

Détermination de l'acide domoïque à l'état de traces dans le milieu marin:

**Amélioration de la sensibilité de la méthode d'analyse
par chromatographie en phase liquide à haute performance
couplée à une détection par fluorescence (HPLC-FD)**

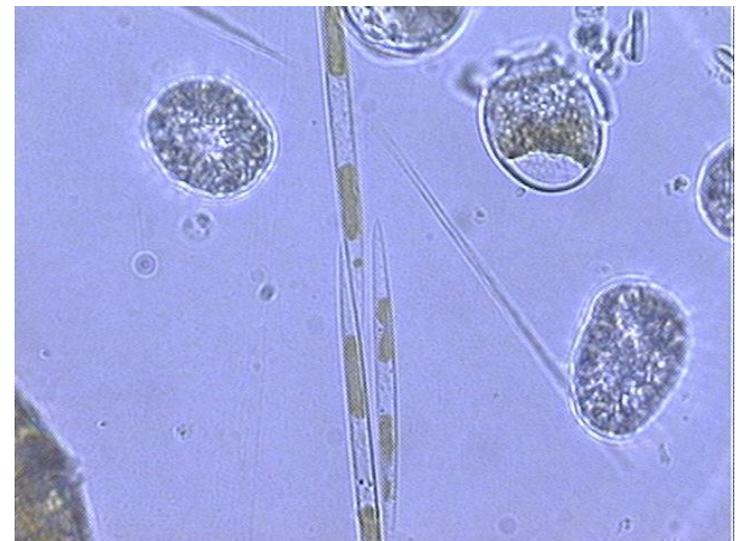
Étude de son transfert dans le réseau trophique

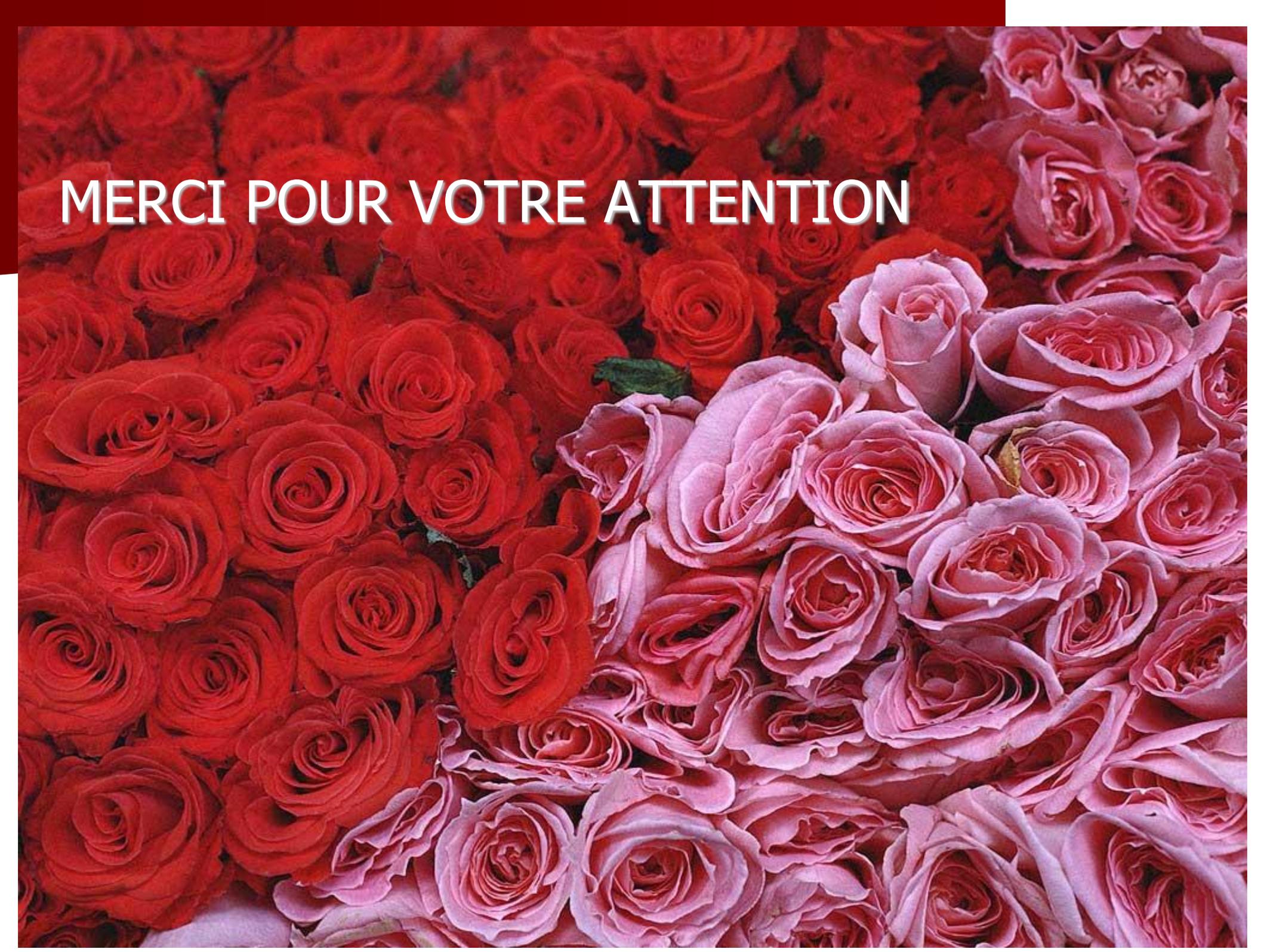


Aurélie DEVEZ

IFREMER

DYNECO/PELAGOS



A dense field of roses, with a dark red section on the left and a lighter pink section on the right. The text "MERCI POUR VOTRE ATTENTION" is overlaid in white, bold, uppercase letters across the top center of the image.

MERCI POUR VOTRE ATTENTION

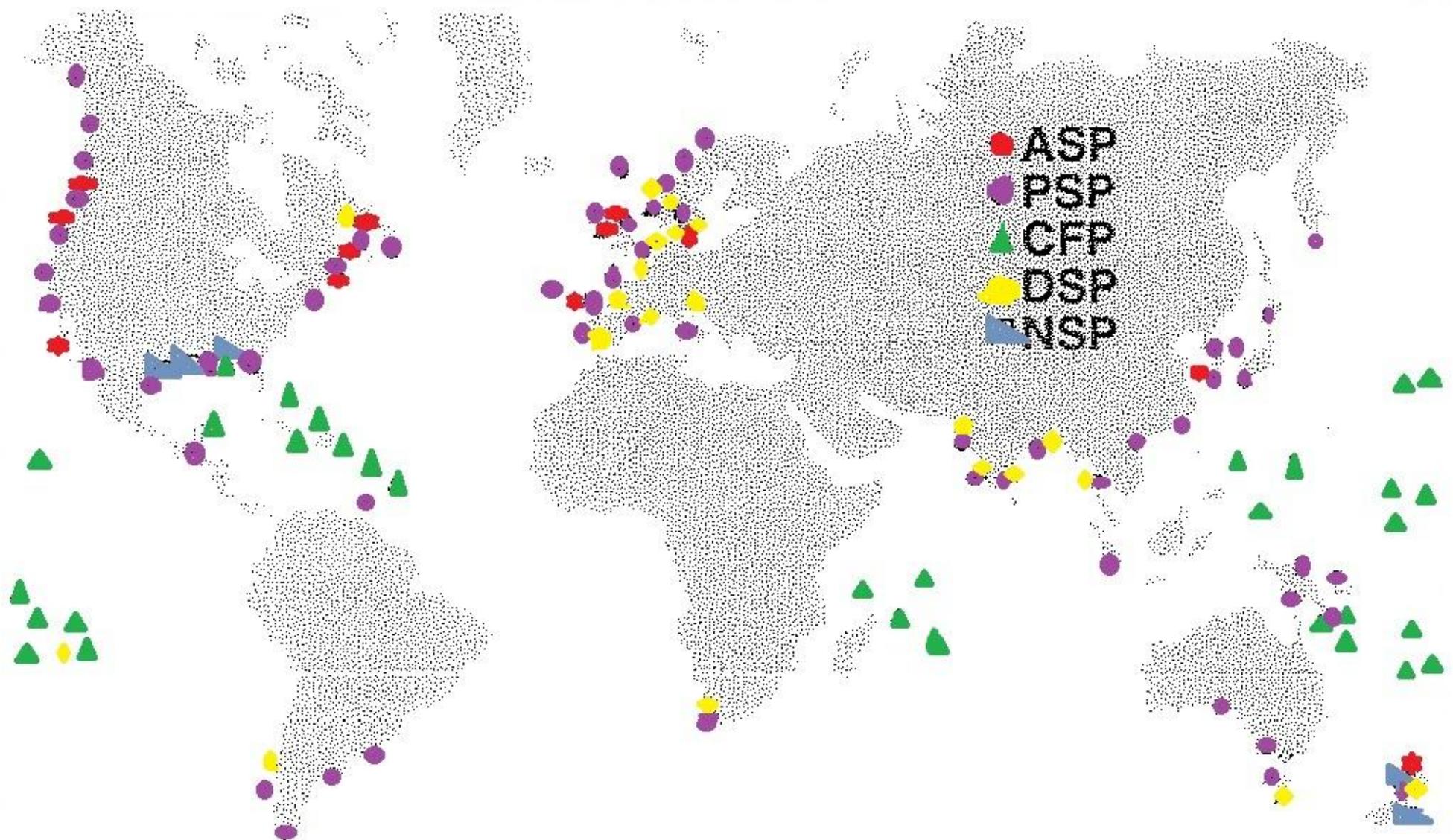
Merci à Pieter Vandromme

Merci à Daniel Delmas et à tous les membres de l'équipe DYNECO/PELAGOS

Livres de chevet

- **Troubleshooting du logiciel CHOMERA**
- **Bates *et al.*, 1989.** Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 46: 1203-1215.
- **Ducasse E. (2011).** Étude de la distribution spatiale des diatomées toxiques du genre *Pseudo-nitzschia* en Bretagne Sud et Mer d'Iroise par hybridation fluorescente (FISH). Rapport IFREMER, 49pp.
- **Einarsson, 1985.** Selective determination of secondary amino acids using precolumn derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate and reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 348: 213-220.
- **Litaker *et al.*, 2008.** Rapid enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the algal toxin domoic acid. *Journal of Shellfish Research* 27(5): 1301-1310.
- **Pocklington *et al.*, 1990.** Trace determination of domoic acid in seawater and phytoplankton by high performance liquid chromatography of the fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) derivative. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 38: 351-368.
- **Takemoto and Daigo 1958.** Constituents of *Chondria armata*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 6: 578-580.
- **Trainer *et al.*, 2012.** *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae* 14: 271-300.

Distribution globale des phytotoxines



Acide domoïque

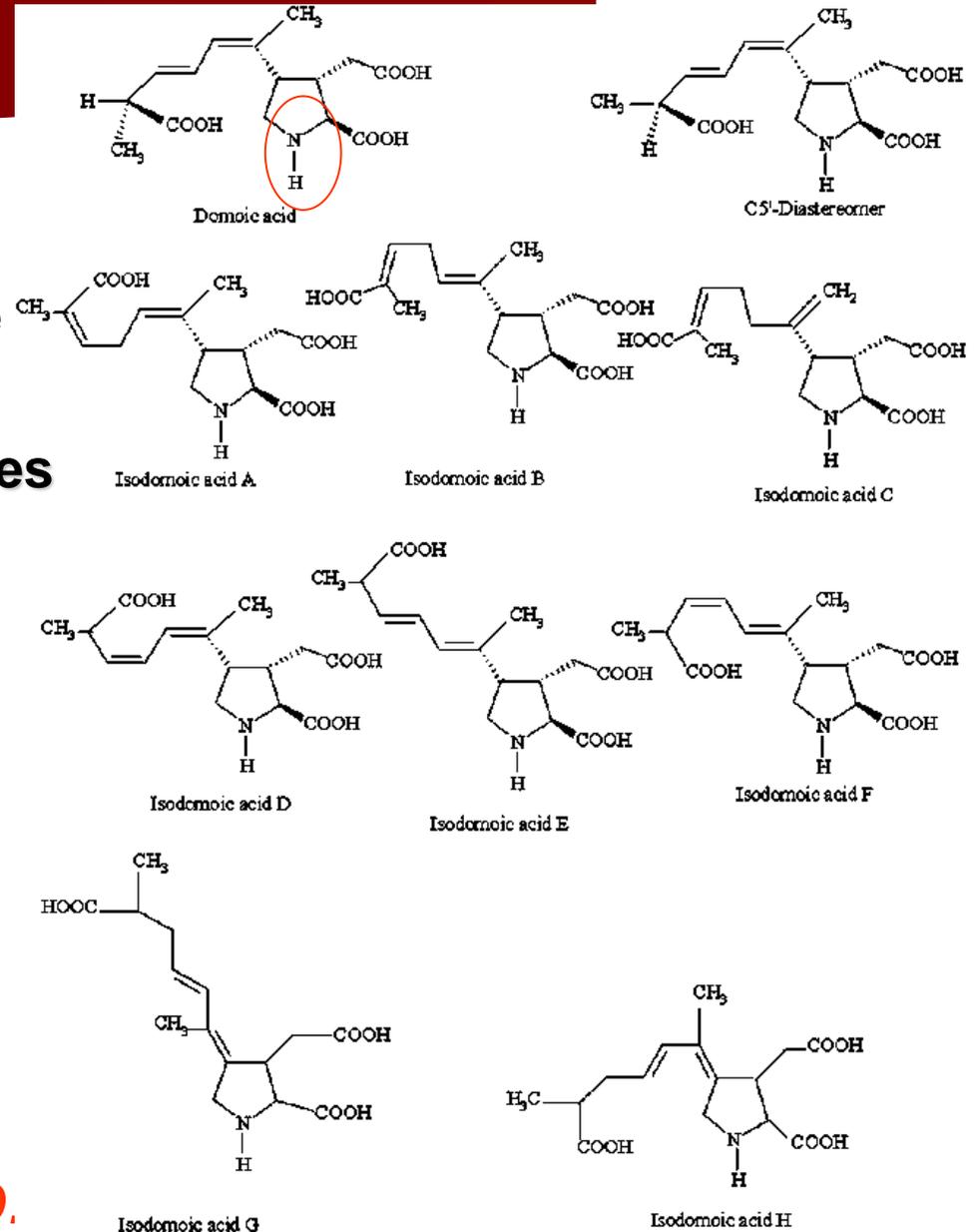
- Amine Secondaire
- Poids moléculaire de 311 Daltons

➤ Trois groupements carboxyliques responsables de sa forte polarité et hydrophobicité

➤ Neurotoxine de la famille des **Kainoïdes** (neurotransmetteur)

➤ Structure similaire à l'acide glutamique susceptible de prendre la place du glutamate lors d'interactions avec certains récepteurs

Produit par les diatomées du genre *Pseudo-nitzschia spp.*



Toxines amnésiantes: Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)

Première intoxication décrite en 1987 au Canada (Baie de Cardigan, Prince Edward Island)
suite à l'ingestion de moules contaminées (Bates *et al.*, 1989)

Due à une neurotoxine (acide domoïque) qui entraîne
une stimulation constante de l'activité neuronale

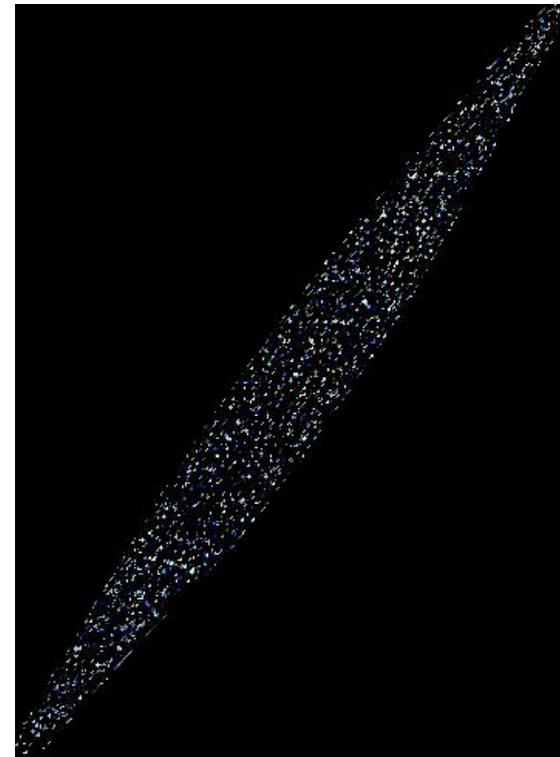
Toxine isolée par une équipe japonaise en 1958 sur *Chondria armata* (microalgue rouge)
(Takamoto & Daigo)

Caractéristiques cliniques

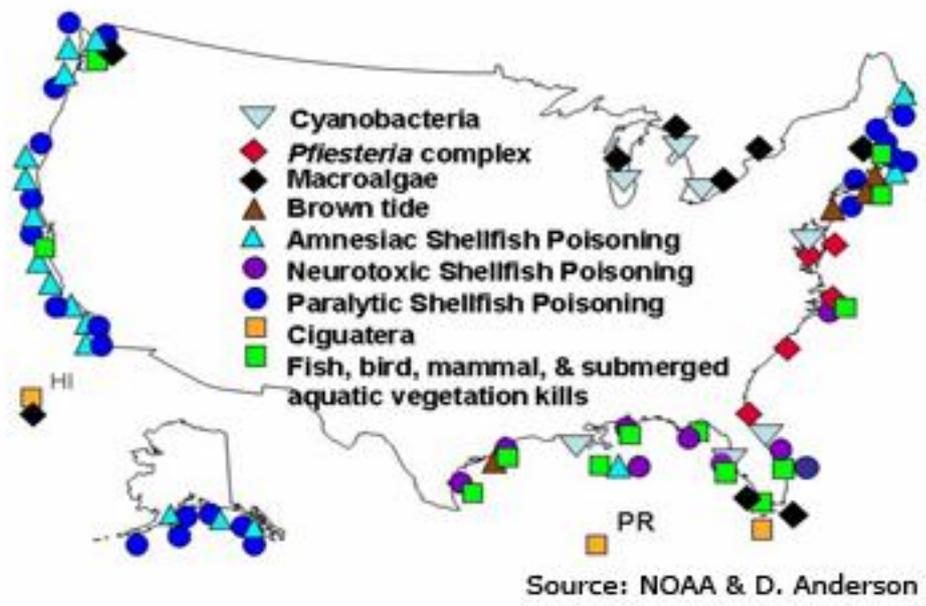
Symptômes neurologiques observés après 24 à 48h d'exposition

Apparition de nausées & de diarrhées

Confusion, pertes de mémoire (temporaires /
permanentes), coma, mort



Distribution des épisodes d'empoisonnement suite à HABs aux Etats Unis



Major HAB-related Events in the Coastal U.S.



Divers degrés de toxicité de *Pseudo-nitzschia*

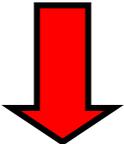
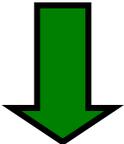
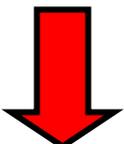
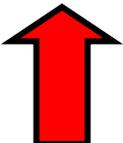
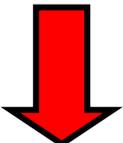
• Toutes les espèces sont-elles capables de produire de l'acide domoïque ?

• Toxicité variable en fonction des espèces et de leur état physiologique

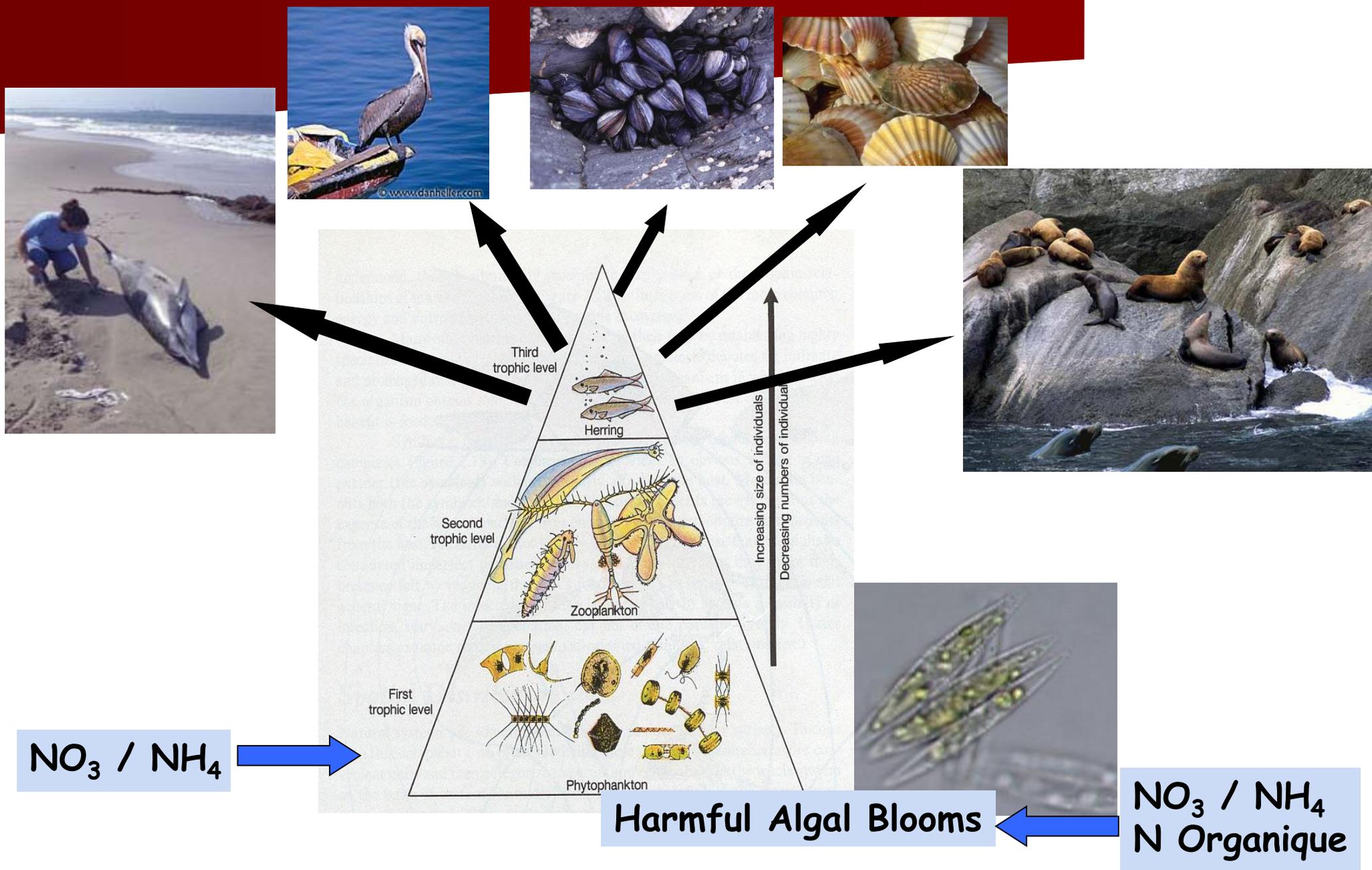
• Taux de toxicité différent en fonction des espèces



Facteurs affectant la production d'acide domoïque

Biodisponibilité des nutriments	Production d'acide domoïque
N 	
P 	
Si 	
Fe 	
Cu  	

Bioaccumulation de l'Acide Domoïque dans la chaîne trophique



$\text{NO}_3 / \text{NH}_4$

Harmful Algal Blooms

$\text{NO}_3 / \text{NH}_4$
N Organique

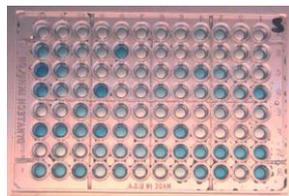
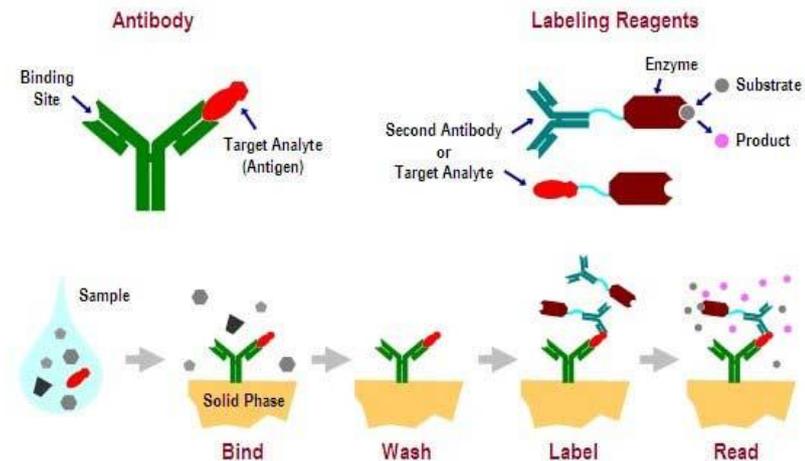
Méthodes d'analyse de l'acide domoïque: CHIMIQUE

- ❑ Méthode de référence pour la quantification de l'acide domoïque
High-Performance Liquid Chromatography avec détection UltraViolet à $\lambda = 242$ nm (HPLC-UV)
- ❑ Chromatographie sur couche mince (Thin Layer Chromatography - TLC)
- ❑ Electrophorèse Capillaire (Capillary Zone Electrophoresis - CZE)
- ❑ Extraction sur phase solide couplée à un échange avec ions faibles
- ❑ Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC/MS)
- ❑ Ionisation par électrospray couplée à un spectromètre de masse (LC/ESI/MS)
- ❑ LC couplée à deux spectromètres de masse (LC/MS/MS)
avec ou sans Extraction en Phase Solide (SPE)
- ❑ LC couplée à un détecteur à diode et deux spectromètres de masse (LC/DAD/MS/MS)
- ❑ **Chromatographie en phase liquide avec détection par fluorescence (HPLC-FD)
avec dérivation pré- ou post-colonne**

Méthodes d'analyse de l'acide domoïque: BIOLOGIQUE

- ❑ Bio-essai “souris” limite de détection = 40 µg/g (Norme 20 µg/g)
- ❑ Résonance Plasmonique de Surface (SPR) basée sur des biocapteurs immunologiques
- ❑ Techniques de ciblage sur récepteurs ou cibles spécifiques
- ❑ Traçage de récepteurs fluorescents spécifiques (sous unité rRNA)
- ❑ Jellet Rapid Test™
- ❑ Essais sur tissus ou cellules cibles
- ❑ **Méthode immuno-enzymatique (ELISA)**

ELISA



Objectifs

- (i) Améliorer les limites de quantification de la méthode d'analyse de l'acide domoïque à l'état de traces
- (ii) Caractériser les conditions environnementales favorisant l'apparition et le développement des diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* en Sud Bretagne
- (iii) Rechercher ces niches écologiques (couche fines situées dans le gradient de densité ou près du fond)
- (iv) Evaluer le niveau de toxicité et les processus de transfert de l'acide domoïque au sein du réseau trophique

PSEUDOMO 1: 11-16 mars 2010

Conditions hivernales, *Pseudo-nitzschia* < 8000 cells/L
DA dissous <0.6 nM

PSEUDOMO 2: 18-25 Septembre 2010

Stratification post estivale
Pseudo-nitzschia < 120 000 cells/L
DA dissous <0.8 nM en Iroise

PSEUTEC : 9-16 juin 2011

Chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur par fluorescence

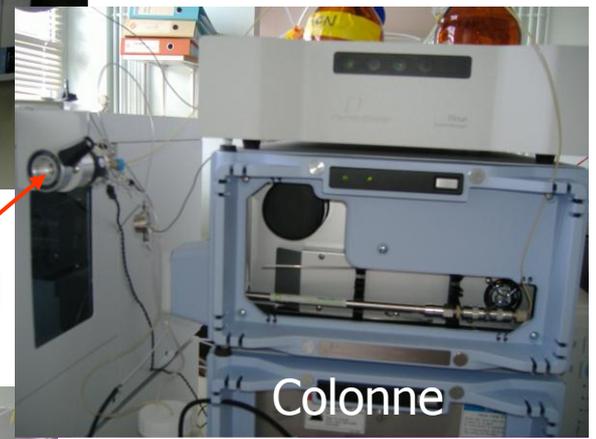
Eluants:
Acétonitrile pur

TFA 0.1%
Fluorimètre

λ excitation = 260 nm
 Λ émission = 313 nm



Injecteur manuel



Colonne

201TPC18 Vydac
(250 x 4.6 mm, 5 μ m)
Four à 55°C

Injecteur automatique



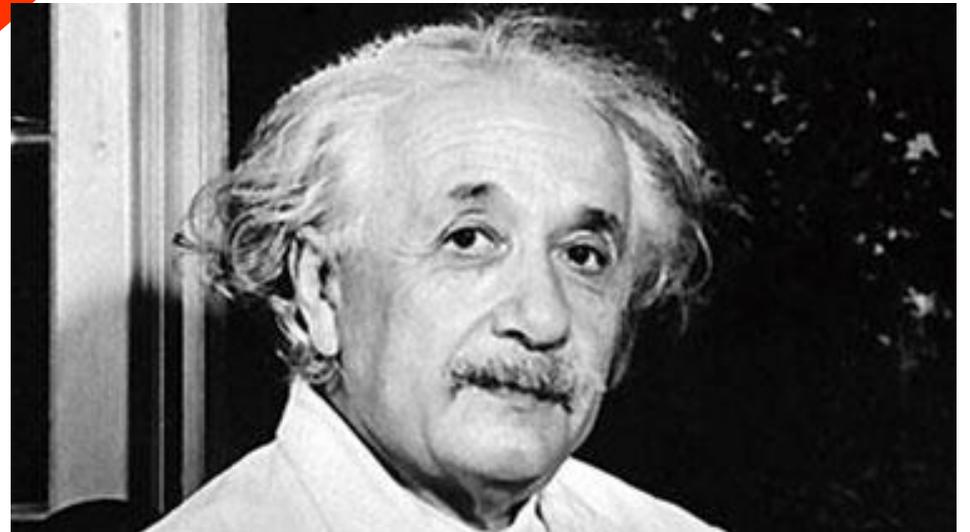
Pompes



POCKLINGTON VERSUS EINARSSON



POCKLINGTON VERSUS EINARSSON



Conditions analytiques des deux protocoles

Pocklington = POCK

Einarsson = EIN

Débit: 1 mL/ min

Gradient linéaire pdt 15 min. 30 à 50% ACN

↗ **100 % ACN pdt 2 min. (durée de 5 min.)**
30 à 50 % ACN pdt 2 min. (durée de 15 min.)

Choix du gradient des éluants:

Différentes étapes de la dérivatisation des échantillons

Méthode originale de Pocklington (1990)

1 mL échantillon
+ 250 µL tampon borate **1M pH = 6.2**
↓ **45 secondes**
+ 300 µL FMOC
↓
+ 3 x 1.7 mL éthyl acétate
↓
+ 3,5 µL acide acétique

Méthode par double dérivatisation par Einarsson (1985)

900 µL échantillon
+ 100 µL tampon borate **0.8M pH = 9.5**
↓ **30 secondes**
+ 100 µL OPA/MeSH
+ 100µl Iodoacétamide
↓ **30 secondes**
+ 300 µL FMOC
↓
+ 3 x 1.7 mL éthyl acétate
↓
+10 µL acide acétique

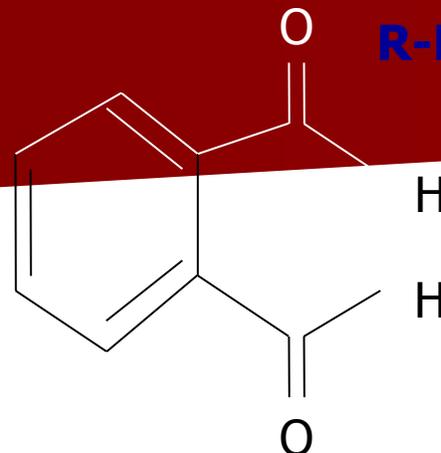
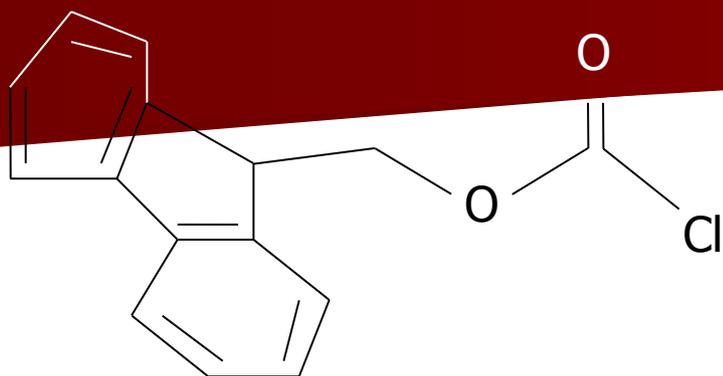
**REACTIF DES AMINES PRIMAIRES
ET SECONDAIRES**

REACTIF DES AMINES PRIMAIRES

Fmoc-Cl : FLUORESCENT
260/313

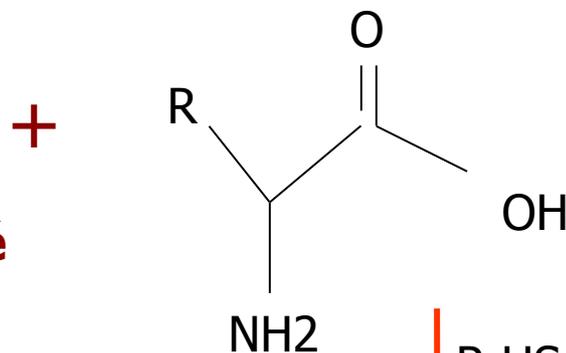
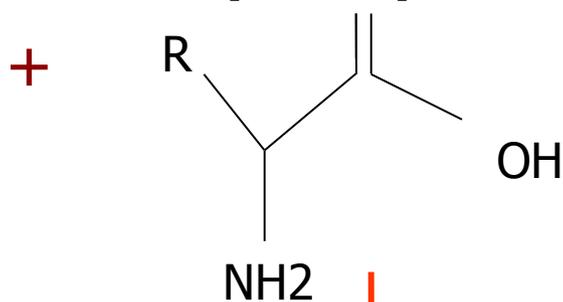
OPA : NON FLUORESCENT
340/450

R-NH : pas de réaction

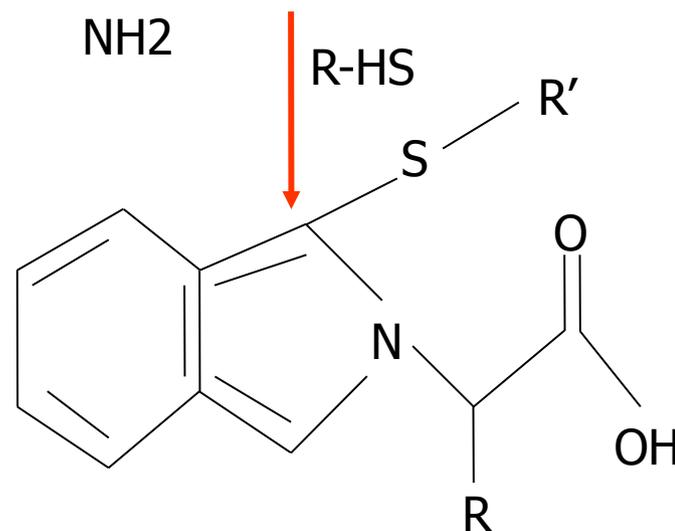
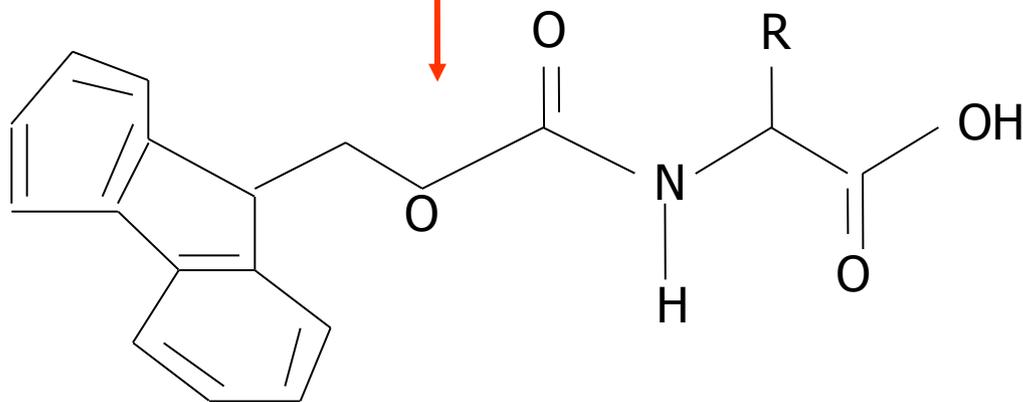


**9 –
Fluorenylmethylchloroformate**

O-phthaldialdehide-mercaptoéthanol

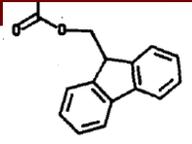
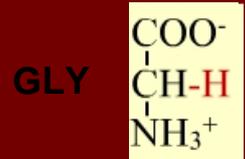


Acide aminé

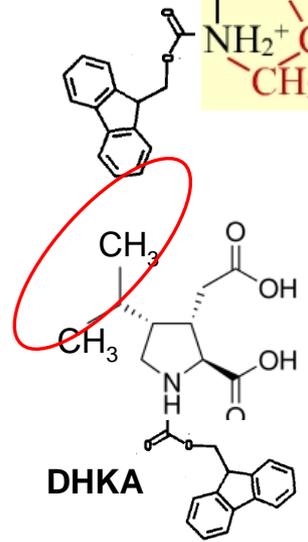
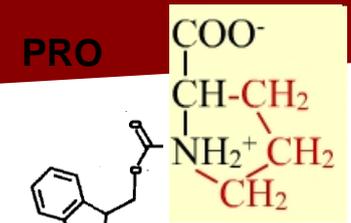


Temps de rétention (en minutes)

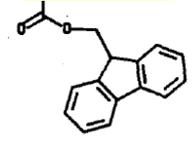
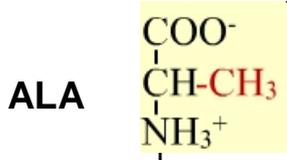
des principaux acides aminés et composés testés



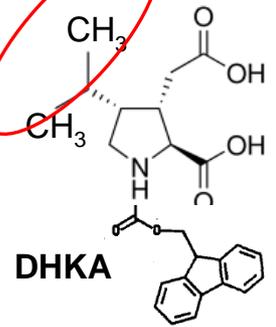
Tr = 8.97 min.



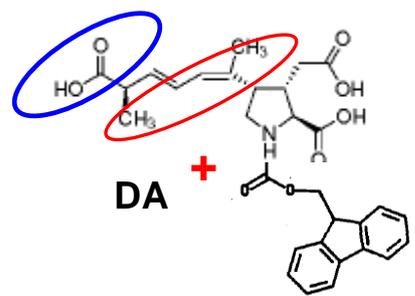
Tr = 12.2 min.



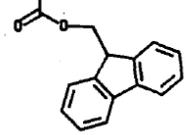
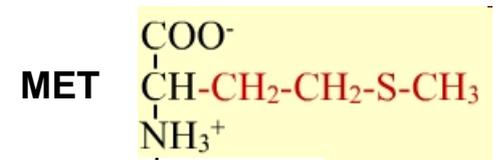
Tr = 8.8 min.



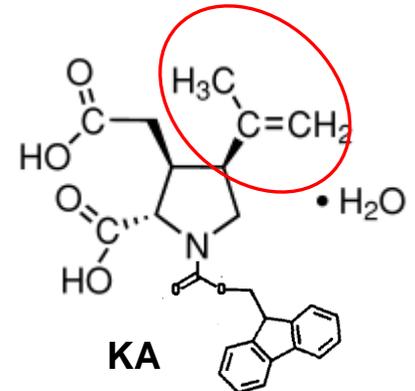
Tr = 14.1 min.



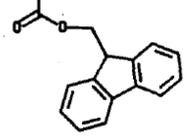
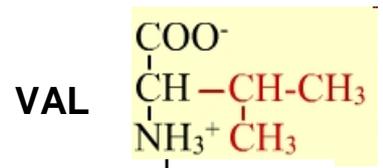
Tr = 13.5 min.



Tr = 7.43 min.

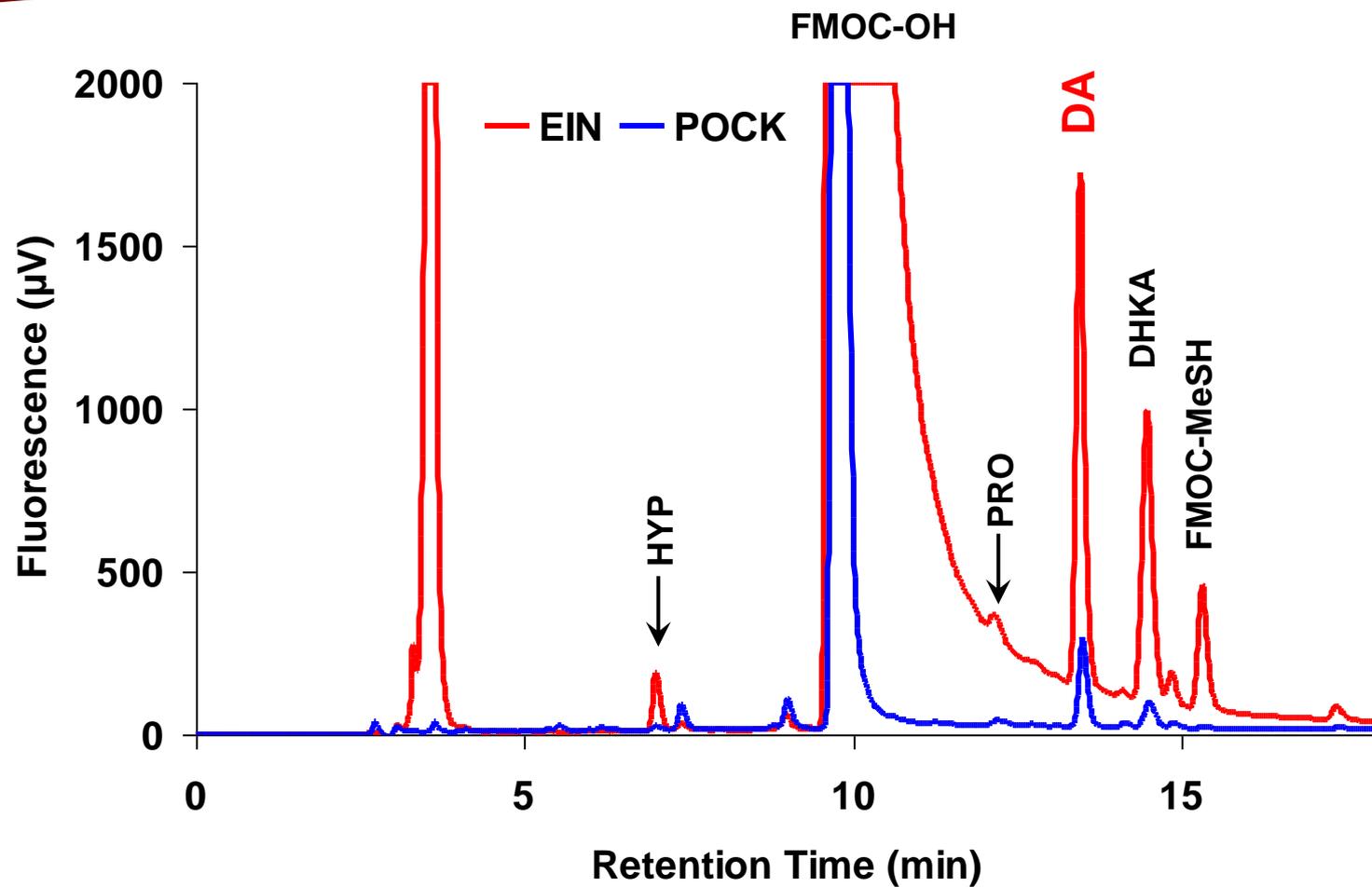


Tr = 12.2 min



Tr = 9.1 min.

Comparaison des deux méthodes



Excellente séparation des pics, pas de co-élution ni d'épaulement

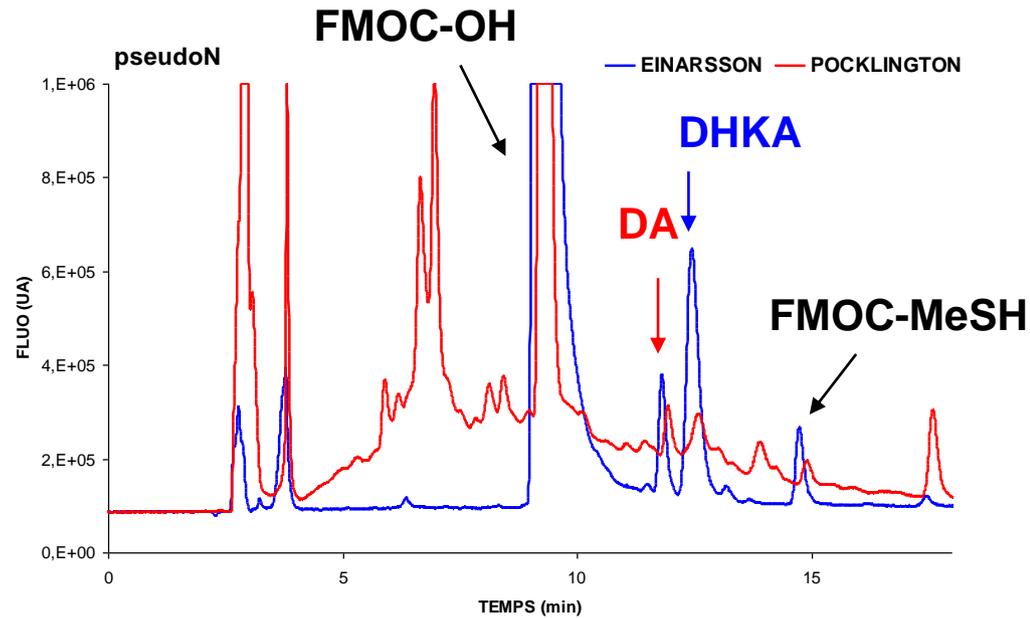
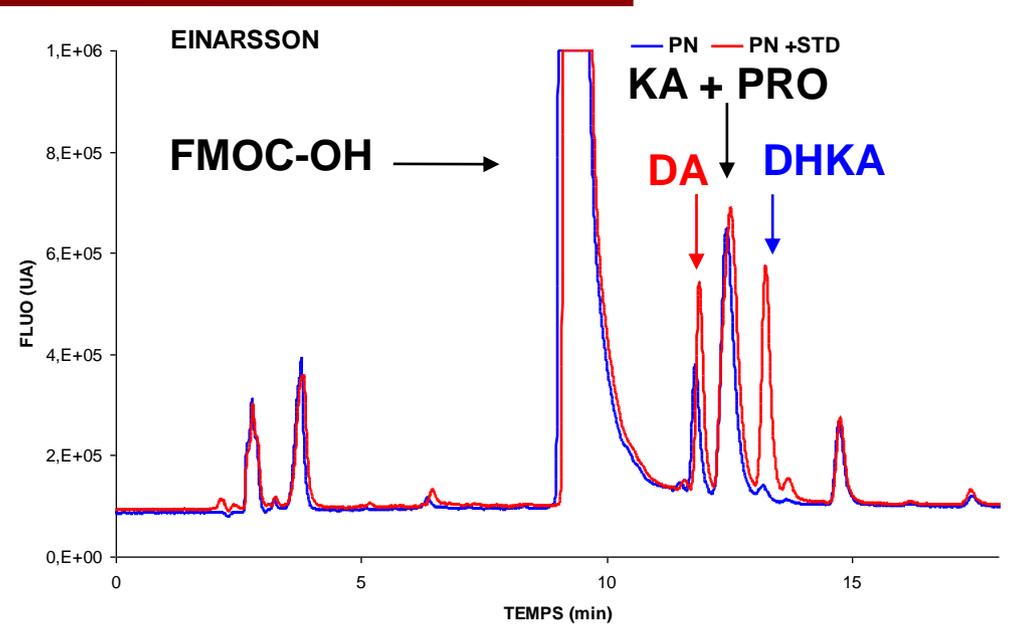
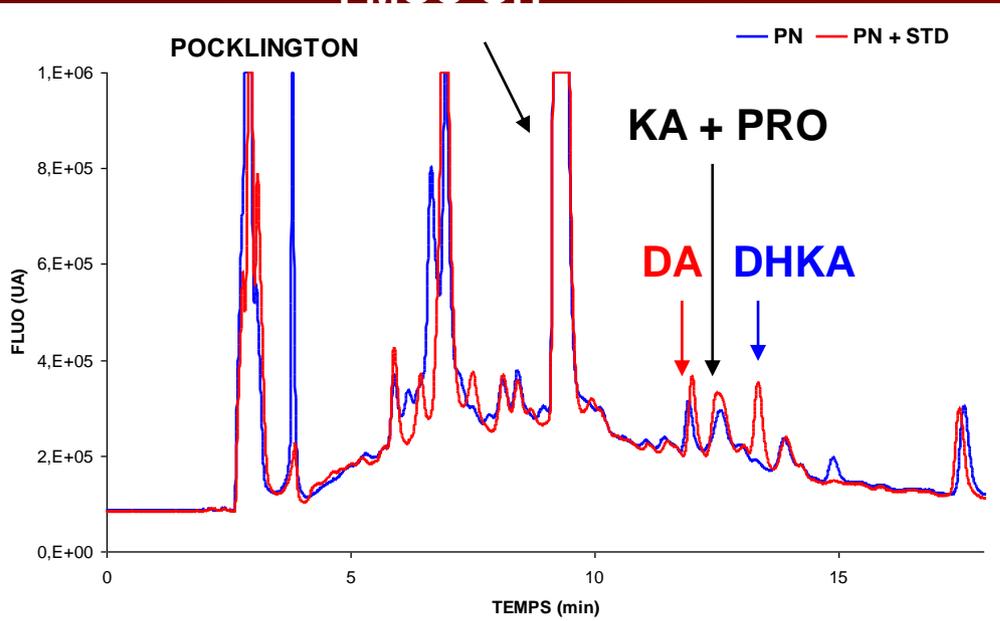
15 mL *Pseudo-nitzschia australis* extrait

par 5mL H₂O

Extrait seul

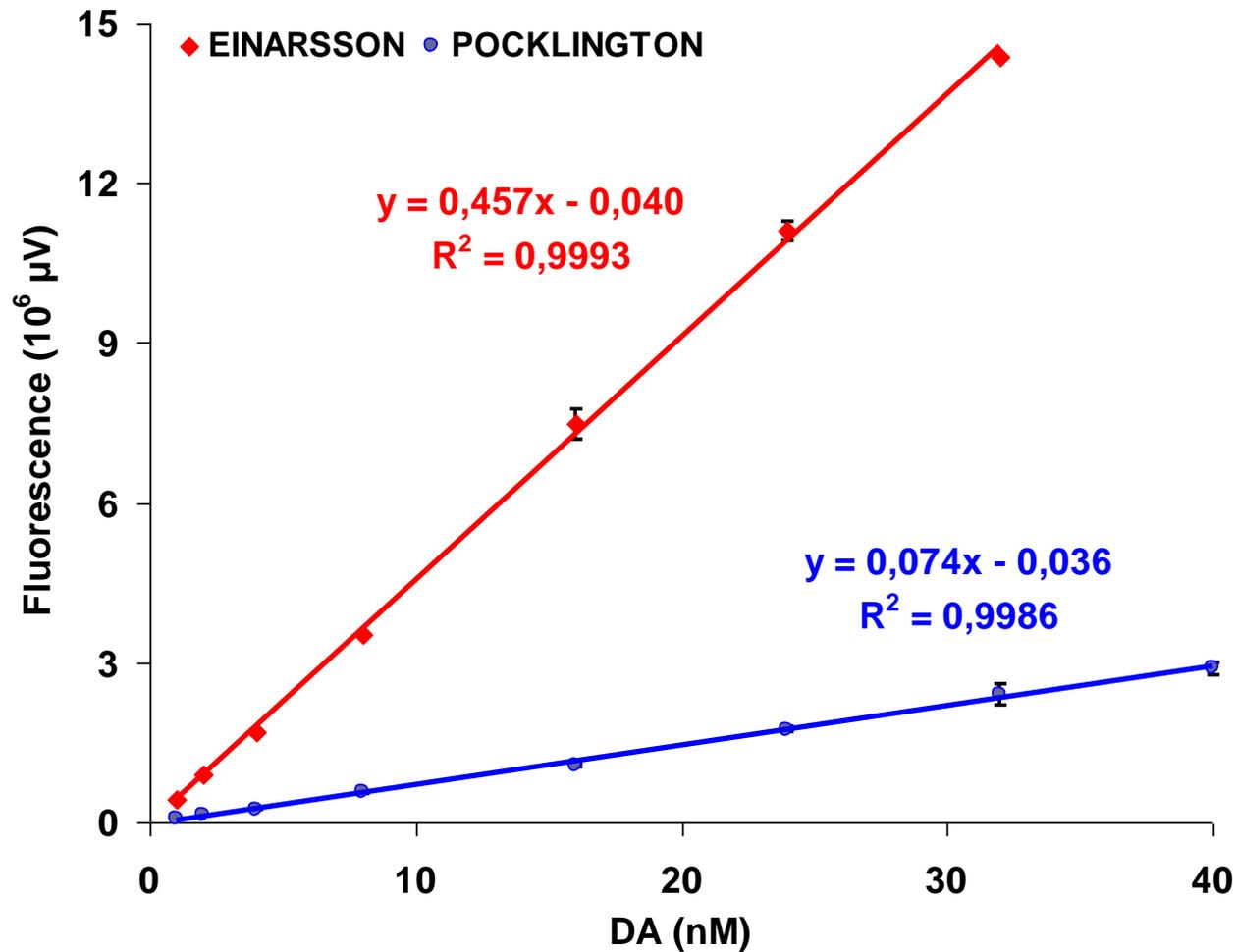
Extrait + 20 µL de standard (DA+ KA+DHKA)

FMOC-OH

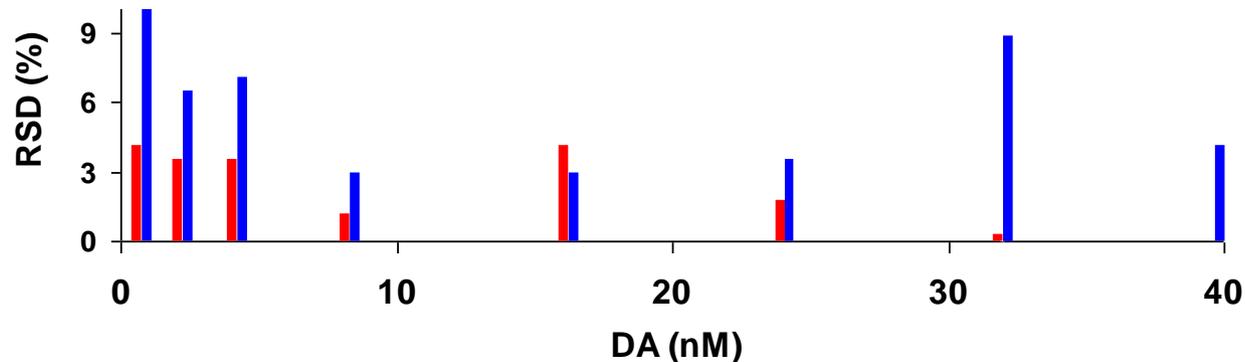


Meilleure ligne de base et meilleure précision

Courbes de calibrations

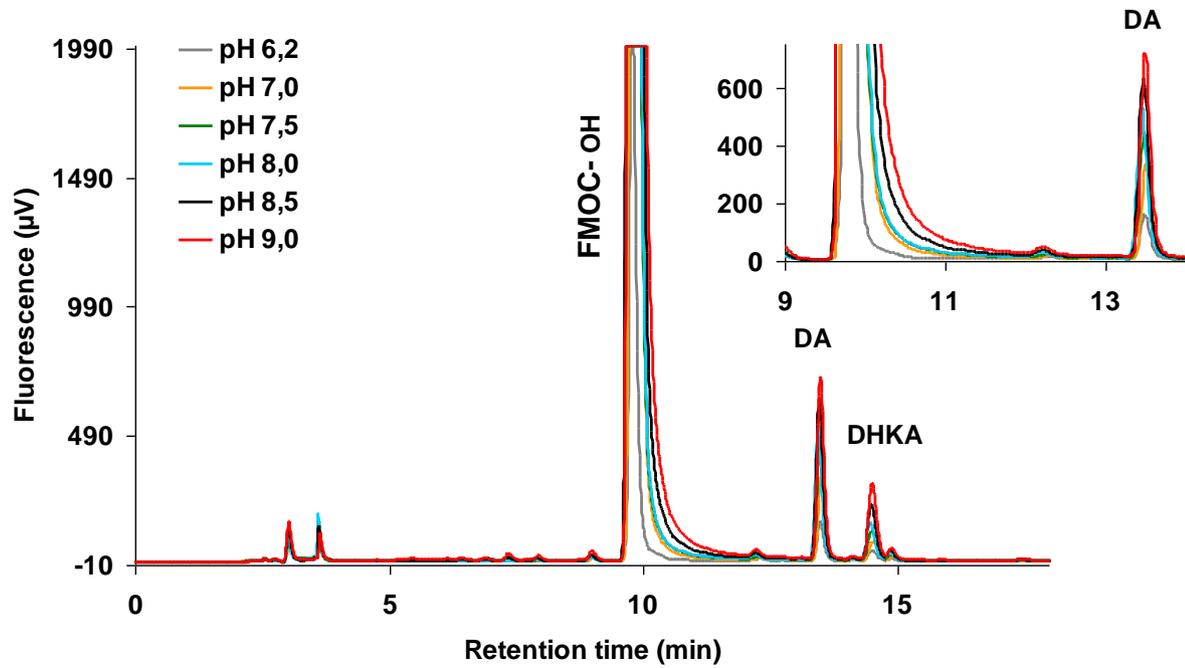
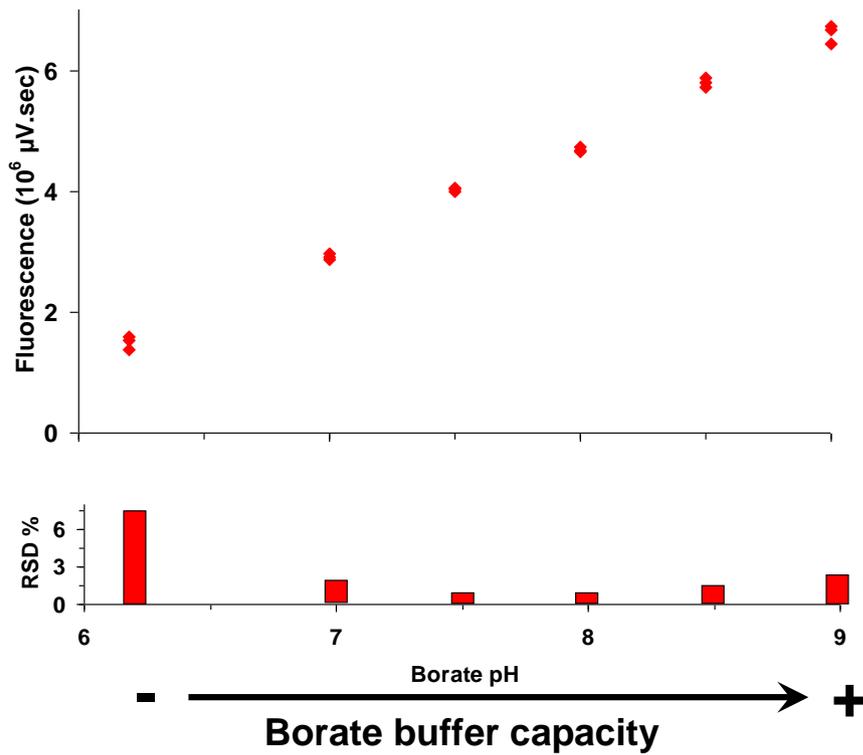


**Amélioration de la
Fluorescence par un
facteur de 6**



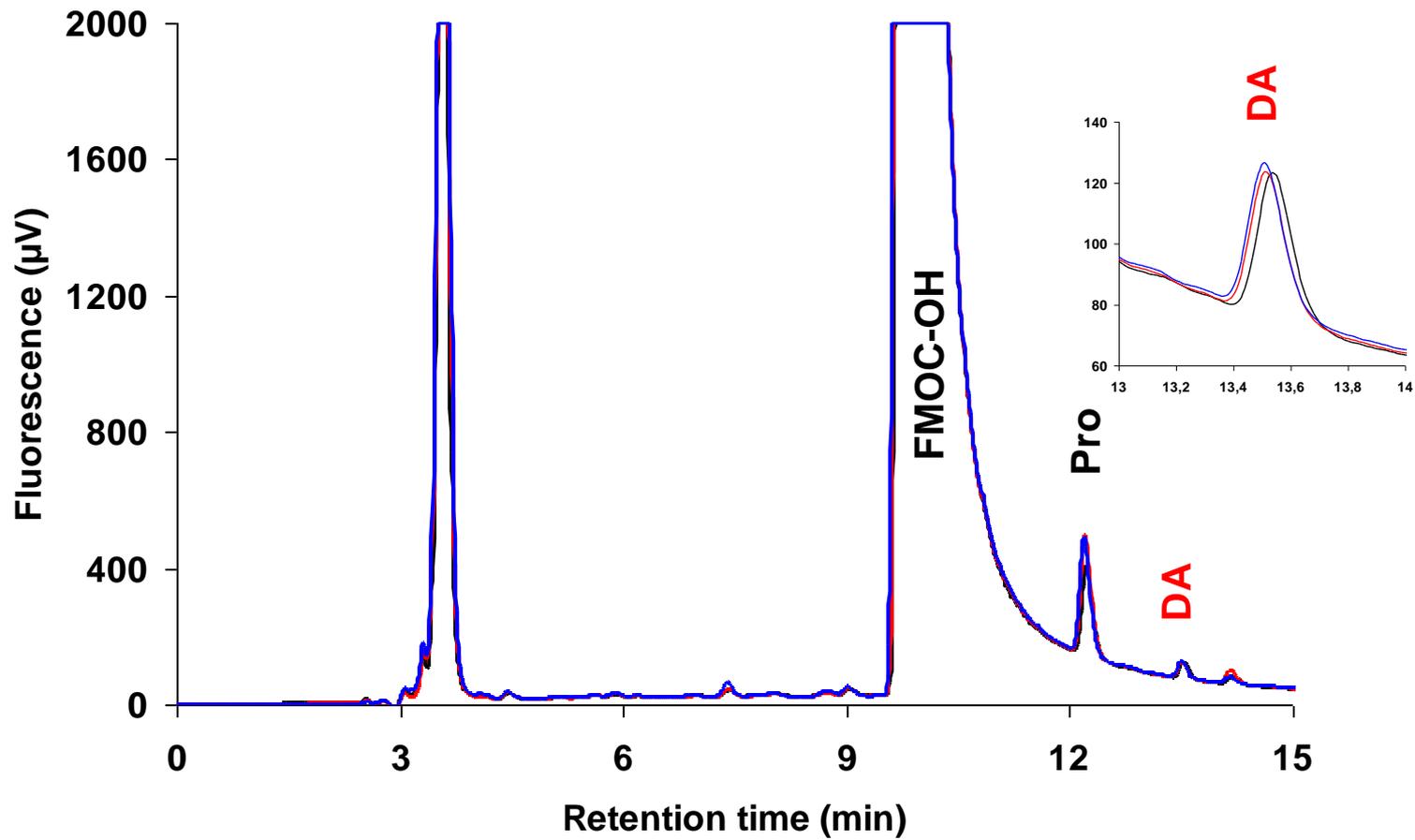
**Amélioration de la
reproductibilité**

Effet du pH



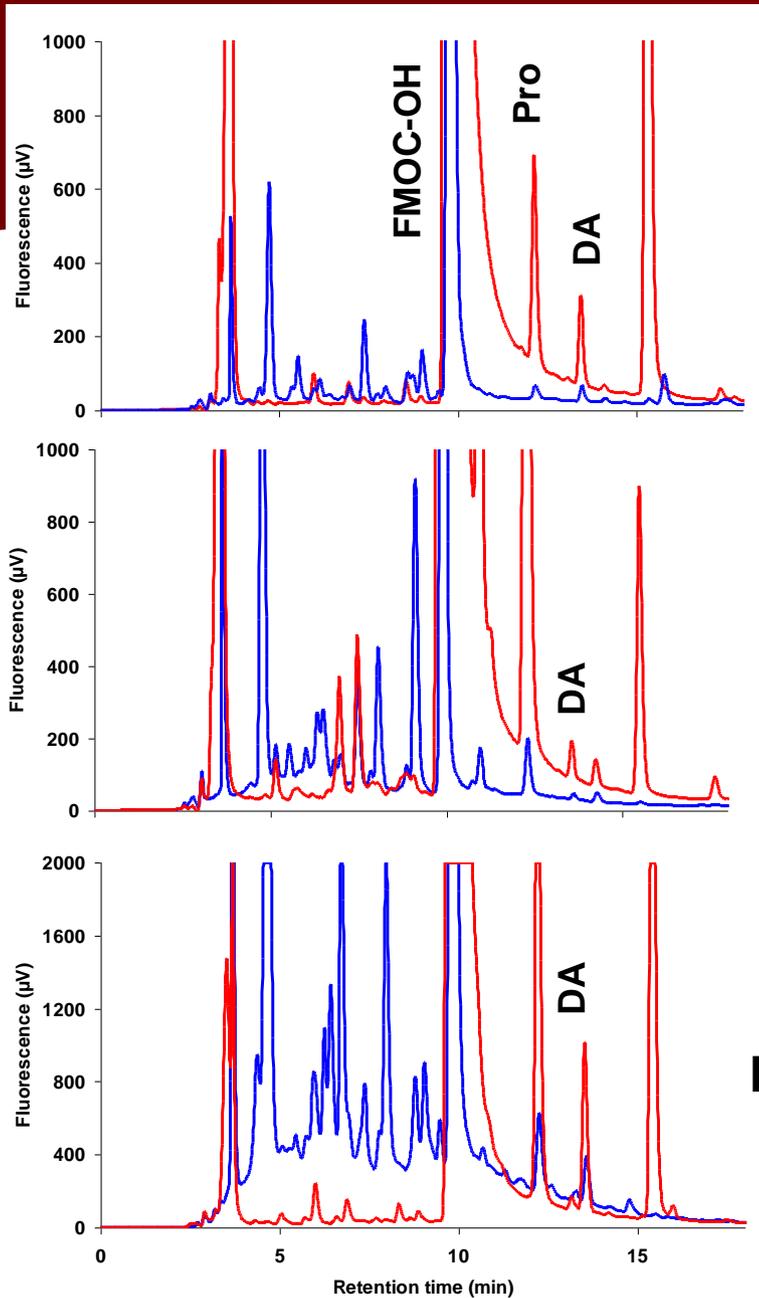
Meilleure capacité du pouvoir tampon pour des pH basiques >8

Reproductibilité



Excellente reproductibilité (n=3)

Acide domoïque particulaire

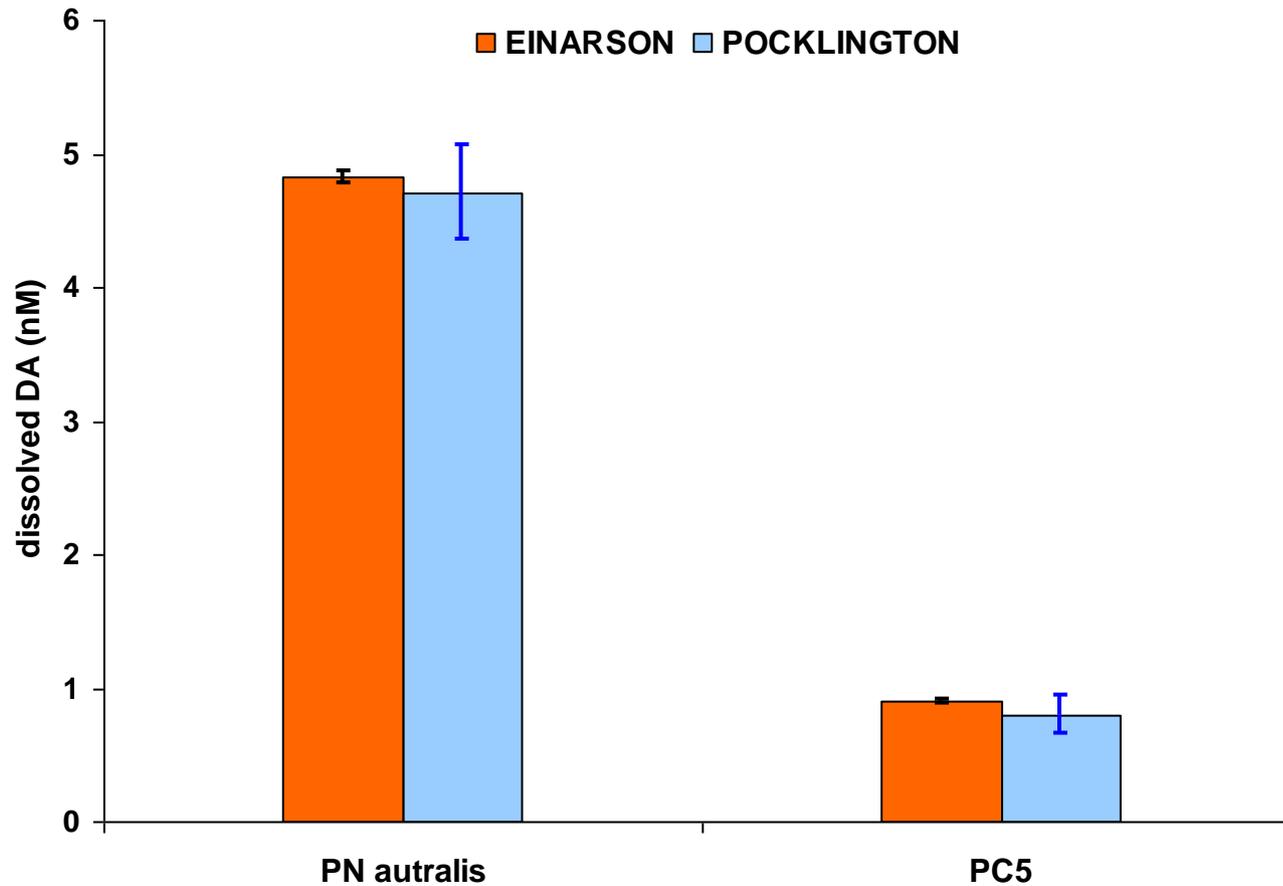


Milieu de culture

Echantillon naturel
(campagne PSEUDOMO, surface)

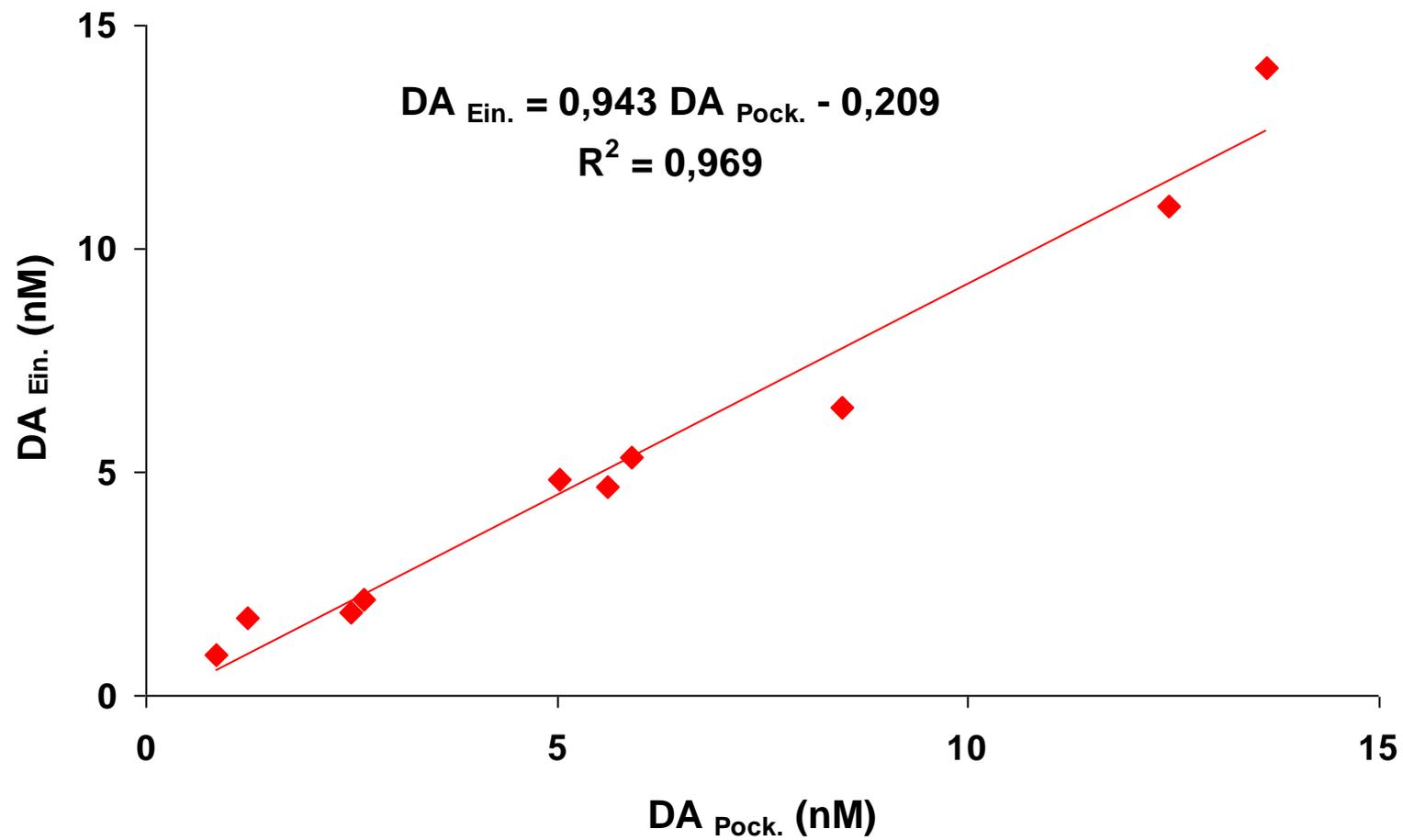
Extrait d'algues (*Pseudo-nitzschia australis*)

Acide domoïque dissous

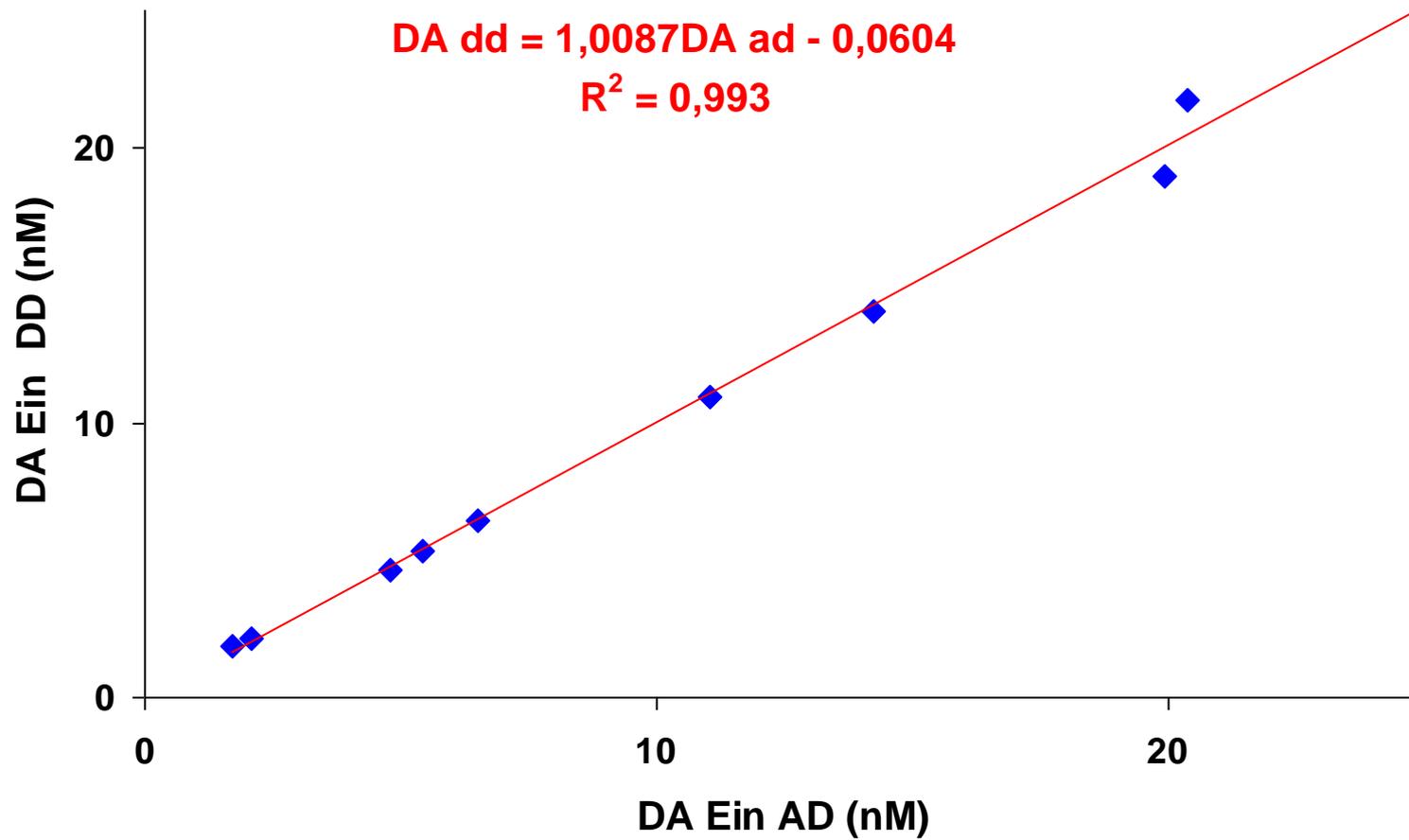


Plus forte variabilité avec le protocole de Pocklington

Corrélation entre les deux méthodes



Variabilité inter-opérateurs



PSEUTEC Juin 2011

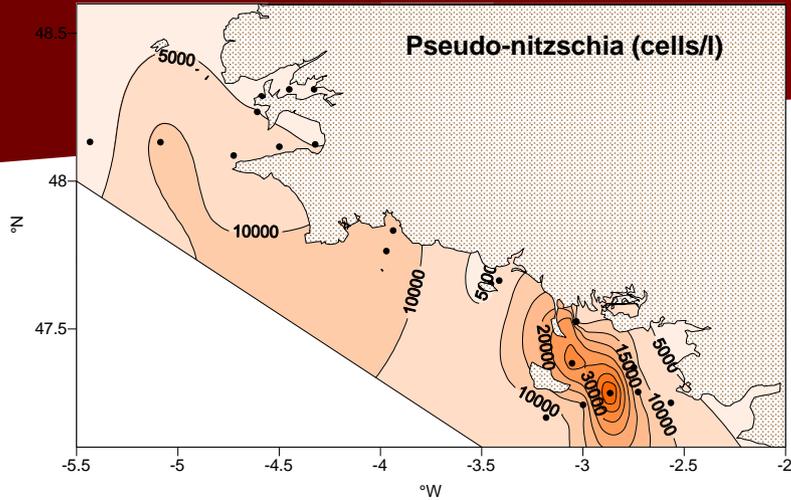


Abondance de *Pseudo-nitzschia* la semaine précédant la campagne....

On pouvait espérer une situation plus favorable qu'en 2010

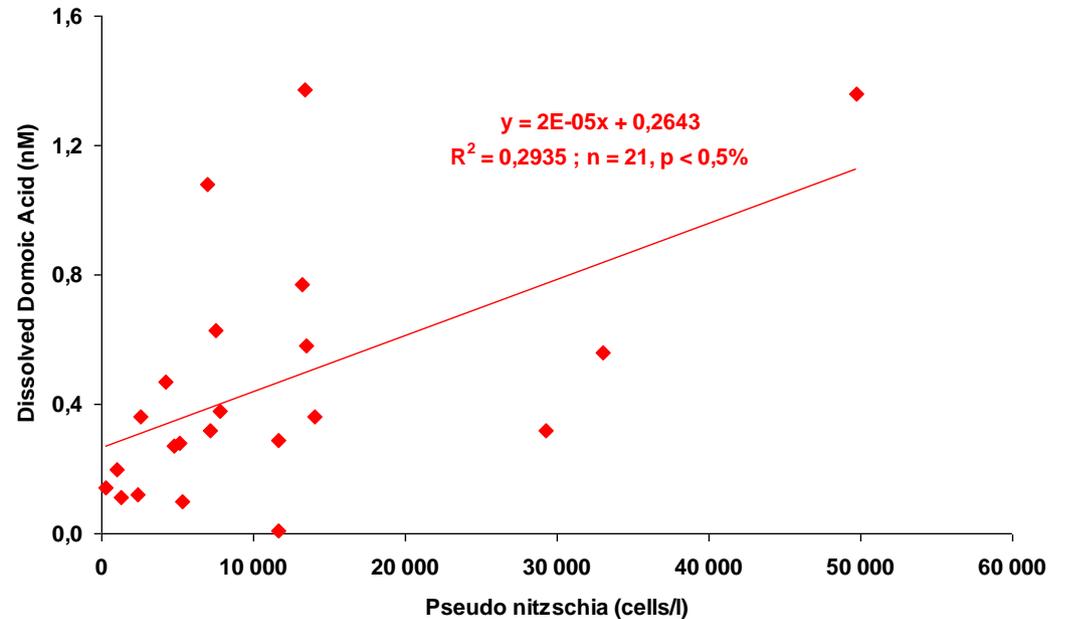
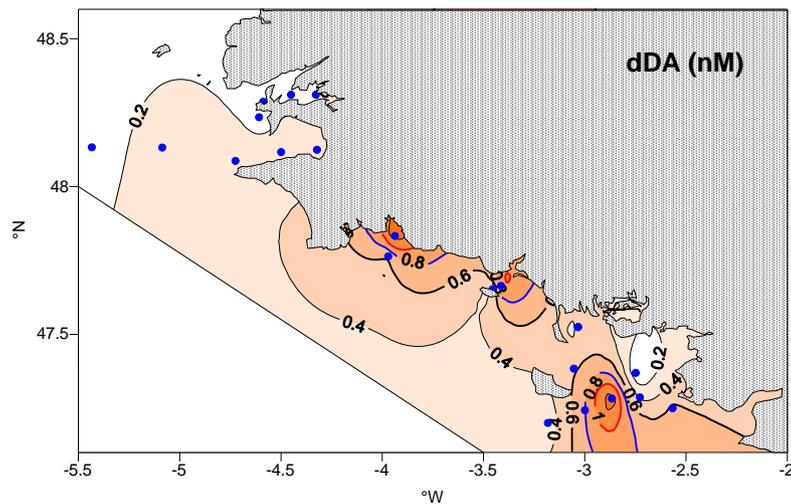


PSEUTEC SURFACE



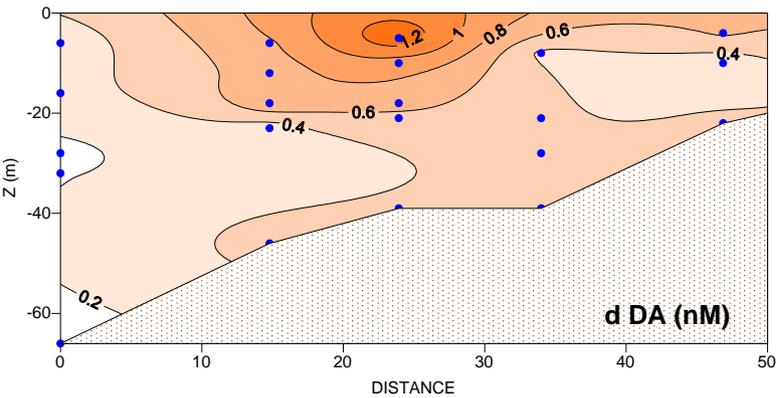
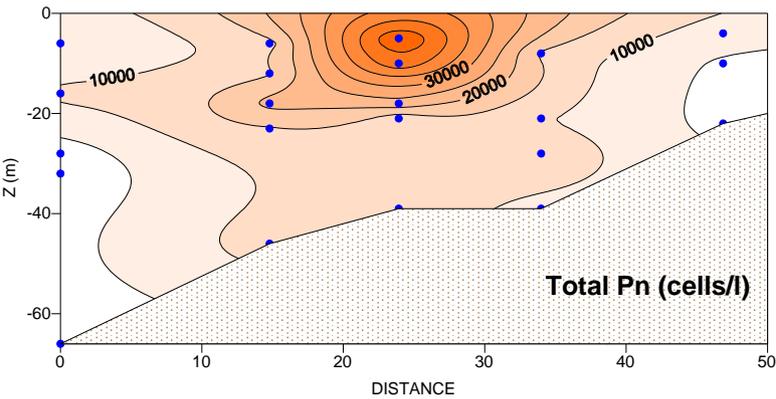
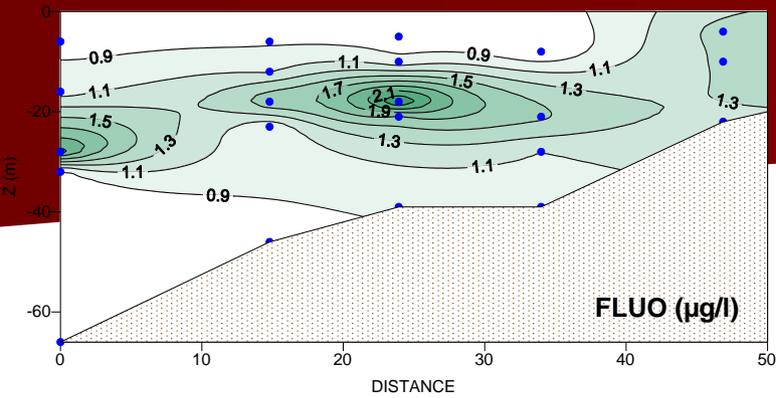
Maximum de *Pseudo-nitzschia* : 50 000 cells / L

C'est raté ...

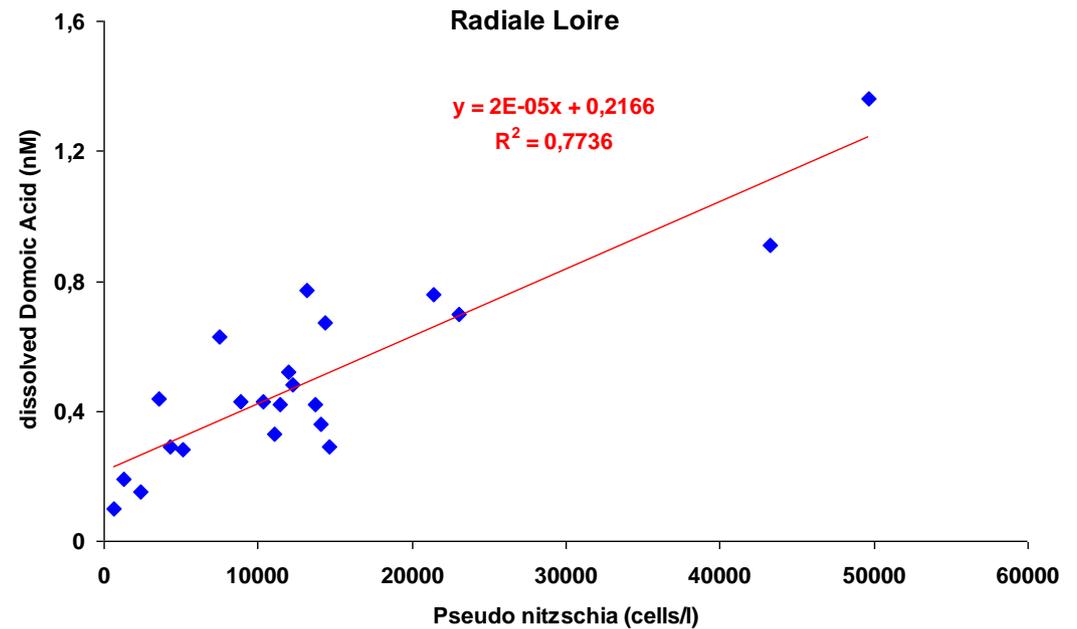


Toutefois, il y a coïncidence entre les distributions de l'acide domoïque dissous et l'abondance des *Pseudo-nitzschia*

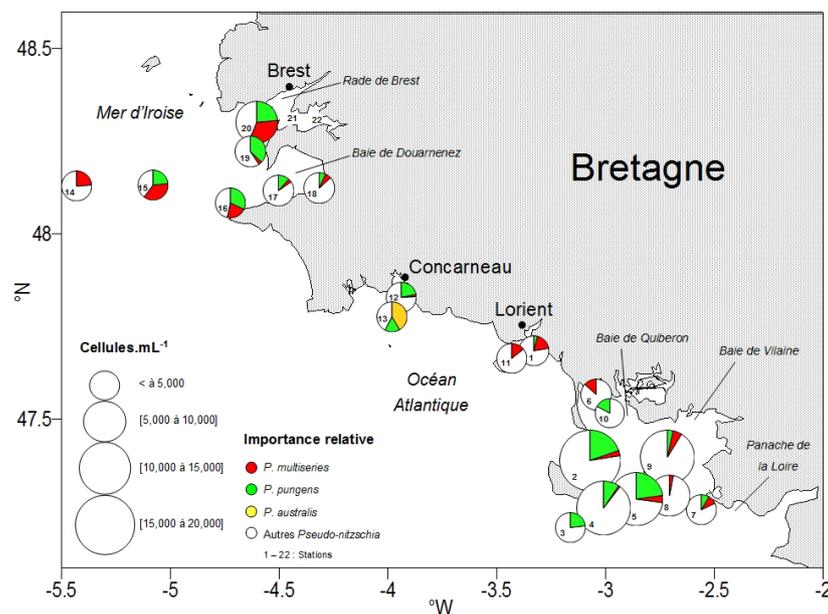
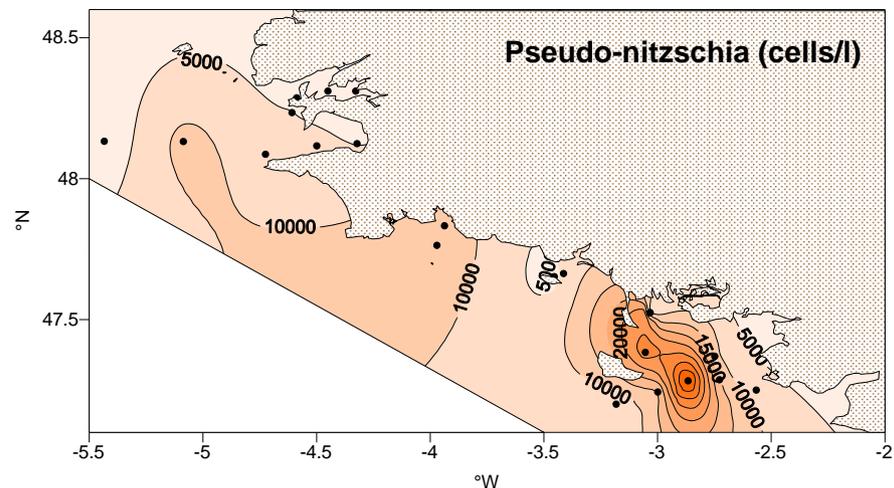
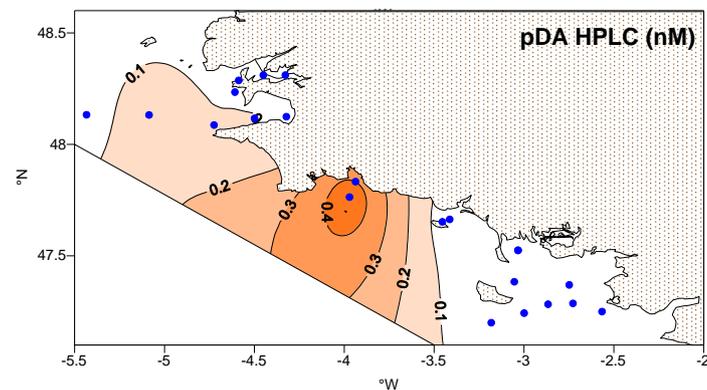
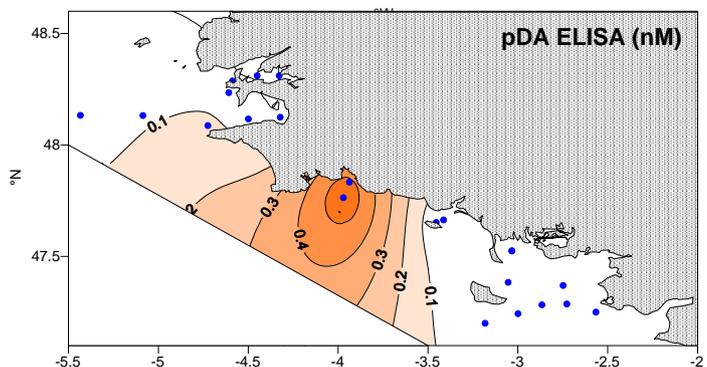
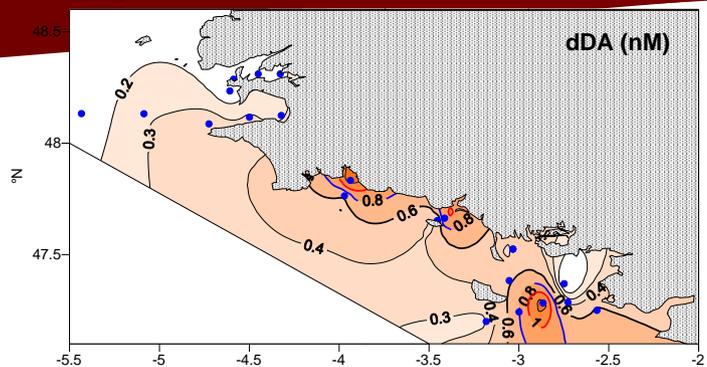
PSEUTEC RADIALE LOIRE

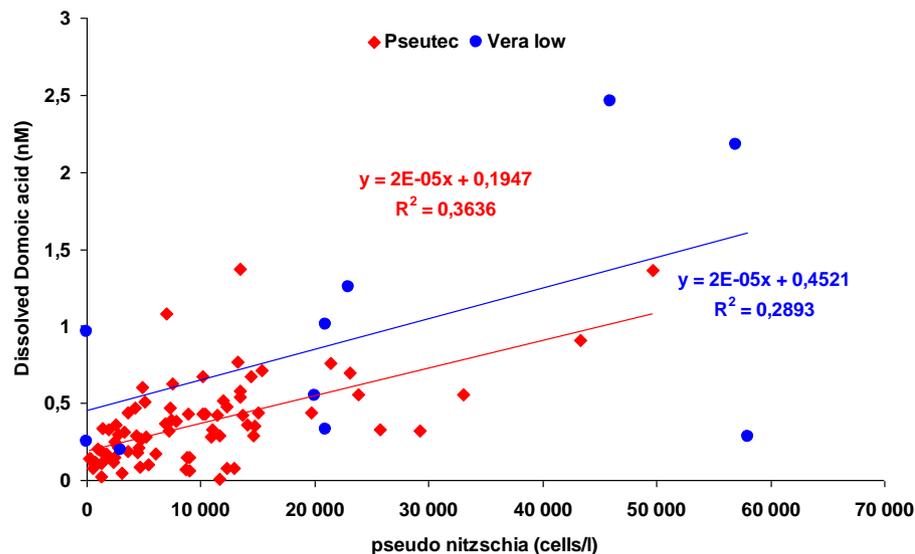
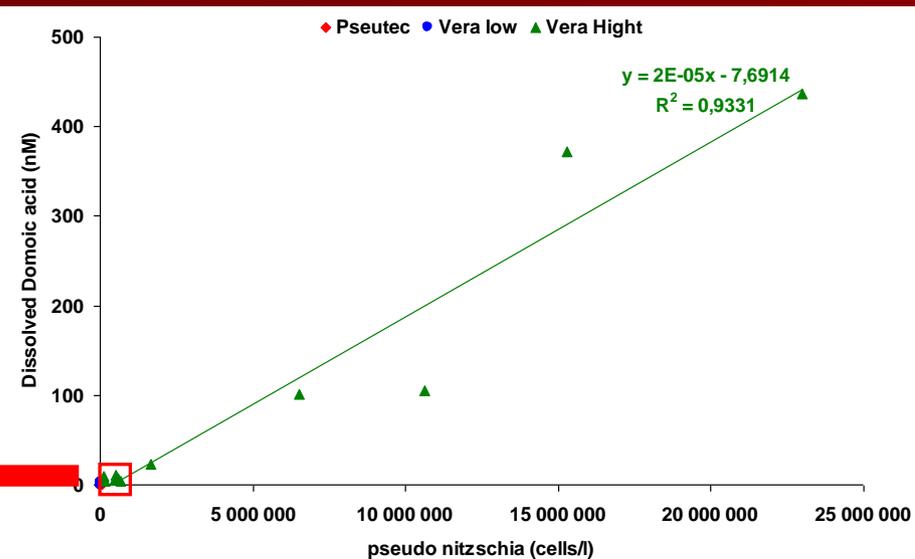


Max de chla situé au bas de la couche de mélange (nutricline); le max de *Pseudo-nitzschia* est situé dans les eaux épuisées en nitrate et phosphore



Acide domoïque dissous / Acide domoïque particulaire



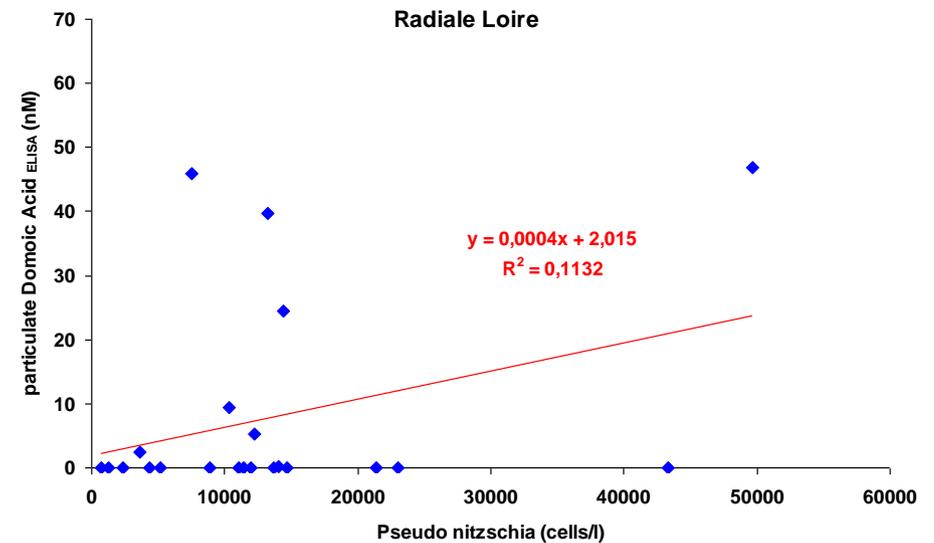
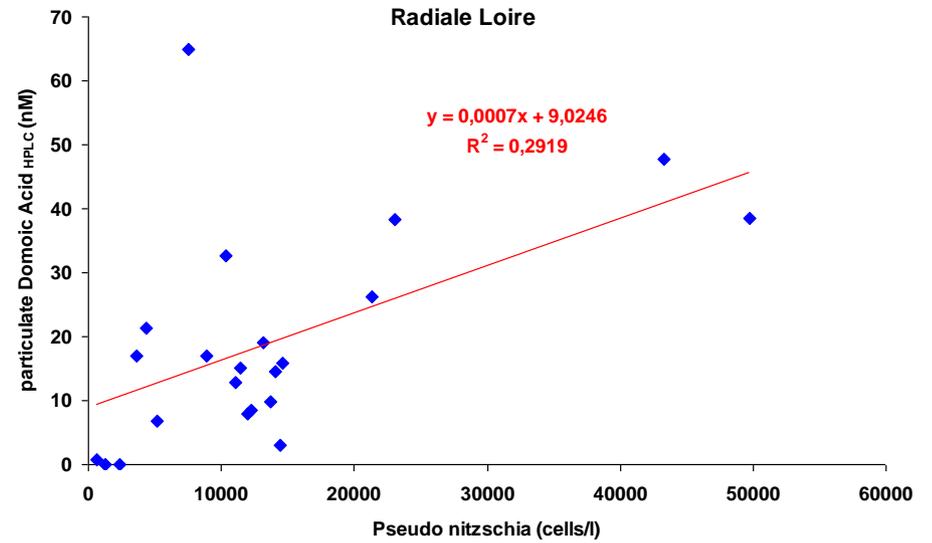
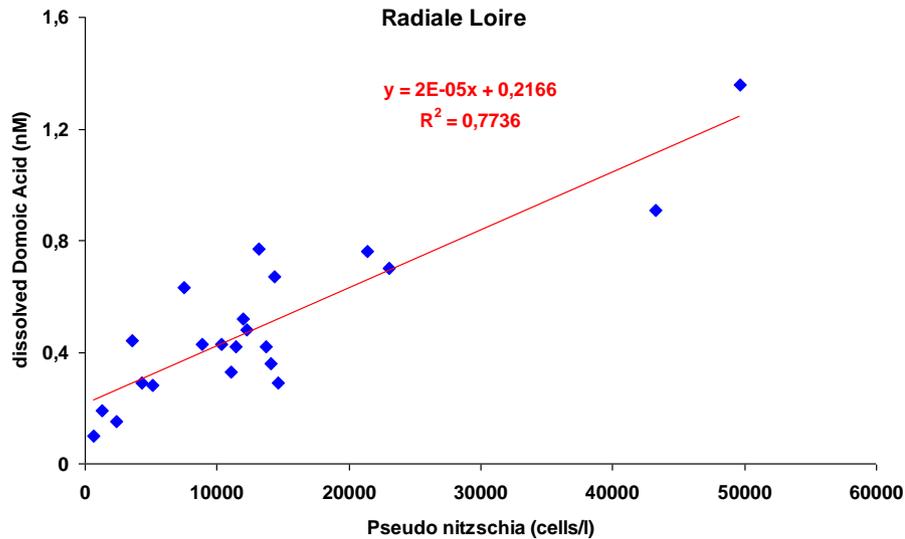


Les 3 campagnes n'ont pas permis d'étudier des blooms significatifs

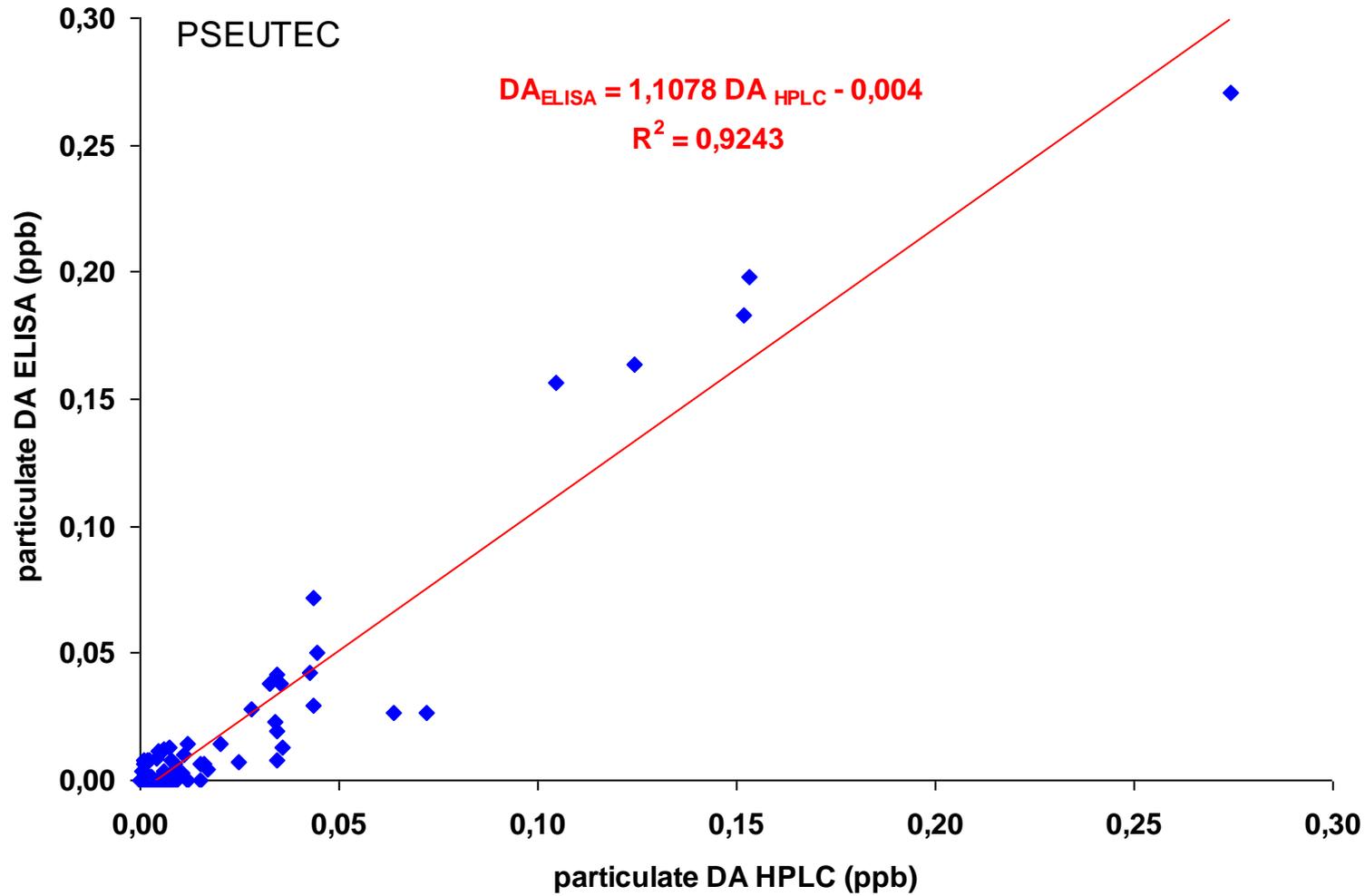
Nécessité de modifier de stratégie et privilégier la dynamique temporelle

Une consolation, les teneurs mesurées sont en adéquation avec les abondances de *Pseudo-nitzschia*

Corrélation entre les concentrations en acide domoïque dissous et particulaire et l'abondance de *Pseudo-nitzschia spp.*



Corrélation AD particulaire (Test Elisa) et AD particulaire (HPLC-FD)



C'EST PAS GENIAL, mais.....

Comparaison par rapport aux intercalibrations de Litaker *et al.* 2008

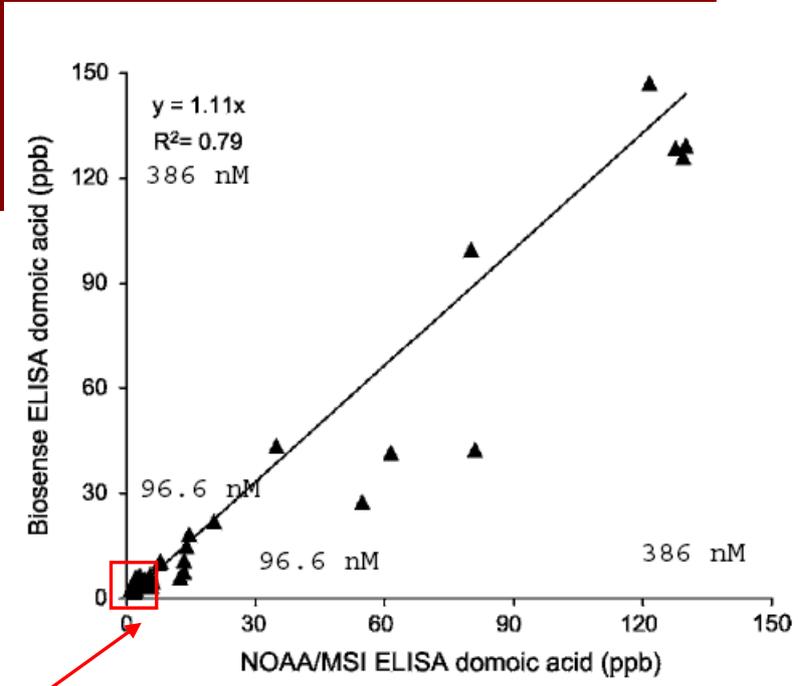
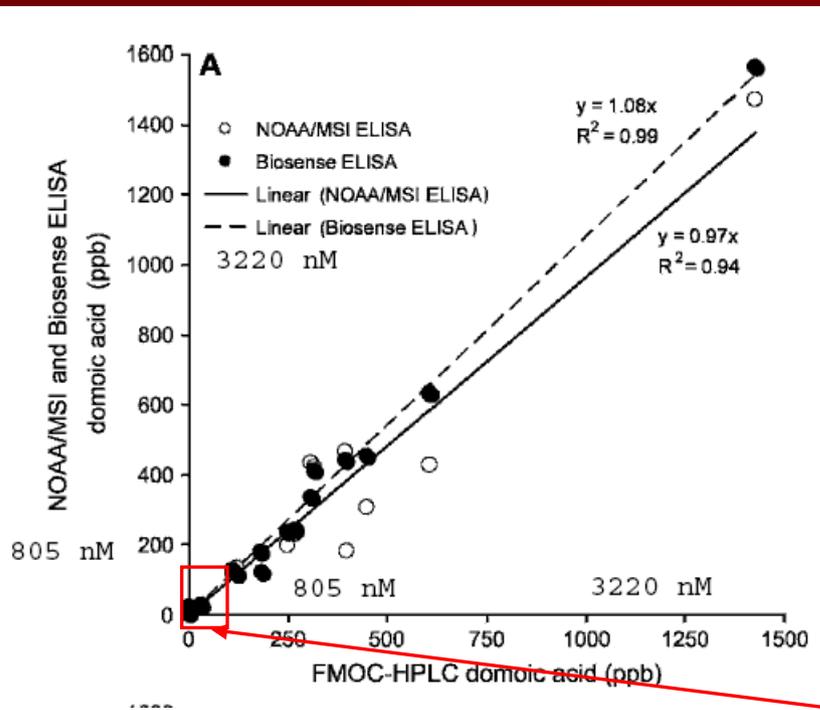
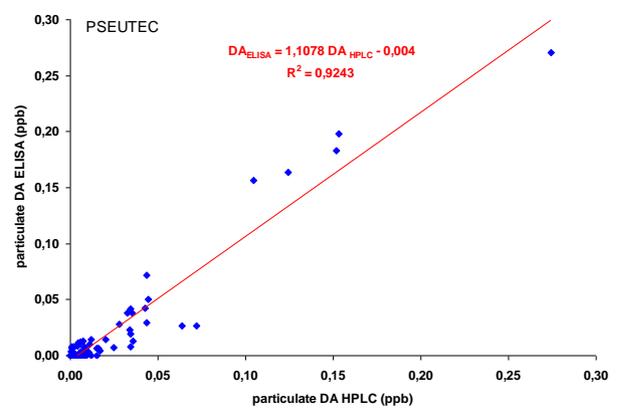
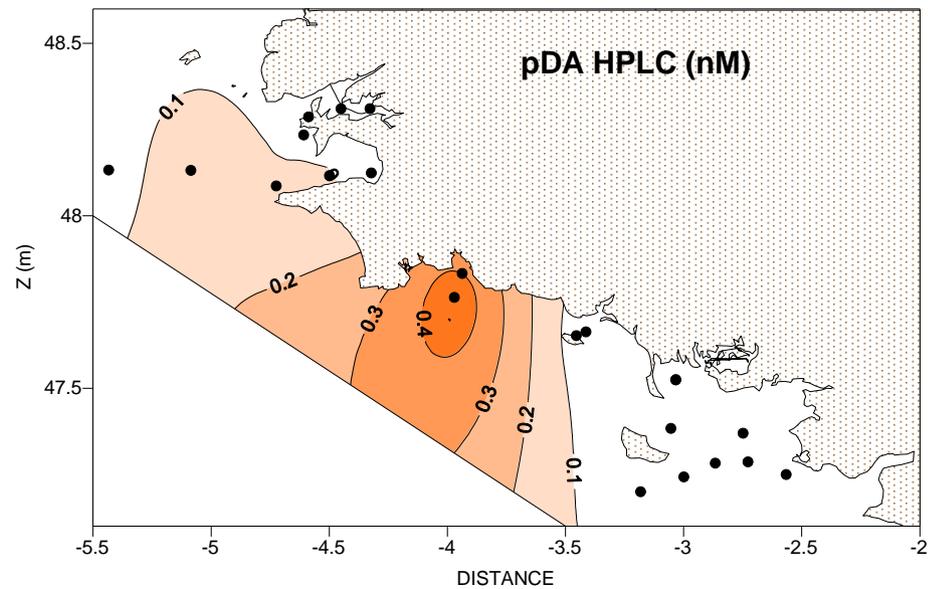
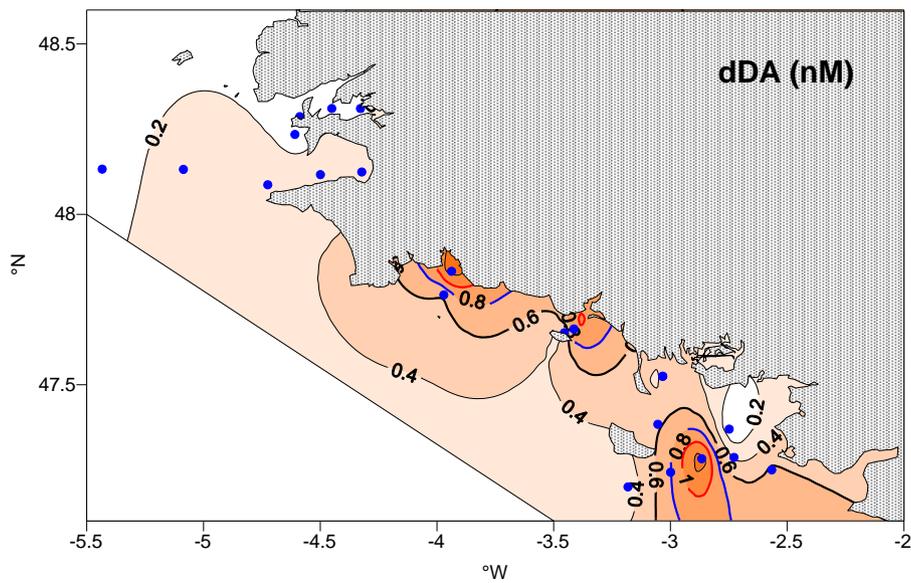
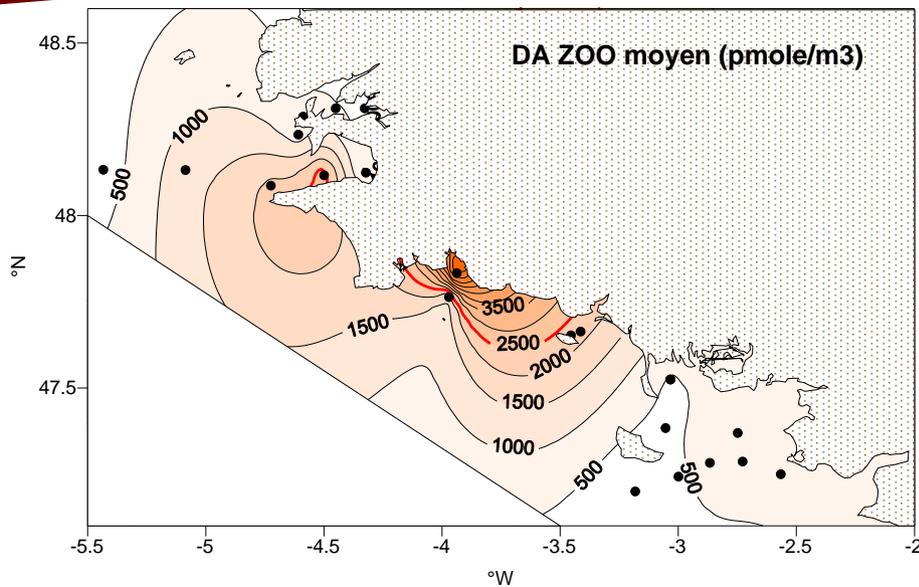


Figure 10. NOAA/MSI ELISA versus Biosense ELISA for phytoplankton samples when the two assays were run several weeks apart showing the

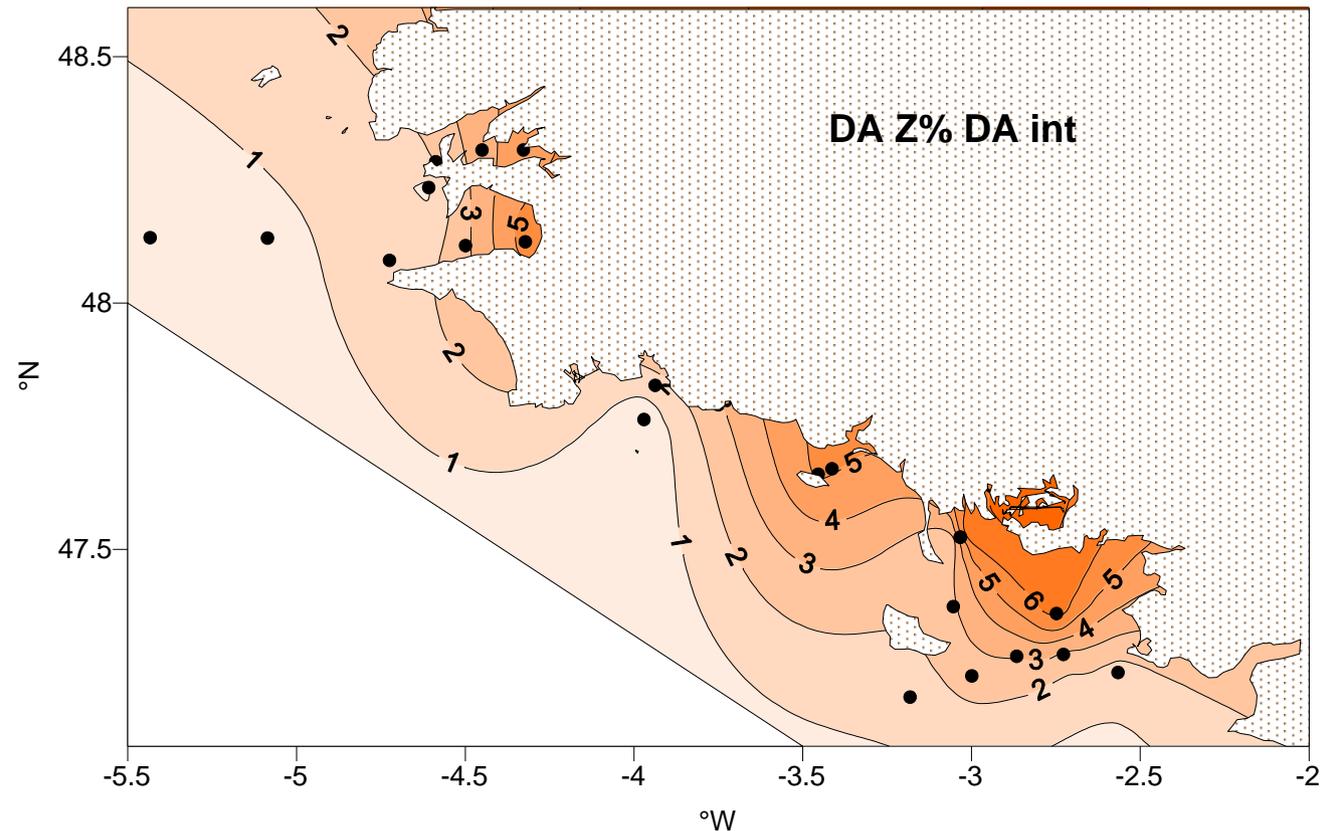
On est là, donc c'est pas si mauvais !!!



Acide domoïque dissous, particulaire et présent dans le zooplancton



Teneurs moyennes de l'AD zooplanctonique



Acide domoïque zooplanctonique = 2 à 6 % de l'AD particulaire

Malgré une maille de filet de 200 μm mauvaise concentration des chaînes de *Pseudo-nitzschia* ?



Augmentation des blooms d'algues toxiques dans monde pourrait être due: Changement climatiques, Pollution, Amélioration des techniques de détection, Prise de conscience de leurs dangers pour la santé humaine,

Perspectives

Échantillon temporel dans la Baie de Concarneau

Confirmation des teneurs en acide domoïque
dans le zooplancton

(HPLC-UV – station de Concarneau)