

Plateforme de spectrométrie isotopique de l'UMR LIENSs

Procédure de préparation et d'envoi des échantillons pour analyses des %C, %N, $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$

Rédacteurs : B. Lebreton, P. Richard, G. Guillou

1. Mise en capsule des échantillons

1.1. Masse des échantillons

Connaître la masse précise d'un échantillon n'est pas strictement nécessaire pour obtenir sa composition isotopique. Toutefois, la composition isotopique est déterminée avec précision dans une certaine gamme de masses. La masse de l'échantillon doit être déterminée avec précision ($\pm 1 \mu\text{g}$) si l'on souhaite connaître le %C et le %N.

Même si la configuration de l'appareil utilisé permet d'analyser des échantillons dans une large gamme de masses avec la même précision, il est préférable d'essayer de rester dans la gamme "optimale". En-dessous des valeurs minimales, les valeurs obtenues ne sont pas fiables. Au-dessus des valeurs maximales, il peut y avoir saturation des détecteurs.

Le tableau ci-dessous indique les masses minimum, maximum et optimales pour chaque type d'échantillon (en mg masse sèche) pour des analyses C et N. Pour les sédiments, des tests sur quelques échantillons doivent être faits pour déterminer la masse optimale. Pour les filtres, la masse n'est pas utile, il est impossible de connaître la masse de fibres de verre par rapport à la matière organique : on se réfère plutôt dans ce cas au volume filtré.

Type d'échantillon	Minimum	Optimal	Maximum
Tissu animal	0,1 mg	0,4 mg	1,5 mg
Micro ou macroalgues	0,2 mg	0,6 mg	1,8 mg
Phanérogames marines	0,3 mg	0,7 mg	2,0 mg
Angiospermes	0,3 mg	0,7 mg	2,0 mg
Sédiment riche en matière organique	0,2 mg	0,6 mg	1,8 mg
Sédiment pauvre (sable)	1,0 mg	-	> 30,0 mg

1.2. Choix des capsules

La plateforme fournit les plaques 96 puits et les capsules (étain ou argent) pour la préparation des échantillons (envoi par courrier). Merci de nous indiquer le nombre et le type d'échantillons que vous souhaitez analyser afin que nous vous fournissions la quantité appropriée. Pour les échantillons d'animaux ou de plantes, les quantités à analyser sont très faibles. Des capsules de 8 x 5 mm conviennent parfaitement (ne pas utiliser de capsules plus petites pour des raisons de combustion et de taille optimale pour le passeur). Une fois préparées, les capsules doivent être conservées dans un dessiccateur.

Les capsules en étain peuvent être attaquées par les sédiments acidifiés (en particulier n'ayant pas été gardés à l'abri de l'humidité) dans un délai assez rapide (8-10 jours). Si l'analyse ne peut être faite dans un délai court après la pesée, il est préférable d'utiliser des capsules en argent et de placer les boulettes réalisées dans une 2^{ème} capsule en étain qui facilitera la combustion.

1.3. Fermeture des capsules

La capsule étant posée verticale dans la zone de travail de la plaque d'aluminium, pincer son bord supérieur sur 1 à 1,5 mm avec une pince à bouts plats type 2A-SA (Fig. 1 A) puis replier vers le bas cette partie (Fig. 1 B). Replier ensuite la partie pliée dans l'autre sens (Fig. 1 C), et presser la capsule avec les deux pinces plates (une servant à maintenir la capsule sur la plaque) jusqu'à obtenir une boulette sphérique de moins de 2,5 mm de diamètre (pour les échantillons animaux ou végétaux).

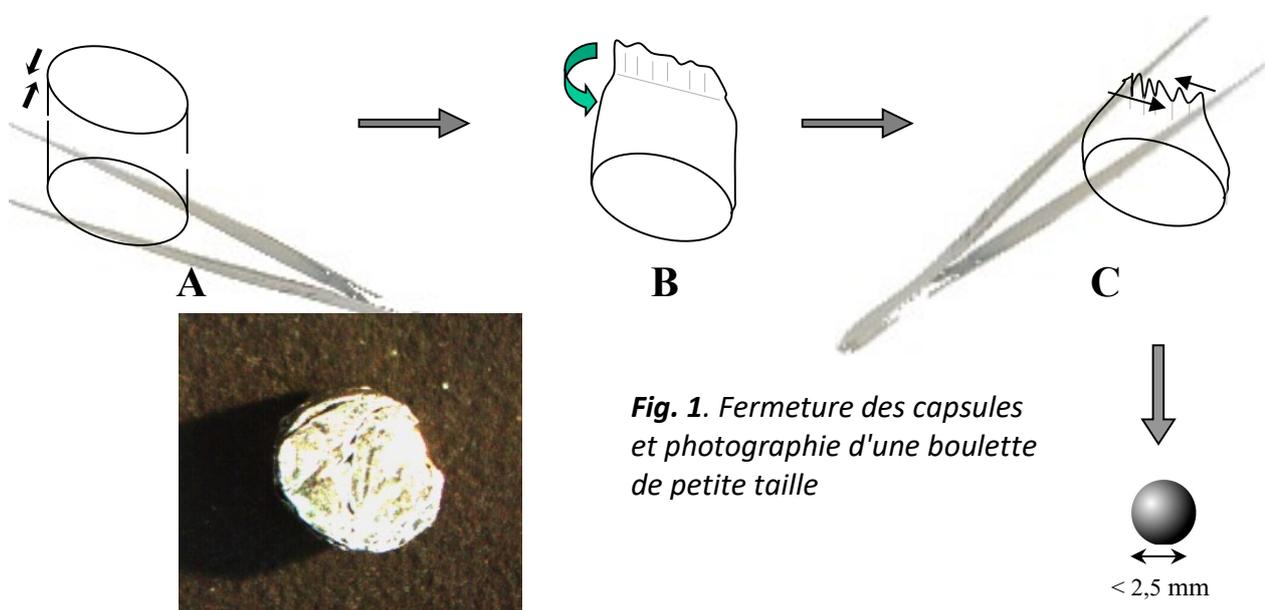


Fig. 1. Fermeture des capsules et photographie d'une boulette de petite taille

Pour les sédiments et les filtres, des capsules de cette taille sont généralement difficiles à faire, le volume des échantillons étant plus important. Dans ce cas, les boulettes sont plus grosses, elles ne doivent cependant pas dépasser 7 mm de diamètre.

Note : Il est préférable de faire de petites boulettes si cela est possible, cela permet d'utiliser un plateau de 100 positions au lieu de 50 et ainsi de réaliser au moins 30% d'analyses supplémentaires par jour.

Note : Il est important de respecter les consignes concernant la forme et la taille des boulettes. Des boulettes mal faites (Fig. 2 A) peuvent soit se rouvrir (perte d'échantillon et contamination des autres), soit se coincer dans le puit du passeur et ne pas être analysées, soit même bloquer le passeur avec, dans des cas extrêmes, perte de tous les échantillons du plateau.

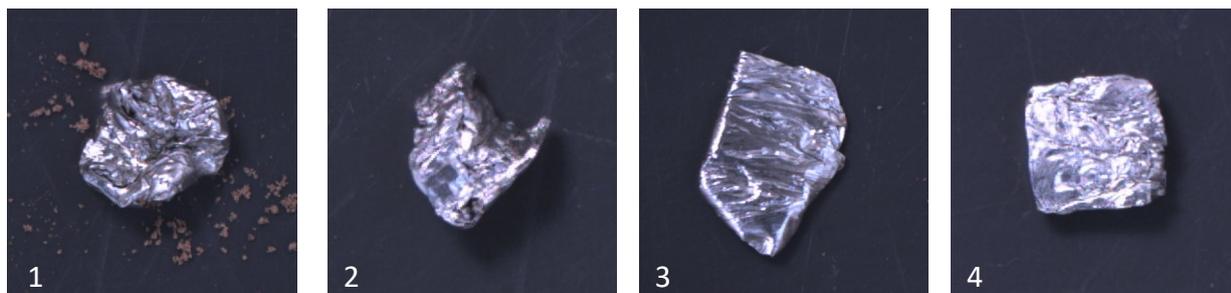


Fig. 2 A. Exemples de boulettes mal formées : 1) Mal fermée : perte d'échantillon ; 2) Avec des protubérances : risque de rester coincée ; 3) Plate : risque de bloquer l'avancement du plateau ; 4) Cubique : risque de rester coincée dans le puit du passeur.



Fig. 2 B. Exemples de boulettes bien formées : 5-6-7) Petites boulettes (tissus animaux et végétaux) ; 7) Grosse boulette (sédiments et filtres).

1.4. Cas des échantillons sur filtres

La taille des puits des plateaux disponibles sur l'analyseur élémentaire ne permet pas de faire des boulettes contenant un filtre de 25 mm (*a fortiori* de 47 mm) dans une capsule en étain, et donc de pouvoir l'analyser en entier. Plusieurs méthodes sont utilisées :

- grattage et récupération de la matière organique des filtres : dans tous les cas la récupération ne peut être quantitative et une fraction non négligeable de fibre de verre est prise avec la matière organique. Il est important de minimiser cette fraction, qui est gênante pour la combustion et augmente la quantité de cendres. Ce type de récupération pose aussi le problème de l'hétérogénéité de la répartition de la matière sur les filtres.
- découpage de fraction de filtres : des aliquotes de filtre peuvent être découpées avec un emporte-pièce, ce qui permet par un rapport de surface d'estimer la quantité totale sur le filtre. Cependant, la répartition de la matière organique est rarement homogène et, à la fois pour l'aspect quantitatif que pour les rapports isotopiques, ce type de traitement peut amener une certaine variabilité.
- utilisation de mini-filtres : la filtration peut être réalisée sur des filtres de 12 mm de diamètre (à découper soi-même dans des filtres plus grands), la filtration étant faite grâce à des supports de filtres de 13 mm (Swinex, par exemple). Après découpage de la partie extérieure non filtrante, détacher autant que faire se peut la face verso du filtre, exempte de matière organique. Tout le reste tient facilement dans une petite capsule. Cette méthode permet d'obtenir une valeur correspondant à l'ensemble du volume filtré. Il est nécessaire cependant d'avoir une charge minimale dans l'eau, la surface de filtration étant réduite.

2. Rangement, conservation et transport des échantillons

2.1. Rangement

Les capsules sont rangées dans des plaques 96 puits (Fig. 3), identifiées en lignes (A à H) et colonnes (1 à 12). Les formulaires d'analyse (feuilles Excel) correspondent à ce rangement (cf. § 3).

📌 **Grouper en séries les échantillons animaux/végétaux et sédiments/filtres (petites et grosses capsules) : 1 grosse boulette parmi les petites oblige à utiliser le plateau à gros puits et diminue la capacité d'analyse.**

📌 **Ne pas laisser de puits vide entre les séries !**

Le couvercle des plaques de capsules doit être maintenu par du **ruban adhésif de laboratoire, repositionnable**. Il est en effet nécessaire d'ouvrir plusieurs fois les plaques pour y placer ou en enlever les capsules, cela doit pouvoir être fait facilement.

📌 **Ne pas utiliser de ruban adhésif de bureau pour fixer les couvercles ! Il existe un fort risque d'ouverture brutale et de mélange ou renversement des capsules (sans compter les traces de colle).**

Chaque plaque doit être marquée (**sur un morceau de ruban adhésif de laboratoire sur le couvercle**) de façon à permettre l'identification du demandeur et de la série d'échantillons (Fig. 3).

📌 **Ne pas écrire directement sur les boîtes ! Les boîtes sont réutilisées après lavage.**

Important : Il est très fortement recommandé d'identifier les boîtes en utilisant un nom identique ou très proche du nom du fichier informatique correspondant (cf. § 3).



Fig. 3. Boîte de rangement des capsules

2.2. Conservation

Excepté les capsules d'échantillons de sédiments acidifiés, qu'il faut analyser rapidement, les capsules des autres échantillons peuvent être conservées pendant de longues périodes, de préférence au dessiccateur sous vide et au sec plutôt qu'au congélateur où il y a ré-humidification.

2.3. Transport

Pour éviter que les capsules, surtout les plus petites, sortent de leur puits et se mélangent pendant le transport (en particulier si les plaques sont envoyées par courrier), placer **une feuille d'aluminium en double ou triple épaisseur sur l'ouverture des puits*** avant de refermer le couvercle. Deux morceaux de ruban adhésif **de laboratoire** suffisent à maintenir le couvercle, mais pour plus de sécurité, entourer la plaque dans une feuille d'aluminium (éviter le parafilm).

*** Ne pas utiliser ni papier type papier filtre ou essuie-tout pouvant amener des fibres, ni parafilm qui peut laisser des traces de carbone type pétrole.**

Les plaques peuvent être envoyées par courrier, en étant protégées des chocs (boite ou enveloppe matelassée suffisamment épaisse).

3. Formulaire de demande d'analyses

Les échantillons doivent être référencés dans un formulaire de demande d'analyses (Classeur Excel) qui doit obligatoirement être adressé par courriel aux responsables de la plateforme. A l'exception des demandes internes à l'UMR LIENSs, ne pas adresser de version papier avec les échantillons, c'est inutile.

- Chaque plaque d'échantillons doit correspondre à un formulaire distinct (un seul formulaire par plaque),

- Une copie numérique de ce formulaire doit être adressée à l'adresse : contact-irms-lienss@univ-lr.fr, mais une copie papier signée du responsable du crédit et valant acte d'engagement doit être fournie pour les analyses internes à l'UMR LIENSs. Le nombre d'échantillons de chaque type doit être noté, le calcul du coût est fait automatiquement.

Les formulaires doivent être remplis en suivant les recommandations ci-dessous :

- Chaque plaque doit avoir une référence indiquée sur la boîte et en haut de la 2^{ème} feuille du formulaire d'analyse (cf. Fig. 4) et doit permettre une identification certaine (par ex. : ne pas utiliser Box 1, Box 2 ou Boîte 1, Boîte 2...).

Demander : P Richard Programme : FoodWeBio Réf. Boîte : FWB 4
Préparé par : P Richard Date : 14/01/09

Puits n°	Référence Echantillon	Poids (mg)	Type	Remarque
A 1	FWB-LR-M4	0.346	muscle	
A 2	FWB-LR-M5	0.309	-	
A 3	FWB-LA-M1	0.441	-	
A 4	FWB-LA-M2	0.288	-	

Fig. 4. Formulaire d'analyse (2^{ème} feuille du classeur)

- La référence des échantillons ne doit pas comporter de caractères tels que : . , / ; () ? : (les espaces et tirets sont autorisés). Cette référence étant utilisée par le logiciel comme nom du dossier où sont rangés les fichiers correspondant à l'échantillon. Il est préférable également de ne pas utiliser de lettres accentuées, non reconnues.
- Ne pas avoir comme référence un seul chiffre ou lettre, ou uniquement des chiffres, les fichiers créés ne sont pas reconnus par le logiciel de l'IRMS (bug).
- Chaque échantillon doit avoir une référence unique (même s'il s'agit de capsules faites à partir du même échantillon) et il est fortement recommandé d'utiliser des références caractéristiques qui ont peu de chances d'être aussi employées par un autre utilisateur (ne pas utiliser par exemple les n° de référence des puits A1, A2... ou Ech 1, Ech 2...).
- Sauvegarder le fichier Excel **en le renommant** avec le même nom que la référence de la boîte.

4. Cas des échantillons enrichis

Les isotopes stables peuvent être utilisés pour des expérimentations basées sur des enrichissements à partir de produits contenant >95% d'un élément enrichi.

❗ De très grandes précautions doivent être prises à toutes les étapes de la préparation d'échantillons enrichis : la moindre contamination a un effet désastreux sur les mesures en abondance naturelle.

En particulier, il est demandé aux utilisateurs d'être très vigilants sur les points suivants :

- le taux d'enrichissement doit être **inférieur à 3% pour le carbone et inférieur à 1% pour l'azote**, comme c'est le cas des algues ou proies marquées dans les expériences de broutage. Leur analyse doit se faire en les "diluant" par le même échantillon non marqué : au moment de la pesée dans la capsule, introduire une toute petite quantité d'échantillon marqué (1/20 ou 1/10^{ème} de la masse totale) que devra contenir la capsule, noter le poids, puis rajouter une quantité du même échantillon non marqué - dont la signature naturelle devra être mesurée à part -, noter le poids total et fermer la capsule.

Dans le calcul des enrichissements (on ne travaille pas directement sur les données exprimées en δ mais sur les abondances absolues), il suffit ensuite de tenir compte du facteur de dilution donné par le rapport des masses de chaque type enrichi et non enrichi.

On peut aussi diluer par un autre produit que le même échantillon non enrichi, mais dans ce cas il faut tenir compte aussi de la teneur en élément (C ou N) de chaque constituant du mélange.

Il est du ressort des utilisateurs de ne pas dépasser ces taux. Au-delà, il y a contamination irrémédiable des réacteurs (parfois même de la colonne CPG), dont le remplacement pourra être facturé.

Au-delà de 1% d'enrichissement, il peut y avoir un "effet mémoire" sur les échantillons suivants, les utilisateurs doivent donc prévoir, autant que faire se peut, leurs séries d'analyses pour aller d'échantillons peu enrichis aux échantillons très enrichis et prévoir éventuellement des blancs supplémentaires entre échantillons.

- Les échantillons doivent être rangés par ordre d'enrichissement (supposé) croissant dans les boîtes 96 puits.

📌 Il est impératif d'indiquer sur les boîtes et dans les formulaires d'analyse qu'il s'agit d'échantillons enrichis.