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.**



## ANNEXE VI : Matériel / appareils utilisés

### Four :

*Memmert 0-26 DIN 40050- IP 20*

### Ultra-sons :

*Branson 1200 ultrasonic cleaner B-1200 E3*

*Branson 5200 ultrasonic cleaner B-5200 E4*

### Homogénéisation :

*IKA Labortechnik ultra-turrax T8*

*IKA Labortechnik ultra-turrax T25*

*IKA Labortechnik KS 125 basic*

### Centrifugation :

*Jouan C412*

### Evaporation :

*N-evap analytical evaporator 111 – 8063*

*Büchi Vacuum distillation/évaporation Rotavator RE111 + Huber Bioblock*

*7007 liquide circulation pompe*

*Jouan RC1010 / RCT90 + Pompe: Edwards RV5*

### Extraction :

Module d'extraction 24 voies & accessoires

24 Port vacuum *Manifoldewlett Packard* série 1100,1050

Lid, Gaskets, and 24 stopcocks (couvercle – joints - robinets)

Glass chamber

Vacuum Gauge, valve

Collection Rack, 24 port size

Stainless Steel Needles

### Chromatographie CLHP/F:

*Hewlett Packard* série 1100,1050

1100 Fluorescence Detector

*Merck* T6300 (chauffage colonne)

Degasser G1322A (on-line vacuum)

Quat Pump G1311A

### Chromatographie Spectrométrie de masse CLHP- SM :

Pompe CLHP Spectra P (P2000-30) à gradient binaire

Passeur automatique avec four de colonne Spectra P (AS100XR)

Module de conditionnement des solvants avec dégazage à membranes (4 voies)

Module interface SN4000 pour le pilotage de la pompe par le calculateur PC du spectromètre de masse à piège d'ions

Ensemble de vide à pompage différentiel avec pompe turbomoléculaire (*Edward* E2M 28)

1 Générateur d'Azote (*Watman* 75-72)

*ThermoFinnigan* LCQ (SM)<sup>n</sup>- Spectromètre de masse ESI piège d'ions



## A N N E X E VII : Mode de calcul de la quantité des toxines

Les quantités des standards sont connues. On peut donc tracer une droite de régression. Si le coefficient de la corrélation est significatif (proche de 1) et si les pics chromatographiques des standards sont bien intégrés, on peut calculer la quantité de toxines dans les échantillons. La droite de régression nous donne la pente et l'ordonnée à l'origine. Avec ces données et la surface des pics chromatographiques correspondants, on peut calculer la quantité des toxines dans les échantillons.

$$\frac{(\text{surface pic}) - (\text{ordonnée origine})}{(\text{pente})} = \text{quantité AO}$$

L'unité d'étalonnage est le **ng**.

La concentration d'AO est rapportée au nombre de grammes de glandes digestives extraits et l'évaluation finale de la toxicité est exprimée en  $\mu\text{g}$  par gramme de DG

$$\frac{\text{quantité AO}}{\frac{\text{quantité GD}}{\text{quantité solution}} \cdot \text{volume injection}} = \text{concentration AO}$$

Pour exemple : (échantillon n° 5 Houat 03-07/05/99)

Aire du pic = 450,436

La droite de régression de pente 240,04 et d'ordonnée à l'origine de 39,43 ( $R^2 = 0,99933$ ), on obtient :

$$\frac{450,436 - 39,43}{240,04} = 1,71 \text{ ng}$$

et la concentration en AO de cet échantillon est donc de :

$$\frac{1,71 \text{ ng}}{0,024 \text{ g}} \cdot 10^{-3} \frac{\text{g}}{\text{mg}} = 0,71 \frac{\mu\text{g} - \text{AO}}{\text{g} - \text{HP}}$$

$$\frac{\quad}{200 \mu\text{l}} \cdot 20 \mu\text{l}$$



## ANNEXE VIII : Exemple de calculs pour l'évaluation de la quantité d'AO dans un échantillon certifié MUS-2

On dissout 3,7 g de glande digestive certifiée dans 25 mL d'une solution à 80 % MeOH.  
 On prélève 5 mL soit 0,74 g par tube.  
 Les 5 mL sont évaporés et repris avec 1000 µl MeOH 100 %.  
 Solution Stock : 1000 µl = (0,74 g).

Analyse en CLHP/F	Analyse en CLHP/MS <sup>2</sup>
Volume à dériver : 35/1000 µl = $\frac{0,74g}{1000\mu l} \cdot 35\mu l = 0,0259g$	Pas de dérivation
Après dérivation et évaporation : Volume injecté : 10/500 µl = $0,0259g \cdot \frac{10\mu l}{500\mu l} = 0,000518g$ de glande digestive à analyser en CLHP/F	Volume injecté : 5/1000 µl = $0,074g \cdot \frac{5\mu l}{1000\mu l} = 0,0037g$ de glande digestive à analyser en CLHP/MS <sup>2</sup>
Avec une concentration certifiée d'AO de $11 \pm 0,3 \frac{\mu g}{g}$ de MUS-2	
On obtient 5,7 ng d'AO. $\left( 0,000518g \cdot 11 \frac{\mu g}{g} \right) = 5,698ng$	On obtient 40,7 ng d'AO. $\left( 0,0037g \cdot 11 \frac{\mu g}{g} \right) = 40,7ng$
Avec une concentration certifiée de DTX1 de $0,9 \pm 0,1 \frac{\mu g}{g}$ de MUS-2	
On obtient 0,46 ng de DTX1. $\left( 0,000518g \cdot 0,9 \frac{\mu g}{g} \right) = 0,4662ng$	On obtient 3,33 ng de DTX1. $\left( 0,0037g \cdot 0,9 \frac{\mu g}{g} \right) = 3,33ng$

