



L'importance d'une préparation fiable et efficace des échantillons dans le développement d'une nouvelle méthode scientifique visant à détecter les résidus de diclofénac chez les vautours et les animaux d'élevage

Par Ngaio Richards¹, Steve Lancaster², Sarah Hall¹, Karen Scott³

¹ Department of Life Sciences, Anglia Ruskin University, East Road, Cambridge, CB1 1PT, Royaume Uni

² Foundation for Analytical Science & Technology in Africa, 49 Swanland Road, Hessle, HU13 0NN, Royaume Uni

³ Department of Forensic Medicine and Science, University of Glasgow, Glasgow, G12 8QQ, Royaume Uni

Genevac : Rob Darrington, Marketing & Business Development Manager - tel: +44-1473-243030, Email : rob.darrington@genevac.co.uk

Introduction

Le diclofénac (Figure 1) est un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS). Introduit en tant qu'antalgique et anti-inflammatoire chez l'homme dans les années 1970, son usage s'est largement répandu en médecine vétérinaire dès les années 1980. Le diclofénac a été autorisé pour usage vétérinaire sur le sous-continent indien entre le milieu et la fin des années 1990^{2,3}. Dans cette région, le bétail est souvent utilisé comme outil de travail et le diclofénac était considéré comme un « médicament miracle » par les vétérinaires et les agriculteurs.

Traditionnellement, sur le sous-continent indien, des millions de carcasses d'animaux d'élevage étaient abandonnées aux charognards, en particulier les vautours. Depuis environ dix ans, plusieurs espèces de vautours, consommateurs principaux de ces carcasses sont en voie d'extinction. En cause : les résidus de diclofénac dans les carcasses de bétail que ces oiseaux consomment⁴.

La découverte que le diclofénac était disponible en usage vétérinaire dans certaines régions d'Afrique en 2007 a alarmé ceux qui s'intéressent à la conservation des vautours d'Afrique déjà en danger, ainsi que d'autres espèces d'oiseaux sensibles dans cette région du globe. Ces inquiétudes ne se limitent d'ailleurs pas au diclofénac. Selon une

étude portant sur des installations de captivité, l'exposition au carprofène, à la flunixin, à l'ibuprofène, au kétoprofène et à la phénylbutazone peut aussi avoir un effet indésirable sur les espèces aviaires⁵. Les AINS étant autorisés dans le monde entier pour l'administration au bétail, il est crucial de pouvoir surveiller leur présence dans l'environnement, dans les carcasses des animaux à la disposition de toute espèce vulnérable, et dans ces dernières elles-mêmes.

La plupart des méthodes classiques de détection du diclofénac nécessitent d'extraire les résidus de médicament à partir des tissus de l'animal après sa mort. Ces échantillons doivent être en suffisamment bon état pour pouvoir être analysés, par conséquent, il est essentiel de les prélever dès que possible après la mort de l'animal. Toutefois, les carcasses ne sont pas toujours retrouvées rapidement et peuvent être soumises à des conditions environnementales extrêmes. Étant donné ces facteurs, il a été estimé qu'une méthode, qui pourrait détecter des résidus dans les matrices riches en kératine qui persistent pendant longtemps dans les carcasses, serait utile pour la surveillance et le travail de conservation à long terme.

Une autre technique a donc été développée pour identifier par GC-MS les résidus de diclofénac chez les vautours et les animaux d'élevage. Une méthode de dépistage multiple préliminaire pour la

détection simultanée du carprofène, du diclofénac, de la flunixin, de l'ibuprofène, du kétoprofène et de la phénylbutazone a également été développée en vue de palier à la pénurie de méthodes de détection des autres AINS préoccupants. La méthode de détection du diclofénac a fait l'objet d'essais sur des échantillons de plumes de vautours, de cheveux et d'ongles humains, en vue d'une future application à l'analyse de serres, de becs, de sabots et d'os.

Cette méthode a été développée principalement pour être diffusée aux laboratoires africains travaillant en collaboration avec la Fondation pour les sciences et technologies analytiques en Afrique (Foundation for Analytical Science & Technology in Africa, FASTA) et plus particulièrement, le laboratoire de chimie de l'université d'agriculture et de technologie Jomo Kenyatta (Jomo Kenyatta University of Agriculture & Technology, JKUAT) à Nairobi, au Kenya. Il est prévu que cette méthode soit systématiquement utilisée dans les études anatomopathologiques sur la faune sauvage, d'une part en vue de déterminer la cause de la mort des vautours africains et d'autre part, pour évaluer la présence ou l'absence du diclofénac et d'AINS préoccupants dans l'environnement agricole. La FASTA est une entreprise caritative créée en vue de promouvoir l'éducation scientifique, la recherche analytique et la préservation de l'environnement en Afrique, grâce

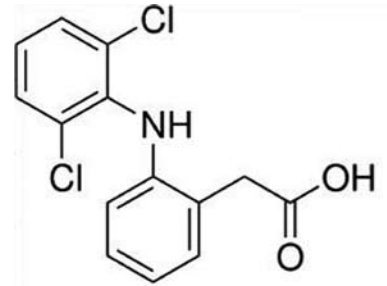


Figure 1 Structure du diclofénac

au renforcement des capacités et au transfert des technologies.

Cet article examine le développement de cette méthodologie, les défis techniques rencontrés, en particulier la préparation des échantillons, et le rôle du concentrateur d'échantillon miVac dans l'augmentation de l'efficacité et de la fiabilité globales de la méthode ainsi que dans sa validation.

Développement d'une méthode de détection du diclofénac dans des échantillons de phanères (cheveux, ongles et plumes)

Le développement de la méthode de détection du diclofénac a nécessité une série d'essais préliminaires successifs complets, à savoir : l'évaluation de la solubilité et de la stabilité de ce composé dans divers solvants, la sélection

Des remplissages de 5 ml à 5 litres, avec une précision de +/- 0.5%!

La doseuse péristaltique Flexicon PF22 réalise des dosages rapides et aseptiques sur des applications pharmaceutiques et de laboratoire.

- Pas de validation de nettoyage
- Changement de produit rapide
- Idéale pour des productions de lots réduits
- La connecter à une imprimante pour traçabilité



Watson-Marlow Pumps Group





Figure 2 – le concentrateur miVac DNA

d'un agent de dérivation, l'optimisation de la dérivation, l'établissement de la sensibilité des instruments, et des essais d'extractions. Tous les échantillons ont été séchés à 40°C et reconstitués avec un agent de dérivation avant d'être passés sur GC-MS. La validation de la méthode a consisté à extraire les échantillons de cheveux, d'ongles et de plumes dans du méthanol pendant une nuit, à sécher ces échantillons et à les dériver avec du N,O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide en présence de 1,0 % de triméthylchlorosilane (BSTFA 1,0 % TMCS) et d'acétate d'éthyle avant de les analyser (Richards 2009, données non publiées).

Lors des stades préliminaires de cette étude, les échantillons ont été séchés par évaporation à 40°C sous un flux constant d'azote dans un bloc de chauffage Techne Dri-block. Toutefois, cette méthode était longue, peu commode et les résultats n'étaient pas homogènes. La mise en place des échantillons en dessous des aiguilles avant le séchage pouvait prendre entre 10 et 15 minutes. Le séchage des échantillons préparés à partir de la solution de méthanol (1,0 – 2,0 ml) a pris au moins 45 minutes, voire fréquemment plus d'une heure. L'extraction des échantillons a souvent pris plusieurs heures, et parfois, ces échantillons n'étaient même pas complètement secs. Le système utilisé a également nécessité une surveillance étroite et les échantillons ont séché à des vitesses différentes à l'intérieur du bloc de chauffage. La reconstitution d'échantillons qui contenaient un petit résidu de méthanol a conduit à une dérivation incomplète ou à une inversion de la réaction. Des retards ont parfois été occasionnés en cas de délais dans la livraison de l'azote, et ce système pouvait seulement traiter 30 échantillons à la fois.

La préparation des échantillons constitue la clé de voûte du développement de la méthode. À ce titre, cette préparation devrait être facile à réaliser, efficace et rentable, et nécessiter un minimum de consommables, en particulier si la méthode doit être utilisée dans les pays en voie de développement. Chaque étape doit être répétable et reproductible avant d'être validée. Il est particulièrement important que la préparation soit rapide et fiable pour une application de ce type, dans laquelle les mesures palliatives et les stratégies de surveillance dépendent de l'obtention ponctuelle de résultats précis. Tous les échantillons doivent être exempts d'artefacts, de telle sorte que l'obtention éventuelle de résultats incongrus ne puisse pas être attribuée à la préparation de l'échantillon. En raison des problèmes soulignés plus haut, une autre méthode d'évaporation des échantillons s'est avérée nécessaire. Le concentrateur d'ADN miVac DNA (Genevac Ltd, Ipswich, Royaume Uni) a été sélectionné, non seulement parce qu'il a été utilisé avec succès dans d'autres applications similaires⁶, mais aussi en raison de la facilité et de la commodité de son utilisation, à savoir : la vitesse comparative de séchage, le plus grand nombre d'échantillons qui peuvent être séchés simultanément, et l'homogénéité des résultats. Les échantillons préparés à partir de la solution (1,0 et 2,0 ml) ont été complètement séchés en seulement 15 minutes, alors que les échantillons extraits avaient pris jusqu'à 1 heure pour sécher. Il n'a été détecté aucun résidu de méthanol. Il a été possible de sécher simultanément jusqu'à 44 échantillons, préparés dans des flacons de 2,0 ou/et de 4,0 ml. Les plateaux porte-flacons peuvent être fabriqués sur mesure en fonction du ou des volume(s) de flacon préféré(s). Bien que le plateau utilisé pour cette étude ait été conçu pour pouvoir recevoir aussi bien des flacons de 2,0 ml que des flacons de 4,0 ml, si l'on avait utilisé uniquement des flacons de 2,0 ml, cela aurait permis de sécher simultanément jusqu'à 78 échantillons. Dans tous les cas, on pouvait affirmer avec certitude avoir obtenu un séchage complet.

Le miVac (Figure 2) sèche les échantillons en portant ces derniers à ébullition sous vide. Au fur et à mesure que la pression diminue dans le système, cela entraîne la baisse du point d'ébullition et par conséquent, celle de la température des échantillons. Les échantillons contenant du méthanol parviennent normalement à l'ébullition à -20°C ; une fois secs, ils se réchauffent pour atteindre la température du système, qui normalement ne dépasse pas +40°C. Les flacons d'échantillons sont centrifugés pendant l'évaporation afin d'éviter toute perte d'échantillon et/ou toute contamination croisée résultant d'un débordement potentiel lors de l'ébullition. Les porte-flacons peuvent être fabriqués sur mesure pour pouvoir recevoir les tailles de flacons préférées.

L'utilisation du concentrateur miVac DNA équipé d'un rotor en aluminium massif, a permis de sécher jusqu'à 44 échantillons en environ 15 minutes, une amélioration importante par rapport au système de purge à l'azote. Aucun problème de séchage partiel ou incomplet n'a été à déplorer, ce qui a éliminé les résultats anormaux dus à une mauvaise dérivation ou à une dérivation incomplète. En outre, le fonctionnement du miVac n'exige pas d'avoir l'attention constante de l'utilisateur et ne nécessite pas de consommables, ce qui le rend adapté à une utilisation dans des régions où la chaîne d'approvisionnement en matériel scientifique est peut-être moins efficace.

Conclusion

Pendant le développement de la méthode et sa validation consécutive, 15 000 échantillons au moins ont été séchés. Bien que ce chiffre représente la norme hebdomadaire pour un laboratoire commercial, il s'agit néanmoins d'un nombre important d'échantillons à préparer et à traiter pour un chercheur thésard travaillant seul. Le processus de préparation des échantillons et la validation de la méthode ont été considérablement améliorés en remplaçant le dispositif de purge à l'azote par le concentrateur miVac DNA. L'analyse du diclofénac dans les plumes, les cheveux et les ongles a été rendue plus facile et les résultats ont pu être interprétés avec confiance. Le concentrateur acheté pour cette étude sera expédié au laboratoire de l'université JKUAT à Nairobi de telle sorte qu'il puisse être utilisé pour cette application et dans les études consécutives.

Références

1. Lees, P., Landoni, M.F., Giraudel, J., Toutain, P.L. 2004. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. *Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics*, 27, p. 479 – 490.
2. Gilbert, M., Watson, R.T., Virani, M.Z., Oaks, J.L., Ahmed, S., Chaudhry, J.I., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A. & Khan, A.A., 2006. Rapid population declines and mortality clusters in three oriental white-backed vulture (*Gyps bengalensis*) colonies in Pakistan due to diclofenac poisoning. *Oryx*, 40, p. 388 – 399.
3. Risebrough, R.W., 2006. Diclofenac: a new environmental poison in south Asia. *Journal of the Bombay Natural History Society*, 103, p. 239 – 250.
4. Oaks, J.L., Gilbert, M., Virani, M.Z., Watson, R.T., Meteyer, C.U., Rideout, B.A., Shivaprasad, H.L., Ahmed, S., Chaudhry, M.J.I., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A. & Khan, A.A., 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*, 427, p. 630-633.
5. Cuthbert, R., Parry-Jones, J., Green, R.E. & Pain, D.J., 2006. NSAIDs and scavenging birds: potential impacts beyond Asia's critically endangered vultures. *Biology Letters*, [Online] 22 Feb., 3, p. 91 – 94. Available at: <http://rsbl.royalsocietypublishing.org/content/3/1/91> [accessed 21 May 2009].
6. Goebel, C., 2008. Sample Preparation for the Detection of Synthetic Analogues of Insulin in Human Serum. *Laboratory News*, January 2008, pp 20.

Remerciements

L'achat du condensateur d'échantillon miVac a été financé par la Fondation pour les sciences et les technologies analytiques en Afrique (Foundation for Analytical Science and Technology in Africa, FASTA).



AGOWA genomics

Next generation sequencing

Les applications du Roche GS FLX TITANIUM technologie

Services proposés:

- Séquençage de novo de génomes
- Shotgun, paired-end et finishing du projet
- Analyses de:
 - transcriptomes / ADNc normalisés
 - pool de fosmidés et de BACs
 - métagénomés
 - profil de méthylation
- Reséquençage ciblé
- ChIP et séquençage d'ARN non codant

Services additionnels:

- Capture de séquences
- Bioinformatique

AGOWA GmbH (groupe LGC)
Ostendstr. 25 • 12459 Berlin
Allemagne

Direct France: +33 (0)603 231019
Email France: matteudi@agowa.com

Tel: +49 (0)30 5304 2260

Email: ngs@agowa.de

Web: www.lgc.co.uk/genomics

LGC 13 2009 11