

Validation d'un test de terrain pour la mesure des microcystines
libérées par les cyanobactéries dans les eaux de surface

Phase 2

Rapport d'étude et de recherche présenté à
Santé Canada
par
Christian Deblois, M. Sc., chimiste

Gouvernement du Québec
Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs
Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec

Mars 2008

Remerciements

Je remercie Santé Canada qui a financé les travaux de recherche et de développement, ce qui a permis de réaliser la présente étude sur les tests immunoenzymatiques servant à mesurer les concentrations de cyanotoxines dans les eaux de surface.

Je remercie également Sarah Gobert, stagiaire doctorale, qui a réalisé la plupart des travaux de ce projet, de même que le personnel du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ), dont Mireille Brunet et Richard Cardin, lesquels ont apporté leur soutien à M^{me} Gobert tout au long de la réalisation de ses travaux ainsi qu'au développement des expertises à mettre en place.

TABLE DES MATIÈRES

1	Introduction	1
2	Caractéristiques de la trousse terrain Qualitube ^{MC} d'EnviroLogix	2
3	Objectifs du projet	3
4	Résultats	3
4.1	Étude comparative des résultats obtenus en utilisant la méthode du CEAEQ et ceux obtenus avec la trousse QualiTube ^{MC}	3
5	Conclusion	7
	Références	8

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 – Résultats obtenus à l'aide du test QualiTube ^{MC} (lecture UV à 450 nm) et de la méthode de référence du CEAEQ	5
---	---

LISTE DES FIGURES

Figure 1 – Microcystine-LR	1
----------------------------	---

1 INTRODUCTION

Le présent rapport fait suite à des travaux réalisés précédemment sur la validation de la trousse de terrain QualiTube^{MC} de même que sur la mise au point d'une méthode de lyse cellulaire efficace afin de pouvoir mesurer les microcystines totales, soit les microcystines libérées dans l'eau, et le contenu intracellulaire des cyanobactéries dans divers échantillons d'eau. Les résultats de ces travaux ont été présentés à Santé Canada dans un premier rapport.

Les cyanobactéries, aussi communément appelées algues bleu-vert, sont des organismes aquatiques qui prolifèrent dans les eaux de surface sous l'influence de différents facteurs environnementaux, tels que la lumière, la température et les nutriments. La classe des cyanobactéries inclut environ 150 genres et 2 000 espèces [1]. Les cyanobactéries possèdent des caractéristiques algales et bactériennes. Elles se distinguent des autres cellules algales par le fait qu'elles sont dépourvues de noyau. Elles contiennent de la chlorophylle *a*, du carotène, de la xanthophylle, de la phycocyanine et de la phycoérythrine. Les dimensions des cellules de cyanobactéries peuvent varier de 3 à 10 µm. Les cellules peuvent se présenter sous différentes formes, soit sous la forme de cellules isolées, de colonies ou filamenteuses. Une prolifération importante de cyanobactéries est généralement accompagnée d'écumes facilement observables en période d'apparition de fleurs d'eau. Même si les fleurs d'eau sont considérées comme des événements naturels, elles peuvent être largement influencées par les activités humaines. De plus en plus de scientifiques s'entendent pour dire que l'apport de phosphore contribue significativement à la prolifération des cyanobactéries.

Les cyanobactéries produisent plus de 70 variantes de microcystines, appelées cyanotoxines [2]. La plus toxique est appelée microcystine-LR (figure 1). Les différents congénères de microcystines sont des heptapeptides cycliques constitués d'un enchaînement d'acides aminés qui permet de distinguer chacun des congénères. La structure générale des microcystines (microcystine-XY) est le cyclo(D-Ala-L-X-D-erythro-β-méthylisoAsp-L-Y-Adda-D-iso-Glu-N-méthylhydroAla), où X et Y représentent les variantes des L-acides aminés. D'autres toxines peuvent également être produites par les cyanobactéries.

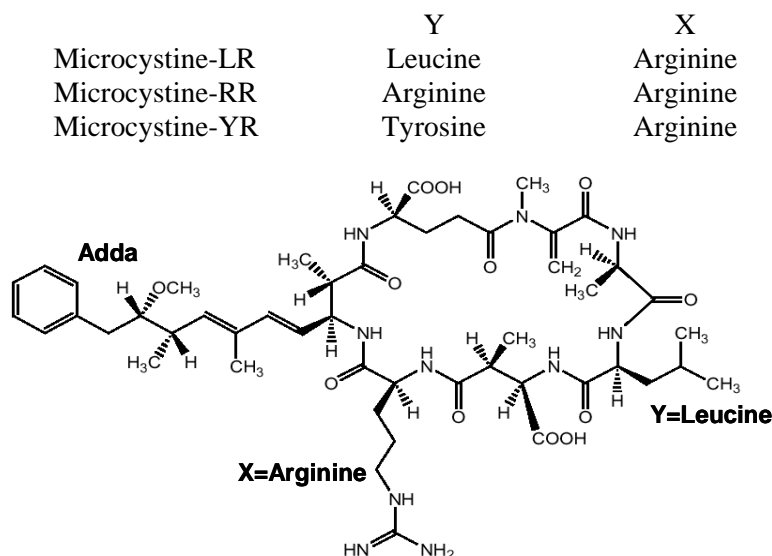


Figure 1 Microcystine-LR

Plusieurs espèces de cyanobactéries peuvent synthétiser des cyanotoxines. Parmi celles-ci, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc* et *Planktothrix* sont les plus courantes. Les microcystines sont considérées comme des hépatotoxines, puisqu'elles inhibent le fonctionnement des phosphatases 1 et 2a, qui sont des enzymes responsables de la phosphorylation d'autres enzymes et protéines^[3]. La toxicité approximative LD₅₀ de microcystine-LR varie de 15 à 150 µg/kg de masse corporelle (m.c.) dans le cas des injections intrapéritonéales et de 5 000 à 11 000 µg/kg m.c. par voie orale chez les souris^[4].

Nous avons choisi d'évaluer une trousse de terrain de type immunoenzymatique (ELISA), qui permet de déterminer visuellement la concentration des microcystines susceptible d'être présente dans des échantillons d'eau prélevés directement dans les plans d'eau du Québec. Différents types de tests immunoenzymatiques sont offerts sur le marché par différents fournisseurs. Nous avons retenu la trousse de terrain QualiTube^{MC} produite par la compagnie EnviroLogix. Ce test ne nécessite que quelques manipulations simples, réalisées dans des tubes à essais. Il permet d'estimer visuellement les concentrations de microcystines totales dans l'eau dans une plage de concentrations contenue entre 0,5 et 3,0 µg/l. La coloration obtenue en réalisant le test est inversement proportionnelle à la concentration de microcystines présentes dans l'eau. Le test doit être fiable et facile à utiliser par des utilisateurs inexpérimentés ou doit nécessiter un minimum de formation pour réaliser les essais.

2 CARACTÉRISTIQUES DE LA TROUSSE DE TERRAIN QUALITUBE^{MC} D'ENVIROLOGIX

Le test colorimétrique de terrain QualiTube^{MC} d'EnviroLogix, sous forme de tubes, a la particularité d'être facilement utilisable par du personnel non spécialisé et requiert très peu de formation. Un test de type immunoenzymatique ne permet pas de distinguer les variantes de microcystines et ne mesure que les toxines libres dans l'eau. Il ne permet pas de mesurer les concentrations de cyanotoxines totales, puisque les toxines intracellulaires ne sont pas libérées. Certaines substances, telles que les colorants naturels ou synthétiques, les métaux et d'autres composés organiques et inorganiques présents dans le milieu, peuvent influencer les résultats du test en bloquant ou en concurrençant les sites où sont fixés les anticorps contenus dans les tubes. Le test permet de mesurer les concentrations de cyanotoxines variant de 0,5 à 3,0 µg/l. Les concentrations supérieures à 3,0 µg/l sont mesurées en diluant l'échantillon et en répétant l'analyse jusqu'à ce que la concentration mesurée soit située à l'intérieur de la plage d'utilisation du test, puisque la coloration bleue caractéristique disparaît complètement à partir d'une teneur d'au moins 3 µg/l en microcystines.

Il est également possible d'effectuer la mesure des concentrations de cyanotoxines en utilisant un spectrophotomètre UV à 450 nm, lequel permet d'obtenir une mesure plus précise que la lecture visuelle.

Les résultats obtenus à partir du test QualiTube^{MC} doivent être considérés comme semi-quantitatifs. Le test permet d'estimer l'absence ou la présence de microcystines dans les eaux de surface, à l'aide de valeurs situées à l'intérieur d'une plage de concentrations variant de 0,5 à 3,0 µg/l. Les microcystines contenues dans les cellules algales vivantes ne sont pas considérées, ce qui représente un inconvénient important puisque la majorité des toxines sont contenues dans les cellules. Cet inconvénient peut être éliminé si une étape de lyse cellulaire efficace est réalisée

avant d'effectuer le test. Dans le rapport précédent, une méthode de lyse cellulaire a été validée et publiée. Les résultats de la présente étude ont été obtenus en appliquant cette méthode.

La compagnie EnviroLogix mentionne, dans son site Internet, que le test QualiTube^{MC} est destiné aux eaux de surface. Des réactifs permettant de provoquer la lyse cellulaire sont maintenant offerts sur le marché. Ceux-ci ne l'étaient pas au début de la présente étude et, par conséquent, ils n'ont été ni évalués ni validés.

Le test QualiTube^{MC} n'est pas un test sélectif. Le dosage d'un échantillon contenant plusieurs types de microcystines donnera une valeur de la concentration qui ne correspondra pas à la concentration en microcystine-LR uniquement, mais à la concentration totale des différentes variantes de microcystines. La sensibilité du test relative à chacune des variantes diffère en fonction des variantes présentes dans l'échantillon.

3 OBJECTIFS DU PROJET

Le projet vise à valider les résultats des mesures de microcystines obtenus à l'aide d'un test de type immunoenzymatique après l'application de la méthode de lyse cellulaire mise au point par le CEAEQ, en effectuant une comparaison de ces résultats avec ceux obtenus par l'analyse des mêmes échantillons par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (HPLC-MS/MS, méthode du CEAEQ, MA. 403 – Microcys 1.0), et ce, à partir de différents types d'échantillons d'eau prélevés durant la saison 2007. La comparaison a été réalisée sur 88 échantillons provenant de différents plans d'eau du Québec.

4 RÉSULTATS

4.1 Étude comparative des résultats obtenus en utilisant la méthode du CEAEQ et ceux obtenus à l'aide de la trousse QualiTube^{MC}

Le test QualiTube^{MC} peut nécessiter parfois plusieurs dilutions si la concentration en microcystines n'est pas connue, puisque ce test permet d'observer une coloration dans la plage de concentrations contenue entre 0,5 et 3 µg/l seulement. Plusieurs reprises du test peuvent être nécessaires dans les cas où la concentration excède 3 µg/l. Des dilutions préalables peuvent être réalisées avec de l'eau déminéralisée lorsque l'ordre de grandeur des concentrations attendues est connu.

Les résultats du test QualiTube^{MC} sont évalués en lecture visuelle, en comparant les couleurs des solutions étalons avec celles obtenues à partir des échantillons. Les concentrations peuvent également être évaluées en utilisant un spectrophotomètre UV ajusté à 450 nm.

Brièvement, la méthode de lyse utilisée consiste en une extraction des microcystines à l'aide d'un mélange de méthanol et d'eau (80/20). Le mélange est ensuite centrifugé pour recueillir le solvant d'extraction. Une deuxième extraction est effectuée en ajoutant le même mélange d'extraction. Le filtrat est récupéré et le méthanol est évaporé sous jet d'argon à 22 °C. Si

l'extrait contient plus de 15 % de méthanol, les concentrations réelles de toxines seront sous-évaluées. Le filtrat est ensuite analysé directement à l'aide du test QualiTube^{MC}.

La méthode d'extraction et de dosage par HPLC-MS/MS mise au point au CEAEQ consiste en une extraction liquide-solide, précédée d'une lyse cellulaire à l'aide d'une sonde ultrasonique conçue pour détruire les parois cellulaires et libérer les toxines intracellulaires. Les microcystines analysées à l'aide de cette méthode (MA. 403 – Microsys 1.0) sont les microcystine-LR, -RR et -YR.

Les résultats de la comparaison sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 – Résultats obtenus à l'aide du test QualiTube^{MC} (lecture UV à 450 nm) et de la méthode de référence du CEAEQ

Échantillon	Méthode du CEAEQ Microcystine				QualiTube ^{MC}	Échantillon	Méthode du CEAEQ Microcystine				QualiTube ^{MC}
	LR	RR	YR	Total			LR	RR	YR	Total	
1	2,8	4,1	0,55	7,4	7,8	45	1,1	13	1,8	16	6,7
2	3,00	1,4	0,29	4,7	4,0	46	9,5	0,00	0,00	9,5	9,8
3	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	47	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5
4	0,40	0,00	0,00	0,40	1,8	48	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5
5	0,00	0,00	9,2	9,2	3,6	49	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5
6	0,06	0,09	0,00	0,15	28	50	0,64	1,1	0,25	2,0	1,4
7	0,05	0,00	0,00	0,05	<0,5	51	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5
8	0,27	0,43	0,03	0,73	<0,5	52	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5
9	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	53	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5
10	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	54	1,1	0,04	0,00	1,1	1,8
11	0,05	0,00	0,00	0,05	<0,5	55	80	89	13	180	360
12	0,05	0,00	0,00	0,05	<0,5	56	30	28	4,1	62	84
13	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	57	0,69	0,00	0,00	0,69	0,50
14	0,78	0,44	0,00	1,2	0,80	58	0,08	0,54	0,05	0,67	0,61
15	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	59	0,53	0,20	0,03	0,76	0,60
16	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	60	0,65	0,15	0,02	0,82	<0,5
17	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	61	160	6,7	1,2	170	190
18	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	62	2,0	0,00	0,00	2,0	2,7
19	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	63	0,65	1,3	0,32	2,3	1,0
20	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	64	0,58	0,00	0,00	0,58	<0,5
21	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	65	3,8	0,00	0,00	3,8	8,1
22	0,64	0,00	0,00	0,64	2,5	66	0,49	0,75	0,23	1,5	0,68
23	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	67	2,4	3,4	1,2	7,0	6,0
24	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	68	1,5	8,3	1,2	11	15
25	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	69	7,1	41	6,1	54	170
26	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	70	15	150	12	180	510
27	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	71	31	180	27	240	650
28	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	72	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5
29	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	73	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5
30	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	74	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5
31	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	75	0,88	6,50	0,72	8,1	5,4
32	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	76	1,0	8,0	0,85	9,9	6,0
33	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	77	6,2	0,00	0,00	6,2	12
34	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	78	1,1	11	0,83	13	9,8
35	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	79	23	0,00	0,90	24	8,5
36	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	80	87	0,00	0,00	87	260
37	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	81	15	0,06	0,00	15	16
38	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	82	25	0,00	0,00	25	38
39	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	83	0,11	0,00	0,00	0,11	<0,5
40	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	84	0,74	0,00	0,00	0,74	0,56
41	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	85	1,6	0,00	0,00	1,6	3,6
42	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	86	0,38	0,03	0,05	0,46	<0,5
43	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	87	8,9	0,00	0,00	8,9	3,9
44	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,5	88	0,00	0,00	0,77	0,77	<0,5

Parmi les 88 échantillons d'eau de surface analysés à l'aide des deux méthodes, 51 échantillons (57,9 %) ont donné des résultats inférieurs aux limites de détection des deux méthodes. Le test QualiTube^{MC} ne donne aucun résultat de type faux positif.

Concernant les 37 échantillons ayant donné des résultats positifs, 14 résultats (38 % des échantillons) obtenus à l'aide du test QualiTube^{MC} sont supérieurs de 1,4 à 3,0 fois à ceux obtenus à l'aide de la méthode LC-MS/MS du CEAEQ, alors que 11 résultats (30 % des échantillons) sont inférieurs de 1,8 à 2,8 fois. Concernant les résultats plus élevés (1,4 à 3,0 fois), il est possible et probable que la présence d'autres toxines non détectées à l'aide de la méthode LC-MS/MS justifie et explique ces résultats plus élevés. Cette affirmation est difficile à vérifier sur le plan analytique, puisque peu d'étalons de référence des variantes de microcystines sont offerts dans le commerce pour les analyses LC-MS/MS. Il est également possible que des composés organiques influencent les résultats du test en bloquant les sites où sont fixés les anticorps, causant ainsi une surévaluation des concentrations de microcystines.

Concernant les résultats plus faibles (1,8 à 2,8 fois), il est possible que des composés se soient complexés ou se soient liés aux microcystines, les empêchant de se fixer aux anticorps, ou que la présence de composés favorisant la fixation des antigènes marqués (chromophores) au support solide contenu dans le tube aient été présents dans ces échantillons. La très grande variabilité de la nature des échantillons d'eau de surface d'un plan d'eau à l'autre pourrait expliquer ces sous-évaluations des concentrations de microcystines.

Concernant 12 échantillons (13,6 % des échantillons) dont les concentrations en microcystines se situent entre 0,5 et 3,0 µg/l (plage d'utilisation du test), la corrélation des résultats entre les deux méthodes est bonne et les variations sont jugées normales et acceptables, soit des variations de 15 à 40 %.

Plusieurs échantillons ayant donné des résultats positifs (25 échantillons) ont nécessité des reprises et des dilutions afin de se situer dans la plage d'applicabilité du test. Concernant certains de ces échantillons, les variations de résultats sont relativement élevées, allant jusqu'à 300 % d'écart. Ces variations sont vraisemblablement causées par l'hétérogénéité de certains échantillons ou une faible représentativité de l'échantillon lorsque de plus petits volumes sont utilisés pour réaliser le test. Les multiples dilutions et reprises peuvent également introduire des variations dans les résultats du test. Un autre facteur pouvant expliquer ces variations positives est la présence d'autres variantes de toxines non analysées par la méthode du CEAEQ, ce qui signifierait que dans certains échantillons, les variations observées ne sont pas vraiment réelles, étant causées par la réponse positive d'autres variantes.

Les échantillons 60 et 88 (2,2 % des échantillons) ont donné des résultats de type faux négatif (3,4 %) à l'aide du test immunoenzymatique en tubes. Des interférences ont empêché les microcystines contenues dans ces échantillons de se fixer correctement aux anticorps des tubes.

5 CONCLUSION

Pendant la saison 2007, 88 échantillons d'eau de surface ont été analysés avec le test QualiTube^{MC} et les résultats ont été comparés avec les ceux de la méthode en usage au CEAEQ (MA. 403 – Microcys 1.0). Le test QualiTube^{MC}, combiné avec la méthode de lyse cellulaire, donne des résultats équivalents aux résultats obtenus à l'aide de la méthode en usage au CEAEQ concernant 13,6 % des échantillons, soit 12 échantillons sur 88. Des écarts importants, soit des résultats plus élevés ou moins élevés, sont observés dans le cas de 25 échantillons lorsque les résultats sont comparés aux résultats obtenus à l'aide d'une méthode considérée comme étant l'une des plus fiables pour la quantification des microcystines.

Le test QualiTube^{MC} d'EnviroLogix est un test qualitatif qui permet d'évaluer la concentration approximative de cyanotoxines totales, après une étape de lyse cellulaire, pour des concentrations comprises dans la plage applicable du test, soit entre 0,5 et 3,0 µg/l. Ce test ne peut pas déterminer directement des concentrations supérieures à 3 µg/l. Des dilutions successives doivent être réalisées pour ramener les concentrations dans la plage d'utilisation du test. La précision des résultats peut être améliorée en utilisant un lecteur spectroscopique ultraviolet portable.

Le test QualiTube^{MC} est de 25 à 100 fois moins sensible que la méthode classique par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse, méthode en usage au CEAEQ. Le test ne permet pas de distinguer les variantes de cyanotoxines présentes. Ce test ne discriminant pas les variantes de cyanotoxines, il ne peut pas être utilisé pour évaluer les concentrations de cyanotoxines par rapport à une norme ou à une recommandation basée sur la toxicité équivalente en microcystine-LR, comme il est recommandé au Québec par l'Institut national de santé publique du Québec [5].

Le test QualiTube^{MC} ne permet pas de déterminer directement les microcystines intracellulaires. Pour ce faire, il doit nécessairement être précédé d'une méthode de lyse cellulaire efficace afin de pouvoir déterminer les microcystines totales. Cependant, ce test permet de mesurer et d'évaluer la présence de toxines qui ne sont ni analysées ni détectées par les méthodes classiques, puisque les étalons de cyanotoxines ne sont pas disponibles pour toutes les variantes.

En résumé, en près de deux heures, en appliquant la méthode de lyse cellulaire mise au point au CEAEQ suivie d'un dosage à l'aide du test QualiTube^{MC}, la concentration approximative de microcystines présente dans le milieu peut être évaluée. Le test est un outil qui peut être utilisé pour réaliser le suivi d'un plan d'eau touché par les cyanobactéries pour lequel une caractérisation préalable a été réalisée et pour lequel les concentrations de toxines sont supérieures à 0,5 µg/l.

Les critères et les circonstances pour lesquelles l'utilisation de ce test pourrait être recommandée doivent être encadrés par des organismes officiels et reconnus pour la gestion des épisodes de fleurs d'eau.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DUY, T. N., P. K. S. LAM, G. R. SHAW et D. W. CONNELL, 2000. *Toxicology and Risk Assessment of Freshwater Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins in Water*, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 163, p. 113-186.
- [2] MINISTRY OF THE ENVIRONMENT, Ontario, 2006. MCYST-E3450, document interne.
- [3] LAMBERT, T. W., M. P. BOLAND, C. F. B. HOLMES et S. E. HRUDEY, 1994. *Quantitation of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with protein phosphatase bioassay*, Environ. Sci. Technol., vol. 28, p. 753-755.
- [4] CHORUS, I. et J. BARTRAM, 1999. *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, E&FN Spon, Londres, 416 p.
- [5] INSTITUT NATIONAL DE SANTÉ PUBLIQUE DU QUÉBEC. *Critères d'intervention et de seuils d'alerte pour les cyanobactéries*, ISBN 2-550-43854-X, publié en 2005. <http://www.inspq.qc.ca>

AUTRES DOCUMENTS PERTINENTS

- AGENCE FRANÇAISE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS. *Évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, la baignade et autres activités récréatives*, juillet 2006, [En ligne] <http://www.afssa.fr/Documents/EAUX-Ra-Cyanobacteries.pdf>
- FRANK, H. U. et C. WOLF, 2002. *Toxicity assessment of cyanobacterial toxins mixture*, Environmental Toxicology, vol. 17, p. 395-399.
- UNIVERSITÉ DE TORONTO, <http://www.botany.utoronto.ca/utcc/Bg-11.pdf>
- PIETSCH, J., H. BORNMANN et W. SCHMIDT. *Oral presentation at Annual meeting of the water chemistry division*, German Chemical Society, mai 2001.
- SONG, W., A. DE LA CRUZ, K. RIEN et K. O'SHEA, 2006. *Ultrasonic induced degradation of microcystin-LR and -RR*, Environ. Sci. Technol., vol. 40, p. 3941-3946.