

# Développement d'une batterie de biotests pour l'évaluation de la toxicité de mélanges de cyanotoxines produits lors d'efflorescences de cyanobactéries

**Philippe Juneau**

Laboratoire d'écotoxicologie des microorganismes aquatiques

Université du Québec à Montréal

Département des sciences biologiques-TOXEN



## En collaboration avec:

**Christian Bastien, MDDEP**

**Christian DeBlois, MDDEP**

**Christian Blaise et François Gagné, Environnement Canada**

**Radovan Popovic, UQAM**

**François Bellemare, Lab-Bell inc.**

**Marie-Claude Perron, UQAM**

**Charles Deblois, UQAM**

**Kui Xu, UQAM**

**Éloïse Veilleux, MDDEP**

**Nathalie Boucher, Lab-Bell inc.**

**Malorie Gélinas, Environnement Canada - UQAM**

# Plan de la présentation

- Problématique
- Objectifs
- Méthodologie
- Résultats : Standards et extraits de cultures  
Mélanges de standards  
Extraits du terrain
- Conclusions et applicabilité

# Les floraisons de cyanobactéries

- Problématique mondiale
- Prolifération en masse
- Influencées par :
  - Nutriments
  - Lumière
  - Température
- Répercussions importantes:
  - Activités récréatives et commerciales
  - Santé humaine et animale



# Toxiques vs Non-Toxiques

- Certaines espèces/souches produisent des toxines
- Distinction visuelle impossible
- Détection rapide essentielle



?



- Basés sur la toxicité « réelle » d'un échantillon
- Une grande variété de bioessais existe
  - *in vivo* sur la souris
    - > problèmes éthiques et coûteux
  - Tests biochimiques (PP, ELISA, ...)
    - > Ne représente pas la toxicité globale sur les organismes aquatiques
  - Utilisation de crustacés, d'insectes, plantes, bactéries
    - > Sensibilité variable, coûts relativement faibles
  - Bioessais émergents (fluorescence chlorophyllienne)
    - > faible coût et rapidité

# Principaux objectifs

- Étudier la sensibilité à différentes cyanotoxines (seule ou en mélanges) de certaines trousse commerciales, de bioessais émergents et de biomarqueurs biochimiques
- Développer sur la base des différentes sensibilités des bioessais, une batterie de quelques bioessais afin d'évaluer le potentiel de risque des efflorescences de cyanobactéries
- Développer une méthode de détection et quantification, par LC-MS/MS, des variantes de microcystines pour lesquelles les standards ne sont pas disponibles
- Valider l'utilisation des bioessais avec des échantillons d'eaux provenant de sites contaminés par les cyanobactéries

# Tests effectués

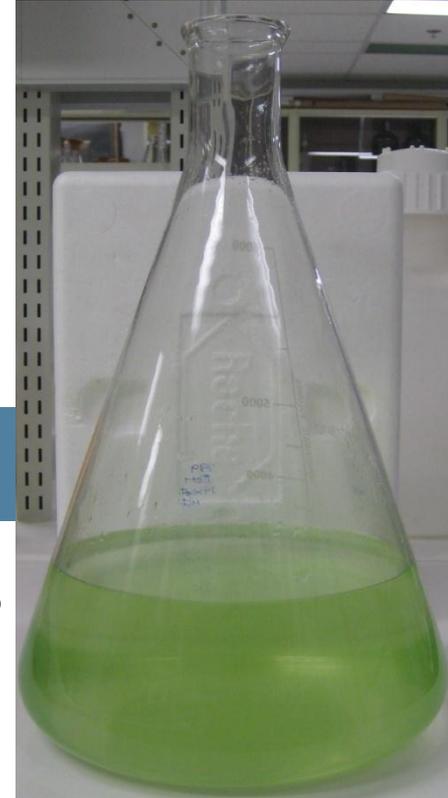
- Trousses commerciales:
  - ThamoToxkit (*Thamnocephallus platyurus*)
  - Rotoxkit (*Brachionus calyciforus*)
- Tests biochimiques:
  - Inhibition des protéines phosphatases (PPI)
  - *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* (ELISA)
  - Métabolisme de la truite arc-en-ciel
- Bioessais émergeants:
  - Bioessais basés sur la fluorescence chlorophyllienne

# Cyanotoxines extraites

- Culture de *Microcystis aeruginosa*
  - Extraction
  - Dosage (MC-LR et <sub>MC-RR</sub>)

## Standards de cyanotoxines

- Standards commerciaux de cyanotoxines
  - MC-LF
  - MC-RR
  - MC-YR
  - MC-LR



## Extraits d'échantillons de terrain

Réservoir Choinière

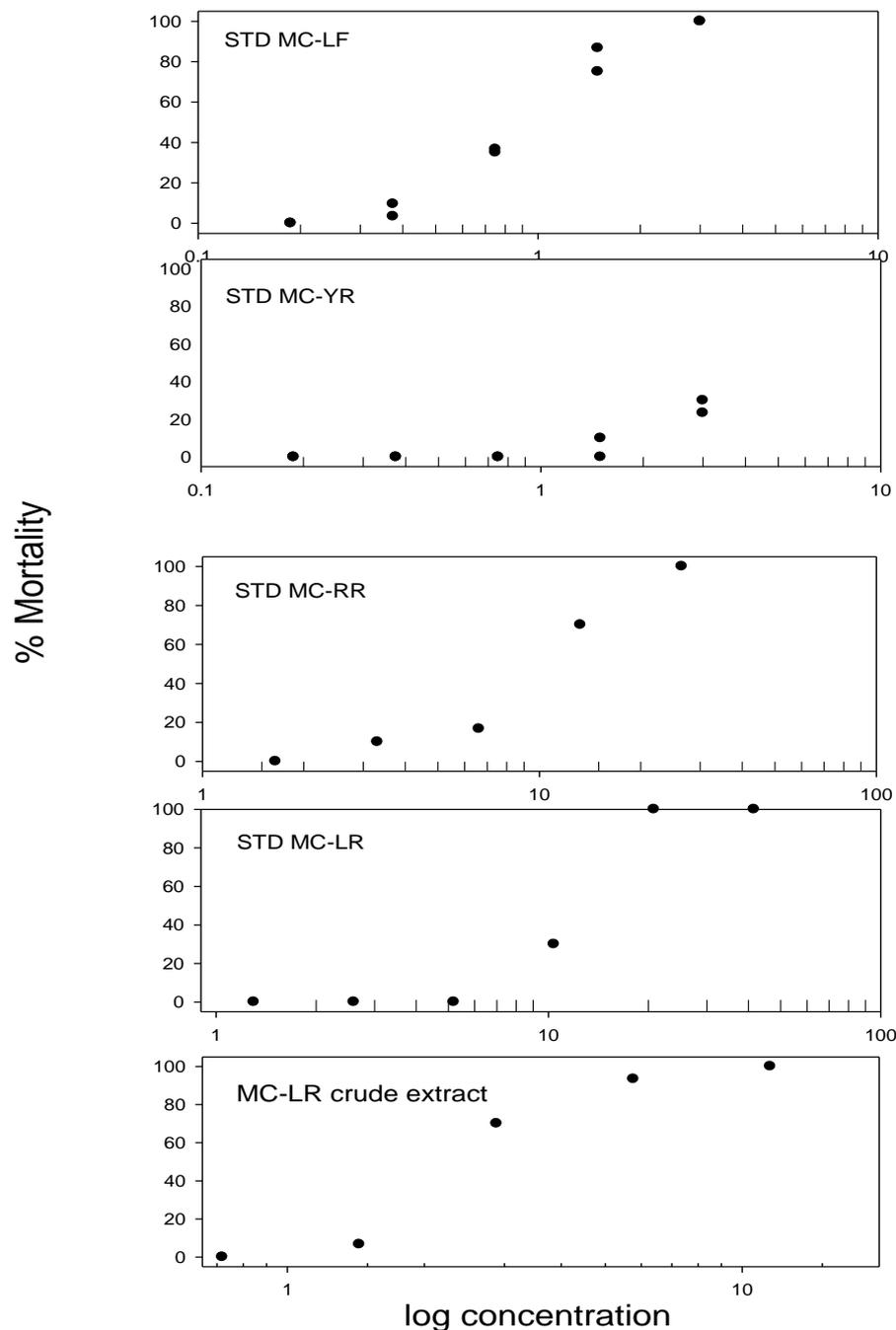
# 1) Trousses commerciales (ThamnoToxkit)

- Utilisation du crustacé *Thamocephallus platyurus*
- Détermination de la mortalité après 24h (LC50)



**Courbes dose-réponse obtenues avec 4 standards de MC (MC-LF; MC-YR; MC-RR and MC-LR) et l'extrait brut de microcystines provenant d'une culture de *M. aeruginosa***

LC50 : MC-LF = 0,8  $\mu\text{g/ml}$   
 MC-YR = nd  
 MC-RR = 10  $\mu\text{g/ml}$   
 MC-LR = 10  $\mu\text{g/ml}$   
 Extrait brut = 2,61  $\mu\text{g/ml}$



# 1) Trousses commerciales (Rotokit)

- Utilisation du rotifère *Brachionus calyciflorus*
- Détermination de la mortalité après 24h (LC50)
- Sensibilité plus faible que les autres tests



## 2) Tests biochimiques (PPI et ELISA)

- Tests réalisés en parallèle des autres tests
- Grande sensibilité :  $IC_{50} = 2-3\mu\text{g/L}$  (PPI) et  $0,3-0,4\mu\text{g/L}$  (ELISA)
- Par contre, relativement coûteux et demande un certain temps (2,5-3,5 heures)

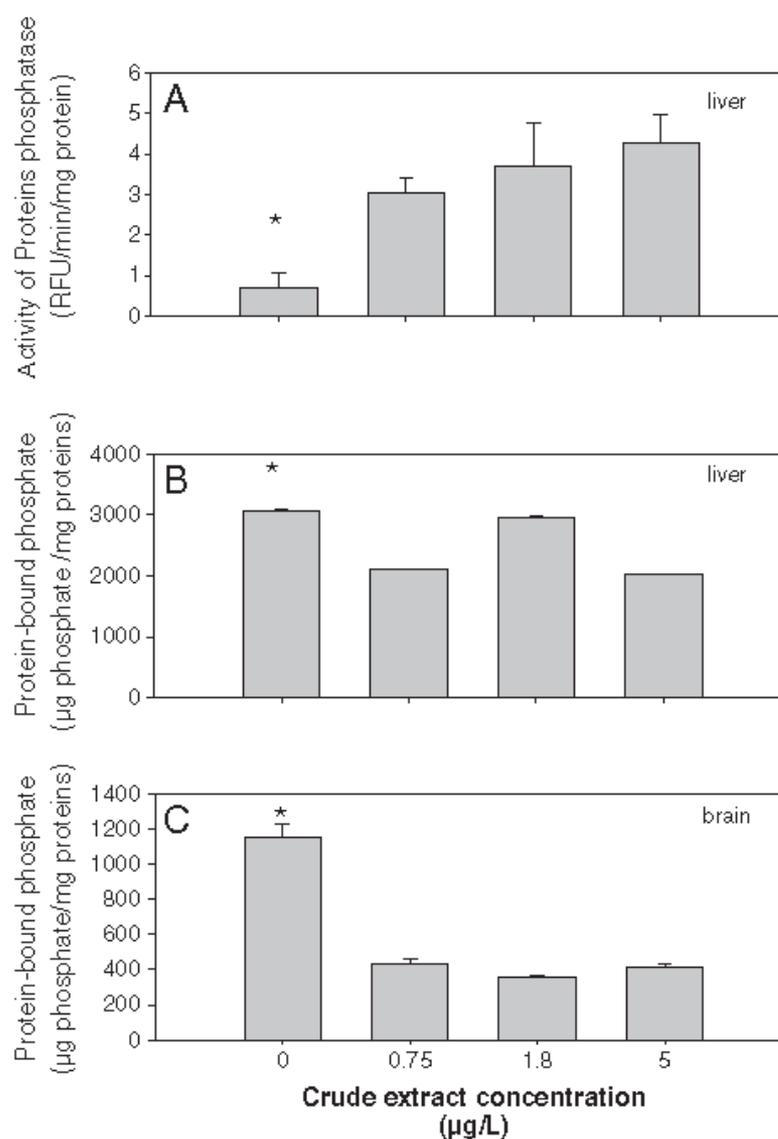


## 2) Tests biochimiques (Métabolisme de la truite arc-en-ciel)

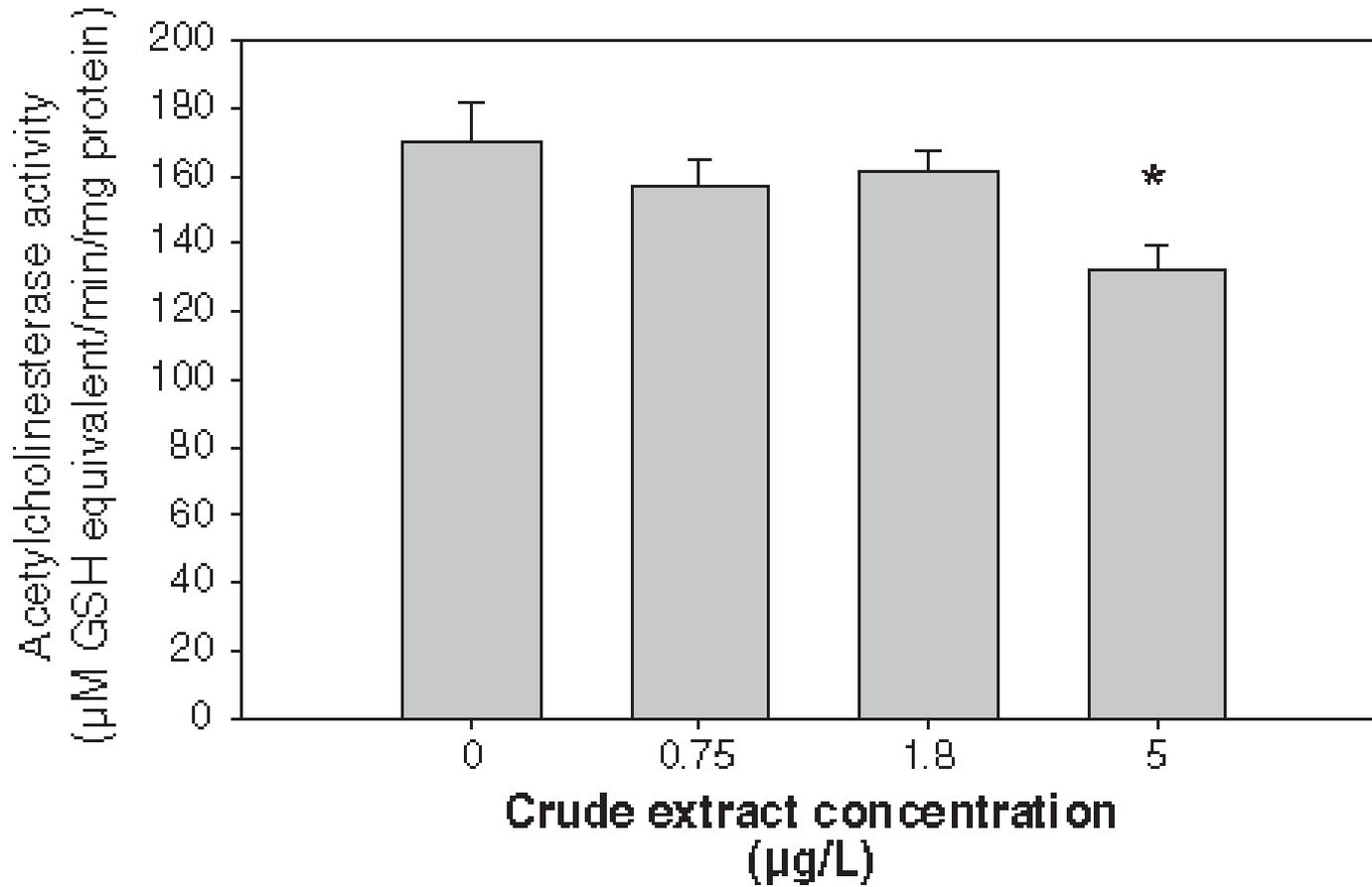
Traitements à l'extrait de toxines (0-5  $\mu\text{g/L}$  MC-LR) pour 96 heures

- Foie:
  - Phosphate liés aux protéines
  - Activité des phosphatases
  - État de phosphorylation des métallothionéines
- Cerveau:
  - Activité de l'acétylcholinestérase
  - Activité de l'ATPase dépendante du sodium

**Informations sur l'action des extraits de microcystines chez le poisson, mais difficilement utilisable pour des analyses répétitives**



A) Activité de la *protéine phosphatase* dans le foie des truites, B) Phosphate lié aux protéines dans le foie et C) phosphate lié aux protéines dans le cerveau



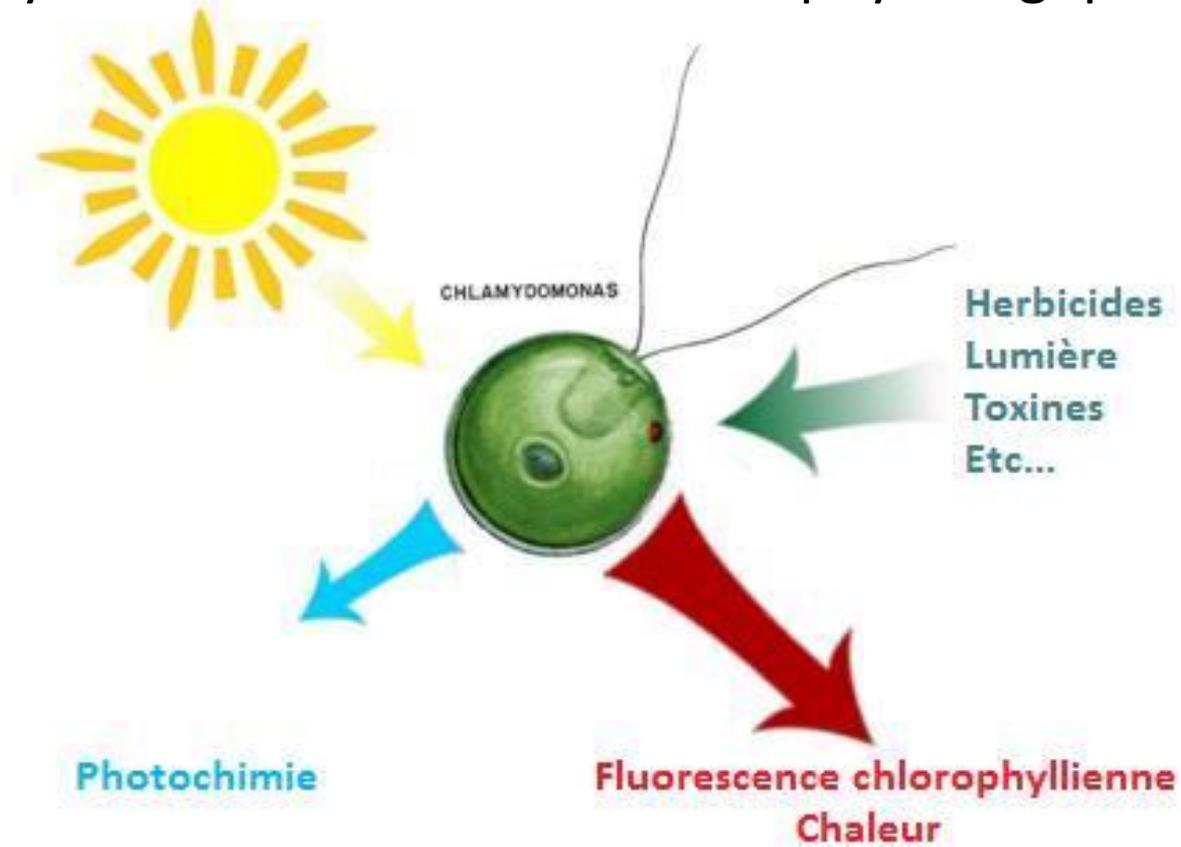
Diminution de l'activité de l'acétylcholinestérase dans le cerveau

MC passe à travers la barrière sang-cerveau chez les grenouilles (Fisher et al. 2005)

Une concentration de 0,75  $\mu\text{g/L}$  MC-LR (provenant d'un extrait) est suffisante pour induire une modification du métabolisme du phosphate et de l'activité neuronale

### 3) Bioessais basés sur la fluorescence chlorophyllienne

- Technique sensible, rapide et accessible
- Photosynthèse = indicateur de l'état physiologique



# Fluorescence

- Fluorimètres:

- LuminoTox
- PEA



Efficacité photochimique



PEA (Plant Efficiency Analyser)



Luminotox

# Fluorescence

- Fluorimètres:

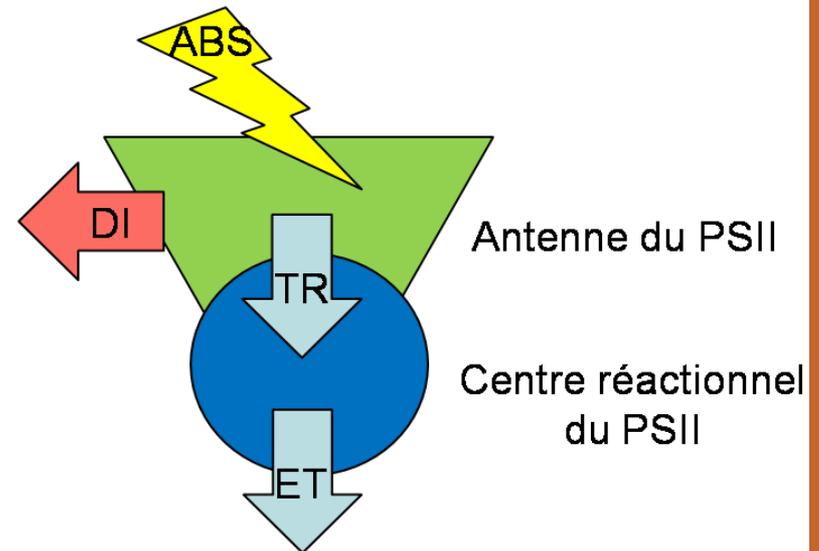
- LuminoTox
- PEA



Efficacité photochimique

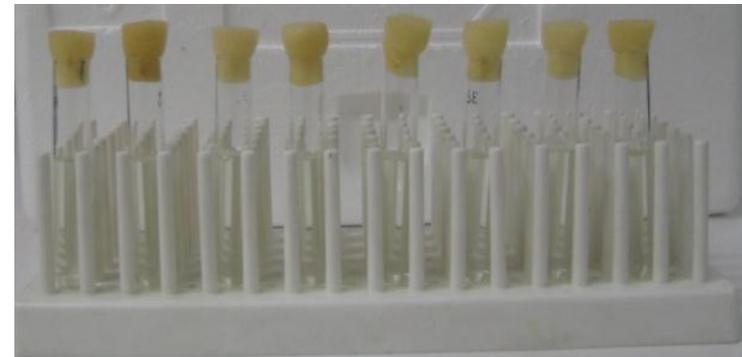
- Flux d'énergie à travers le PSII :

- ABS: énergie absorbée
- TR: énergie piégée
- ET: énergie dirigée vers la chaîne de transport des électrons
- DI: dissipation de l'énergie

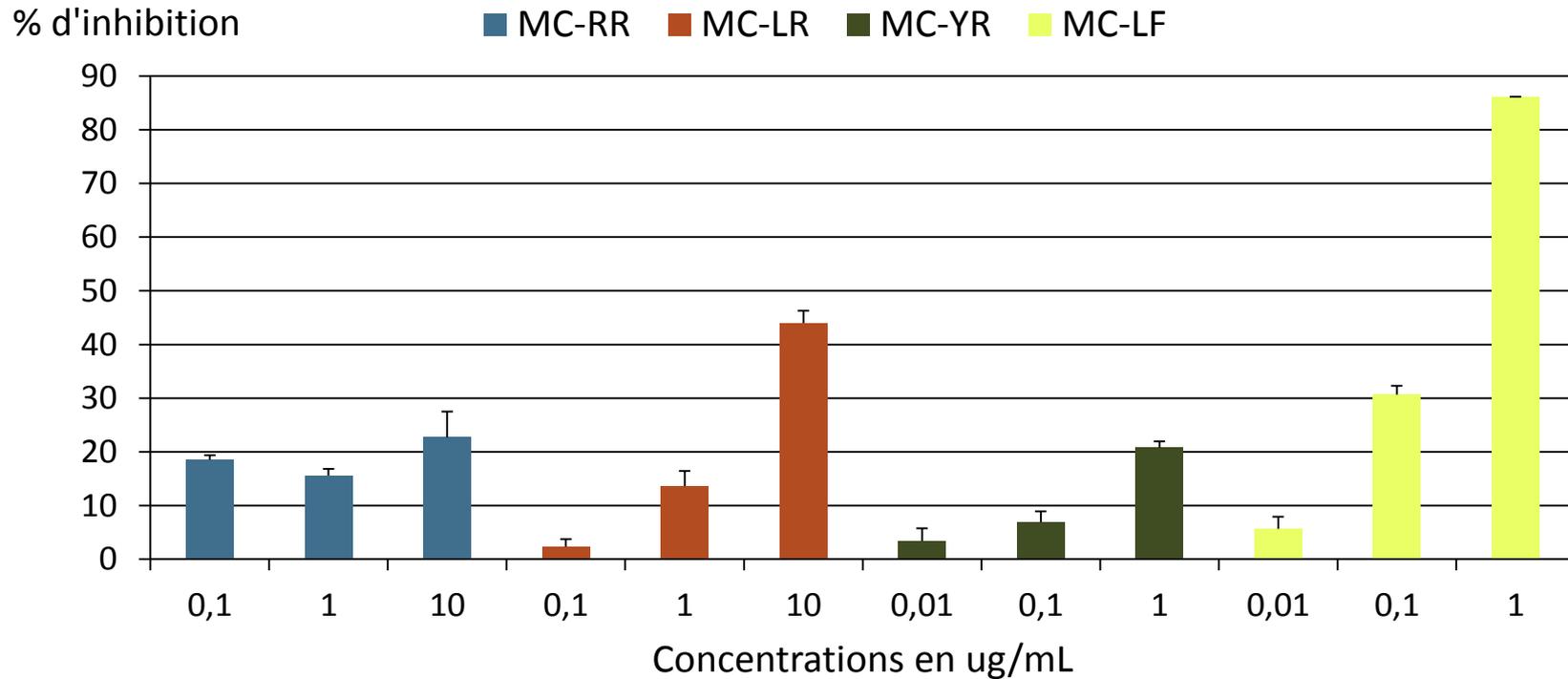


# Expositions des algues

- Expositions en éprouvettes
- Standards de cyanotoxines → *Chlorella sp.*  
SAPS (*Chlorella sp.*)  
CEP (thylacoïdes d'épinard)
- Cyanotoxines extraites → *Chlorella sp.*  
*Chlamydomonas reinhardtii*  
*Scenedesmus obliquus*  
*Pseudokirchneriella subcapitata*  
CEP et SAPS
- 500 000 cellules/mL
- 0,01 à 10 µg MC/mL
- Algues adaptées au noir
- Expositions:
  - Court terme: 15 minutes
  - Long terme: 6-24-77 heures



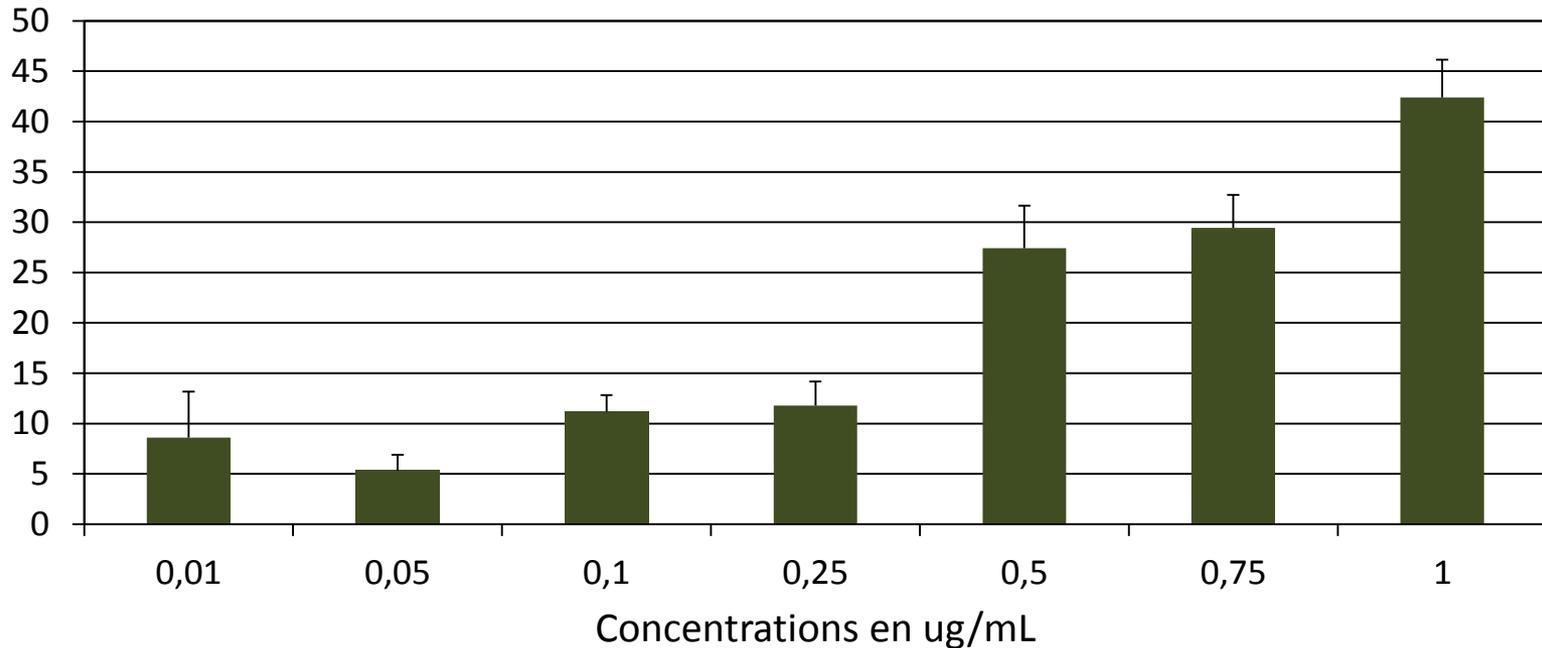
# LuminoTox (SAPS) et standards de cyanotoxines



- Effet en 15 minutes
- Ordre de toxicité:
  - MC-LF > MC- YR > MC-LR > MC-RR
- CEP -> Aucun effet significatif à faibles concentrations

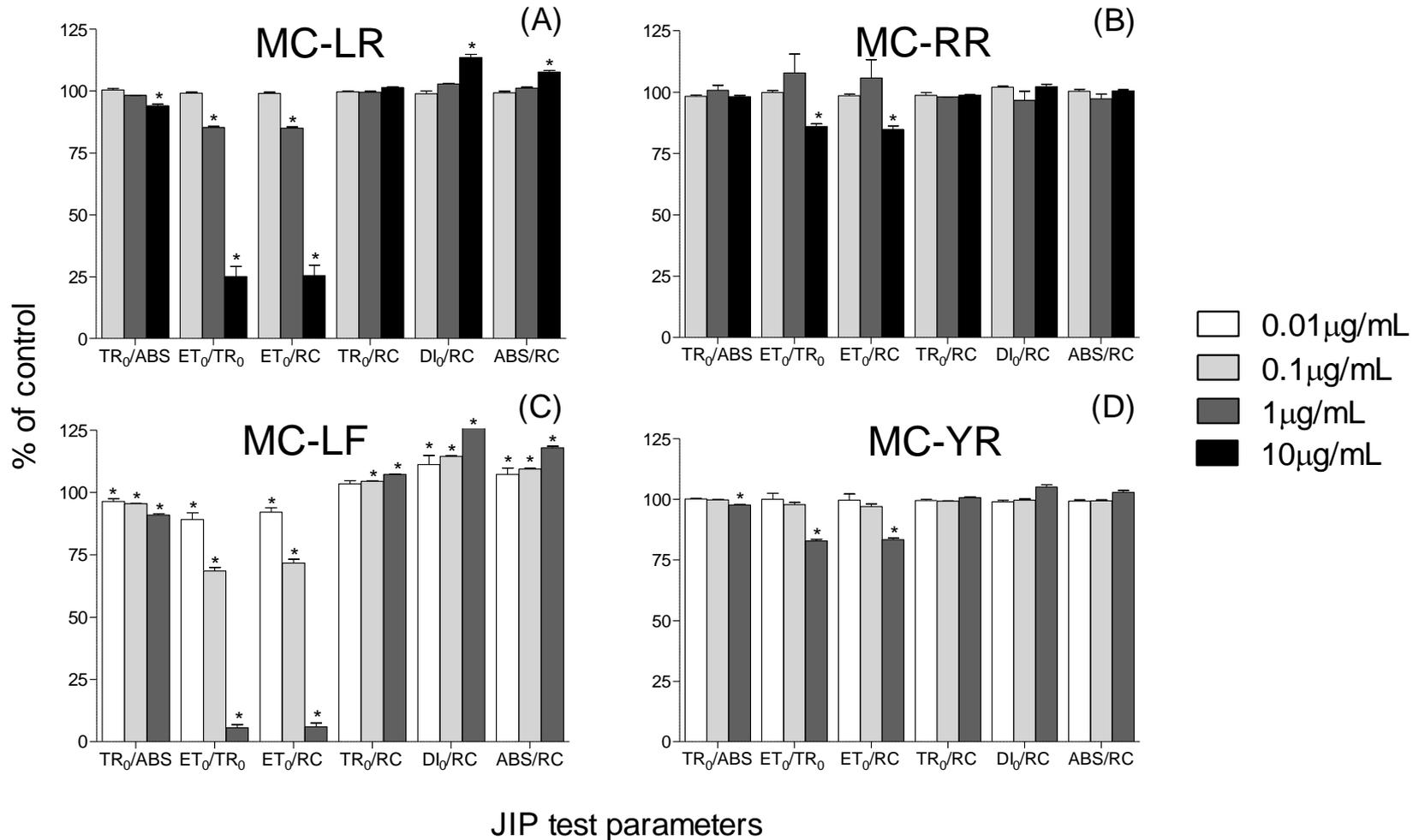
# LuminoTox (SAPS) et cyanotoxines extraites

% d'inhibition



- Effet en 15 minutes
- Effet significatif dès 0,05 $\mu$ g/mL
- CEP -> Aucun effet significatif à faibles concentrations

# PEA (*Chlorella sp.*) et standards de toxines



- Certains paramètres sont plus sensibles (TR<sub>0</sub>/ABS, ET<sub>0</sub>/RC et ET<sub>0</sub>/RC)
- Même ordre de toxicité pour les toxines (15 min. d'exposition)
- Permet d'en savoir plus sur le mode d'action des cyanotoxines

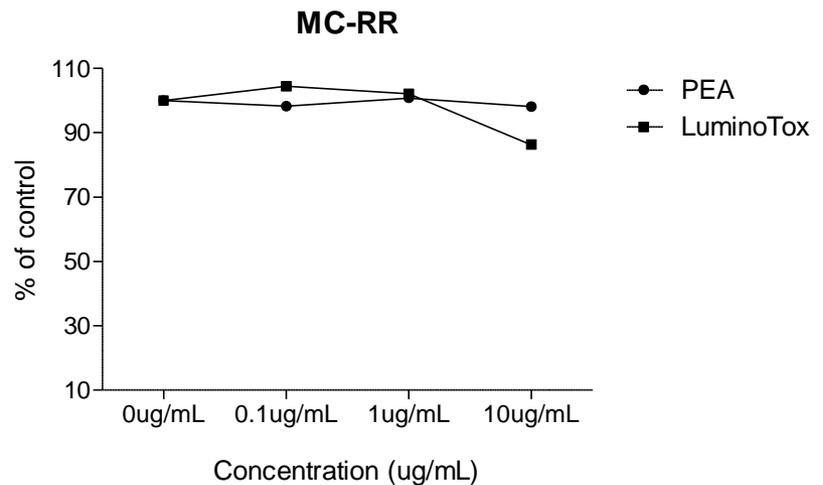
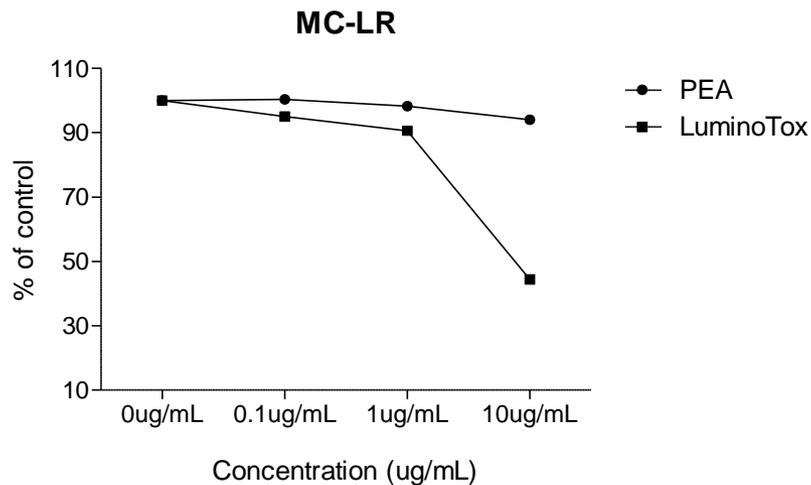
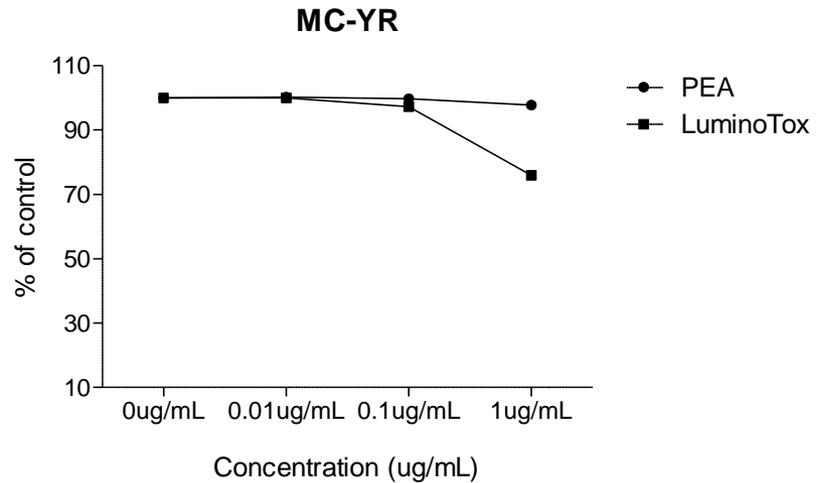
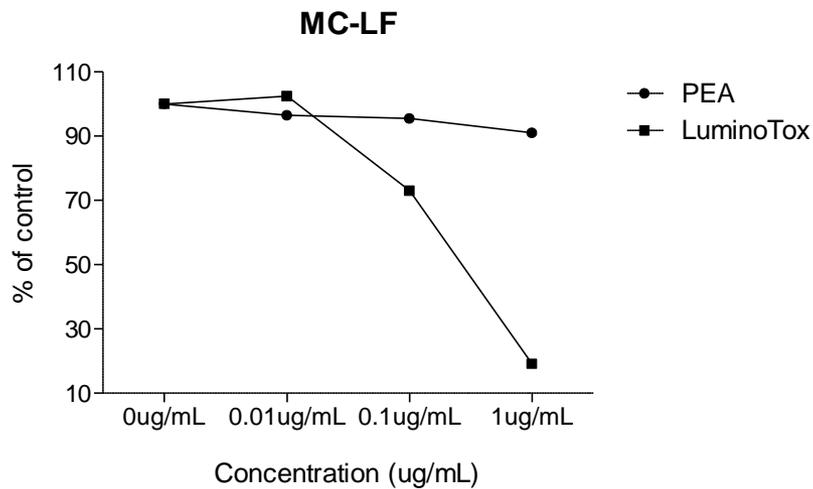
# PEA et cyanotoxines extraites

Tableau I. Valeurs des paramètres exprimés en % du témoin, pour 1µg/mL

| Espèce                                 | ETo/RC | ABS/RC | Dlo/RC |
|--|--------|--------|--------|
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>       | 42,7   | 112,6  | 129,7  |
| <i>Scenedesmus obliquus</i>            | 80,2   | 109,2  | 123,9  |
| <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 79,5   | 105,9  | 123,5  |
| <i>Chlorella sp.</i>                   | 91,1   | 104,8  | 121,6  |

- Différence de sensibilité entre les espèces:
  - *C. reinhardtii* > *S. obliquus* > *P. subcapitata* > *Chlorella sp.*

# Luminotox (SAPS) vs PEA (TR<sub>0</sub>/ABS) – Stds de cyanotoxines

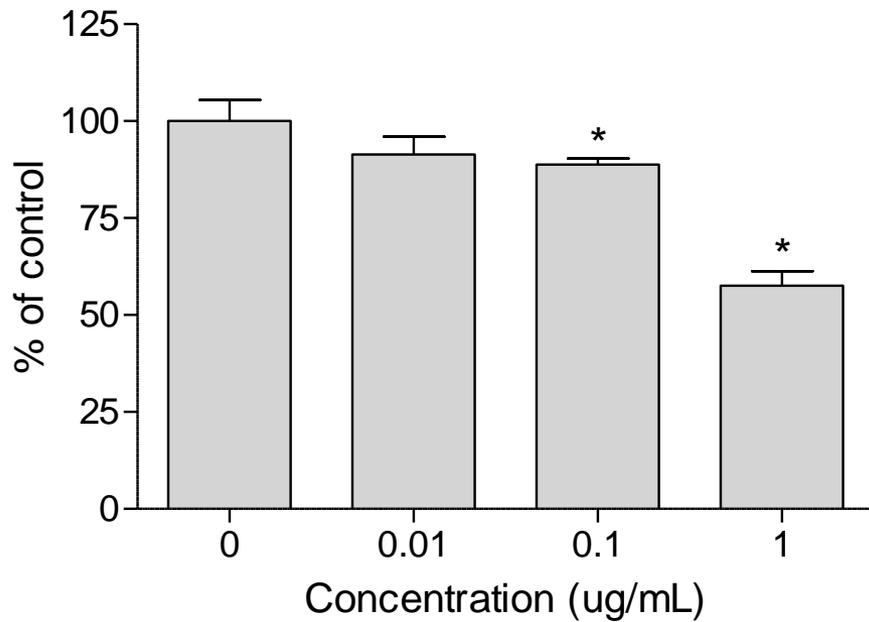


- Sensibilité des deux appareils comparable à faibles concentrations pour le paramètre relié à l'efficacité photochimique

# Extraits et Lipopolysaccharides

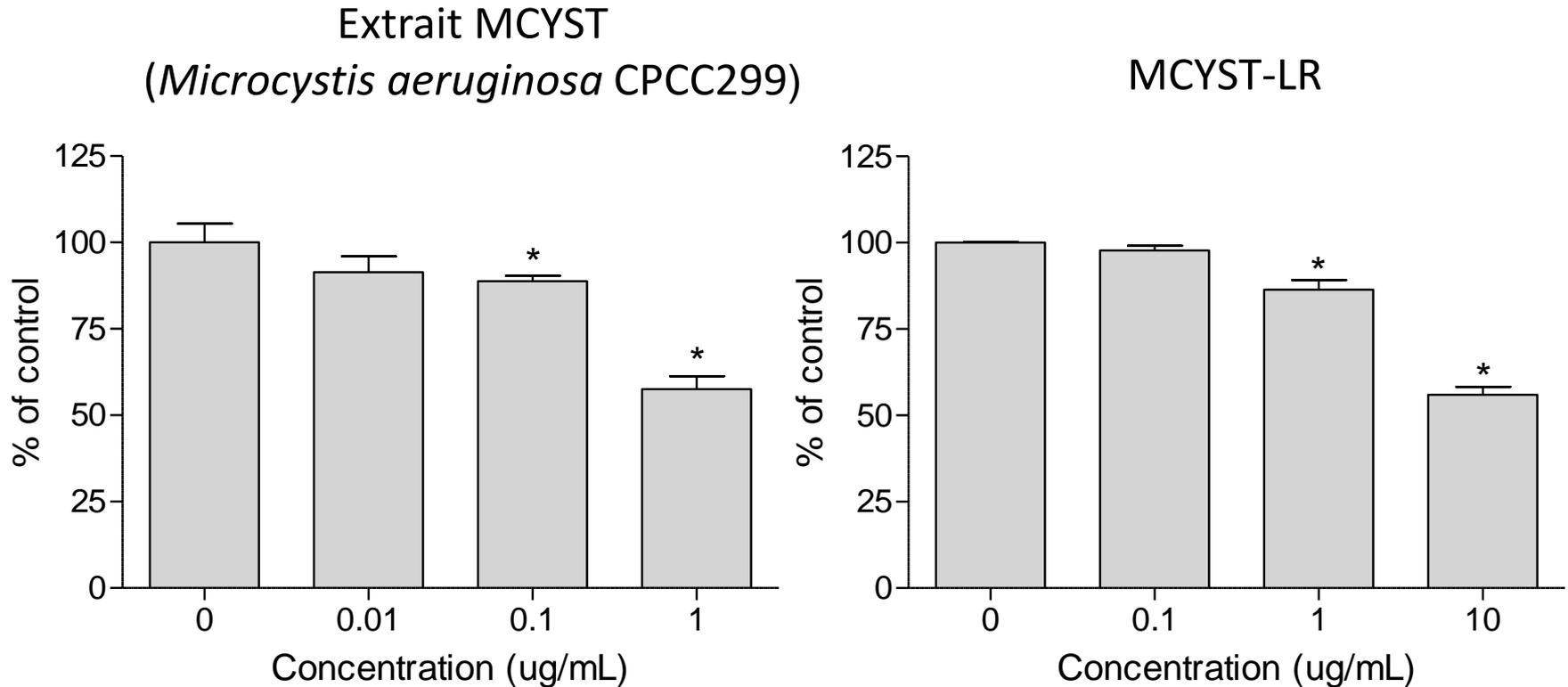
## Extrait MCYST

(*Microcystis aeruginosa* CPCC299)



- Extrait MCYST 1 $\mu$ g/mL =  $\downarrow$  42%

# Extraits et Lipopolysaccharides



- Extrait MCYST 1 $\mu$ g/mL =  $\downarrow$  42%
- MCYST-LR 1 $\mu$ g/mL =  $\downarrow$  14%

Est-ce que les LPS sont responsables de la toxicité observée?

1. Lipopolysaccharides présents chez *M. aeruginosa*

2. LPS n'affectent pas la fluorescence chlorophyllienne des espèces testées

3. D'autres études sont nécessaires afin d'identifier qu'est-ce qui est responsable de la toxicité observée

# Mélanges de standards

- Interaction entre les différents standards ? (synergie, antagonisme, ...)
- Thamnotoxkit et fluorescence des algues
- Analyses des résultats en cours (d'ici la fin février) -> effets complexes

# Échantillons - Réservoir Choinière

- Inhibition de la croissance et de la photosynthèse (fluorescence) chez les algues vertes à des concentrations de MC-LR de 0,5-1  $\mu\text{g/ml}$
- Tests en cours (jusqu'à la fin mars) avec les diatomées et les cyanobactéries

## Applicabilité/défis:

- Acquisition de connaissances « fondamentales » est nécessaire afin de comprendre comment agissent les toxines sur les organismes étudiés
- L'utilisation de la fluorescence chlorophyllienne nécessite des échantillons incolores
- Une extraction et donc pré-concentration est nécessaire pour certains tests

# Applicabilité:

| Tests        | Concentrations<br>MC-LR | Avantages                                | Inconvénients   |
|--------------|-------------------------|--|-----------------|
| PPI          | 2-3 µg/L                | Sensible                                 | Temps<br>\$\$   |
| ELISA        | 0,25-0,4 µg/L           | Très sensible                            | Temps<br>\$\$\$ |
| Truite       | 0,75 – 5 µg/L           | Très sensible<br>Mécanismes              | Temps<br>\$\$\$ |
| Thamnotoxkit | 10 µg/ml                | Moins sensible<br>Simplicité             | \$\$            |
| Fluorescence | 0,5-1 µg/ml             | Peu sensible<br>Mécanismes<br>Simplicité | \$              |

**Fonds de recherche  
sur la nature  
et les technologies**



**FRQNT: action concertée sur les cyanobactéries**

