

Mise au point d'une méthode de lyse cellulaire et évaluation d'un test de terrain pour la mesure des microcystines libérées par les cyanobactéries dans les eaux de surface

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, MDDEP

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ)

Mars 2007

## **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 CEAEQ, dont Mireille Brunet, Ginette Côté, Carole Veillette ainsi que Richard Cardin, lesquels ont apporté leur soutien à M<sup>me</sup> Gobert tout au long de la réalisation de ses travaux ainsi qu'au développement des expertises à mettre en place.

Note au lecteur : Les points de vue exprimés dans ce document sont ceux des auteurs/chercheurs et ne reflètent pas nécessairement l'opinion officielle de Santé Canada.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>Remerciements</b>	ii
1 Introduction	1
2 Caractéristiques de la trousse DE terrain QualiTube <sup>MC</sup> d'Envirologix	3
3 Objectifs du projet	5
3.1 Validation des performances de la trousse QualiTube <sup>MC</sup>	5
3.2 Mise au point d'une méthode de lyse cellulaire facilement applicable sur le terrain afin de mesurer les microcystines totales	5
4 Résultats	6
4.1 Résultats obtenus lors de la validation de la trousse QualiTube <sup>MC</sup>	6
4.2 Résultats des différentes méthodes de lyse cellulaire évaluées	7
4.2.1 Évaluation du test QualiTube <sup>MC</sup>	7
4.2.2 Évaluation des méthodes de lyse cellulaire	9
5 Conclusion	12
<b>Bibliographie</b>	13

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Réactivité croisée de différentes toxines, selon le fabricant EnviroLogix relativement au test QualiTube <sup>MC</sup>	4
Tableau 2	Comparaison des résultats obtenus pour les concentrations de toxines libres dans l'eau en utilisant le test QualiTube <sup>MC</sup> et la lecture spectroscopique UV obtenue à 450 nm	7
Tableau 3	Étude comparative du test QualiTube <sup>MC</sup> et de la méthode LC-MS/MS	8
Tableau 4	Résultats obtenus par LC-MS/MS relativement aux différentes méthodes de lyse évaluées	10
Tableau 5	Comparaison des résultats de la lyse cellulaire obtenus par centrifugation à l'aide du test QualiTube <sup>MC</sup> et par la méthode de référence en LC-MS/MS	11

## LISTE DES FIGURES

Figure 1	Microcystine-LR	1
Figure 2	Coloration obtenue à l'aide du test QualiTube <sup>MC</sup>	6
Figure 3	Effet du traitement aux ultrasons sur les cellules de cyanobactéries	10

## 1 INTRODUCTION

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  $\mu\text{m}$ . 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- $\beta$ -méthylisoAsp-L-Y-Adda-D-iso-Glu-N-méthyl-déhydroAla), où X et Y représentent les variantes des L-acides aminés. D'autres toxines peuvent également être produites par les cyanobactéries.

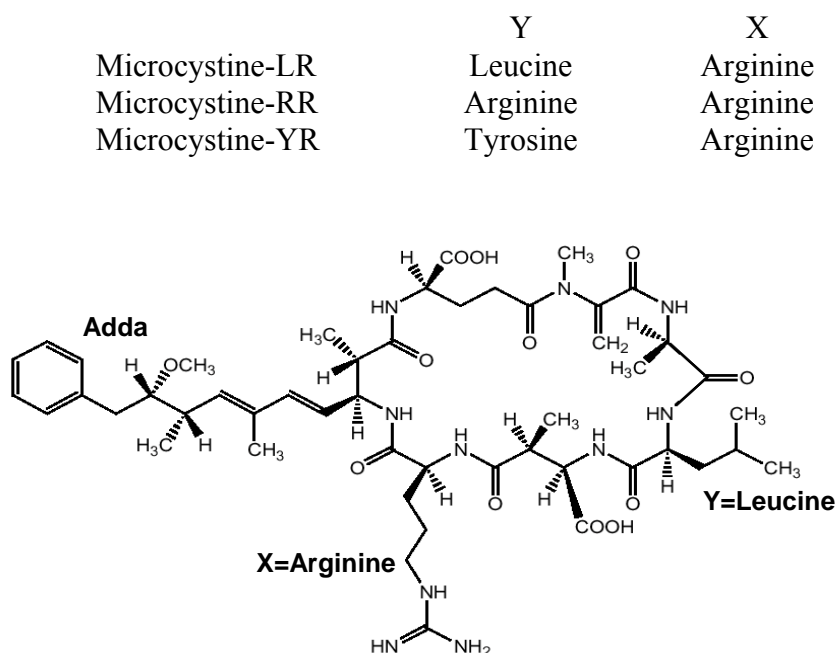


Figure 1 Microcystine-LR

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 LD<sub>50</sub> de microcystine-LR varie de 15 à 150 µg/kg de masse corporelle (m.c.) pour les injections intrapéritonéales et de 5 000 à 11 000 µg/kg m.c. par voie orale chez les souris [4].

La présence de cyanobactéries et l'apparition de fleurs d'eau sont signalées depuis plusieurs années dans divers pays du monde. En 1999, le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ) a mis au point une méthode d'analyse pour le dosage des cyanotoxines libres et intracellulaires par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS), afin de répondre aux besoins de connaissances exprimés par le ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec (MDDEP) sur la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les cours d'eau et les lacs du Québec. Les toxines sont synthétisées à l'intérieur des cellules et sont libérées dans le milieu naturel lors de la lyse cellulaire. En phase de croissance, les toxines sont essentiellement intracellulaires et moins de 10 à 20 % de la teneur totale en toxines est extracellulaire [5]. Les méthodes d'analyse généralement utilisées pour la mesure des cyanotoxines sont la chromatographie liquide couplée à un détecteur UV ou la chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse. Des méthodes colorimétriques par la technique ELISA (dosage immunoenzymatique), par protéine phosphatase-1 ou -2A (PP1 ou PP2A) et la technique ACP<sup>1</sup> peuvent également être utilisées.

Le MDDEP, le ministère de l'Environnement de l'Ontario, Santé Canada et d'autres organismes recommandent une concentration maximale de 1,5 µg/l de microcystine-LR dans l'eau potable tandis que l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) en recommande une concentration maximale de 1,0 µg/l. En 2005, l'Institut national de la santé publique du Québec (INSPQ) a proposé un seuil d'alerte de 16 µg/l pour la microcystine-LR et de 20 000 cellules de cyanobactéries par millilitre dans les plans d'eau récréatifs du Québec [6]. Des facteurs de toxicité équivalente (FTE) ont été élaborés par Wolf et Frank [7] pour les microcystines-LR, -YR, -YM, -LA et -RR.

Après la mise en place de l'expertise, des programmes de surveillance ont été élaborés au fil des ans afin de recueillir des données et de l'information sur les niveaux de cyanobactéries et les concentrations de toxines présentes dans différents cours d'eau et lacs du Québec. Depuis ce temps, le nombre de cours d'eau touchés et les facteurs favorisant la prolifération des fleurs d'eau au Québec sont mieux connus. Cependant, le nombre d'épisodes de fleurs d'eau survenus aux cours des dernières saisons et leur importance ont pris des proportions qui ont inquiété les responsables du MDDEP et du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS). En 2006, le MSSS a procédé à la fermeture de plusieurs plages au Québec et a diffusé plusieurs avis de non-consommation de l'eau potable, principalement dans la région sud-ouest du Québec. Les pressions sociales, municipales, politiques et médiatiques ont été considérables, ce qui a occasionné beaucoup de travail et nécessité la concertation des différents acteurs concernés du MSSS et du MDDEP.

---

<sup>1</sup> ACP pour « Amplification en chaîne par polymérase », aussi connu sous PCR pour « Polymerase Chain Reaction ».

Le nombre de demandes d'analyse soumises au CEAEQ a triplé en 2006 et décuplé en 2007 par rapport à l'année 2005, ce qui a nécessité la réalisation de plus de 4 000 heures de travaux analytiques en urgence en 2006 et de plus de 12 000 heures en 2007, compte tenu du fait que plusieurs prises d'eau potable étaient exposées aux cyanobactéries. La charge de travail et le risque de voir la même situation se reproduire en 2008 font en sorte que nous désirons évaluer des méthodes de remplacement qui pourraient être utiles au personnel du MDDEP en région et ainsi réduire le nombre de demandes d'analyses qui pourraient être soumises au CEAEQ.

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 ELISA sont offerts sur le marché par différents fournisseurs. Nous avons retenu la trousse de terrain QualiTube<sup>MC</sup> 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.

Par ailleurs, il existe deux autres trousse produites par EnviroLogix, soit la trousse QuantiTube<sup>MC</sup>, utilisant un instrument de mesure et de lecture optique, et la trousse QuantiPlate<sup>MC</sup>, qui requiert des équipements plus spécialisés et du matériel de laboratoire fixe. Le test QuantiTube<sup>MC</sup> peut représenter une option intéressante bien qu'il nécessite un plus grand nombre de manipulations et l'utilisation d'un spectrophotomètre, ce qui permet d'obtenir des résultats quantitatifs.

## **2 CARACTÉRISTIQUES DE LA TROUSSE DE TERRAIN QUALITUBE<sup>MC</sup> D'ENVIROLOGIX**

Le test colorimétrique de terrain, 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 ELISA 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<sup>MC</sup> doivent être considérés comme semi-quantitatifs. Le test permet d'estimer l'absence ou la présence de microcystines pour une plage de concentrations variant de 0,5 à 3,0 µg/l. Toutefois, il ne permet de mesurer que les microcystines libres dans les eaux de surface. 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.

La compagnie EnviroLogix mentionne, dans son site Internet, que l'utilisation du test QualiTube<sup>MC</sup> n'est pas recommandée pour l'eau potable et les eaux usées.

Les tests colorimétriques doivent être validés dans un cadre précis d'utilisation, puisqu'ils peuvent parfois sous-évaluer ou surévaluer les concentrations obtenues en fonction des caractéristiques et de la provenance des différents échantillons testés. Cependant, le test de terrain représenterait un outil intéressant de dépistage et de suivi de la problématique d'un plan d'eau touché par des fleurs d'eau de cyanobactéries, s'il permettait de mesurer les cyanotoxines totales, soit les toxines libres et intracellulaires. Pour ce faire, Santé-Canada a collaboré au financement des travaux de recherche visant à évaluer la fiabilité et l'applicabilité de la trousse QualiTube<sup>MC</sup> et la mise au point d'une méthode de lyse cellulaire permettant de mesurer les toxines totales dans les échantillons soumis aux essais à l'aide de ce test de type ELISA.

Le test ELISA 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, pour chacune des variantes, diffère en fonction des variantes présentes dans l'échantillon.

La toxine la plus sensible au test est la microcystine-LA alors que la microcystine-YR est la moins sensible.

Tableau 1 Réactivité croisée de différentes toxines, selon le fabricant EnviroLogix relativement au test QualiTube<sup>MC</sup>

Sensibilité de détection des différentes toxines		
Microcystine	50 % B/Bo <sup>1</sup>	81,5 Bo LOD <sup>2</sup>
LR	0,94	0,30
LA	0,78	0,43
RR	1,53	0,65
YR	2,53	0,69
Nodularine	1,44	0,53

<sup>1</sup>  $\%B/B_0 = \frac{\text{densité optique de l'échantillon}}{\text{densité optique du blanc}}$

<sup>2</sup> LOD : limite de détection



### **3 OBJECTIFS DU PROJET**

Le projet comporte deux objectifs principaux, soit :

- Évaluer la trousse de terrain QualiTube<sup>MC</sup> et en recommander l'utilisation, le cas échéant, dans un cadre d'utilisation défini.
- Mettre au point une méthode de lyse cellulaire afin d'obtenir les concentrations de microcystines totales dans le milieu, soit les microcystines extracellulaires et les microcystines intracellulaires qui peuvent représenter plus de 80 % des microcystines totales.

Sans une méthode de lyse cellulaire, les résultats obtenus à l'aide du test ELISA pourraient être sous-estimés de façon significative, puisque les recommandations sont basées sur les concentrations de cyanotoxines totales.

#### **3.1 Validation des performances de la trousse QualiTube<sup>MC</sup>**

- Vérifier la facilité d'utilisation du test afin de recommander l'utilisation éventuelle de cet outil.
- Vérifier la conformité de la plage de concentrations recommandées.
- Comparer les résultats obtenus par lecture visuelle avec les lectures obtenues à l'aide d'un spectrophotomètre UV à 450 nm.
- Vérifier les résultats obtenus à l'aide de la trousse à partir d'échantillons contenant des microcystines provenant de cyanobactéries cultivées en laboratoire.

#### **3.2 Mise au point d'une méthode de lyse cellulaire facilement applicable sur le terrain afin de mesurer les microcystines totales**

- Évaluer différentes méthodes de lyse cellulaire. Les méthodes évaluées sont la congélation, le chauffage, la sonde ultrasonique et l'ajout d'un biocide, soit le sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>), et la centrifugation suivie de filtration.
- Mesurer les concentrations de microcystines libres, avant et après l'application des méthodes de lyse cellulaire évaluées.
- Vérifier l'efficacité des méthodes de lyse cellulaire, soit en mesurant les microcystines intracellulaires après l'application des méthodes de lyse, en utilisant la méthode d'analyse de microcystines intracellulaires par LC-MS/MS mise au point au CEAEQ (MA. 403 – Microcys 1.0).

## 4 RÉSULTATS

### 4.1 Résultats obtenus lors de la validation de la trousse QualiTube<sup>MC</sup>

La trousse de terrain QualiTube<sup>MC</sup> est relativement facile à utiliser dans des conditions contrôlées, idéalement dans un édifice commercial, public ou résidentiel. Par contre, elle serait moins facile à utiliser dans une embarcation exposée au vent et à des conditions météorologiques très ensoleillées, puisque les manipulations et les lectures de coloration seraient difficiles à réaliser.

La trousse a été utilisée selon les recommandations et le mode de fonctionnement fournis par le fabricant. Le test est facile à réaliser dans des conditions contrôlées et l'estimation de la concentration est relativement facile à effectuer. La figure 2 présente les différents degrés de coloration obtenus pour le témoin, les étalons de microcystines à 0,5 et 3 µg/l et un échantillon pour lequel la concentration en microcystines se situe entre 0,5 et 3,0 µg/l, soit approximativement 2 µg/l.

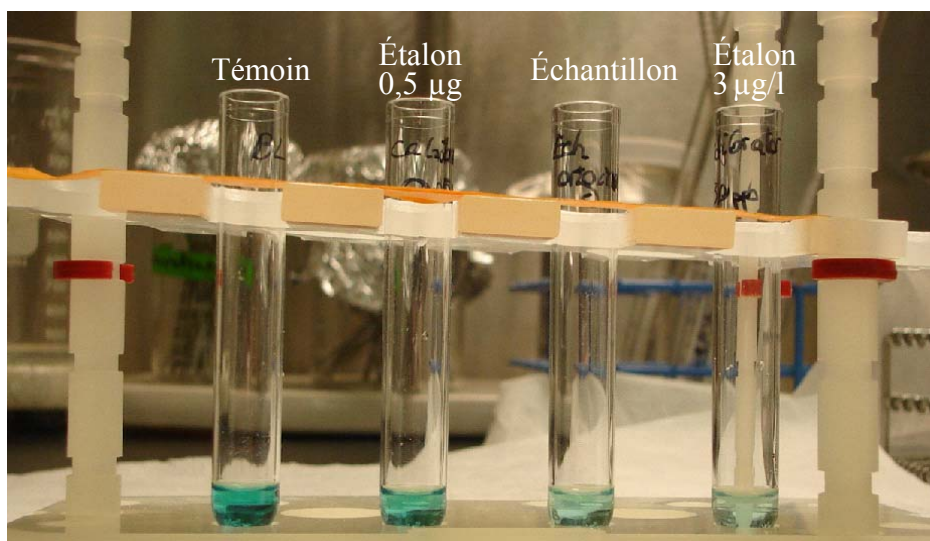


Figure 2 Coloration obtenue à l'aide du test QualiTube<sup>MC</sup>

L'échantillon sur lequel le test a été réalisé provient de plusieurs échantillons obtenus par cultures de cyanobactéries produites dans les laboratoires du CEAEQ. La souche de *Microcystis aeruginosa* utilisée provient de la collection de l'Université de Toronto et porte le numéro d'identification UTCC # 299. Cette souche ne produit pratiquement que de la microcystine-LR à raison d'environ 415 µg/g de poids sec d'algues. La souche a été cultivée dans les laboratoires du CEAEQ dans des conditions de croissance optimisées en utilisant le milieu de culture Bg-11, tel qu'il est décrit dans le protocole publié dans le site Internet de l'Université de Toronto [8].

La réalisation du test peut demander parfois plusieurs dilutions lorsque la concentration en microcystines n'est pas connue, puisque le test ne permet d'observer la coloration que dans la plage de concentrations allant de 0,5 à 3 µg/l. Plusieurs reprises du test peuvent être requises

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<sup>MC</sup> sont évalués en lecture visuelle en comparant les couleurs des solutions standards avec celles obtenues à partir des échantillons. Les concentrations peuvent également être évaluées en utilisant un spectrophotomètre UV ajusté à 450 nm. Les concentrations obtenues par lecture visuelle ont été comparées avec les concentrations obtenues à l'aide d'un spectrophotomètre UV.

## 4.2 Résultats des différentes méthodes de lyse cellulaire évaluées

### 4.2.1 Évaluation du test QualiTube<sup>MC</sup>

Différentes méthodes de lyse cellulaire ont été évaluées et ont servi à la comparaison des résultats obtenus par les deux types de lecture. Ces résultats sont présentés dans le tableau 2. Concernant chacun des essais effectués, la lecture visuelle a été comparée à la lecture spectrophotométrique.

Tableau 2 Comparaison des résultats obtenus pour les concentrations de toxines libres dans l'eau en utilisant le test QualiTube<sup>MC</sup> et la lecture spectroscopique UV obtenue à 450 nm

Caractéristiques des échantillons		Toxines totales QualiTube <sup>MC</sup> µg/l	
	Traitement	Lecture visuelle	Lecture photométrique (450 nm)
R1 J7 2 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	Sans traitement	> 0,5 < 3	2,1
	Congelé	> 3	6,7
	Congelé + CuSO <sub>4</sub> 0,001 %	> 3	6,4
	Congelé + CuSO <sub>4</sub> 0,001 % délai de 1 h avant la congélation	> 3	6,6
R2 J5 4 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	Sans traitement	> 0,5 < 3	1,0
	Congelé (4x)	> 0,5 < 3	2,4
	Congelé (4x) + CuSO <sub>4</sub> à 0,016 % + bain à ultrasons (4 x 10 min.)	≈3	3,2
	Congelé (4x) + CuSO <sub>4</sub> à 0,032 % + bain à ultrasons (4 x 10 min.)	> 0,5 < 3	2,2
	CuSO <sub>4</sub> à 0,016 %	> 0,5 < 3	1,1
	Bain à ultrasons (4 x 10 min.)	> 0,5 < 3	1,4
	CuSO <sub>4</sub> à 0,016 % + bain à ultrasons (4 x 10 min.)	> 0,5 < 3	0,84
	Congelé (4x) + CuSO <sub>4</sub> à 0,016 %	> 0,5 < 3	2,4

Caractéristiques des échantillons		Toxines totales QualiTube <sup>MC</sup> µg/l	
R2 J7 10 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	Sans traitement	< 0,5	0,43
	Congelé (1x)	< 0,5	0,40
	Congelé (1x) + CuSO <sub>4</sub> 0,016 % délai de 1 h	< 0,5	0,42
	Congelé (1x) + CuSO <sub>4</sub> 0,016 % délai de 2 h	< 0,5	0,35
	Congelé (3x)	< 0,5	0,33

R1 et R2 sont des repiquages cellulaires, R1 étant le premier repiquage et R2, le second. Le nombre de cellules par millilitre (cell/ml) est obtenu à l'aide d'un compteur à particules.

Les lectures visuelles et la méthode spectroscopique donnent des résultats concordants en tenant compte de la plage de concentrations applicable du test QualiTube<sup>MC</sup>, puisque les résultats positifs obtenus sont évalués et classés dans des intervalles de concentrations. Sur le terrain, une lecture spectroscopique ne serait donc pas nécessaire pour connaître approximativement la concentration de toxines présentes dans l'échantillon, bien que celle-ci donne des résultats plus précis.

Les résultats obtenus à l'aide du test QualiTube<sup>MC</sup> ont été comparés à ceux obtenus à l'aide de la méthode LC-MS/MS pour les cyanotoxines libres à deux degrés de concentration dans un échantillon de cyanobactéries cultivées en laboratoire. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 Étude comparative du test QualiTube<sup>MC</sup> et de la méthode LC-MS/MS

Toxine	QualiTube <sup>MC</sup> µg/l (n=4)	LC- MS/MS µg/l (n=4)
Microcystine-LR R7 J8 CV %	6,3 16,3	6,6 15,3
Microcystine-LR R7 J8 CV %	3,5 24,8	3,9 7,3

Les concentrations moyennes obtenues pour la mesure de la microcystine-LR (n=4) à partir du test QualiTube<sup>MC</sup> sont comparables à celles obtenues à l'aide de la méthode LC-MS/MS. Le coefficient de variation relatif obtenu à l'aide du test QualiTube<sup>MC</sup> est plus élevé que celui obtenu à l'aide de la méthode LC-MS/MS pour les deux concentrations évaluées pour un nombre d'échantillons n=4.

#### 4.2.2 Évaluation des méthodes de lyse cellulaire

Les méthodes de lyse cellulaire évaluées sont l'utilisation de bains ultrasoniques, le chauffage, la congélation, l'ajout d'hydroquinone et de sulfate de cuivre de même que l'extraction méthanol-eau et acétonitrile-eau, suivie d'une centrifugation et d'une filtration.

Les résultats relatifs aux toxines obtenus à l'aide des différentes techniques de lyse cellulaire évaluées sont présentés dans le tableau 2. Les techniques ont été appliquées sur des cellules de cyanobactéries cultivées en laboratoire à différents stades de maturité. En fonction du stade de maturité cellulaire, les concentrations de toxines libres dans l'eau varient significativement. Tel qu'il est indiqué au tableau 2, les concentrations de toxines libres mesurées varient en fonction du stade de croissance des cellules utilisées, des conditions de croissance et du redémarrage des cultures.

Les résultats des essais pour R1 J7 et R2 J5 indiquent que la congélation a permis de libérer environ de 2 à 3 fois plus de toxines que la quantité initiale de toxines libres, alors que pour R2 J7, le traitement n'a donné aucune augmentation significative des toxines libres. Le sulfate de cuivre et le traitement dans un bain à ultrasons indiquent des niveaux de toxines libres à peu près identiques à ceux obtenus par congélation. Nous avons également évalué la lyse cellulaire par ébullition des échantillons. Les résultats obtenus sont comparables aux résultats obtenus par congélation.

Les résultats que nous avons obtenus par immunoessais à l'aide de différentes méthodes de lyse cellulaire indiquent une augmentation d'un facteur de 2 à 3 du niveau de toxines libres. Sur la base de ces résultats, nous pouvons penser que ces méthodes de lyse cellulaire ont un taux d'efficacité de l'ordre de 10 à 60 %. En effet, dans la littérature, Pietsch [9] rapporte que le contenu intracellulaire en toxines représente plus de 90 % des toxines totales dans le cas des cellules ayant une maturité de moins de 10 jours. Nous avons également observé, de façon générale, que le contenu intracellulaire moyen représente 80 % des cyanotoxines totales lorsque nous appliquons la méthode élaborée au CEAEQ sur des cellules ayant différents degrés de maturité.

Le tableau 4 présente les résultats obtenus lors de différents essais en déterminant les concentrations de toxines intracellulaires et extracellulaires par LC-MS/MS. Ces méthodes n'ont pas donné des résultats satisfaisants, sauf dans un cas, lors des essais de congélation sur les cellules du R2 J7. Les résultats des différents essais réalisés par congélation ne sont pas reproductibles et varient significativement d'un essai à l'autre. La maturité, le nombre de cellules et le volume d'échantillon utilisé sont des facteurs qui influencent de façon significative les résultats obtenus.

Sur la base des conditions expérimentales utilisées et des résultats que nous avons obtenus, ces méthodes ne pourront pas être recommandées pour déterminer la concentration totale en toxines du milieu. Lors de certains essais, nous observons une diminution du nombre de toxines libres ou extracellulaires par rapport à la concentration de toxines présente initialement. Cette diminution de la concentration des toxines libres est possiblement causée par des substances libérées lors de la lyse ou par un mécanisme de dégradation chimique non déterminé.

Tableau 4 Résultats obtenus par LC-MS/MS relativement aux différentes méthodes de lyse évaluées

Méthode de lyse cellulaire		Toxines totales intracellulaires et extracellulaires $\mu\text{g/l}$
R2 J7 $1,03 \times 10^7$ cell/ml	Échantillon méthode de référence	55,3
	Échantillon congelé pendant une nuit	61,9
	Échantillon congelé + 0,032 % $\text{CuSO}_4$ délai de 2 h	39,9
R9 J6 $4,23 \times 10^7$ cell/ml	Échantillon méthode de référence	85,7
	Échantillon congelé pendant une nuit + hydroquinone	16,4
	Échantillon congelé 3x + hydroquinone	28,7
	Échantillon ultrasons + hydroquinone	6,6
	Échantillon sable chaud $100^\circ\text{C}$ + hydroquinone	16,4

La figure 3 illustre les effets du traitement aux ultrasons sur l'état et le nombre de cellules de cyanobactéries après le traitement. Le nombre de cyanobactéries après le traitement a diminué considérablement, comme l'indique la partie droite de la figure. La présence de débris cellulaires est également facilement observable.

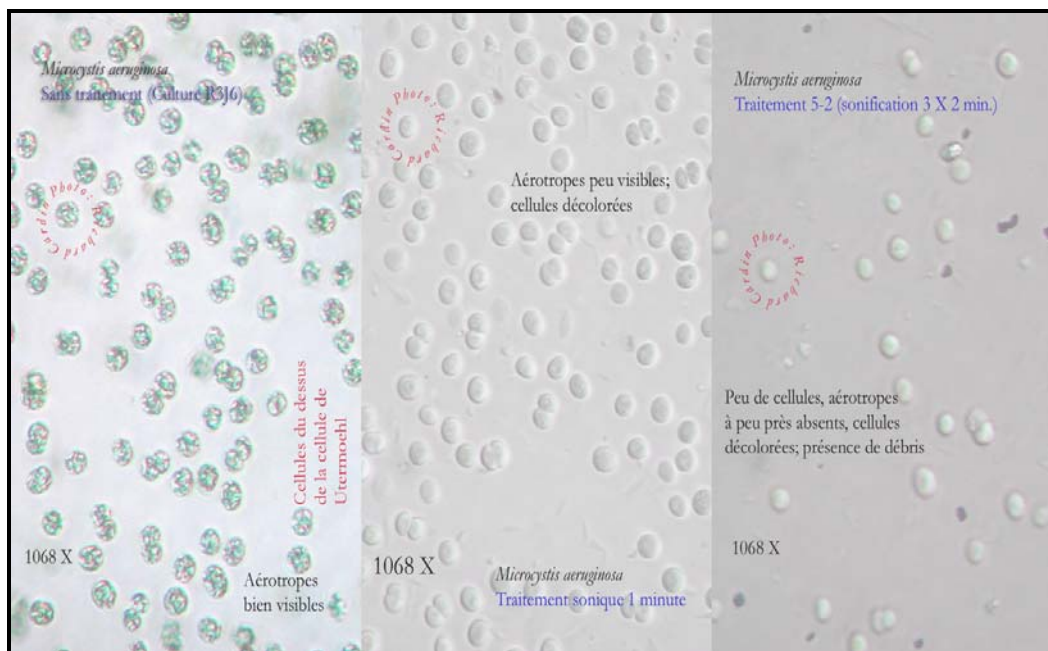


Figure 3 Effet du traitement aux ultrasons sur les cellules de cyanobactéries

Nous avons par ailleurs évalué une méthode d'extraction par centrifugation, une option intéressante qui semble plus efficace que les méthodes courantes évaluées précédemment. Elle est inspirée de la procédure d'extraction décrite par Song [10]. Les tubes de centrifugation

utilisés sont les Ultrafree-CL LH, 0,45 µm, vendus par Millipore. Les échantillons sont extraits avec 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 sont sous-évaluées. Le filtrat est ensuite analysé directement à l'aide du test QualiTube<sup>MC</sup>.

Un mélange d'acétonitrile et d'eau a également été évalué afin de vérifier l'efficacité d'extraction de celui-ci. Le mélange de méthanol et d'eau s'est avéré un mélange plus efficace pour l'extraction des cyanotoxines intracellulaires.

Le tableau 5 montre les résultats obtenus pour la lyse cellulaire par centrifugation avec le mélange méthanol-eau et le mélange acétonitrile-eau. Cette méthode de lyse cellulaire a été vérifiée sur des échantillons de cyanobactéries à différents stades d'évolution et en la comparant avec la méthode intracellulaire et extracellulaire utilisée au CEAEQ.

Finalement, un test a été effectué sur un échantillon d'eau de surface provenant d'un lac contenant un mélange de microcystines-LR, -RR et -YR.

Tableau 5 Comparaison des résultats de la lyse cellulaire obtenus par centrifugation à l'aide du test QualiTube<sup>MC</sup> et par la méthode de référence en LC-MS/MS

Caractéristique de l'échantillon		Toxines totales intracellulaires et extracellulaires	
		QualiTube <sup>MC</sup> (µg/l)	LC-MS/MS* (µg/l)
R11 J7 5,4 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	Méthode de référence	–	85
	Centrifugation MeOH (80/20)	–	126
	Centrifugation ACN	34	–
R12 J8 12,4 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	Sans traitement	11	–
	Centrifugation ACN/MeOH (75/25)	16	–
R13 J6 8,0 x 10 <sup>6</sup> cell/ml R10 J28 34,0 x 10 <sup>6</sup> cell/ml	R13 J6 Méthode de référence	–	85
	R13 J6 Centrifugation MeOH (80/20)	91	82
	R10 J28 Méthode de référence	–	64
	R10 J28 Centrifugation MeOH (80/20)	62	54
Eau de surface 400 000 cell/ml	Méthode référence	–	18,5
	Centrifugation MeOH (80/20)	19,4	–

\* La méthode de référence est celle utilisée au laboratoire du CEAEQ pour la mesure des cyanotoxines intracellulaires et extracellulaires.

– Non déterminé.

Le mélange méthanol-eau s'est avéré un mélange plus efficace pour l'extraction des microcystines intracellulaires.

De plus, en utilisant l'extraction par centrifugation au méthanol, la concentration en toxines totales est sensiblement identique à celle obtenue par la méthode de référence.

## 5 CONCLUSION

Parmi les méthodes de lyse cellulaire évaluées (congélation, chauffage, ultrasons, biocides, centrifugation), la méthode de centrifugation utilisant une extraction au méthanol-eau donne les meilleurs résultats pour la détermination des cyanotoxines totales (intracellulaires et extracellulaires). Concernant les eaux de surface, cette méthode donne des résultats équivalents à la méthode en usage au CEAEQ (Ma. 403 – Microcys 1.0).

Le test QualiTube<sup>MC</sup> d'EnviroLogix est un test qualitatif qui permettrait d'évaluer la concentration approximative de cyanotoxines totales, après lyse cellulaire, pour des concentrations comprises dans la plage applicable, soit  $< 0,5 \mu\text{g/l}$ , entre  $0,5$  et  $3,0 \mu\text{g/l}$  ou  $> 3 \mu\text{g/l}$ . Le test ne peut pas déterminer directement des concentrations supérieures à  $3 \mu\text{g/l}$ . 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 portatif.

Le test QualiTube<sup>MC</sup> est de 25 à 100 fois moins sensible que les méthodes courantes classiques 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. Le test ne discriminant pas les variantes, il ne pourra pas être utilisé pour évaluer les concentrations de cyanotoxines par rapport à une norme ou à une recommandation basée sur la microcystine-LR.

Le test QualiTube<sup>MC</sup> 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 permettre de déterminer les microcystines totales. Cependant, le test permet de mesurer et d'évaluer des toxines qui ne sont pas analysées et détectées par les méthodes courantes, puisque les étalons de cyanotoxines ne sont pas tous disponibles.

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



## 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] 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>
- [6] 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.
- [7] FRANK, H.U. et C. WOLF, 2002. *Toxicity assessment of cyanobacterial toxins mixture*. Environmental Toxicology, vol. 17, p. 395-399.
- [8] UNIVERSITÉ DE TORONTO, <http://www.botany.utoronto.ca/utcc/Bg-11.pdf>
- [9] PIETSCH, J., H. BORNMANN et W. SCHMIDT. *Oral presentation at Annual meeting of the water chemistry division*, German Chemical Society, mai 2001.
- [10] 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.