

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

Équipe de recherche

JUNEAU, Philippe, Université du Québec à Montréal

Bastien, Christian, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs

Blaise, Christian, Environnement Canada

Deblois, Christian, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs

Gagné, François, Environnement Canada

Popovic, Radovan, Université du Québec à Montréal

Partenaire

Bellemare, François (LabBell Inc.)

Étudiants

Deblois, Charles, doctorat, Université du Québec à Montréal

Gélinas, Malorie, postdoctorat, Environnement Canada et Université du Québec à Montréal

Perron, Marie-Claude, maîtrise, Université du Québec à Montréal

Xu, Kui, doctorat, Université du Québec à Montréal

A) Objectifs :

L'objectif principal de ce projet de recherche était de développer une batterie de bioessais sensible afin de déterminer la toxicité des cyanotoxines d'échantillons d'eau de façon rapide et peu coûteuse. De façon plus spécifique, nos objectifs étaient les suivants :

- 1) Étudier la sensibilité aux différentes cyanotoxines (seule ou en mélange) de certaines trouses commerciales, de bioessais émergents et de biomarqueurs biochimiques.
- 2) Développer, sur la base des différences de sensibilités des bioessais, une batterie de quelques bioessais afin d'évaluer le potentiel de risque des blooms de cyanobactéries.
- 3) Développer une méthode de détection et quantification, par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), des variantes de microcystines pour lesquelles les standards ne sont pas disponibles.
- 4) Valider l'utilisation de la batterie de bioessais développée lors de l'accomplissement de l'objectif 2 avec des échantillons d'eau provenant de sites contaminés par les cyanobactéries et comparaison avec la toxicité au niveau des poissons.

B) Méthodologie :

Afin d'atteindre les objectifs de ce projet de recherche deux principales sources de matériel ont été utilisées :

- 1) Standards de cyanotoxines disponibles commercialement tels que l'anatoxine-a et les microcystines-LR, RR et YR. Ces standards seront utilisés seuls ou en combinaison.
- 2) Différentes espèces de cyanobactéries (*Anabaena flos-aque* et *Microcystis aeruginosa*) achetées à la « Canadian Phycological Culture Centre » (CPCC), ont été cultivées au laboratoire sous des conditions contrôlées de température et de lumière afin d'obtenir une quantité de toxine constante entre les échantillons. Les cultures de cyanobactéries étaient maintenues en croissance exponentielle par des dilutions avec le milieu de culture. Les dosages des cyanotoxines (anatoxine-a et microcystines-LR, RR et YR) par chromatographie LC-MS/MS ont été effectués sur les divers échantillons.

1) Comparaison de la sensibilité de divers bioessais aux cyanotoxines et développement d'une batterie de bioessais et d'un protocole pour l'évaluation du risque d'un bloom de cyanobactéries.

Les bioessais utilisés dans cette étude seront effectués pour chacun des standards de toxines disponibles seuls ou en combinaison et pour des extraits provenant de cultures cyanobactériennes. Dans un premier temps, nous avons classé par ordre de sensibilité les biotests lorsqu'exposé à une concentration des différents échantillons de toxines. Par la suite, pour les bioessais ayant démontré une grande sensibilité, nous avons effectué des courbes dose-réponses. Les tests que nous avons utilisés étaient les suivants :

Tests biochimiques :

Inhibition de des protéines phosphatases 1 et 2A (PPI) et ELISA: La détection des cyanotoxines hépatotoxiques de type microcistine (MCYST) a été accomplie en utilisant l'essai d'inhibition de la protéine phosphatase (PPI) et par la reconnaissance des MCYST par des anticorps spécifiques (ELISA : *Enzyme Linked Immunosorbant Assay*).

Cultures primaires d'hépatocytes de poissons et métabolisme de l'hydre: Le potentiel toxique des hépatotoxines a été évalué dans les hépatocytes de Truite arc-en-ciel par la mesure de l'inhibition de l'activité phosphatase de ces cellules, tels que décrit précédemment pour divers polluants [19]. De plus, la neurotoxicité a aussi été examinée chez les alevins de truite arc-en-ciel.

Trousses commerciales de bioessais:

ThamnoToxkit (*Thamnocephalus platyurus*):

Ces trouses utilisant le crustacé *Thamnocephalus platyurus*, comme tests standardisés et potentiellement sensibles aux cyanotoxines, nous permettrons d'évaluer la mortalité (ThamnoToxkit FTM) après 24h (LC50). La vitalité des organismes a été évaluée au microscope.

Rotokit (*Brachionus calyciforus*):

Le Rotokit FTM permet d'évaluer la mortalité de ces organismes (LC50) en 24h. De plus, l'inhibition de la reproduction de ces organismes (Short-Chronic Rotokit F) peut être évaluée par la détermination de l'inhibition de la croissance de la population de rotifères (48h-EC50). Ainsi les larves de rotifères sont portés à éclosion après 24h d'incubation à 25°C sous une lumière intense, puis répartis dans des plaques spécifiques de 36 puits contenant les échantillons à tester. Enfin, ils sont comptabilisés au microscope après immobilisation dans du lugol (Short-Chronic Rotokit F) ou simplement évalués pour leur survie (Acute Rotokit F).

Bioessais émergents démontrant une sensibilité accrue à plusieurs contaminants:

Bioessais basés sur la fluorescence chlorophyllienne de divers organismes photosynthétiques (*Scenedesmus obliquus*, *Navicula peliculosa*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Microcystis aeruginosa*, *Chlamydomonas reinhardtii* et membranes thylacoïdiennes d'épinard) :

L'utilisation de la fluorescence chlorophyllienne, permet d'évaluer de façon simple et rapide l'activité photosynthétique des algues, de plantes supérieures ou de membranes thylacoïdiennes, ce qui est un grand avantage car cette activité est intimement liée à la physiologie de l'organisme photosynthétique étudié. Les cultures de différentes espèces phytoplanctoniques, ainsi que des membranes de thylacoïdes d'épinards ont été exposées aux différents échantillons de toxines pour une période de 0,25 à 24h. Par la suite, l'activité photosynthétique sera mesurée à l'aide des fluorimètres suivants : Le Luminotox (Lab-Bell inc.) et le Handy-PEA (Hansatech). À l'aide de ces appareils, diverses variables ont été calculées et permettent d'estimer la toxicité des différents échantillons de cyanotoxines.

2) Mise au point d'une méthode alternative pour palier au manque de standards pour les cyanotoxines :

Il existe actuellement que peu de solutions standards pour la détection et quantification des cyanotoxines. Nous avons proposé une approche qui permettrait de détecter la présence de cyanotoxines dont nous ne possédons pas de standard, mais ayant des caractéristiques semblables aux toxines connues. Il est théoriquement possible, en se basant sur la structure connue des différentes variantes de microcystines, d'estimer leur présence dans un échantillon. Chacune des microcystines a une transition MS/MS caractéristique, soit l'ion moléculaire M+H qui donne un ion fille à 135 amu. Connaissant l'ion moléculaire des toxines inconnus à doser et leur énergie de dissociation (à peu près la même pour toutes les microcystines) nous pourrions déterminer la concentration de la toxine non disponible en la comparant à la réponse de la même transition pour la microcystine-LR à une concentration connue. De plus chacune des toxines a un temps de rétention spécifique en chromatographie liquide qui, lorsqu'il est déterminé, demeure toujours le même pour une microcystine donnée.

3) Validation de l'utilisation de la batterie de bioessais développée avec des échantillons d'eau provenant de sites contaminés par les cyanobactéries:

Nous avons utilisé certains des bioessais mentionnés précédemment pour tester la toxicité d'échantillons provenant directement de sites contaminés. Les échantillons recueillis ont été préparés comme pour les cultures de cyanobactéries et analysés par différents bioessais.

4) Validation des bioessais et comparaison de la toxicité au niveau des poissons

En coordination avec le groupe de recherche de l'axe 3.1 qui travaillera sur la toxicité et la bioaccumulation des cyanotoxines chez le poisson, nous effectuerons des analyses comparatives afin d'établir un lien entre la toxicité évaluée les bioessais et celle observée chez le poisson. Pour ce faire les mêmes échantillons de cyanotoxines utilisés pour l'axe 3.1 pourront aussi être utilisés pour évaluer la toxicité par différents bioessais.

C) Résultats obtenus :

Bioessais basés sur la fluorescence chlorophyllienne :

La réalisation des premiers tests de toxicité des cyanotoxines provenant de cultures de cyanobactéries avait été compromise par la couleur des échantillons. En effet, lors de l'extraction des cyanotoxines, il y a d'autres composés qui sont simultanément extraits (tels que les pigments photosynthétiques). Par conséquent, la coloration verte des échantillons provoquent une surestimation de l'effet réelle des cyanotoxines (ce qui n'est pas un problème pour des bioessais qui ne sont pas basés sur la fluorescence de la chlorophylle). Dans la seule étude publiée utilisant la fluorescence comme bioessais, aucune mention de cette surestimation n'avait été faite. Nous avons donc établi une procédure de décoloration de l'échantillon (à l'aide d'un traitement à la lumière) afin d'obtenir un échantillon de toxines limpide qui n'affectera pas les mesures de fluorescence chlorophyllienne. Cette méthode a donné de bons résultats (malgré le fait que la concentration de microcystines diminuait aussi avec le traitement). Une autre méthode de décoloration a récemment été développée récemment, et celle-ci semble intéressante car il ne semble pas y avoir de dégradation des cyanotoxines (Lajeunesse et al., 2012, J. of chromatography 1219 : 93-103). Nous conseillons donc l'utilisation de cette dernière pour de futures extractions.

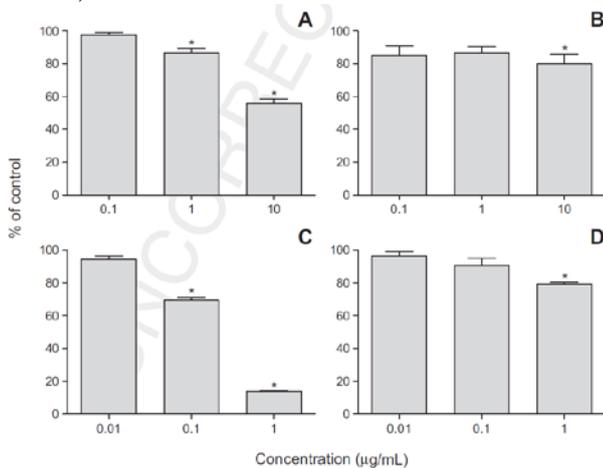


Figure 1. Pourcentage d'inhibition de l'efficacité photochimique de *Chlorella* sp. suite à une exposition de 15 minutes aux différents standards de MCYST A : LR, B : RR, C :LF, D :YR. Les

sp.. Cependant, les algues étudiées ont manifesté une sensibilité différente aux MCYSTs, l'espèce la plus sensible étant *C. reinhardtii*, suivie par *S. obliquus*, *P. subcapitata* et *Chlorella* sp.. Les résultats montrent qu'après seulement 15 minutes d'exposition la fluorescence chlorophyllienne est une méthode rapide, avec une sensibilité à partir de 0,1 µg/mL.

Afin de développer un test sensible à la présence des microcystines nous devons tenir compte de la toxicité potentielle des lipopolysaccharides (LPS), constituant majeur de la paroi cellulaire des cyanobactéries. Pour se faire nous avons développé une méthodologie pour extraire et doser les LPS présent sur une souche toxique et non-toxique de *M. aeruginosa*. Nous avons donc récolté les cellules pour ensuite les lyophiliser. Les LPS ont été extraits des échantillons en utilisant un kit d'extraction (iNtRON BIOTECHNOLOGY) et ont ensuite été quantifiés avec un dosage chromogénique à l'aide du « Chromo-*Limulus* amebocyte lysate » (Associates of Cape Cod inc.). Par la suite, trois algues vertes (*Chlamydomonas reinhardtii* CC125, *Scenedesmus obliquus* CPCC5, *Pseudokirchneriella subcapitata* CPCC37) et deux cyanobactéries (*M. aeruginosa* CPCC299 et CPCC632) ont été exposées aux LPS pour une période de 24 heures et la toxicité des échantillons a été évaluée à l'aide du fluorimètre *Plant Efficiency Analyzer* (PEA, *Hansatech*). Nous avons démontré que les LPS ne causaient pas de toxicité au niveau de l'activité photosynthétique. Par conséquent, d'autres substances extraites lors de la procédure peuvent induire une toxicité au niveau de l'activité photosynthétique.

Chlorella sp. a été exposé à différentes concentrations d'extrait de MCYSTs provenant de *M. aeruginosa* (CPCC299). Les dosages au HPLC de ces extraits indiquent que *M. aeruginosa* (CPCC299) synthétise principalement de la MCYST-LR ainsi qu'un peu de MCYST-RR. Les résultats obtenus avec le Luminotox montrent une inhibition de l'activité photosynthétique après seulement 15 minutes d'exposition (Figure 2). La réponse varie en fonction de la concentration en MCYSTs. Les paramètres JIP calculés à partir des cinétiques PEA montrent aussi que les microcystines extraites de la culture de *M. aeruginosa* causent une augmentation de trois paramètres et une diminution de trois autres.

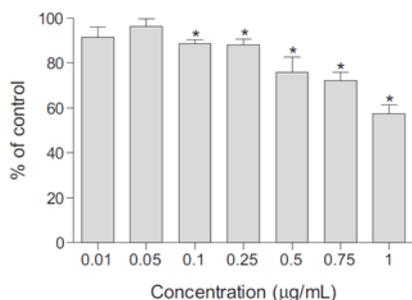


Figure 2. Pourcentage d'inhibition de l'efficacité photochimique de *Chlorella sp.* suite à une exposition de 15 minutes à différentes concentrations de MCYSTs extraites à partir de culture de *M. aeruginosa* (CPCC299). Les résultats sont obtenus avec le LuminoTox.

Les résultats de ces travaux ont été présentés à divers congrès et publié en partie dans la revue *Toxicon* (Perron et al., 2012. *Toxicon*, sous presse).

Nous terminerons prochainement l'évaluation de la toxicité de mélanges de standards de cyanotoxines et ces résultats feront l'objet d'une autre publication dans une revue à comité de lecture.

Expositions des alevins :

Nous avons exposé des jeunes truites (*Oncorhynchus mykiss*) à différentes concentrations d'extraits de MCYST provenant de culture de *Microcystis aeruginosa*, puis mesuré des biomarqueurs dans le foie et le cerveau. Suite à l'exposition aux extraits de MCYST, une augmentation de la phosphatase des protéines avec une baisse significative de la phosphorylation des protéines hépatiques ont été observées dans le foie des jeunes truites (Figure 3). Aucun changement dans l'activité de la glutathione-S-transferase (GST) ni aucune altération au niveau de la peroxydation des lipides ont été observés suite à l'exposition des extraits de MCYST. Ces résultats montrent une perturbation biochimique dans le foie des jeunes truites sans que le processus de détoxification GST ne soit déclenché. Les résultats montrent aussi que la hausse des phosphatases de protéines constitue un mécanisme de défense ou de compensation de l'effet inhibiteur des MCYST sur cette famille d'enzyme.

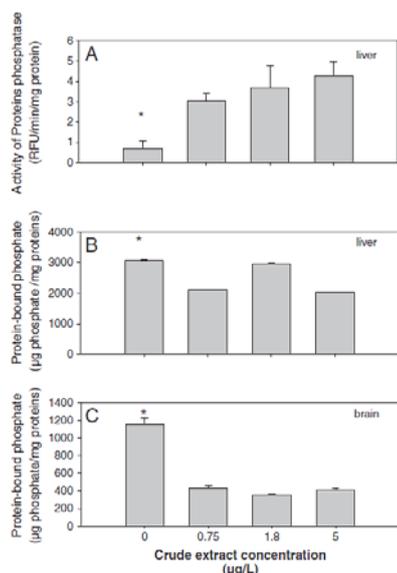
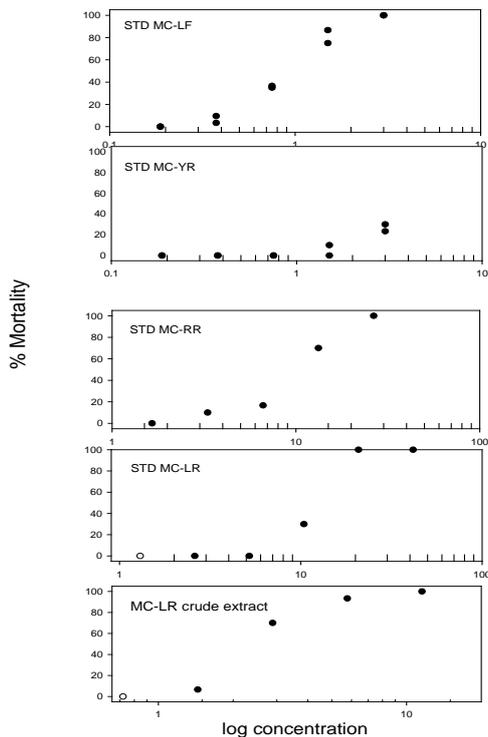


Figure 3 : A) Change in protein phosphatase activity in the trouts liver, B) phosphate bound to protein in the liver and C) phosphate bound to protein in the brain exposed to 4 concentrations of MC-LR from crude extracts.

Les résultats de ces travaux ont été présentés au congrès de l'ATW en 2009 et un article a été publié : Gélinas et al. (2012), *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B, 116 : 261-267.

Trousses commerciales de bioessais (Thamnotoxkit et Rotoxkit) :

Nous avons exposé le microcrustacé *Thamnocephalus platyurus* à des concentrations croissantes de 4 types de MCYST ainsi qu'à leur mélange (MCYST-LF; MCYST-YR; MCYST-RR and MCYST-LR). La concentration qui diminue la mobilité (survie) pour 50 % des organismes (EC_{50}) a été déterminée. Dans un deuxième temps, les standards ont été mélangés entre eux à différentes concentrations pour tester leurs effets sur la survie des *Thamnocephalus*. Les résultats concernant cette deuxième partie sont en cours d'analyse et devraient faire l'objet (avec la première partie) d'une publication au cours des prochains mois.



Nous avons testé 4 différents standards de cyanotoxines sur la survie des *Thamnocephalus*. La toxicité des extraits purs varie en fonction de la variante utilisée. Les concentrations pour atteindre 50% de mortalité varient entre 0.8 et 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 4).

L'extrait de microcystine provenant de la culture de *Microcystis aeruginosa* cultivée (contenant essentiellement de la MCYST-LR) est plus toxique que le standard de la même variante (MCYST-LR). L'anatoxine s'est avérée non-toxique pour ce microcrustacé jusqu'à une concentration de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Figure 4: EC_{50} graphs of the 4 MC standards (MC-LF; MC-YR; MC-RR and MC-LR) and the MC-LR crude extract. The low concentration of MC-YR could not reach the EC_{50} .

Nous avons effectués des essais avec les Rotoxkits, par contre ceux-ci ont démontrés une faible sensibilité concernant la toxicité des microcystines et nous avons une problématique avec les solvants. De plus, puisque le coût relié à l'achat de quantités suffisantes de toxines pour obtenir un effet significatif et poursuivre ces tests était trop élevé (vs le budget prévu), ce bioessai a été abandonné.

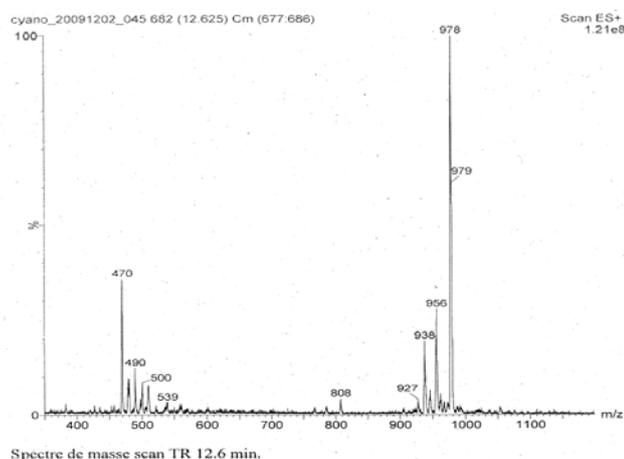
Tests d'inhibition de la protéine phosphatase et ELISA :

Ces tests ont été réalisés en parallèle aux autres bioessais et démontrent une grande sensibilité. Par contre, le temps nécessaire à la réalisation de ces tests et leurs coûts sont trop élevés. Par conséquent, ces tests ne sont pas de bons candidats pour la batterie de bioessais.

Mise au point d'une méthode alternative pour pallier au manque de standards pour les cyanotoxines :

Nous avons analysé 9 échantillons provenant de cultures de cyanobactéries. Les cellules ont été recueillies sur un filtre et les microcystines analysées au Centre d'expertises en analyse environnementale du Québec (CEAEQ). Les variantes couramment analysées sont : microcystine-LR, -RR, -YR, -LA, -LF, -LW et -LF. Les cellules ont été lysées et les microcystines ont été extraites et analysées selon la méthode développée et mise au point au CEAEQ. La microcystine-LR a été détectée dans 5 échantillons pour lesquels les concentrations ont variées de 14 à 1200 $\mu\text{g}/\text{l}$ dans l'extrait final. Les microcystines-RR et YR ont été détectées dans un seul échantillon, soit l'échantillon identifié #19 (correspondant à une souche de *Microcystis* sp. isolée du Réservoir Choinière, Parc national de la Yamaska). Les concentrations ont été de 250 et 120 $\mu\text{g}/\text{l}$ respectivement pour cet échantillon.

Nous avons tenté l'identification d'autres variantes de microcystines dans les extraits de cultures. Les extraits ont été analysés en chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem dans le mode balayage afin d'identifier les ions moléculaires des autres variantes de microcystines possiblement présentes dans les échantillons (Figure 5). Dans une seconde étape, les extraits ont été analysés dans le mode des ions précurseurs de la masse 135 amu (fragment ADDA) puisque toutes les variantes de microcystines possèdent ce fragment commun (Figure 6). Finalement, les extraits ont été analysés dans le mode ions sélectifs/ions sélectifs (MS/MS) ont utilisant des masse théoriques de variantes et une énergie de collision dans l'ordre de grandeur de celle utilisée pour les variantes déjà analysées.

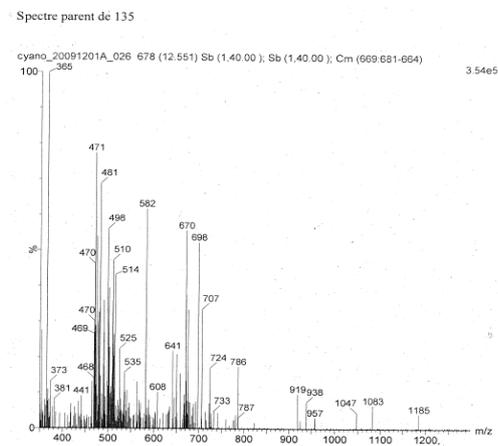


Spectre de masse scan TR 12.6 min.

Hypothèse

Ion	Charge	m/z
M+H	2	479
M+H+Na	2	490
M+Na+Na	2	501
M+H	1	956
M+Na	1	978
M-18 (H ₂ O)	1	938

Figure 5. Spectre de masse obtenu en balayage pour l'extrait #19



Function 1

Scans in function: 1405
 Cycle time (secs): 1.100
 Scan duration (secs): 1.00
 Inter Scan Delay (secs): 0.100
 Retention window (mins): 0.000 to 26.000
 Ionization mode: ES+
 Data type: Accurate Mass
 Function type: Parents of 135.10
 Mass range: 350 to 1300
 Collision Energy: 20.0

Figure 6. Spectre de masse des ions parents du fragment de masse à 135 amu

Plusieurs possibilités de variantes ont été ainsi obtenues. Il est cependant difficile de conclure avec certitude à la présence et l'identification de variantes spécifiques. Dans plusieurs cas, de 2 à 7 variantes demeurent des possibilités. Nous ne sommes donc pas en mesure de conclure à la présence d'une variante spécifique de microcistine en particulier à la suite de ces différents travaux. Tant que des étalons purifiés ne seront pas disponibles commercialement, il demeurera malheureusement difficile de détecter et identifier avec certitude d'autres variantes de microcystines.

Validation de l'utilisation de la batterie de bioessais avec des échantillons d'eau provenant du terrain et comparaison avec la toxicité au niveau des poissons :

La validation complète de l'utilisation des différents bioessais n'a pu être complétée en raison de l'effort plus important consacré à la détermination du mode d'action des cyanotoxines sur les différents organismes étudiés. Par contre, nous avons effectué des tests sur les algues (viabilité, photosynthèse, production d'espèces réactives oxygénées) avec des échantillons prélevés directement aux sites où nous pouvons retrouver des épisodes de proliférations de cyanobactéries. Nous avons remarqué une toxicité de ces extraits sur les paramètres étudiés lorsque la concentration de microcystines était de 1,05µg/mL pour *P. subcapitata*. Nous poursuivons l'analyse des résultats obtenus pour *A. flos-aquae* et *N. pelliculosa* et nous sommes à la préparation d'un article qui sera soumis d'ici l'été 2012. La comparaison entre les résultats obtenus avec les différents bioessais et la toxicité obtenue sur les poissons pourra être effectuée lorsque les analyses effectuées par le groupe responsable de l'étude avec les poissons seront complétées.

D) Applicabilité des résultats et retombées escomptées :

Ce projet de recherche nous a permis d'identifier parmi plusieurs biotests ceux qui ont une bonne sensibilité aux cyanotoxines individuelles et leur mélange. Par contre, l'applicabilité de ces bioessais sur des échantillons d'eau brute (sans étape d'extraction) n'est probablement pas possible à cause des concentrations relativement faibles de cyanotoxines que nous retrouvons dans ces échantillons. Il est donc nécessaire d'effectuer une extraction des cyanotoxines avant d'effectuer les bioessais.

Cette étude a permis aussi d'approfondir nos connaissances sur le mode d'action des microcystines au niveau des organismes aquatiques et ainsi nous permettre d'améliorer notre compréhension de l'impact de ces toxines sur l'écosystème aquatique.

La réalisation de ce projet procure aux instances québécoises d'autres outils bioanalytiques pour identifier la présence de blooms toxiques. Les résultats de ce projet pourront avoir un impact important sur les **activités récréo-touristiques** et la **gestion de la qualité de l'eau** de plusieurs réservoirs qui sont fréquemment affectés par la présence de toxines. Les résultats obtenus lors de ce projet permettent donc d'obtenir des informations essentielles pour l'évaluation de la toxicité réelle des plans d'eau affectés par la prolifération de cyanobactéries et ainsi, dans le contexte de la problématique québécoise, d'améliorer notre gestion lors des évènements de prolifération de cyanobactéries.