



● Développement de modèles toxicocinétiques pour les cyanotoxines chez le poisson et leur application à l'exposition humaine

Sami Haddad, Ph.D.

Dép. de santé environnementale et santé au travail

Université de Montréal





Équipe

- Chercheurs
 - Sami Haddad (U de Montréal)
 - Philip Spear (UQÀM)
 - Philippe Juneau (UQÀM)
- Partenaires/chercheurs
 - Philippe Brodeur (MEF)
 - Christian Deblois (CEAEQ)
 - Denis Belleville (INSPQ)
- Étudiant(e)s
 - Benedicte Aubry (candidate au Ph.D. UQÀM)
 - à déterminer (Maitrise)
- Techniciennes
 - Isabelle Rheault (UQÀM) (2008 - avril 2010)

Problématique

- Détection dans la chair de poissons dans plusieurs études
- Exposition humaine
 - Pêche commerciale
 - Pêche sportive
- Manque d'outil permettant d'estimer l'exposition humaine via la consommation de poisson



Objectif général

Développer un modèle toxicocinétique pour prédire l'accumulation de MC-LR, RR, YR et l'anatoxine-A chez le poisson





Objectifs spécifiques

1. Mettre au point de méthodes d'extraction et de détection rapide et efficace
2. Toxicocinétique
 1. Développement de modèle
 2. Paramétrage
 3. Expositions de poissons en milieu contrôlé
3. Simuler l'exposition chez l'humain

I- Mise au point de méthodes

Méthode de détection

HPLC-MS/MS

- Conditions chromatographiques
 - HPLC Agilent 1200 SL series
 - Éluant : acétonitrile/H₂O (+0.1%AF), débit de 0.4 ml/min à 25°C
 - 30% ACN (0 à 0.5 min)
 - 30% → 95% (0.5 à 3 min)
 - 95% (3 à 7 min.)
 - Volume d'Injection 10 µl
 - Colonne : Zorbax Eclipse Plus C18 de 3.0 x 50 mm, 1.8 microns.
 - Temps de rétentions
 - 1.686 min (MC-RR), 3.002 min (NOD), 3.554 min (MC-YR), 3.629 min (MC-LR) et 4.688 min (MC-LF)
 - Anatoxine-A
 - dédoublements de pics
 - Méthode avec méthanol/H₂O (25% à 0 min, 95% à 15 min jusqu'à 20 min). Le temps de rétention est 1.161 min. La transition de masse suivi en MRM est 166.1 → 91.0



I- Mise au point de méthodes

Méthode de détection

Agilent 6410 Triple Quadrupole LCMS

Source	MMI
Scan Type	MRM
Ion Mode	ESI
Polarity	Positive
Delta EMV	300 V

Gas Temp.	300 C
Vaporizer	200 C
Gas Flow	5 L/min
Nebulizer	60 psi
Capillary	3000 V

Toxine	Ion Précurseur	Ion Produit	Fragmenteur (V)	E. Collision (V)
MC-YR	1045.6	135	100	65
	524.3	135	100	10
MC-RR	1038.6	135	100	65
	519.9	135	100	30
MC-LR	995.5	135	100	65
	498.2	135	100	10
MC-LF	986.5	135	100	65
	493.3	135	100	10
NOD	825.4	135	100	60

I- Mise au point de méthodes

Méthode de détection : Stabilité du signal

Surf ace NODULARINE

NODULARINE

Concentration en ug/L

$$y = 8,5132E-04x - 3,4845E-04$$

$$R_2 = 9,9962E-01$$

> SIGNAL OK

Moyenne	76463
Ecart Type	6805
Erreur	8.9%

Surf. ion / Surf. NOD

MC-YR ion I045

Concentration en ug/L

I- Mise au point de méthodes

Méthode d'extraction

Insp. P. Juneau

1.5 mL MeOH 100%

Bain à ultrason

Centrifugation →



1.5 mL MeOH 80%

Bain à ultrason

Centrifugation →



1 mL MeOH 100%

Bain à ultrason

Centrifugation →

S
U
R
N
A
G
E
A
N
T



Évaporation sous N₂

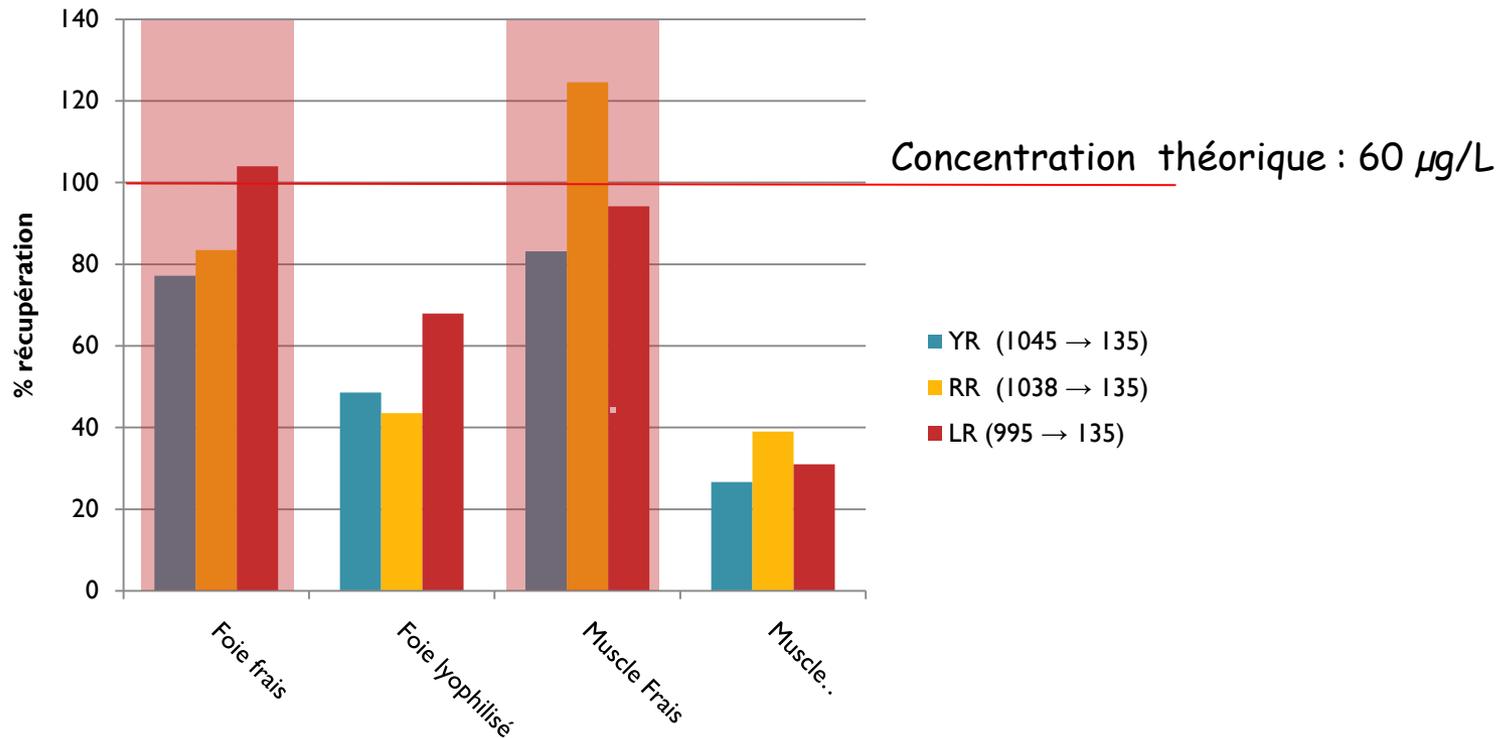
+

500µL MeOH 100%



I- Mise au point de méthodes

Méthode d'extraction : Tissue frais vs lyophilisé



> L'extraction est meilleure avec les tissus frais

I- Mise au point de méthodes

Conclusion

- Extraction plus efficace à partir des tissus frais
- Récupération égale quel que soit la concentration
- Durée totale de 4 H + Chromato. 7min



I- Mise au point de méthodes COMPARAISONS

Smith, J. L. et G. L. Boyer (2009).	MeOH Sonication Centrifugation	préparation du thiol-LR Lyophilisation	Thiol-LR >12H Lyoph. 72H Chromato. 40 min	60-99 %
Dai, M., P. Xie, et al. (2008).	ODS cartridge Sonication Centrifugation	Lyophilisation HLB cartridge Silica cartridge	Prep. ODS >2H 2 x SPE 2H Chromato. 22 min	91-103 %
Xie L. et Park H.D. (2007)	HLB cartridge Silica cartridge	Lyophilisation	Lyoph. + 70 min min. 2H / cartridge Chromato. 20 min	83-97 %
Bogialli, S., M. Bruno, et al. (2005).	H ₂ O pH 2 Haute température	préparation du système de filtration « homemade »	Chromato. 30 min	62-81 %
Nouvelle méthode	MeOH Sonication Centrifugation	Filtration rapide	Total ~ 4 h 7 min	Min. 83 %



Objectifs spécifiques

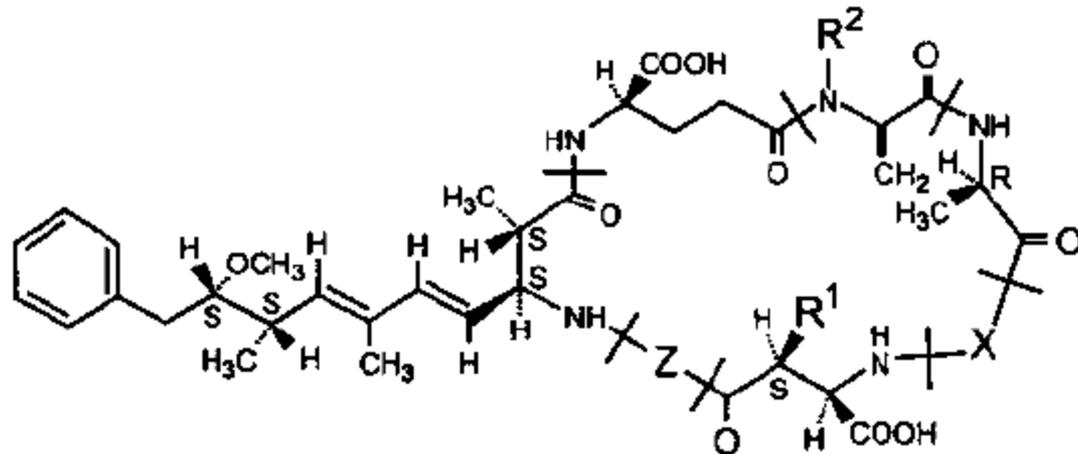
1. Mettre au point de méthodes d'extraction et de détection rapide et efficace
2. Toxicocinétique
 1. Développement de modèle
 2. Paramétrage
 3. Expositions de poissons en milieu contrôlé
3. Simuler l'exposition chez l'humain

2 Toxicocinétique

Microcystines

- Plusieurs études ont démontré leur présence dans la chair et les organes des poissons (Magalhaes et al. 2003; Mohamed et al. 2003; Ozawa et al. 2003; Xie et al. 2004; Yokoyama and Park 2002)
- Toxicocinétique
 - Connaissances minimales chez les poissons, ni chez les mammifères
 - Passage au travers les membranes cellulaires est difficile (Vesterkvist and Meriluoto 2003)
 - Accumulation particulière dans le foie (Falconer and Yeung 1992; Fischer et al. 2000)

MC-LR (MW: 995.2)
MC-RR (MW: 1038.2)
MC-YR (MW: 1045.2)





2.1-Modélisation toxicocinétique à base physiologique (TCBP)

- Description mathématique des processus d'absorption, de distribution, de biotransformation et d'excrétion permettant de simuler/prédire les concentrations sanguines ou tissulaires en fonction du temps et de l'exposition

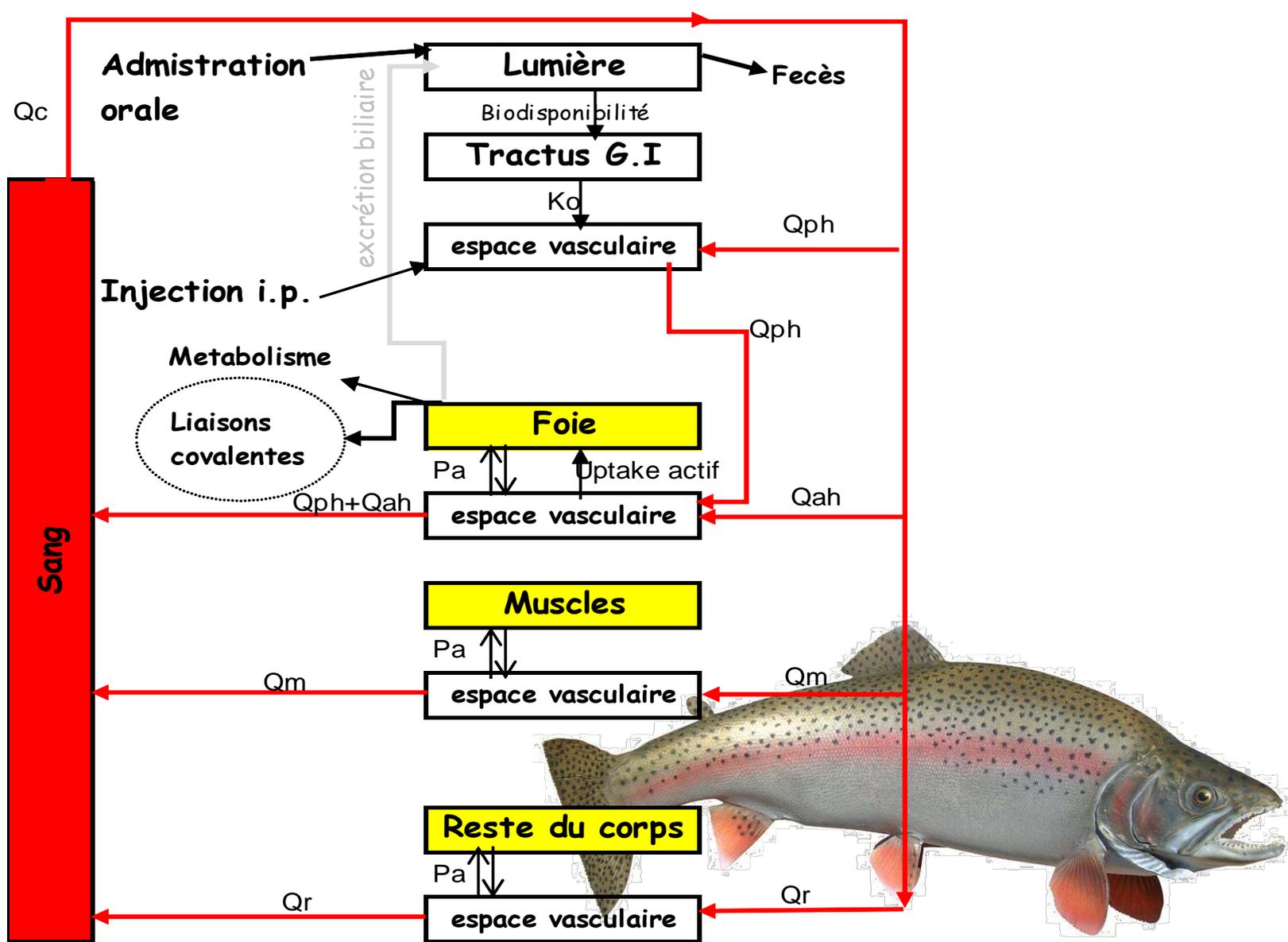


Figure 1. Représentation conceptuelle du modèle TCBP des cyanotoxines chez le poisson (truite et perchaude).

Modélisation TCBP

Utilité : Extrapolation interespèce



Extrapolation



Spécifique à l'espèce:

- Coeff. de partage
- Débits
- Volumes
- Enzyme [C]

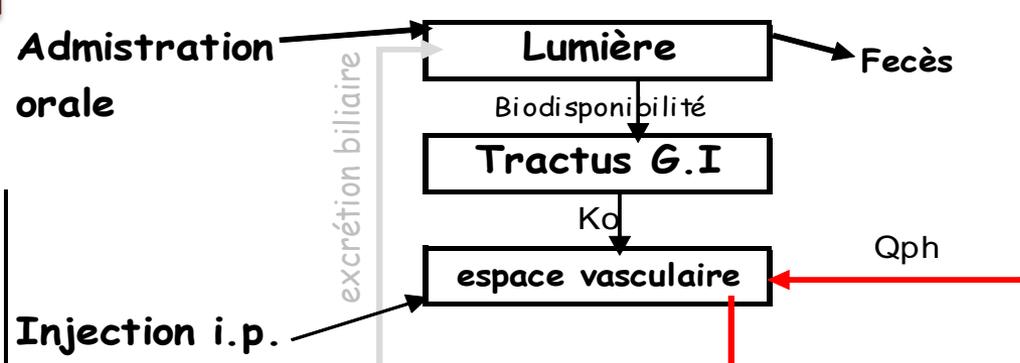
INVARIANT:

- V_{max_c}
- Km

Spécifique à l'espèce:

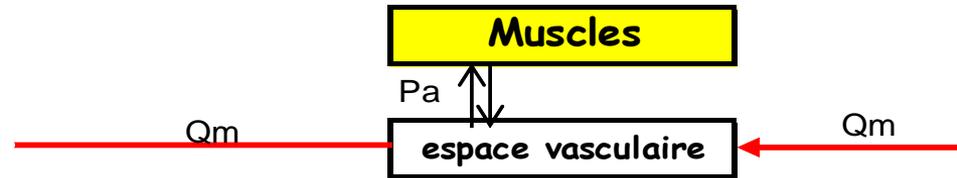
- Coeff. de partage
- Débits
- Volumes
- Enzyme [C]

Absorption



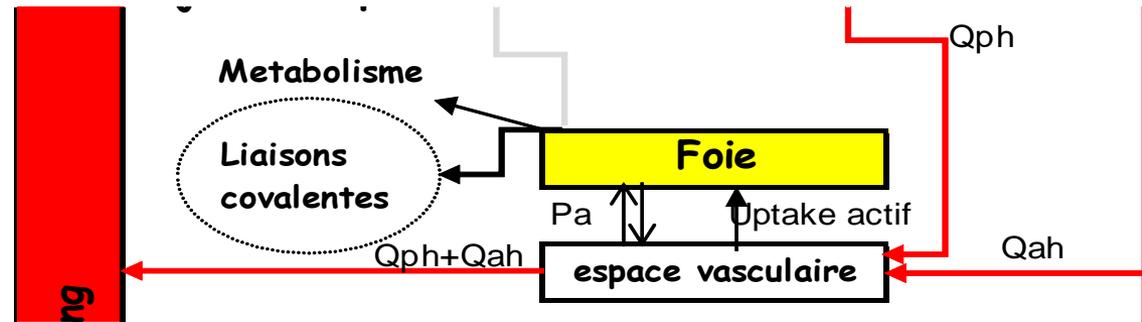
- DOSE Disponible = **BD** x Dose orale
- $TAG_i = Q_{ph} (C_a - C_v) - TAG_{it} - R_{tract}$
- $TAG_{it} = \text{Dose disponible} \times K_o$
 - dose absorbée

Distribution aux tissus (ex. muscles)



- Espace vasculaire
 - $T_{Asm} = Q_m * (C_a - C_{vm}) - T_{Atm}$
- Tissu
 - $T_{Atm} = P_{am} * (C_{vm} - (C_t / P_{rm}))$

Distribution et métabolisme au foie



- Espace vasculaire

- $T_{Asf} = (Q_{ph} * C_{vGi}) + (Q_{ah} * C_a) - ((Q_{ah} + Q_{ph}) * C_{vf}) -$
 $- P_{af} * (C_{vf} - (C_t / Prf))$
 $- TUPT$

- Tissu

- $T_{Atf} = P_{af} * (C_{vf} - (C_t / Prf)) + TUPT - T_{met} - T_{Met2}$
- Transport actif (1^{er} ordre)
 $TUPT = C_{lint} * C_{vf}$
- Métabolisme (saturable)
 $T_{met} = V_{max} * C_f / (K_m + C_f)$
- Liaisons covalentes (1^{er} ordre)
 $T_{met2} = K_f * C_f$



2.2 Modélisation TCBP

Paramétrage

- Paramètres Nécessaires
 - Paramètres
 - Physiologiques des poissons
 - volumes tissulaires
 - débit sanguins aux tissus
 - Physicochimiques
 - Coefficients de partage tissu : sang
 - Biochimiques
 - Constantes reliées au métabolisme
 - Constante relié aux liaisons covalentes
 - Constante de perméabilité
 - Données cinétiques pour ajuster et valider le modèle
 - Concentrations sanguines
 - Concentrations tissulaires

2.2 Paramétrage

Paramètres physiologiques

Paramètres physiologiques		Valeur
Poids corporel du poisson ¹⁾ (g)	BW	104
Débit cardiaque ¹⁾ (ml/hr/g)	KQCR	64,48
VOLUMES: Fraction du poids corporel ^{a)}		
	Fraction au Foie KVF	0,013
	Fraction au GI KVGI	0,048
	Fraction au reste du corps KVR	0,063
	Fraction aux Muscles KVMP	0,836
	Fraction sang total ²⁾ KVB	0,04
	TOTAL	1,00
Espace vasculaire : Fraction du volume du tissu ^{a)}		
DEBIT : Fraction du débit sanguin (Qc) ^{a)}		
	Foie KQFR	0,029
	GI KQGI	0,174
	Reste du corps KQR	0,145
	Muscles KQMP	0,652
	TOTAL	1,000

2.2 Paramétrage

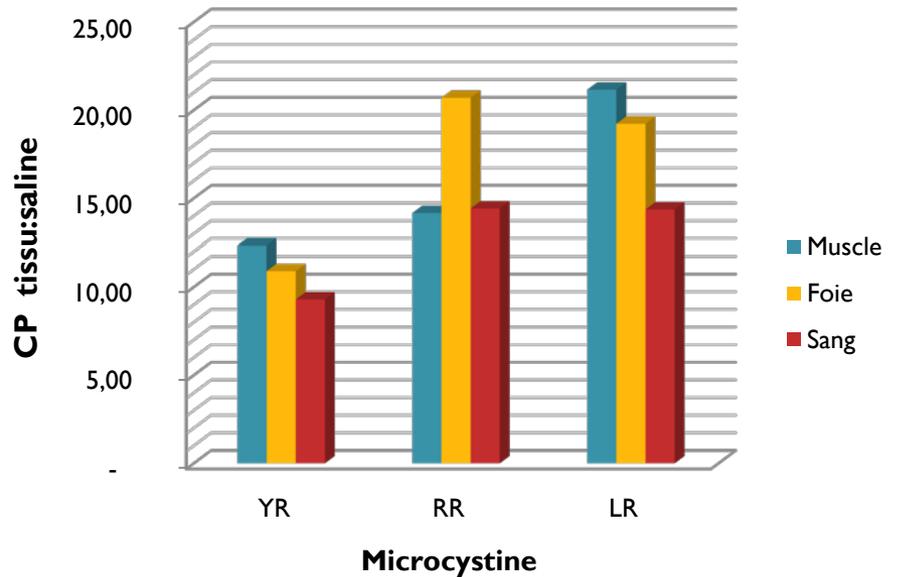
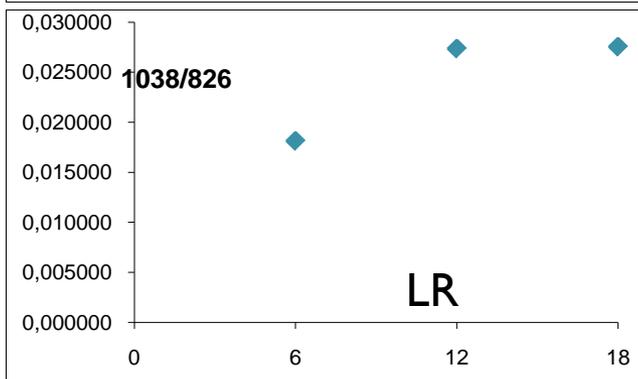
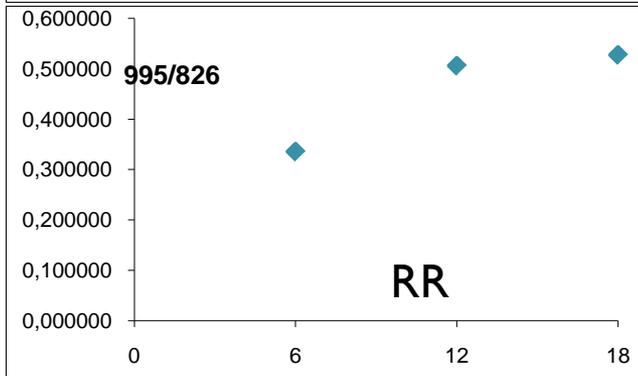
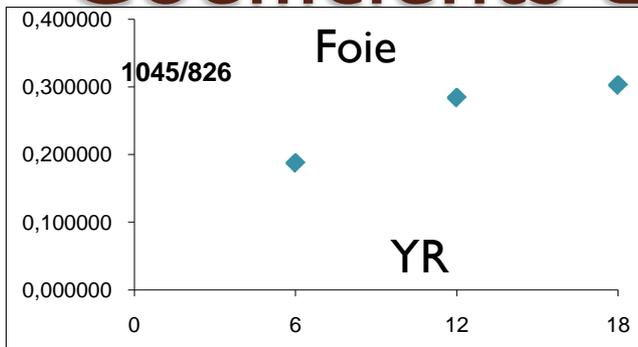
Coefficients de partage (CP)

- Détermination de CP tissus :
sang
 - Dialyse à l'équilibre (RED device de Pierce)
 - Mesure tissue : saline
 - Muscle (chair)
 - Foie
 - Sang
 - Incubation à 4°C
 - Temps d'équilibration ~15 h
 - 100 µl tissu pour 900 µl de saline
 - 0.6 µg



2.2 Paramétrage

Coefficients de partage (CP)



	CP tissu:sang		
	YR	RR	LR
Muscle:sang	1,3	1,0	1,5
Foie :sang	1,2	1,4	1,3



2.2 Paramétrage

Autres paramètres

- BD et K_o
- Métabolisme : V_{max} et K_m
- Liaisons covalentes : K_f
- Uptake actif : C_{int}
- Perméabilité : P_a pour chaque compartiment

- Tous seront optimisés sur les cinétiques obtenues d'expositions in vivo

2.3 Expositions animales en milieu contrôlé

- Exposition Orale
- Exposition i.p. 14C-microcystine



2.3 Expositions animales en milieu contrôlé

Exposition orale

- Enfin prêt pour les expositions !!!!
 - Poissons dans nos bassins
 - MC-LR en stock (achetés 11 mg @ 3740 USD)
 - À partir de fleurs d'eau (insuffisant et contraint par les conditions environnementales)
- Exposition 10 jours à 50 $\mu\text{g}/\text{j}$ par poisson
 - Moulé vaporisé MC (éthanol)
 - Deux autres doses...
- Échantillons (n=4; total: 32 poissons/dose):
 - 0, 1j, 3j, 10 j (période d'exposition)
 - 12 h, 24h, 48h, 10 j (période d'épuration)
 - Sang, foie, muscle, carcasse



2.3 Expositions animales en milieu contrôlé

Exposition orale



Exposition i.p. ^{14}C -microcystine

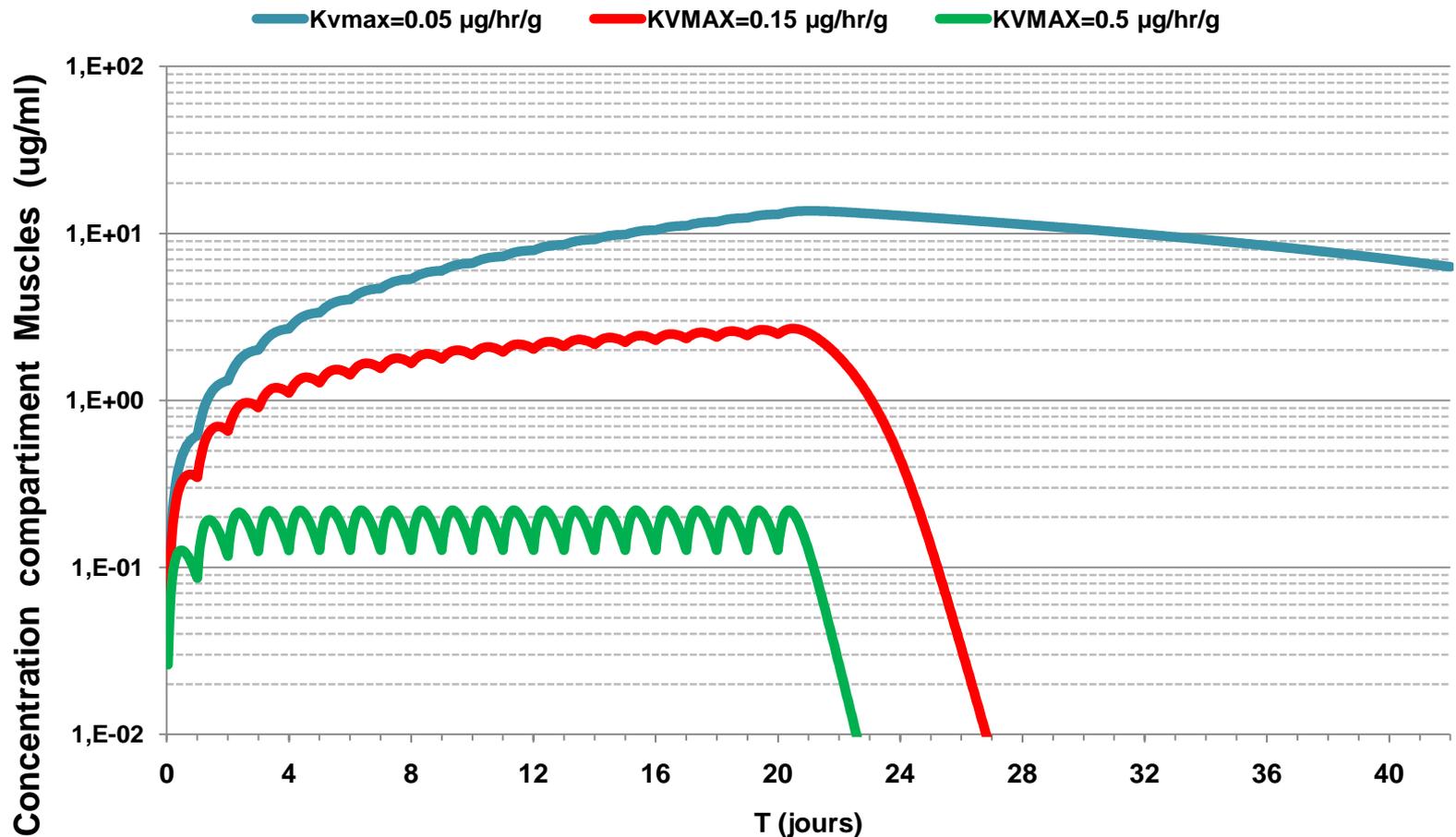
- 3 doses à ^{14}C -microcystine LR
- Incubation cyanobactéries
 - 10 mCi $^{14}\text{C}\text{-H}_2\text{CO}_3$
- Extraction/purification
- Exposition 1 dose i.p. bolus
 - 60min | 20 min, 24 hr
 - Cinétique sanguine, Hépatique , muscle, carcasse
 - Fraction libre et liée de façon covalente
 - Fractions biotransformée.



Comportement du modèle

Impact du métabolisme

Effet de la variation du métabolisme
sur la concentration musculaire

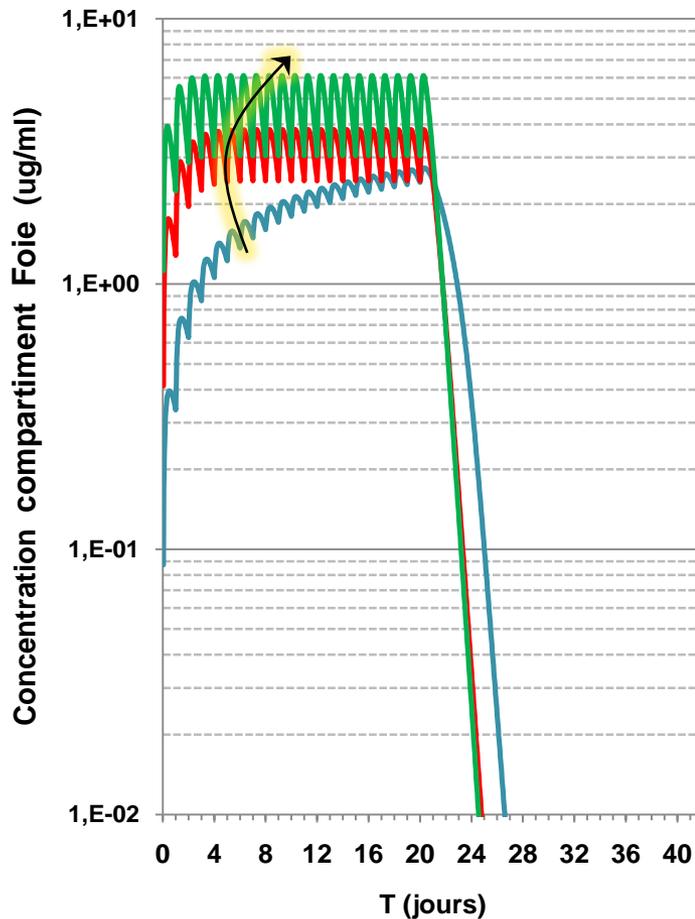


Comportement du modèle

Impact du uptake actif hépatique

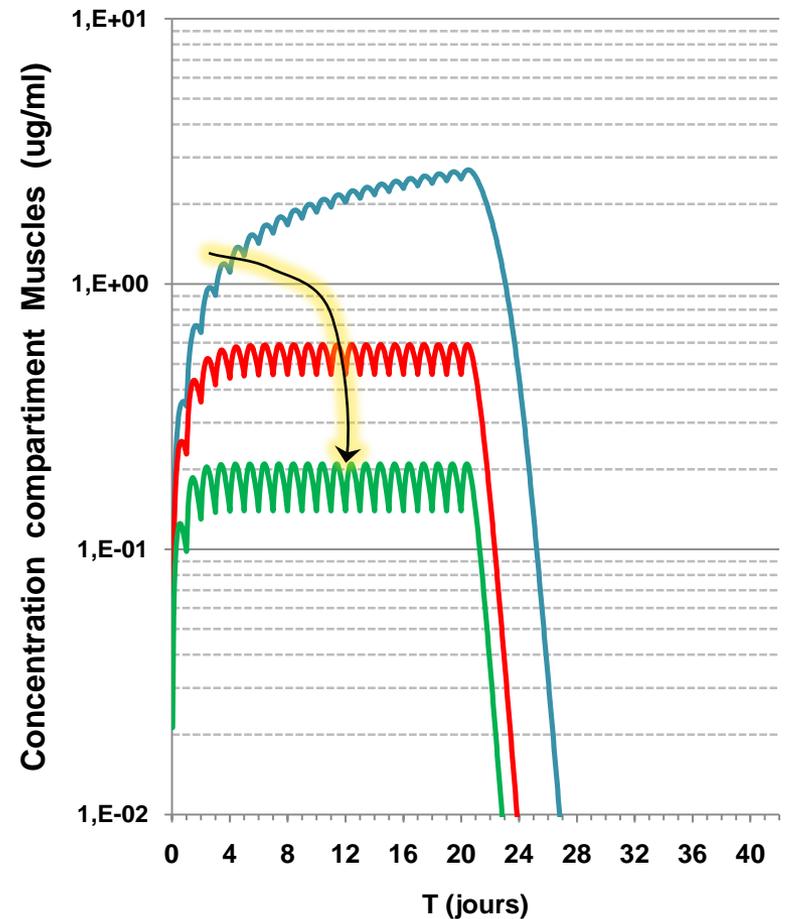
Effet sur la concentration hépatique

— Kclintr: 0.0 ug/h/g — Kclintr: 0.10 ug/h/g
— Kclintr: 0.50 ug/h/g



Effet sur la concentration musculaire

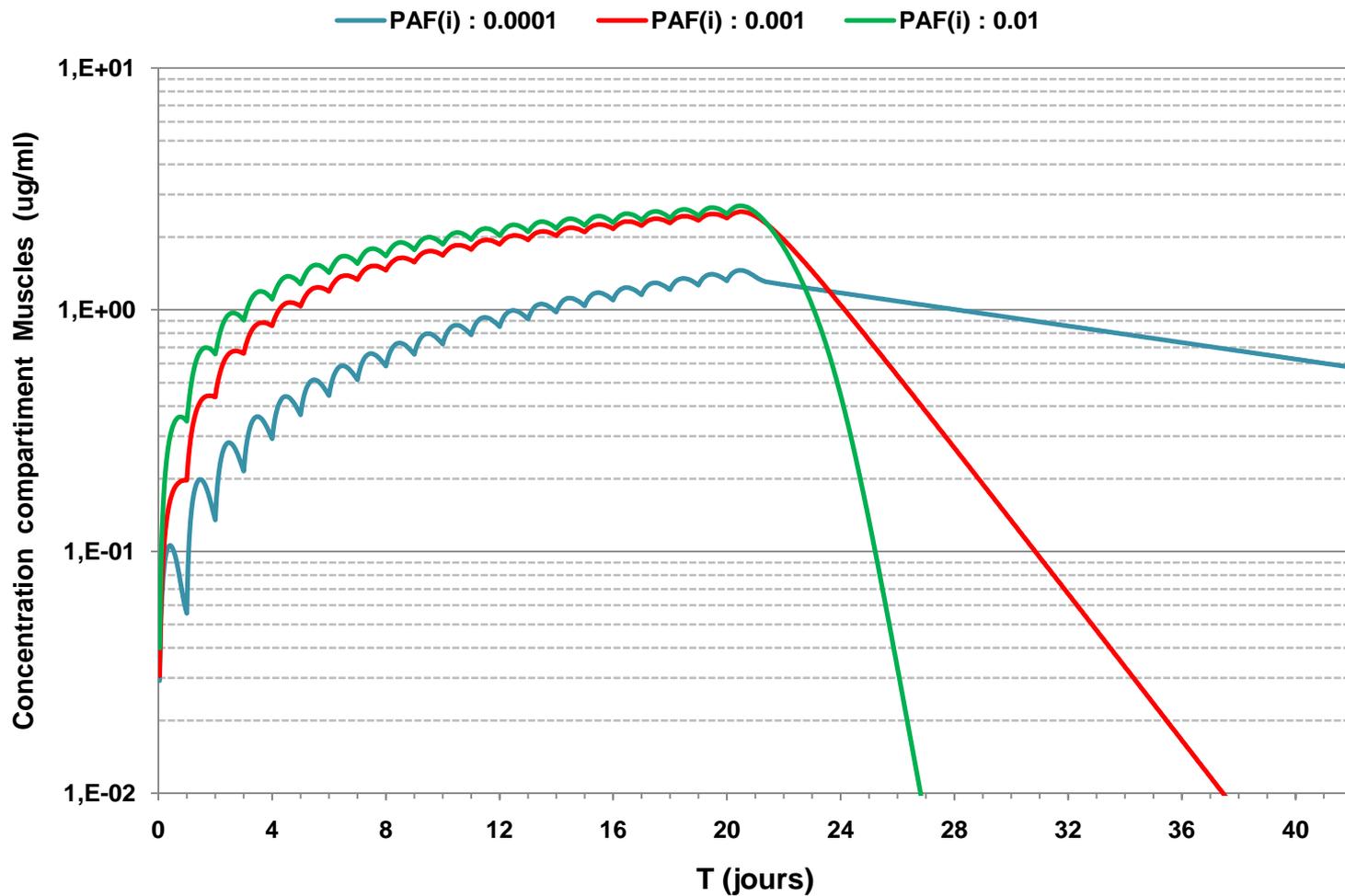
— Kclintr: 0.0 ug/h/g — Kclintr: 0.10 ug/h/g
— Kclintr: 0.50 ug/h/g



Comportement du modèle

Impact de la perméabilité membranaire

Effet de la variation de la diffusion
sur la concentration musculaire



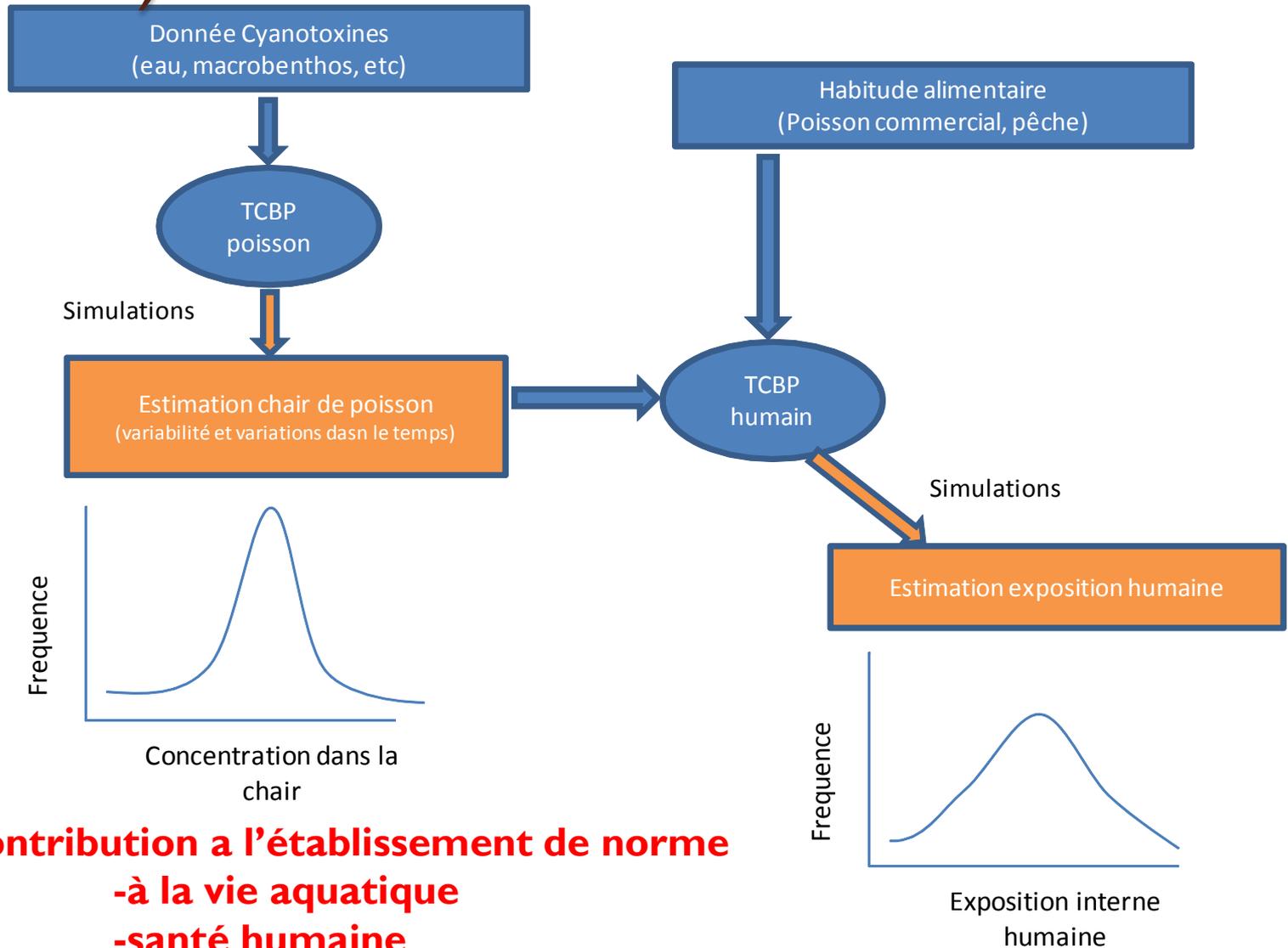
3-Estimation de l'exposition

Objectifs

- Simuler les niveaux chez les poissons en milieu naturel en fonction des variations temporel en cyanobactéries
- Simuler l'exposition humaine via la chair de poisson par les habitudes alimentaires



Estimation par Simulations (objectif final)



Contribution a l'établissement de norme
-à la vie aquatique
-santé humaine

Reste à faire

- Expositions
 - Truites
 - IP (cyano I4C)
 - Oral
 - Perchaudes
 - Extrapolation de modèle et Validation de l'extrapolation
 - Estimation de l'exposition humaine



Période de questions...



I- Mise au point de méthodes

Méthode d'extraction : Tissue frais vs lyophilisé

	NODULARINE	Effet matrice moyen en %
Foie Frais	61752	-19,24
Foie Lyophilisé	57528	-24,76
Muscle Frais	79007	3,33
Muscle Lyophilisé	77230	1,00

- > Pas d'effet matrice dans le muscle
- > Effet matrice moyen de 22% dans le foie

Limite de détection

- Limite instrumentale de détection (estimé)
 - MC-YR : 7.8 pg (0.78 µg/L)
 - MC-RR : 62.6 pg (6.26 µg/L)
 - MC-LR : 3.9 pg (0.39 µg/L)
 - MC-LF : 0.9 pg (0.09 µg/L)



Test de formulation

	% recuperation					
	MC-LR		MC-RR		MC-YR	
	995	498	1038	520	1045	523
	Extraction sur la moulée mise dans 500 uL d'eau					
T0	84,27	41,01	105,00	44,97	90,72	30,37
T 30sec	118,87	39,45	133,85	37,27	96,06	25,07
T 1min	104,98	31,20	128,13	33,29	107,49	17,69
T 2min	199,26	55,03	229,31	56,00	150,94	37,90
T 5min	99,72	18,60	114,33	29,52	93,81	15,60
	Mesure des toxines dans les 500 uL d'eau					
T0	-0,69	-3,19	-2,01	-2,53	1,23	-5,86
T 30sec	16,63	9,22	25,94	13,92	16,55	3,85
T 1min	24,23	15,49	29,34	16,86	21,35	6,40
T 2min	20,16	11,15	24,84	14,13	17,96	4,87
T 5min	31,80	16,21	48,76	16,23	30,38	8,41
	Extraction sur la moulée mise dans 25 mL d'eau					
T0	104,42	51,65	132,85	35,85	95,60	28,07
T 30sec	106,81	25,74	104,63	31,81	85,33	18,90
T 1min	110,28	70,35	135,35	29,45	90,75	23,29
T 2min	119,43	33,13	117,02	32,88	80,62	20,32
T 5min	57,63	16,35	54,07	22,17	43,56	6,41

I- Mise au point de méthodes

Méthode analytique: comparaison interlaboratoire

Tableau 3. Comparaison d'analyses par LC-MS/MS de cultures de cyanobactéries préparées dans le laboratoire de Philippe Juneau.

Echantillon Id #	MC-LR (µg/L)		MC-RR (µg/L)		MC-YR (µg/L)		MC-LF (µg/L)		Anatoxine (µg/L)	
	UQAM	CEAEQ	UQAM	CEAEQ	UQAM	CEAEQ	UQAM	CEAEQ	UQAM	CEAEQ
1	32	14	--	--	--	--	--	--	--	--
2	158	85	--	--	--	--	--	--	--	--
4	304	180	--	--	--	--	--	--	--	--
12	2493	1200	--	--	--	--	--	--	--	--
18	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
19	1030	480	230	250	159	120	--	--	--	--
20	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
21	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
22	1250	510	--	--	--	--	--	--	--	--



I- Mise au point de méthodes

Efficacite vs Concentration

Truite Arc en Ciel



Foie

Muscle

500 mg de tissu
+ toxines (12h à 15°C) ⇒ 0 - 240 µg/L

Introduction

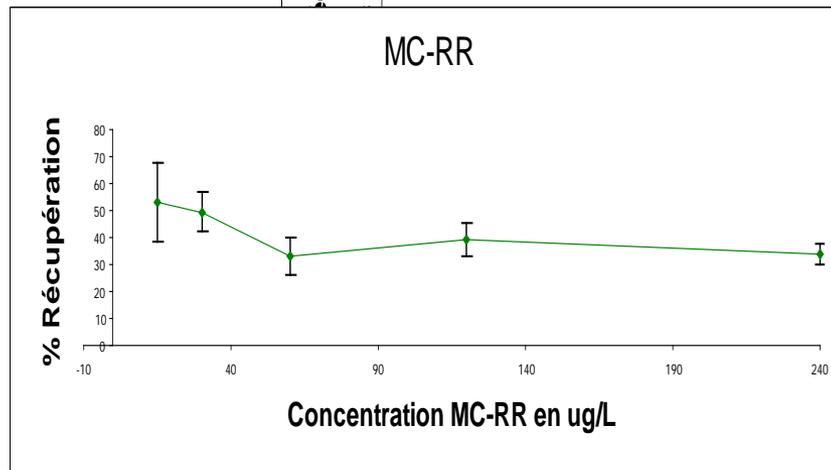
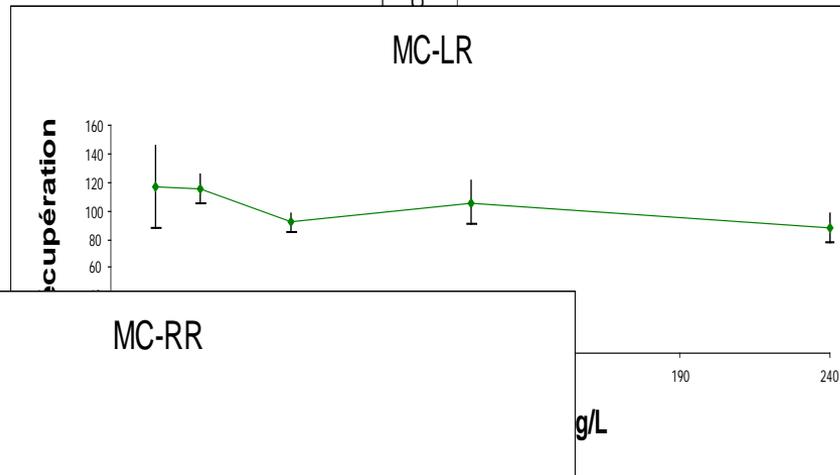
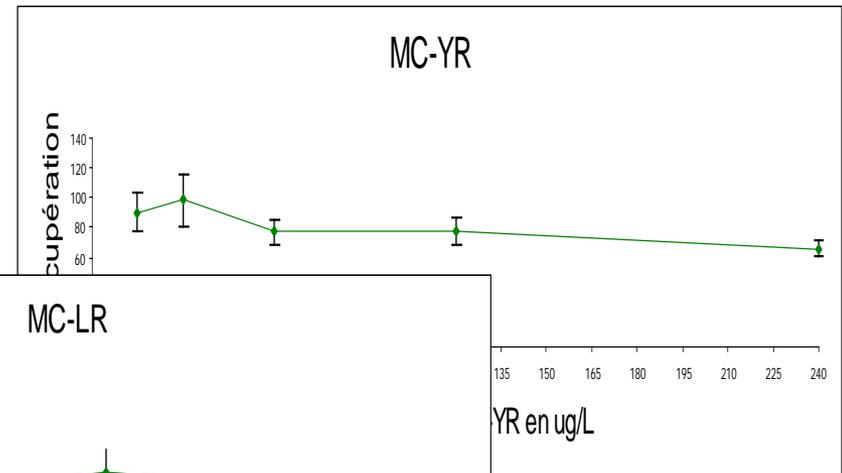
- Microcystines
 - hépatotoxines (van Apeldoorn et al. 2007)
 - stables et persistantes dans l'environnement (van Apeldoorn et al. 2007)
 - toxines les plus fréquentes en eau douce (~70 variantes)



I- Mise au point de méthodes

Efficacite vs Concentration

FOIE





4-Simulation de l'exposition

Échantillonnage (petits poissons et macrobenthos) - Été 2008

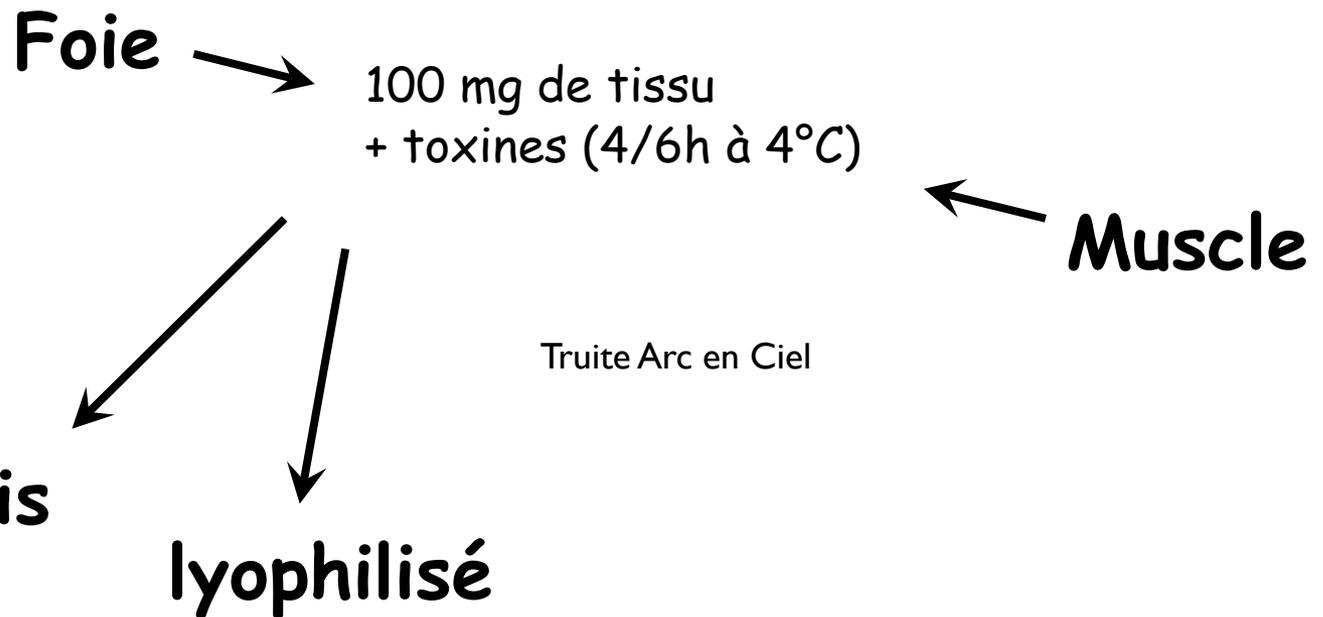
- Réservoir Choinière du Parc Yamaska, Lac Stukley du Parc Orford, Lac Saint-Pierre (section sud-ouest),
- Effectué par l'équipe de Philippe Brodeur (MRNF)
 - Poissons (2-3 cm)
 - Capture par filet (seine)
 - Identification des espèces
 - congelés (glace sèche) sur le terrain et conservés à -20°C pour analyses
 - Sédiments
 - Échantillonneur du type Ponar
 - 50 L de sédiments / site.
 - rincés et tamisée (jusqu'à 2 mm) pour obtenir des organismes consommés par la perchaude.
 - Fond des lacs échantillonné avec un râteau pour les organismes associés aux algues et aux cyanobactéries filamenteuses ainsi qu'aux macrophytes.
 - peu d'organismes macrobenthiques obtenus et masse totale insuffisante pour les analyses



I- Mise au point de méthodes

Méthode d'extraction : Tissue frais vs lyophilisé

Maquereau





2-Expositions animales en milieu contrôlé

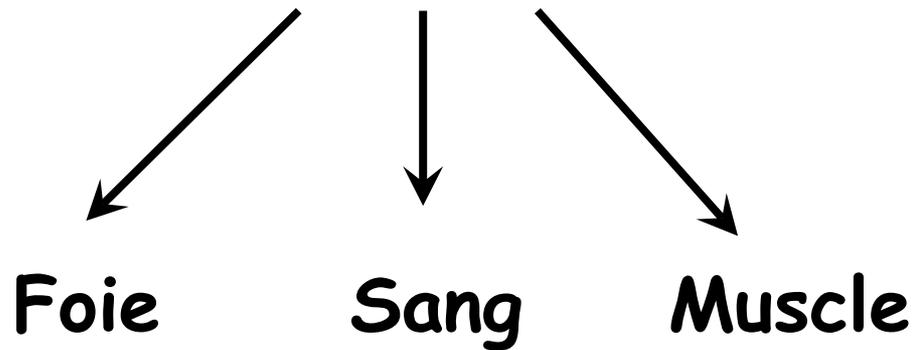
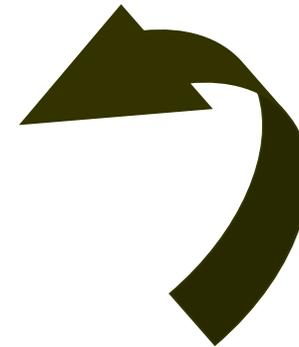
Exposition orale: Formulation

- Vaporisation d'extraits méthanoliques de cyanobactérie sur moulée de poisson
- Tests de perte par dissolution dans l'eau
 - Temps maximal de flottaison de la moulée avant déglutition : 2 min.
 - Test dans volume d'eau de 500 μ L et 25 ml.
 - Mesure
 - de la récupération dans les billes des moulé
 - l'apparition de MC dans l'eau
- Aucune perte appréciable de MC sur la moulé n'était remarquée dans les 2 min après la mise en eau.

2-Expositions animales en milieu contrôlé

Exposition orale: Établissement des doses

Truite Arc en Ciel



Extraction sur la **totalité** du tissu

2-Expositions animales en milieu contrôlé

Exposition orale: Établissement des doses

		Concentration tissulaire (ng MC-LR / g de tissu)	
		Test	Mohamed et al. (2003)
Prelev. +6H	Muscle	0.13	102
	Foie	4.47	531.8
	Sang	-	-
Prelev. +24H	Muscle	0.09	102
	Foie	1.36	531.8
	Sang	-	-

Oreochromis niloticus

Egypte

Bloom *Mioscystis aeruginosa* 7.5 mg MC / L



2-Expositions animales en milieu contrôlé

Exposition orale: Source de microcystine

- Design expérimental initial : 28 jours d'exposition et 28 post-exposition
 - 6 truites par temps de sacrifice : j1, j7, j14, j28, **j35, j42, j48 et j56**
 - 972 portions de moulée/dose d'exposition = 48.6 mg de cyanotoxines
- Rendement de culture de cyanobactéries :
 - 116 µg /L de culture dans 6 L de milieu stérile (toutes microcystines).
 - ~100 culture de 6L / dose d'exposition
- Rendement de production à grande échelle (aquarium de 250 L) (milieu non stérile)
 - Rendement en cyanobactérie 20% des culture de 6L en milieu stérile
 - Environ 20 à 25 µg MC / L (3 mg par aquarium).
 - !!! ~15 cultures de 250 L à 10 à 12 jours de croissance, → 6 mois pour la première exposition.



2-Expositions animales en milieu contrôlé

Exposition orale: Source de microcystine

- Nous avons pu récolter 10 mg jusqu'à maintenant
- Modification du design d'exposition
 - Réduction de quantité de cyanotoxines de moitié
 - le nombre de poisson par groupe de 6 à 4
 - le temps d'exposition de 28 j à 21 j.
- Récolte d'environ 10 L de cyanobactéries concentré
 - Fleurs d'eau en septembre 2010 (Réservoir Choinière)
 - Lyophilisation et extraction en cours