



HAL
open science

Développement validation d'une méthode d'analyse de cyanotoxines par HPLC-MS-MS : Programme phytoplancton lacs Aquitains

Sarah Pelletier

► **To cite this version:**

Sarah Pelletier. Développement validation d'une méthode d'analyse de cyanotoxines par HPLC-MS-MS : Programme phytoplancton lacs Aquitains. Sciences de l'environnement. 2013. hal-02606085

HAL Id: hal-02606085

<https://hal.inrae.fr/hal-02606085>

Submitted on 16 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Développement / validation d'une méthode d'analyse de cyanotoxines par HPLC-MS/MS

PROGRAMME PHYTOPLANCTON-LACS-AQUITAINS
RAPPORT DE STAGE M2 E χ CE



Aout 2013

SARAH PELLETIER

LABORATOIRE DE CHIMIE DES EAUX

Equipe CARMA - Unité REBX

Irstea Centre de Bordeaux

50 avenue de Verdun

33612 Cestas - Gazinet

Sous la direction de :

Nicolas Mazzella et Christophe Laplace-Treyture

Pour mieux
affirmer
ses missions,
le Cemagref
devient Irstea



REMERCIEMENTS

Durant ces six mois de stage de nombreuses personnes m'ont accompagnées, aiguillées et conseillées, de mon arrivée au sein d'Irstea et du laboratoire de chimie des eaux, jusqu'à la finalisation de ce projet. Parmi elles, je souhaite tout particulièrement remercier :

- Nicolas Mazzella, qui m'a accueillie au sein du laboratoire de chimie des eaux. Sa disponibilité, ses explications et ses conseils m'ont permis de mener à bien mon sujet. Je le remercie de son attention et de m'avoir transmis ses connaissances en chimie analytique qui m'ont permis d'enrichir mes connaissances techniques.
- Christophe Laplace-Treyture qui co-encadrait mon stage. Je souhaite le remercier pour son accueil et sa gentillesse. Mais aussi de m'avoir fournis toutes les informations sur les cyanobactéries, les aspects règlementaires et les protocoles de terrains quand j'en avais besoins. Je le remercie aussi pour le temps qu'il a pris pour corriger mon rapport avec Nicolas Mazzella.
- Je remercie également, Brigitte Delest, Aurélie Moreira, Vincent Fauvelle et Gaëlle Poulier pour le temps qu'ils ont passé à m'expliquer le fonctionnement et l'organisation du laboratoire ainsi que les différents protocoles et appareils utilisés durant ce stage. Grâce à eux ma maîtrise des techniques de laboratoire s'est grandement améliorée.
- Je remercie, Karine Madarassou, Mélissa Eon et Coralie Camins pour les bons moments passés au sein du laboratoire grâce à leur sympathie et leur humour.
- Je voudrais remercier tous ceux que j'ai rencontrés durant ce stage: Kéwin pour sa bonne humeur et surtout ses gâteaux, Sarah, Manon, Théo et tous les autres que je n'ai pas cités qui ont contribué à la bonne ambiance durant ces six mois.
- Merci à Sylvia Moreira de m'avoir laissé m'installer dans son bureau et pour les réponses à mes questionnements sur les techniques de terrains.
- Je remercie Magalie Baudrimont et Nathalie Geneste, qui se sont montrées le plus disponible possible lorsque j'en avais besoin et qui se sont assurées du bon déroulement des stages de la première promotion du Master EXCE.

Enfin, je tiens également à remercier Anthony pour son soutien et sa présence car il a su m'épauler et m'encourager tout au long de ces six mois.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Recommandations de gestion et de surveillance en fonction du niveau de contamination	11
Tableau 2 : Résultats de la validation de la méthode "dosage microcystine par HPLC-ESI-MS/MS"	23
Tableau 3 : Résultats des tests ELISA	24
Tableau 4 : Résultats des dosages des microcystines des lacs aquitains par HPLC-ESI-MS/MS.....	25
Tableau 5 : Comparatif ELISA et HPLC-MS/MS sur un an (1000 analyses)	27

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure générale d'une microcystine inspirée de (Yuan, 1999).....	10
Figure 2 : Principe du test ELISA compétitif	12
Figure 3 : Schéma ESI	14
Figure 4 : Fonctionnement MS/MS type «MRM ».....	15
Figure 5 : Structure de la leucine enképhaline.....	18
Figure 6 : Test de différentes PM sur un mélange de microcystines à 50 µg.L ⁻¹	19
Figure 7 : Mécanisme réactionnel de formation du fragment 134 su Mc-LR (Antoniou, 2008).....	20
Figure 8 : Droite de recouvrement de YR.....	23
Figure 10 : Moyenne de chlorophylle a sur les lacs aquitains de juin-juillet 2013 (µg.L ⁻¹).....	26
Figure 9 : Moyenne de chlorophylle a sur les lacs aquitains de janvier à juillet 2013 (µg.L ⁻¹).....	26

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADDA :Acide 3-amino-9-méthoxy-2, 6, 8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-diénoïque
ACN :Acétonitrile
CARMA :Contaminants Anthropiques et Réponses des Milieux Aquatiques
CEMAGREF :Centre du Machinisme Agricole, du Génie Rural et des Eaux et Forêt
CCGL :Communautés de Communes des Grands Lacs
CG :Chromatographie Gaz
DCE :Directive Européenne Cadre sur l'Eau
ELISA :Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMT :Ecart Maximal Toléré
ESI :ElectroSpray Ionization
EUP :Eau Ultra-Pure
HLB :Hydrophilic-Lipophilic Balance
HPLC :High Performance Liquid Chromatography
IC :Intervalle de Confiance
Irstea :	Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture
MeAsp : <i>erythro</i> - β -methylaspartic
Mdha :N-méthyl-déhydroaniline
MES :Matières En Suspension
MRM :Multi Reaction Monitoring
MS :Spectrométrie de Masse
PM :Phase Mobile
PS :Phase Stationnaire
REBX :Réseaux, Epuration et qualité des eaux
SPE :Solid Phase Extraction
TR :Temps de Rétention
VTR :Valeur Toxique de Référence

Irstea (Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture) anciennement Cemagref (Centre du Machinisme Agricole, du Génie Rural et des Eaux et Forêt) est un organisme de recherche qualifié d'EPST (Etablissement Public à caractère Scientifique et Technologique) spécialisé en sciences et technologies pour l'environnement. Il a été créé en 1981, et compte actuellement neuf centres en France métropolitaine dont un à Bordeaux.

Le centre de Bordeaux dirige ses activités de recherches, d'expertises et d'appui aux politiques publiques sur le fonctionnement des milieux aquatiques, la gestion de l'eau mais aussi sur l'interface entre gestion des territoires et eau.

Au sein de ce centre, il existe plusieurs unités de recherche dont l'unité REBX (Réseaux, Epuration et qualité des eaux) qui focalise ses travaux et recherche sur l'eau avec de grandes thématiques telles que la qualité des hydro-systèmes continentaux ou l'analyse du fonctionnement hydrauliques des systèmes de distribution d'eau potable par exemple.

Au sein de cette unité, il existe plusieurs équipes : Epuration, Ouvrage hydraulique, Réseaux d'eau potable et CARMA (Contaminants Anthropiques et Réponses des Milieux Aquatiques). J'ai intégré cette dernière pour réaliser mon stage.

Les activités de cette équipe tendent à caractériser le fonctionnement et les réponses des écosystèmes aquatiques sous l'influence de diverses catégories d'altérations anthropiques. Plusieurs thématiques de recherche sont abordées comme la chimie de l'environnement, l'écotoxicologie ou encore la bio-indication.

Mon stage se déroule au sein du laboratoire de chimie des eaux, partie intégrante de l'équipe CARMA, qui assure entre autres, les analyses physico-chimiques en appui aux travaux de recherche des équipes de l'unité REBX. Des activités de recherches et développements méthodologiques et analytiques y sont menées, comme par exemple le développement et la validation d'une méthode analytique de dosage des cyanotoxines, sujet de mon stage.

TABLE DES MATIÈRES

CONTEXTE DE L'ÉTUDE	7
PROGRAMME PHYTOPLANCTON-LACS AQUITAINS.....	7
GÉNÉRALITÉS	8
LES CYANOBACTÉRIES.....	8
<i>Prolifération « Bloom »</i>	8
<i>Facteurs favorisants</i>	9
<i>Les cyanotoxines</i>	9
Hepatotoxines : microcystines et nodularines.....	9
mécanisme de toxicité des microcystines.....	10
<i>Intoxications</i>	11
RÈGLEMENTATION EN VIGUEUR POUR LES EAUX DE BAINNADES.....	11
TECHNIQUES DE DOSAGES DES MICROCYSTINES AU LABORATOIRE	12
LE TEST ELISA.....	12
L'ANALYSE EN HPLC-MS/MS.....	13
<i>L'analyse en chromatographie Liquide haute performance</i>	13
<i>La spectrométrie de masse</i>	13
La source electrospray (ESI).....	14
L'analyseur quadripolaire.....	14
<i>Technique couplée : HPLC et spectrométrie de masse en tandem triple quadripole</i>	14
MATÉRIELS ET METHODES	15
ECHANTILLONNAGE TERRAIN.....	15
DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE.....	16
<i>Conditionnement des échantillons</i>	16
<i>Extraction en phase solide</i>	16
Optimisation de la SPE.....	16
Volume de fuite.....	16
Rinçage.....	17
<i>Elution</i>	17
<i>Choix de l'étalon interne/traceur</i>	17
<i>Choix de la phase mobile et du gradient</i>	18
<i>Paramètres spectrométrie de masse</i> :.....	19
VALIDATION DE LA MÉTHODE D'ANALYSE DES MICROCYSTINES HPLC/MS/MS :.....	20
PRINCIPE.....	20
<i>Paramètres testés</i> :.....	21
Linéarité.....	21
Spécificité.....	21
Rendements d'extraction.....	22
La Limite de quantification.....	22
RÉSULTATS ET DISCUSSION RELATIF À LA VALIDATION DE LA MÉTHODE SPE-HPLC-MS/MS.....	22
RÉSULTATS DOSAGES LACS AQUITAINS ET DISCUSSION	24
RÉSULTATS TEST ELISA.....	24
RÉSULTATS HPLC-ESI-MS/MS.....	25
CROISEMENT DES RÉSULTATS DES DEUX MÉTHODES DE DOSAGE.....	26
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	28
BIBLIOGRAPHIE	29

ANNEXES	30
ANNEXE I : TEST ELISA.....	30
Matériels contenus dans le kit Microcystins-ADDA ELISA de chez Abraxis.....	30
Protocole :.....	30
ANNEXE II : MATÉRIELS	31
Solvant et standards	31
Consommables.....	31
Appareillages.....	31
ANNEXE III : PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS.....	32
Conditionnement :	32
Extraction (SPE) :.....	32
Elution :	32
ANNEXE IV : PARAMETRES HPLC.....	33
ANNEXE V : PARAMÈTRES D'IONISATION ET LES TRANSITIONS.....	34
ANNEXE IV : CHROMATOGRAMME	35

PROGRAMME PHYTOPLANCTON-LACS AQUITAINS

Dans le cadre du programme phytoplancton-lacs aquitains, convention de partenariat Agence de l'Eau Adour-Garonne - Irstea, les plans d'eau de Cazaux-Sanguinet, Parentis-Biscarrosse, Carcans-Hourtin et Lacanau font l'objet d'un suivi mensuel sur l'année 2013, par l'équipe CARMA de l'unité REBX d'Irstea de Bordeaux. En effet, il existe différents rapports scientifiques et techniques issus de travaux antérieurs du Cemagref qui portent plus généralement sur la qualité physicochimique des eaux et des sédiments mais les connaissances sur les communautés de phytoplancton des quatre grands plans d'eau aquitains sont à ce jour, encore insuffisantes.

Ces quatre plans d'eau, soumis à la Directive Cadre Européenne sur l'Eau (DCE, 2000), sont pourtant d'intérêt touristique majeur en Aquitaine. Leur évaluation d'état écologique, requise par la DCE, nécessite une connaissance des communautés de phytoplancton présentes et une bonne compréhension de leurs dynamiques. Dans ce contexte, les plans d'eau de Cazaux-Sanguinet et Carcans-Hourtin sont considérés comme des plans d'eau de référence peu soumis aux pressions anthropiques. Au contraire, le plan d'eau de Parentis-Biscarrosse, soumis à de fortes pressions anthropiques dans le passé, est en situation de remédiation.

Par ailleurs, les plans d'eau de Cazaux-Sanguinet et de Parentis-Biscarrosse font actuellement l'objet d'une collaboration active liée à la problématique « cyanobactérie des eaux de baignade » entre les communautés de communes des grands lacs (CCGL) et de Mimizan et l'équipe CARMA de l'Unité de Recherche REBX. Ces lacs sont en effet sujets à des proliférations de cyanobactéries assez conséquentes tout au long de l'année.

Le suivi mensuel comprend 4 volets étudiés au point de plus grande profondeur de chacun des lacs :

- Un relevé des paramètres de physico-chimie de terrain (pH, conductivité, O₂ dissous) associé à un relevé de la teneur en chlorophylle totale et sa répartition dans les principaux groupes algaux.
- Un prélèvement d'un échantillon intégré¹ sur la zone euphotique pour analyse des éléments majeurs de la chimie des eaux (MES, azote, phosphore, chlorophylle-a...) ainsi que celles des microcystines (échantillons utilisés pour le dosage au laboratoire des microcystines par « Enzyme-Linked Immunosorbent Assay » - test ELISA et par chromatographie liquide haute performance couplée avec de la spectrométrie de masse en tandem - HPLC-ESI-MS/MS²).
- Un autre prélèvement dans la même zone pour analyse de la communauté phytoplanctonique au microscope (détermination et quantification en biovolume des taxons rencontrés).
- Un prélèvement de fond pour analyse des éléments majeurs de la chimie des eaux.

L'ensemble de ces données font l'objet d'une bancarisation dans une base de données spécifique à l'équipe CARMA et regroupant les données de chimie, de phytoplancton et de macrophytes en

¹ Cf. Echantillonnage Terrain

² Cf. Techniques de dosages des microcystines au Laboratoire p7

plans d'eau, acquises par l'équipe au cours des décennies passées. Cette base de données permettra de répondre à différentes problématiques comme la dynamique des communautés (distribution spatio-temporelle) et en particulier celle des cyanobactéries en lien direct avec les usages des plans d'eau, notamment la baignade.

L'étude de 2013 comprend le développement de techniques analytiques pour la détection de différentes cyanotoxines, leurs séparations et quantifications par des moyens analytiques poussés (couplage HPLC-MS/MS). En effet le test ELISA utilisé actuellement, est une méthode non séparative qui ne donne accès qu'à la concentration totale dite « en équivalent MC-LR » car cette toxine, la microcystine-LR est la plus répandue et une des plus toxiques. Elle est donc prise comme référence. La chromatographie permet quant à elle, d'obtenir la concentration de chaque variant de toxine et ainsi de savoir lesquels sont les plus présents dans les lacs étudiés. De plus, les résultats du test ELISA sont beaucoup plus variables (coefficient moyen de variation pour des analyses répétées du même échantillon) que ceux obtenus par HPLC, car ce test peut être plus facilement affecté par la matrice de l'échantillon et les conditions expérimentales (Babica et al, 2006).

C'est sur cet axe de travail que se positionne mon stage au sein du laboratoire. Le but est de permettre l'analyse en routine de ces toxines lors des campagnes mensuelles de 2013. Les quantifications de ces molécules et l'évaluation de leurs occurrences sur les plans d'eau aquitains permettront d'en estimer les risques sanitaires.

GÉNÉRALITÉS

LES CYANOBACTÉRIES

Les cyanobactéries ou « algues bleues » sont des micro-organismes procaryotes possédant des pigments photosynthétiques et pouvant produire des toxines, 50 à 75 % des isolats de fleurs d'eau sont capables de produire des toxines, plus d'une toxine étant souvent présente. Les cyanobactéries possèdent une grande diversité morphologique et peuvent ainsi être regroupées sous forme de filaments ou rester unicellulaire. Elles possèdent également une grande diversité écologique leur permettant de coloniser la plupart des habitats aquatiques. Elles s'adaptent à des environnements extrêmes en termes de température, pH et d'éclairement. Dans les milieux aquatiques, elles sont planctoniques (en suspension dans la colonne d'eau) ou benthique (fixées aux substrats).

PROLIFÉRATION « BLOOM »

Quand les conditions sont favorables, beaucoup d'espèces formants des colonies unicellulaires genre *Microcystis*, connaissent des phases de prolifération massive. Cela provoque des efflorescences ou « bloom » dans les lacs et réservoirs eutrophes, surtout en été et en automne. Il se produit sur une courte période (quelques jours) une production de biomasse importante et une diminution de la diversité spécifique phytoplanctonique puisqu'une ou deux espèces deviennent alors largement dominantes. Elles peuvent provoquer une coloration de l'eau, des agrégats flottants appelés écumes (quand le bloom est en surface).

FACTEURS FAVORISANTS

L'apparition de bloom est favorisée par plusieurs facteurs (Afsset, 2006) :

Tout d'abord, externes à la communauté algale :

- Une augmentation de la concentration du milieu en nutriments ;
- Une augmentation de la luminosité et de la température de l'eau ;

Mais aussi interne aux cyanobactéries :

- Certaines possèdent des vésicules de gaz leurs permettant des déplacements dans la colonne d'eau, bloquant ainsi l'accès à la lumière des autres espèces ;
- D'autres ont la possibilité de s'associer en filaments qui protègent les colonies contre le broutage ;
- et un certain nombre peut synthétiser des toxines

LES CYANOTOXINES

Les cyanobactéries peuvent produire différentes familles de toxines ayant des organes cibles différents. Ces toxines sont intracellulaires et synthétisées par les cellules en croissance, puis elles sont relâchées dans le milieu, le plus souvent, lors de la mort de la cyanobactérie.

- Une toxine peut être produite par différentes espèces (synthèse de microcystines par *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*,...) ;
- Une espèce peut produire différentes toxines. (*Anabaena spiroides* peut produire de l'anatoxine-a et des microcystines) ;
- La quantité de toxine synthétisée est variable pour une espèce. Elle dépend de l'environnement, de la phase de croissance et du clone considéré.

Les cyanotoxines possèdent une grande variabilité de structures chimiques, entraînant des impacts toxiques différents.

- **Hépatotoxine** : Microcystines, Nodularines, Cylindrospermine ;
- **Neurotoxine** : Anatoxine, Saxitoxine ;
- **Dermato-toxine** : Aplysiatoxine (eau de mer).

HEPATOTOXINES : MICROCYSTINES ET NODULARINES

Microcystines : Ce sont des peptides cycliques de sept acides-aminés. Leurs structures générales est cyclo-[d-Ala-**X**-d-MeAsp-**Z**-Adda-d-Glu-Mdha-] avec :

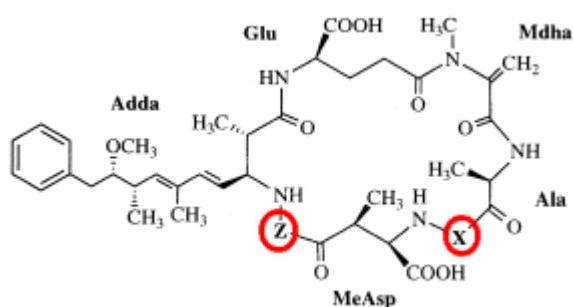
- MeAsp et Mdha correspondant respectivement à l'acide *erythro*- β -méthylaspartic et à la N-méthyl-déhydroaniline.
- **X** et **Z**, sont deux aminoacides variables qui vont définir le type de variant (Figure 1).
- Le fragment ADDA est quant à lui l'acide 3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-diénoïque (Yuan, 1999).

Les microcystines sont des molécules amphiphiles. Le caractère polaire est lié à la présence d'acides carboxyliques et à l'apparition fréquente d'arginine. Le résidu ADDA leur confère, un caractère hydrophobe.

Ce sont les toxines les plus impliquées dans les intoxications, en particulier le variant LR. Les microcystines sont synthétisées par différents genres de cyanobactérie tel que *Microcystis* ou encore *Planktothrix* (pays nordiques). La présence d'un certain type de variant de microcystine dépend de la souche de cyanobactérie et des paramètres physico-chimiques de l'environnement.

Nodularines : Ce sont des peptides cycliques à cinq acides aminés, synthétisées par *Nodularia spumigena*. On retrouve cette espèce et cette toxine dans de nombreux pays, mais elles n'ont pas encore été détectées en France. La difficulté analytique en terme d'identification de certaines toxines liée par exemple aux techniques non séparatives tel que la méthode ELISA, masque probablement leur occurrence sur notre territoire.

Ces hépatotoxines sont solubles et stables dans l'eau. En effet, elles se dégradent en 2 à 6 semaines à la lumière voire plus si elles se trouvent dans une zone obscure (Afsset, 2006). Lorsque la concentration en microcystine LR est de 2 g.L⁻¹, 90 % (+/-3%) de cette toxine est dissoute dans l'eau et cette valeur passe à 96 % (+/-3%) pour une concentration de 1 g.L⁻¹ (Rivasseau et al, 1998).



	LR	RR	YR	LA	LF	LY	LW
X	Leu	Arg	Tyr	leu	Leu	Leu	Leu
Z	Arg	Arg	Arg	Ala	Phe	Tyr	Trp

Figure 1 : Structure générale d'une microcystine inspirée de Yuan (1999)

MÉCANISME DE TOXICITÉ DES MICROCYSTINES

Les microcystines se lient à des protéines phosphatase PP1 ou PP2 en faisant une liaison covalente avec les cystéines des sous unités enzymatiques, ce qui inhibe l'enzyme. La conséquence est une modification de la phosphorylation de nombreuses protéines pouvant entraîner des nécroses, l'apoptose des hépatocytes, hémorragie et décès (Afsset, 2006). La toxicité des microcystines et des nodularines est liée à la présence du fragment ADDA. En effet, lorsque celui-ci n'est pas présent la toxicité diminue fortement (Meriluoto et al, 2005)

Comme ces molécules sont plutôt hydrosolubles, elles franchissent les membranes cellulaires via un co-transport avec un ion organique au sein des sels biliaires. Ce mécanisme de franchissement des barrières biologiques explique l'organotropisme limité des microcystines.

Toxicité aiguë : Hémorragie, risque de décès.

Toxicité chronique : Altération hépatique, promotion tumorale (LR est un proto-oncogène).

INTOXICATIONS

Les premiers cas rapportés d'intoxication animale par des cyanobactéries datent du XIX^e siècle. Ces intoxications aiguës souvent mortelles, se produisent suite à une ingestion de cyanobactérie (bloom) par des animaux sauvages ou domestiques (Soares et al, 2006). Les intoxications humaines se traduisent elles par des troubles intestinaux et des irritations cutanées suite à une contamination par ingestion d'eau de boisson ou d'eau brute lors d'activités nautiques comme la baignade (Afsset, 2006). A ce jour, il n'y a pas eu d'intoxication humaine aiguë due aux cyanobactéries en France mais il y a de nombreux cas avérés dans le reste du monde. Ainsi, 126 patients d'un centre de dialyse au Brésil, ont été intoxiqués et 60 sont décédés suites à cette intoxication (Soares et al, 2006).

RÈGLEMENTATION EN VIGUEUR POUR LES EAUX DE BAINADES

En France, les principes pour la gestion et la surveillance des proliférations de cyanobactéries dans les eaux de baignade ont été publiés par la Direction Générale de la Santé sur la base d'un avis du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France le 4 juin 2003. La surveillance sanitaire se base sur trois critères : la vulnérabilité des eaux (site à faible ou haut risque), comptage cellulaire et dosage des microcystines en équivalent microcystine-LR. Les résultats fournissent les recommandations à mettre en place (Tableau 1).

Tableau 1 : Recommandations de gestion et de surveillance en fonction du niveau de contamination par les cyanobactéries (<http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/cyano/cyanobacteries.html>)

Niveaux	Nombre de cyanobactéries (cellules/ml) et teneur en Mc-LR	Recommandations	
		Gestion	surveillance
I	< 20 000 +/- 20%	Information du public au niveau des blooms	Journalière, comptage + identification bimensuelle.
	Entre 20 000 et 100 000 +/- 20%	Information du public au niveau des zones d'usages	Journalière, comptage + identification hebdomadaire
II	> 100 000 +/- 10% [LR] < 25 µg.L ⁻¹	Information du public + limitation de la baignade dans les zones les plus concentrées.	// (idem)
	> 100 000 +/- 10% [LR] > 25 µg.L ⁻¹	Information du public + limitation activités nautiques + interdiction de la baignade.	// (idem)
III	Présence de mousse ou d'écume.	Information du public + interdiction des activités nautiques et de la baignade + prévenir tout contact avec les écumes (personnes ou animaux)	Suivi de l'évolution et de la localisation des écumes, poursuite du suivi hebdomadaire + suivi des concentrations en toxine bimensuel.

Donc en termes de réglementation, la valeur seuil à ne pas dépasser pour les eaux de baignades est de 25µg.L⁻¹ et l'OMS a également fixée une valeur seuil de microcystine LR dans les eaux de boissons qui est de 1 µg.L⁻¹. Cette microcystine est la seule cyanotoxine pour laquelle une VTR (valeur toxique de référence) a été fixée, et cette valeur seuil est appliquée par de nombreux pays.

Le rapport AFSSA/AFFSET de 2006 préconise une concentration maximale tolérable de 13 $\mu\text{g.L}^{-1}$ +/- 5 % en microcystines (somme de tous les dérivés de microcystines). Il y est proposé que l'interdiction de la baignade et de la pratique de sports nautiques soit effective lorsque le dépassement de cette valeur est confirmé par deux prélèvements à trois jours d'intervalle.

TECHNIQUES DE DOSAGES DES MICROCYSTINES AU LABORATOIRE

LE TEST ELISA

C'est une technique immuno-enzymatique de détection des microcystines qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée résultante de l'interaction enzyme/substrat. Le test utilisé au laboratoire est un test ADDA dépendant donc il permet de doser simultanément les nodularines et les microcystines car toutes possèdent ce fragment.

La figure 2 nous montre un exemple de test ELISA compétitif avec en haut un échantillon contenant des cyanotoxines et en bas un échantillon n'en contenant pas.

Le test contient une plaque de puits où est fixé un antigène spécifique de ADDA représenté par un triangle gris.

- Premièrement, on fait incuber dans les puits nos échantillons (cyanotoxines en rouge) puis une solution d'anticorps primaire (en bleu).
- Ensuite est ajouté l'anticorps (en jaune) de détection couplé à une enzyme (étoile bleu) qui va se fixer spécifiquement sur les anticorps à doser.
- Après une étape de rinçage, on ajoute la solution contenant le substrat de l'enzyme, la réaction induite est colorée. Cette coloration est inversement proportionnelle à la concentration en microcystines / nodularines de l'échantillon.

En effet, plus il y a d'hépatotoxines, moins le 1^{er} anticorps pourra se fixer et par conséquent l'anticorps de détection ne pourra pas se fixer non plus. Dans ce cas-là, la coloration sera très faible. La concentration obtenue est dite « LR équivalent » car ce test ne discrimine pas les microcystines entre elles du fait de la reconnaissance du fragment ADDA, c'est pour cela que dans notre développement de méthode, les échantillons seront dosés à la fois par ELISA et par SPE-HPLC-MS/MS.

Le protocole complet du test ELISA se trouve en annexe I.

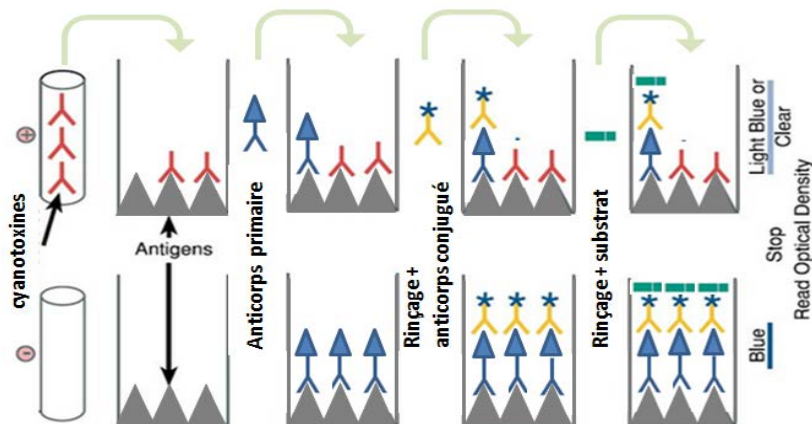


Figure 2 : Principe du test ELISA compétitif inspiré de www.elisa-antibody.com/index.php?page=competitive-elisa

L'ANALYSE EN CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

La chromatographie est une méthode de séparation d'analytes grâce à la différence de répartition de ceux-ci entre une phase stationnaire « PS » greffée dans une colonne et une phase mobile « PM » composée d'un mélange de solvant. Les composés à éluer vont être transportés avec la PM et retenues sélectivement par la phase stationnaire. Ainsi à chaque composé correspond un pic à un temps donné appelé « temps de rétention » ou TR correspondant au temps que celui-ci met pour sortir de la colonne. Il existe plusieurs types de chromatographie comme la chromatographie gazeuse, sur couche mince CCM, ou encore liquide. Vers la fin des années 60, a été développée la chromatographie liquide haute performance qui permet d'étudier des mélanges complexes de molécules, même thermolabiles ou de grand poids moléculaires. L'HPLC peut s'appliquer quasiment à tous les mélanges et en faisant varier la composition de la PM et de la PS, la palette de composés pouvant être étudiée est d'autant plus amplifiée.

LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE

C'est une technique d'identification basée sur la détermination de la masse des molécules qui permet de connaître la structure d'un composé en étudiant les différents fragments créés. Pour cela, les composés d'un échantillon vont être ionisés, et les ions ainsi créés vont être soumis à des champs magnétiques, ainsi leurs rapports « masse sur charge » ou « M/Z » pourront être déterminés en fonction de leurs trajectoires. Il y a toujours quatre étapes en spectrométrie de masse, peu importe l'appareillage choisi :

- **L'ionisation** : Les composés de l'échantillon vont être ionisés et devenir des ions en phase gazeuse par divers procédés (impact électronique, ESI ...). Cette étape va augmenter l'énergie des molécules, provoquant lors de sa dissipation une fragmentation liée aux ruptures successives des liaisons chimiques. A la fin de cette étape, il y a formation d'ions moléculaires et d'ions fragments.
- **L'accélération** : Après la première étape, les ions caractérisés par leurs rapports m/z vont être accélérés et focalisés à travers des lentilles (champ électrique) ce qui augmente leurs énergies cinétiques.
- **La séparation** : Une fois accélérés, les ions vont migrer à travers des champs magnétiques ou électriques au sein de l'analyseur. Ils vont être discriminés en fonctions de leurs trajectoires liées à leurs rapports m/z.
- **Détection** : Les ions vont être captés et amplifiés par le détecteur. Les informations sont ensuite retraitées par un système informatique. Un spectre de masse m/z en fonction de l'abondance relative sera créé.

LA SOURCE ELECTROSPRAY (ESI)

C'est une technique d'ionisation douce appelée aussi « électronébulisation » et son fonctionnement est schématisé sur la figure 3. Ce mode d'ionisation s'effectue à pression atmosphérique. Cette technique repose sur l'introduction du composé en solution dans l'appareil par un capillaire très fin porté à haut potentiel (quelques kV) permettant de charger la solution. La solution va s'accumuler au bout du capillaire formant un cône de Taylor, composé de fines gouttelettes ou « nébulisat ». En mode ionisation négative les gouttelettes seront mono chargées et en ionisation positive (ce qui est notre cas) elles seront polychargées (adduits proton par exemple), le mode d'ionisation dépend du signe de différence de potentiel existant entre le capillaire et la contre électrode. Quand les forces de répulsion coulombiennes sont supérieures aux forces de tension superficielles, le cône s'allonge et se sépare en très fines gouttelettes. Un courant d'azote est propulsé également dans le capillaire afin de faciliter la nébulisation. Selon les sources ESI, on a parfois un gaz séchant (azote en général), chauffé, qui arrive perpendiculairement au spray afin de faciliter la désolvatation. La diminution de la taille des gouttelettes liée à l'évaporation, associée à l'augmentation de la densité de charge provoque à terme, la rupture de celles-ci en gouttelettes beaucoup plus fines formant des ions en phase gazeuse. Plus loin une contre électrode dirige le faisceau ionique vers l'interface (orifice conique). Cette interface est composée de plusieurs lentilles et la pression qui y règne est beaucoup plus faible. Ici, il y a deux phénomènes : la désolvatation complète des ions et leurs activations par collision créant des ions fragments. Les ions moléculaires « intacts » et les ions fragments sont ensuite envoyés dans l'analyseur de masse (Beaudry et al, 2006).

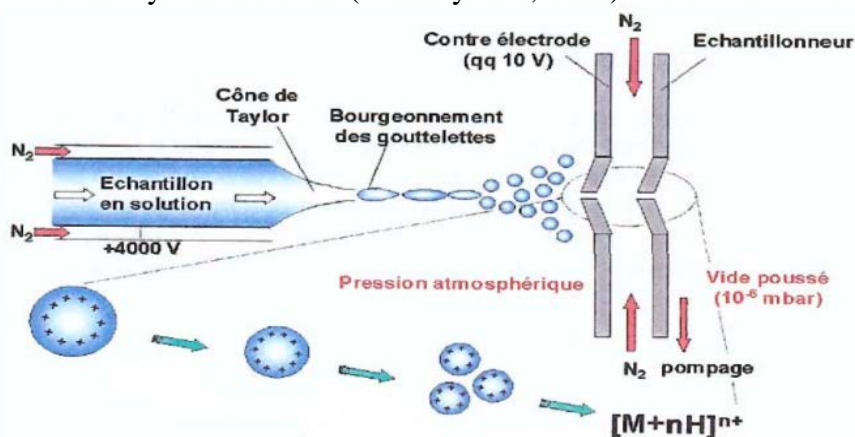


Figure 3 : Schéma ESI

L'ANALYSEUR QUADRIPOLAIRE

Cet analyseur de type « Q » discrimine les ions via leurs rapports m/z grâce à des champs électromagnétiques. Il est composé de quatre électrodes hyperboliques ou cylindriques, deux électrodes sont soumises à une tension continue et les deux autres à une tension alternative avec une haute fréquence. Les ions dont la trajectoire n'est pas déviée ou qui ne s'écrasent pas sur les électrodes, arriveront jusqu'au détecteur, sinon ils n'apparaîtront pas.

TECHNIQUE COUPLÉE : HPLC ET SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM TRIPLE QUADRIPOLE

On peut coupler les performances de séparation de l'HPLC avec la détection par spectrométrie de masse en tandem.

Pour commencer les composés vont être séparés grâce à leurs temps de rétention. Les composés sont élués par la phase mobile et retenues sélectivement sur la colonne composée de phase stationnaire. L'appareil de chromatographie est relié à un dispositif de détection ESI-MS/MS. La chromatographie permet d'envoyer à des temps différents les composés dans le spectromètre de masse. Suite à cette première séparation les composés vont pénétrer dans un spectromètre de masse triple quadripôle.

L'analyseur de type triple quadripôle permet d'effectuer de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Il est composé de 3 quadripôles successifs Q1, Q2 et Q3. Suite à l'ionisation dans la source par ESI, le 1^{er} quadripôle sélectionne un « ion parent » ou « ion précurseur » en fonction des rapports m/z. Cet ion va entrer dans Q2 qui est en fait, une chambre de collision remplie de gaz inerte (argon). Dans cette chambre l'ion se fragmente par CAD (dissociation activé par collision), c'est-à-dire que son énergie interne va augmenter via les collisions avec les molécules de gaz jusqu'à la fragmentation, formant ainsi un ou plusieurs « ion fils » ou « ion fragment ». Les ions fils entrent dans Q3 où ils sont balayés et séparés en fonction de leurs m/z. Le mode d'acquisition « Multi Reaction Monitoring » ou MRM schématisé en figure 4, permet la sélection simultanée d'un ion parent dans Q1 ainsi que d'un ion fils caractéristique dans Q3 ce qui correspond à une transition (notée Q1>Q3). Cela permet une détection spécifique et une augmentation du rapport signal/bruit. Ainsi grâce à ce couplage on peut facilement détecter simultanément plusieurs composés grâce aux transitions (Q1>Q3) propres à chacun.

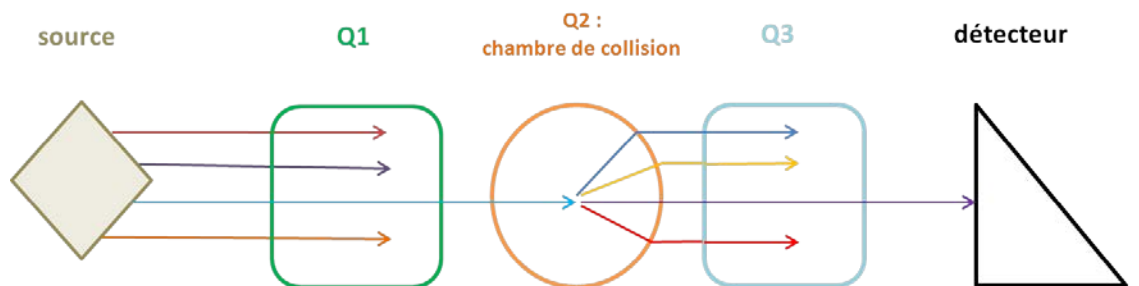


Figure 4 : Fonctionnement MS/MS type «MRM »

Détection Q1/Q3

MATÉRIELS ET METHODES

ECHANTILLONNAGE TERRAIN

Les échantillons pour le développement de la méthode analytiques sont prélevés sur quatre lacs aquitains Cazaux-Sanguinet, Parentis-Biscarrosse, Carcans-Hourtin et Lacanau.

Pour chaque lacs, quelques litres d'eau intégrés sur la zone euphotique³ ont été prélevés pour le développement de la méthode et l'optimisation du protocole. La zone de prélèvement se situe au point le plus profond du lac dans la zone où la lumière pénètre suffisamment pour permettre la photosynthèse. Cette technique de prélèvement suit le protocole standardisé d'échantillonnage décrit par (Laplace-Treyture et al, 2009). Puis à chaque nouvelle campagne de prélèvement (1 par

³ 2.5 x fois la zone de transparence mesurée avec le disque de Secchi

mois), un flacon d'un litre d'eau intégré sur la zone euphotique a été prélevé pour les analyses sur ces 4 lacs, ainsi qu'un flacon de 10 ml pour les tests ELISA.

Les échantillons sont ensuite conservés au congélateur pour limiter la dégradation et pour permettre une pré-lyse cellulaire lors de la décongélation (Meriluoto et al, 2005).

DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE

CONDITIONNEMENT DES ÉCHANTILLONS

On filtre 200 ml d'eau de l'échantillon prélevé sur des filtres GF/F en fibre de verre pour retenir les éventuelles cyanobactéries. Le filtre est ensuite découpé dans un tube rempli avec 10 ml de méthanol. Le tout est placé dans le bac à ultra son pendant 20 minutes. Cela permet une lyse des cyanobactéries et un relargage des microcystines (Meriluoto et al, 2005). Les 10 ml de méthanol contenant les microcystines venant du filtre sont ajoutés au filtrat restant (200 ml) et on réalise une Extraction en phase solide (SPE) sur des cartouches oasis HLB.

EXTRACTION EN PHASE SOLIDE

Cette technique permet de récupérer des analytes très peu concentrés dans un échantillon sur un adsorbant contenu dans une cartouche. Elle permet de purifier et de concentrer les échantillons. Trois étapes la composent :

- Conditionnement de la cartouche avec différents solvants ;
- Percolation de l'échantillon sur la cartouche ;
- Etape de rinçage avec un mélange de solvant de façon à éliminer les impuretés sans éluer les composés à analyser.

La cartouche choisie pour le dosage des microcystines est une OASIS HLB 6 ml 150 mg d'adsorbant basé sur un copolymère hydrophile-hydrophobe de type « Poly (divinylbenzène-N-vinylpyrrolidone) ». Les avantages de ce type d'adsorbant sont sa mouillabilité et les bonnes interactions avec les composés polaires ou amphiphiles (cas des microcystines).

Le protocole complet de la préparation des échantillons est détaillé en annexe III

OPTIMISATION DE LA SPE

VOLUME DE FUITE

Le volume de fuite permet de savoir si les cyanotoxines s'adsorbent bien sur la cartouche ou si au contraire on a des pertes (capacité d'adsorption dépassée en fonction du volume percolé). Nous avons réalisé une série d'extraction sur cartouche avec différents volumes d'eau d'Évian dopées à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ en microcystine, acidifié ou non. Les volumes testés étaient de 100, 200 et 500ml acidifiés à 0,02 % d'acide acétique (environ pH 5) ou non (pH de l'eau d'Évian = 7.2). Le percolât a été récupéré puis analysé par HPLC-ESI-MS/MS. Il s'avère que pour tous les volumes testés, acidifiés

ou non, la rétention des molécules est optimale sur l'adsorbant de la cartouche car elles ne sont pas quantifiées ou détectées.

En raison de l'étape de filtration pendant le conditionnement de l'échantillon, nous avons choisi un volume d'extraction de 200ml pour que le volume soit suffisamment important pour la récupération de cyanobactéries sur les filtres GF/F. Ce volume semblait par ailleurs, également suffisant pour atteindre des limites de quantification (LQ) satisfaisantes par la suite, soit environ 30 ng.L⁻¹. Cela correspond à 1/3 du seuil pour l'eau potable (plus restrictif que le seuil réglementaire pour les eaux de baignades).

RINÇAGE

Cette étape permet d'éliminer les molécules co-éluées, adsorbées sur la cartouche tout en conservant les microcystines. Pour optimiser cette étape, nous avons réalisé des extractions avec 200 ml d'eau dopée en microcystine à 0.1 µg.L⁻¹. Quatre conditions de rinçage différentes sont testées 1) Pas de rinçage, 2) 10 ml de méthanol aqueux 5%, 3) 10 ml de méthanol aqueux 15% et 4) 10 ml de méthanol aqueux 30 %. Le tout en triplicat. Après analyse des résultats, les concentrations retrouvées sont quasi identiques pour les 4 conditions et conformes à celles attendues. Cependant, nous pouvons constater que le bruit de fond et les impuretés co-éluées diminuent significativement pour la condition 4, donc avec le plus fort pourcentage testé de méthanol comme déjà montré par d'autres auteurs (Rivasseau et al, 1998).

ELUTION

L'élution permet de désorber sélectivement les composés d'intérêt avec un faible volume de solvant. L'optimisation de cette étape consiste à choisir le volume et le solvant optimal d'élution. Comme les microcystines ont des polarités différentes (Rivasseau et al, 1998), nous avons testé différents volumes et solvants pour l'élution d'une cartouche sur laquelle a percolé 200 ml d'eau dopée à 0.1µg.L⁻¹ en microcystines. Dans un premier temps, nous avons élué les cartouches avec 2x3 ml de méthanol pur puis avec 2x5 ml de dichlorométhane (beaucoup plus apolaire). Il s'avère que 2 x 3 ml de méthanol pur suffisent pour éluer toutes les microcystines.

Ensuite, l'éluat est évaporé sous azote et le résidu est repris dans 1 ml de mélange eau/ACN (90 : 10 v/v). Au final nous concentrons 200 fois l'échantillon, puisque nous passons de 200 ml avant la préparation à 1 ml à la fin. Ce facteur de concentration nous permettra d'atteindre les limites de quantifications (LQ) visées.

CHOIX DE L'ÉTALON INTERNE/TRACEUR

Le standard interne, la leucine Enképhaline, est ajoutée en fin de préparation d'échantillon, juste avant l'analyse, pour une concentration finale de 25 µg.L⁻¹. C'est un peptide linéaire composé de 5 acides aminés (figure 5) et de poids moléculaire égal à 555.6 Da. Il est intéressant de choisir ce peptide comme étalon interne puisqu'il n'est pas présent dans le milieu aquatique et que sa nature peptidique lui confère des propriétés physico-chimiques proches de celles des cyanotoxines, donc il

n'interfère pas dans le dosage de celles-ci (Cong et al, 2006). De plus, les étalons de microcystines deutérés ou autres isotopes stables ne sont pas encore commercialisés (Xu et al, 2008).

Cependant, lors du développement de la méthode analytique, il s'est avéré que la leucine faussait les résultats lors des retraitements de données lorsqu'on la considérait comme un étalon interne. Des biais étaient induits car elle a un temps de rétention plus bref que les autres molécules d'intérêt (2,80 min alors que les autres TR sont compris entre 4,8 et 6,1 min). Ainsi la leucine n'est probablement pas impactée de la même façon par les effets matriciels et donc fausse légèrement les concentrations calculées. Nous avons donc fait le choix, de conserver la leucine non pas comme étalon interne mais comme « traceur », c'est-à-dire ajouté en quantité connue avant le début de la préparation des échantillons. Le rendement de cette molécule nous permettra de voir s'il y a eu un problème lors de la préparation et/ou un éventuel problème d'effet matriciel.

En voulant vérifier le rendement de la leucine dans de l'eau d'Evian dopée à 125 ng.L^{-1} (5 réplicats), les résultats obtenus sont de l'ordre de $5.25 (+/- 0.25) \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ au lieu des $25 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ attendus. Des concentrations de même ordre de grandeur sont obtenues avec cette molécule dans des matrices naturelles. Donc la perte ne provient pas d'un effet matriciel mais est sans doute liée à une étape du protocole de préparation des échantillons, probablement lors du rinçage de la cartouche SPE avec une solution méthanol/EUP 30:70 (v/v). Au vu des faibles rendements de cette molécule dans ce protocole, il serait judicieux d'envisager par la suite, l'utilisation d'un autre traceur qui ne serait pas élué durant l'étape de rinçage. En attendant, les rendements, bien qu'inférieurs à la valeur attendue, sont assez constants (coefficient de variation de 4.7 %), ce qui permet d'avoir une idée sur un éventuel problème d'étalonnage ou de matrice, et ainsi de continuer à l'utiliser comme traceur durant cette étude.

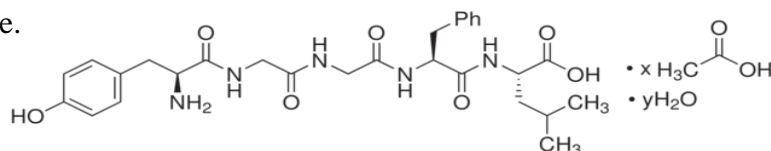


Figure 5 : Structure de la leucine Enképhaline

CHOIX DE LA PHASE MOBILE ET DU GRADIENT:

Différentes phases mobiles (PM) contenant de l'eau ultra pure (EUP) et de l'acétonitrile (ACN), acidifiées à différents pourcentages d'acide formique et/ou contenant de l'acétate d'ammonium ont été testées (Figure 6). Le choix de la PM est très important car elle est garante de la bonne séparation et résolution des pics. Comme la chromatographie liquide est directement reliée au spectromètre de masse via l'électrospray, la phase mobile joue un rôle dans l'ionisation des composés et donc sur la résolution (Draper et al, 2009). En effet, pour le dosage des microcystines, la PM doit être légèrement acidifiée pour obtenir une meilleure séparation des pics sur le chromatogramme ainsi qu'une meilleure ionisation (Beltran et al, 2012) en favorisant la formation des adduits $[M+H]^+$ en ionisation positive (Cong et al, 2006). Cependant elle ne doit pas avoir un pH trop bas car cela favoriserait la forme doublement protonée posant des problèmes pour la quantification par la suite. De plus nous ajoutons de l'acétate d'ammonium qui permet de limiter ce phénomène de double protonation mais risque en contrepartie, de former des adduits sodiums qui posent aussi des problèmes pour la quantification.

Choix final de la phase mobile : 0.1% acide formique (Wang et al, 2007) + 5 mM acétate d'ammonium + ACN/EUP. Ainsi le chromatogramme obtenu montre une bonne séparation des pics et un faible bruit de fond pour un mélange de microcystine à 50 µg.L⁻¹.

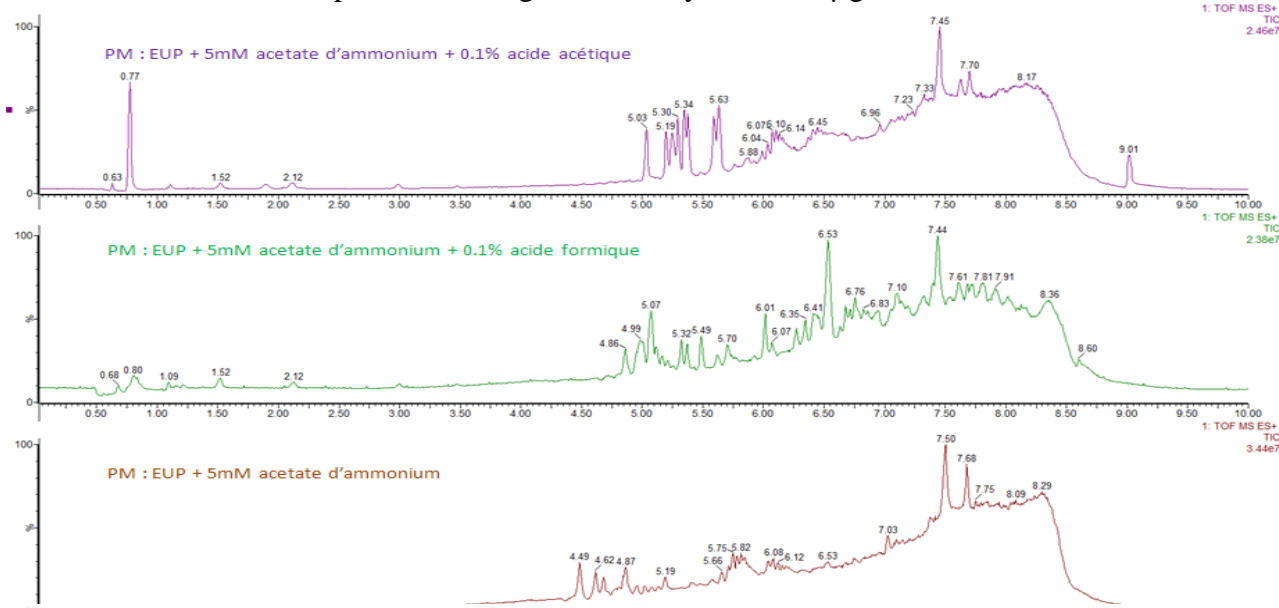


Figure 6 : Test de différentes PM sur un mélange de microcystines à 50 µg.L⁻¹

Afin de pouvoir éluer toutes microcystines, un gradient d'élution a été sélectionné. En effet, même si nous sommes sur une phase mobile polaire, les microcystines ont des polarités différentes, donc il faut faire varier la polarité de la phase mobile. Ainsi avec un solvant polaire (EUP : polarité 10,2 selon ROHRSCHEIDER) et un moins polaire comme l'ACN (5.8) la PM peut éluer toutes les microcystines, à des temps de rétentions différents grâce au gradient qui fait varier la polarité de la phase mobile est donc l'affinité des microcystines avec la PS de la colonne.

Les paramètres complets du système chromatographique sont en annexe IV.

PARAMÈTRES SPECTROMÉTRIE DE MASSE :

Le nombre de charges positives formées sur une molécule en ESI varie en fonction de la structure moléculaire et des conditions d'ionisation. Comme c'est une ionisation dite « douce », un minimum d'énergie excédentaire est transféré à la molécule ionisée et donc peu de fragmentation se produit dans la source. Rappelons que le mode d'analyse est « MRM » donc nous suivons les transitions « ion précurseur/ion fils » ou « Q1>Q3 ». On favorise l'ion précurseur au niveau de la source car il n'y a pas de fragmentation dans celle-ci (ionisation douce), puis on le casse dans la cellule de collision. Le précurseur est uniquement isolé dans Q1, il n'atteindra jamais le détecteur (Wang et al, 2007).

Sélection d'ions précurseurs / fils : Il y a deux ions qui sont produits avec les plus hautes abondances ils sont donc choisis comme un ion de quantification et un de qualification. L'ion avec la plus grande abondance est l'ion de quantification, et celui avec la seconde plus forte abondance est l'ion qualitatif. La meilleure énergie de collision et les différents paramètres de la source sont déterminés ainsi (Xu et al, 2008). Plus l'énergie de collision est élevée, plus on forme de petits

fragments, ce qui justifie un CE (collision energy) plus élevé pour obtenir le fragment de 107 Da, par rapport aux 135 Da, par exemple pour les microcystines.

Sélection d'ions précurseurs : Grâce aux infusions (injection direct dans la source de l'analyte) en mode ESI positif, on sélectionne pour chaque molécule les ions précurseurs en fonction des intensités relatives des ions multichargés.

- ➔ $[M+2H]^{2+}$ à m/z 519,9 est l'ion précurseur choisi pour MC-RR, il donne le pic le plus intense dans le spectre de masse ;
- ➔ $[M+H]^+$ est l'ion précurseur pour les autres molécules pour m/z 1045,6 (YR), 995,5 (LR), 910,4 (LA), 1002,5 (LY), 1025,5 (LW), 986,5 (LF).

Le fragment m/z 135 est récurrent et en grande quantité dans les spectres de masse des microcystines et des nodularines. En effet, il correspond à un fragment provenant du résidu ADDA $[Phe-CH_2-CHOMe]^+$ présent dans ces deux types de molécule. La formation de ce fragment est provoquée par la rupture hétérolytique de la liaison du groupe méthoxy (Beltran et al, 2012) selon le schéma réactionnel présenté en figure 7. Cet ion est donc souvent choisis pour la quantification (Triantis et al, 2010).

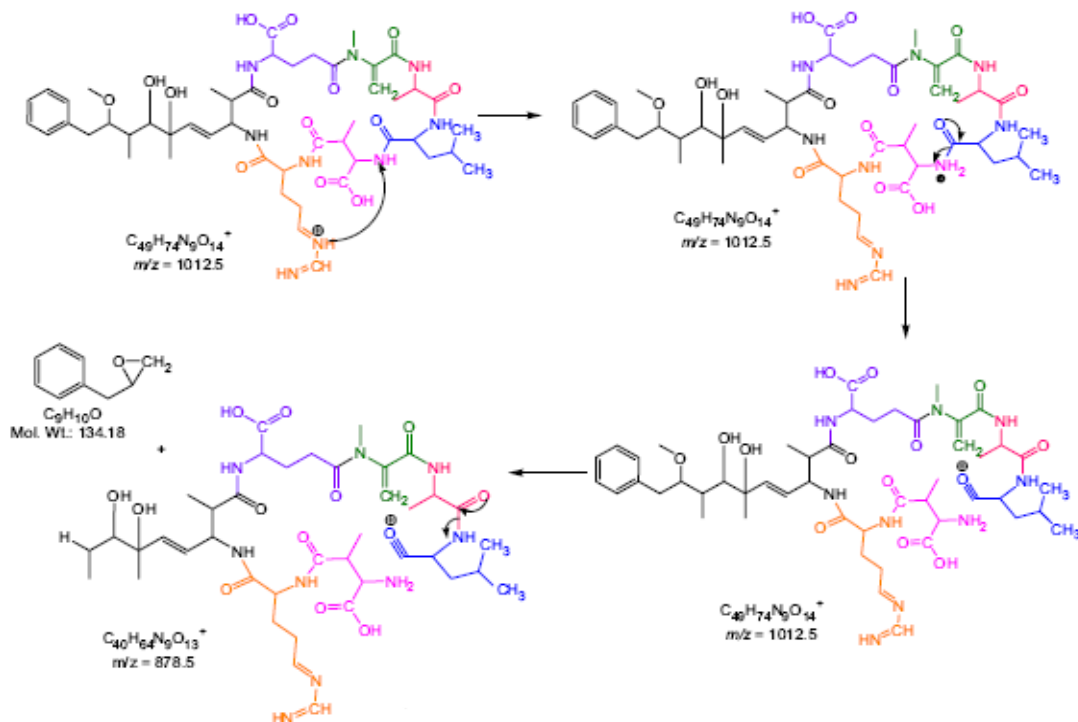


Figure 7 : Mécanisme réactionnel de formation du fragment 134 sur Mc-LR (Antoniou et al, 2008)

VALIDATION DE LA MÉTHODE D'ANALYSE DES MICROCYSTINES HPLC/MS/MS :

PRINCIPE

Pour valider une méthode, il faut vérifier plusieurs paramètres recommandés dans la norme : NF T90-210 - Qualité de l'eau - Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire. Ici les paramètres testés sont : la linéarité, la spécificité, les rendements d'extractions et les limites de quantifications. La validation de méthode a été réalisée avec des étalons.

LINÉARITÉ

L'étude de la linéarité permet de vérifier si la réponse instrumentale est proportionnelle à la concentration dans une gamme choisie grâce à une régression linéaire ($A = a.C + b$). Ici, cinq niveaux de concentration (5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) avec 5 réplicats par niveau de concentration. Pour les raisons mentionnées auparavant, l'étalonnage externe a été préféré. Il est réalisé pour chaque toxine en traçant le graphe *Aire de l'analyte* en fonction de la *concentration de l'analyte*. Si la concentration est proportionnelle à l'aire on obtient une droite. Le domaine d'étalonnage et la régression sont validés avec une analyse de la variance grâce à un test de Fisher qui compare les écarts entre les moyennes des points expérimentaux et la droite du graphique, ainsi le domaine d'utilisation de la méthode est déterminé.

Si le domaine n'est pas linéaire, une étude de la dispersion et de la distribution des résidus est réalisée pour valider un modèle quadratique. Un résidu est l'écart entre la valeur estimée via une droite de régression $A = a.C^2 + b.C + c + \varepsilon$ (ε = le résidu) et la valeur mesurée. Les résidus sont caractérisables comme des erreurs de mesure, ceux sont une accumulation de petits aléas non-maîtrisables, indépendants et non expliqués par le modèle de régression. Pour valider le modèle quadratique, un écart maximal toléré (EMT) est appliqué, il est par convention de 40% pour les deux premiers points de gamme et de 20% pour les autres. Cela permet aussi de connaître la tolérance de déviation (justesse de l'appareil) accordée aux points de contrôle « QC » (étalon injecté environ tous les 10 échantillons au cours d'une séquence d'analyse). Pour cela la valeur du résidu « ε » exprimé en pourcentage doit être inférieure ou égale à l'EMT. Par ailleurs, les coefficients de corrélation r^2 sont déterminés.

Pour toutes les molécules étudiées, la régression linéaire est acceptable et le domaine d'étalonnage est valide entre 5 et 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$. La fonction d'étalonnage a aussi été validée avec un modèle quadratique, ce type de régression donnant des résultats parfois plus justes, notamment lors de l'étude de la spécificité.

SPÉCIFICITÉ

Cela permet d'évaluer si la méthode est spécifique à l'analyte étudié et si les concentrations calculées sont influencées par un éventuel effet matriciel. En effet, dans les matrices naturelles, certaines impuretés ou d'autres composés peuvent être co-élusés avec les analytes d'intérêts, et cela peut minorer ou majorer les concentrations calculées d'un facteur plus ou moins important en fonction de la matrice et de l'analyte étudié.

Ce test se déroule en deux étapes. Premièrement, il faut réaliser tout le protocole de préparations sur 10 échantillons de lacs (en duplicats), l'éluat est séparé en deux fractions. Une fraction est analysée en HPLC-MS/MS pour connaître la concentration initiale en analytes du milieu. Puis, en fonction de ces résultats, des ajouts dosés de même ordre de grandeur que les concentrations initiales sont effectués dans la deuxième fraction d'éluat avant analyse. Une droite de recouvrement *grandeur*

retrouvée = f (grandeur ajoutée) est tracée par la suite. S'il n'y a pas d'effet matriciel, les valeurs des concentrations ajoutées sont statistiquement égales aux différences entre les mesures après et avant ajouts, ainsi la droite théorique a une origine et une pente non significativement différente de 0 et de 1 selon un test de Student ($p=0,01$).

Ici, il n'y avait pas de microcystines détectées (absentes ou en dessous du seuil de détection). Dans la 2^{ème} fraction, six niveaux de concentrations avec « n » réplicats par niveaux ont été répartis comme ceux-ci : 5 (n=1) ; 10 (n=2); 25 (n=2); 50 (n=2); 75 (n=2) et 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (n = 1).

RENDEMENTS D'EXTRACTION

Les rendements d'extractions renseignent sur l'efficacité de la SPE et du protocole en général (étape de filtration, élution...). Ils sont calculés et validés grâce aux moyennes et aux écart-types des taux de récupération obtenus sur une matrice dépourvue de cyanotoxines, dopée artificiellement. Elle est dopée avant extraction à deux niveaux de concentration pour obtenir des concentrations finales correspondant à 20% et 80% de la gamme soit 10 et 75 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Les rendements obtenus sont visibles dans le Tableau 2. Un test de Cochran ($p=0,01$) a permis de vérifier l'homogénéité des variances associées aux 2 niveaux de dopage.

Ici nous sommes dans l'étape de validation qui intervient après la phase d'optimisation de la SPE où des rendements avaient déjà été calculés (Cf. Optimisation de la SPE).

LA LIMITE DE QUANTIFICATION

La limite de quantification correspond à la plus petite concentration quantifiable sans que l'erreur sur la mesure ne soit significative. Ce paramètre est défini en effectuant un dopage de concentration proche de la limite de quantification pressentie dans une matrice d'intérêt dépourvue d'analytes d'intérêt. Pour que la LQ soit validée, sa valeur doit être bornée entre des EMT de +/- 60% de la valeur pressentie. Tout comme les rendements, les résultats de LQ calculés sont visibles dans le Tableau 2

RÉSULTATS ET DISCUSSION RELATIF À LA VALIDATION DE LA MÉTHODE SPE-HPLC-MS/MS

Pour toutes molécules étudiées, la régression est acceptable et le domaine d'étalonnage est valide en linéaire et en quadratique (Tableau 2) pour des concentrations comprises entre 5 et 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Pour toutes les molécules (sauf LR), le modèle préférentiellement utilisé est le quadratique car les résultats obtenus pour la spécificité sont bien meilleurs avec celui-ci. Pour LR, les deux modèles sont validés mais le linéaire donne de meilleurs résultats pour la spécificité.

Tableau 2 : Résultats de la validation de la méthode "dosage microcystine par HPLC-ESI-MS/MS"

	Modèles validés	Spécificité		Rendement (%) (%C.V)	Rendement corrigé (%) ⁴	LQ (ng.L ⁻¹) (%C.V) ⁵
		IC pente	IC origine			
RR	Quadratique et linéaire	0.99<IC<1.17	-3.23<IC<6.25	76 (17.8)	71	35 (6.7)
LW	Quadratique et linéaire	0.88<IC<1	-0.01<IC<6.62	83 (25.8)	89	21 (3.9)
LY	Quadratique et linéaire	0.90<IC<1.10	-1.27<IC<8.89	79 (26.0)	79	23 (8.2)
NOD	Quadratique et linéaire	0.87<IC<1.07	-1.75<IC<8.85	69 (23.0)	72	18 (7.4)
LR	Quadratique et linéaire	0.98<IC<1.13	-0.41<IC<7.15	89 (22.9)	85	23 (6.2)
YR	Quadratique et linéaire	0.92<IC<1.06	-0.06<IC<7.26	87 (22.5)	88	21 (14.9)
LA	Quadratique et linéaire	0.88<IC<1.24	-0.33<IC<18.57	76 (26.9)	72	29 (6.5)
LF	Quadratique et linéaire	0.93<IC<1.08	-0.61<IC<6.87	81 (23.5)	80	25 (12.2)

En ce qui concerne la spécificité, en étalonnage interne avec la leucine, celle-ci n'était pas validée pour tous les analytes (sauf LA). En effet, les pentes étaient significativement différentes de 1, mais les origines étaient validées car non significativement différentes de 0.

Les données ont donc été retraitées en étalonnage externe (sans leucine) et ainsi les spécificités ont été validées. Ainsi pour chaque molécule, les pentes et les ordonnées à l'origine ne sont pas significativement différentes de 1 et 0, et comprise dans les intervalles de confiances (Tableau 2). La figure 8 représente la droite de recouvrement $grandeur\ retrouvée = f(grandeur\ ajoutée)$ du variant MC-YR.

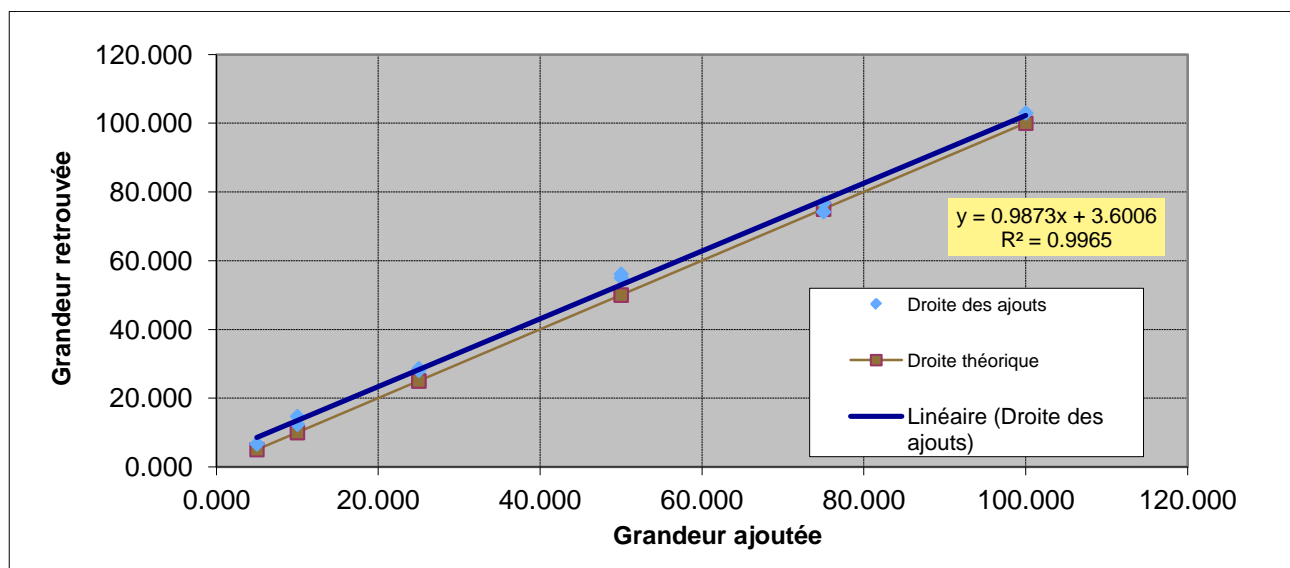


Figure 8 : Droite de recouvrement de YR.

Les effets matrices peuvent résulter d'une compétition d'ionisation au sein de la source electrospray (ESI) entre les analytes et des impuretés polaires ionisables et des sels également présents dans la matrice (composés interférents). Cela modifie la conductivité et donc la compétition entre les forces surfaciques et coulombiennes, permettant le détachement des gouttelettes du cône de Taylor. Le cône devient irrégulier et provoque une suppression ou une augmentation du signal, induisant des écarts de justesse et parfois des problèmes de répétabilité (Beltran et al, 2012) (Beaudry et al, 2006).

⁴ Moyenne des rendements / pente de la spécificité

⁵ Coefficient de variation : (écart type / moyenne) *100

Ainsi les acides humiques présents dans l'eau, par exemple, peuvent être co-élués avec le composé à analyser et fausser la quantification de celui-ci. Pour éviter que cela se produise il est important de bien optimiser l'étape de SPE pour éliminer un maximum ces acides (Reemtsma et al, 2001).

Afin de savoir si cet effet matrice doit être corrigé, les rendements d'extraction ont été testés en réalisant 10 extractions sur des matrices sans ou pauvre en microcystines. 5 matrices sont dopées pré-extraction à 50 ng.L⁻¹ et les 5 autres à 375 ng.L⁻¹, afin d'obtenir *in fine* des concentrations de 10 et 75 µg.L⁻¹ respectivement. Lors de la validation du domaine d'étalonnage, pour des valeurs d'ajouts de 10 et 75 µg.L⁻¹, les EMT sont de +/- 20 %. Si les rendements sont bornés par cette valeur alors on peut considérer qu'il n'y a pas d'effets matriciels significatifs. Dans le tableau 2, les rendements sont en moyenne de 80% avec un C.V moyen de 23.5%, les rendements sont donc bien bornés par la valeur de rendement optimale de 100% +/- 20%. Par conséquent les effets matriciels ne sont pas significatifs pour les molécules étudiées dans les matrices des 4 lacs.

Pour les LQ, nous avons choisis de prendre comme valeur de LQ pressentie : 30 ng.L⁻¹ ce qui correspond à une concentration finale avant analyse d'environ 6 µg.L⁻¹ au vue du facteur de pré-concentration de 200 appliqué (de 200 ml à 1 ml). Ainsi nous sommes dans le domaine de linéarité défini au préalable (entre 5 et 100 µg.L⁻¹). Lors du retraitement de données, nous avons pondéré notre régression quadratique avec un facteur 1/X pour améliorer le poids et, par conséquent, la justesse des faibles concentrations. Grâce à ce facteur de pondération on obtient une meilleure homogénéité des variances, indispensable à la validation de cette étape. Les LQ sont comprises entre 21 et 29 ng.L⁻¹ avec un CV moyen de 8.2% (tableau 2).

RÉSULTATS DOSAGES LACS AQUITAINS ET DISCUSSION

RÉSULTATS DES TESTS ELISA

Tableau 3 : Résultats des tests ELISA

Echantillons de 2013	Résultats (µg.L ⁻¹)	Seuil (µg.L ⁻¹)	Echantillons de 2013	Résultats (µg.L ⁻¹)	Seuil (µg.L ⁻¹)
Parentis 14/01	<min	0.05	Parentis 15/05	<Min	0.05
Hourtin 15/01	<min	0.05	Hourtin 14/05	<Min	0.05
Lacanau 15/01	<min	0.05	Lacanau 14/05	<Min	0.05
Cazaux 14/01	<min	0.05	Cazaux 15/05	<Min	0.05
Parentis 11/02	0.076	0.05	Parentis 05/06	<Min	0.05
Hourtin 12/02	<min	0.05	Hourtin 04/06	<Min	0.05
Lacanau 12/02	<min	0.05	Lacanau 04/06	<Min	0.05
Cazaux 11/02	<min	0.05	Cazaux 05/06	<Min	0.05
Parentis 18/03	<min	0.05	Parentis 09/07	<Min	0.05
Hourtin 19/03	<min	0.05	Hourtin 08/07	<Min	0.05
Lacanau 19/03	<min	0.05	Lacanau 08/07	<Min	0.05
Cazaux 18/03	<min	0.05	Cazaux 09/07	<Min	0.05
Parentis 15/04	<min	0.05			
Hourtin 16/04	0.06	0.05			
Lacanau 16/04	<min	0.05			
Cazaux 15/04	<min	0.05			

Les résultats du test ELISA montrent des concentrations supérieures à la valeur du seuil de détection ($0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$) seulement pour les échantillons du 11 février pour Parentis et du 16 avril pour Cazaux (Tableau 3).

Ce dosage, grâce aux kits commerciaux, permet une lecture rapide des résultats avec des coûts plus faibles à l'achat que les méthodes chromatographiques. Cependant, une validation de méthode devrait être réalisée en fonction des applications. En effet, des variations de résultat peuvent être induites par les standards utilisés (fournis dans le kit) et/ou par des effets matriciels (Triantis et al, 2010). La méthode ELISA peut être un outil utile pour le dosage global des microcystines et des nodularines dans les eaux mais la méthode doit encore être validée au laboratoire. Il faudrait définir les incertitudes (justesse et fidélité de la méthode) pour être sûr de la fiabilité des résultats.

RÉSULTATS HPLC-ESI-MS/MS

On constate que les types de variant de microcystines présents sont RR et LR et exclusivement dans le lac de Parentis-Biscarrosse (Tableau 4) Cependant, pour les résultats dits « positifs », les concentrations en microcystine LR et RR sont en dessous des LQ (respectivement 23 et 35 ng.L^{-1}) trouvées lors de l'étape de validation (Tableau 2) sauf pour l'échantillon de Parentis du 9 juillet 2013. En effet, il n'y a que pour cet échantillon que la concentration en LR = 33 ng.L^{-1} est supérieure à la LQ (23 ng.L^{-1}).

Tableau 4 : Résultats des dosages des microcystines des lacs aquitains par HPLC-ESI-MS/MS

Echantillons de 2013	Résultats ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Microcystines ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		Echantillons de 2013	Résultats ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Microcystines ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	
Parentis 14/01	0.026	RR = 0.0125	LR = 0.013	Parentis 15/05	0.022	RR = 0.008	LR = 0.014
Hourtin 15/01	<min		NA	Hourtin 14/05	<Min		NA
Lacanau 15/01	<min		NA	Lacanau 14/05	<Min		NA
Cazaux 14/01	<min		NA	Cazaux 15/05	<Min		NA
Parentis 11/02	0.021	RR = 0.0073	LR = 0.014	Parentis 05/06	0.026	RR = 0.011	LR = 0.015
Hourtin 12/02	<min		NA	Hourtin 04/06	<Min		NA
Lacanau 12/02	<min		NA	Lacanau 04/06	<Min		NA
Cazaux 11/02	<min		NA	Cazaux 05/06	<Min		NA
Parentis 18/03	0.0083	RR = 0.0083		Parentis 09/07	0.057	RR = 0.024	LR = 0.033
Hourtin 19/03	<min		NA	Hourtin 08/07	<Min		NA
Lacanau 19/03	<min		NA	Lacanau 08/07	<Min		NA
Cazaux 18/03	<min		NA	Cazaux 09/07	<Min		NA
Parentis 15/04	0.0053	RR = 0.0053					
Hourtin 16/04	<min		NA				
Lacanau 16/04	<min		NA				
Cazaux 15/04	<min		NA				

Nous retrouvons des microcystines dans le lac de Parentis-Biscarrosse car c'est le lac, parmi les quatre étudiés, le plus sujet aux proliférations de cyanobactéries, En effet, au cours de l'année, des taux de chlorophylle-a élevés et plusieurs blooms visibles ont été relevés, On explique cela par des teneurs en phosphore particulièrement élevées dans ce lac. Plus précisément, c'est le rapport azote minéral sur orthophosphate qui est particulièrement bas et qui favorise le développement des

cyanobactéries potentiellement productrices de toxines. La probabilité de retrouver des cyanotoxines dans le lac de Parentis-Biscarrosse est alors plus élevée que dans les autres lacs de l'étude.

En utilisant les données de chlorophylle a totale et attribuable aux cyanobactéries (Gogin, S., communication personnelle), obtenue *in situ* de janvier à juillet 2013 (Figure 9), on observe qu'il n'y a pas de différences significatives dans les moyennes de chlorophylle-a cyano entre les lacs. En revanche, si l'on ne regarde que les mois de juin et de juillet (Figure 9), la moyenne des teneurs en chlorophylle-a cyano est bien plus importante sur le lac de Parentis-Biscarrosse que sur les autres lacs. Cela permet d'expliquer les résultats du dosage par HPLC-ESI-MS/MS du 9 juillet sur ce lac.

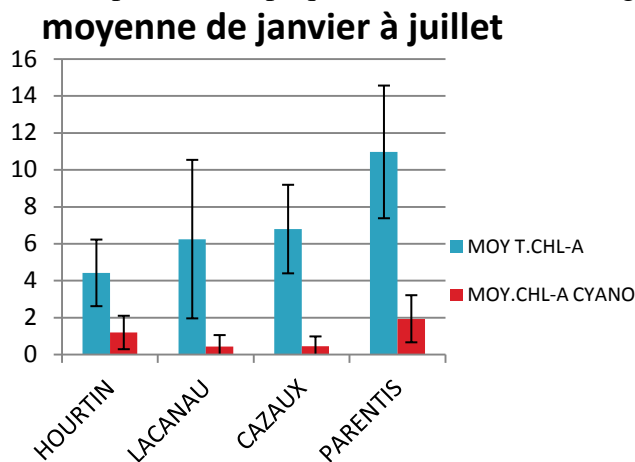


Figure 10 : Moyenne de chlorophylle a sur les lacs aquitains de janvier à juillet 2013 (µg.L⁻¹)

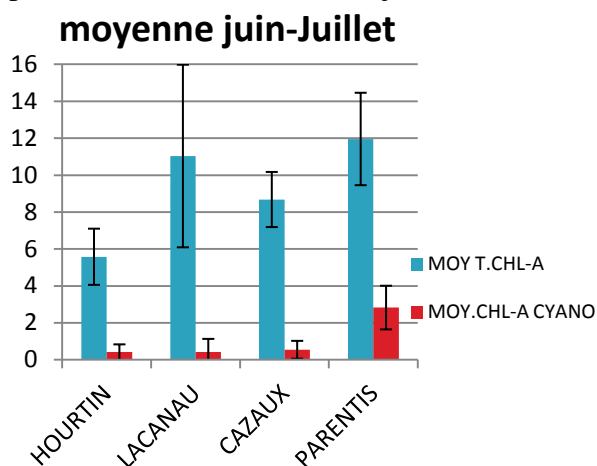


Figure 9 : Moyenne de chlorophylle a sur les lacs aquitains de juin-juillet 2013 (µg.L⁻¹)

CROISEMENT DES RÉSULTATS DES DEUX MÉTHODES DE DOSAGE

Le seul résultat en commun pour les deux méthodes est celui du lac Parentis-Biscarrosse le 11 février 2013 mais avec des valeurs différentes. Nous ne pouvons pas confirmer la concentration réelle en cyanotoxines car :

- Les résultats du test ELISA sont peut-être des faux positifs causés par des interférences et des concentrations proches des LQ (augmentation des incertitudes) rendant le résultat encore plus douteux.
- Les résultats de HPLC-ESI-MS/MS sont en dessous des LQ, nous ne pouvons pas confirmer la quantité de microcystines présentes dans l'échantillon, nous savons juste qu'elle est inférieure à la LQ, voir à la limite de détection ($LD = LQ/3$) quand aucun pics n'apparaît sur le chromatogramme ce qui n'est pas le cas ici.

De plus, l'échantillon du lac de Parentis-Biscarrosse du 9 juillet 2013 présente une concentration en MC-LR supérieure à la LQ (méthode HPLC) mais cette dernière n'est pas quantifiée avec le test ELISA car cette fois-ci, c'est la LQ de l'ELISA qui est trop élevée et comme il ne s'agit pas d'une relation dose-réponse linéaire, on ne peut pas estimer la LD. En résumé, les concentrations présentes dans les différents lacs au cours de ce premier semestre 2013 sont trop basses pour être détectées par le test ELISA. En revanche, la méthode chromatographique couplée à la spectrométrie de masse en tandem permet de les détecter mais pas de les quantifier correctement car elles sont inférieures aux LQ. Il est possible d'abaisser les valeurs des LQ en reprenant l'étape de validation,

c'est-à-dire en validant un nouveau domaine d'étalonnage commençant non plus à $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ mais à $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ par exemple. Ainsi les LQ pressenties pourraient être de l'ordre de $10\text{-}15 \text{ ng.L}^{-1}$. De cette manière, les concentrations obtenues sur les lacs en HPLC-MS/MS seraient supérieures aux LQ et donc quantifiables. La baisse des LQ n'a pas un grand intérêt car le seuil réglementaire ($25 \mu\text{g.L}^{-1}$) est plus grand d'au moins un facteur 1000, les LQ actuelles suffisent amplement en terme de surveillance sanitaire.

Si on réalise une comparaison plus globale des deux tests (Tableau 5), on se rend compte que le test ELISA à des valeurs de LQ plus élevées, et ne fournit qu'une information sur la concentration totale en cyanotoxines contrairement au dosage SPE-HPLC-MS/MS qui fournit une information sur la concentration de chaque variant présent. De plus pour le dosage SPE-HPLC-MS/MS, la sensibilité est plus haute ce qui en fait une méthode performante et sans risque de faux positif (grâce aux deux transitions en MRM) contrairement à ELISA. Malheureusement le temps de retraitement de données est plus long pour la méthode chromatographique. Mais, sur un an, soit environs 1000 analyses, le dosage chromatographique est plus économique (en terme de consommables) que l'ELISA. Par cette comparaison, il est montré que le dosage des cyanotoxines par SPE-HPLC-MS/MS semble préférable au test ELISA, en termes de coût et d'identification/quantification de cyanotoxines quand le laboratoire d'analyse est équipé d'une HPLC couplée à un spectromètre de masse en tandem. Cela est le cas pour les analyses de routine effectuées dans cadre du programme phytoplancton-Lacs-Aquitains.

Tableau 5 : Comparatif ELISA et HPLC-MS/MS sur un an (1000 analyses)

	Coût consommables €	Préparation Echantillons (30-40)	Retraitement donnée (30-40)	LQ ng.L^{-1}	Faux positif	LD (LQ/3) ng.L^{-1}	Dosage MCs
ELISA	19330	Environ 1/2 journée	Quelques minutes	50	oui	17	concentration Totale
SPE-HPLC MS/MS	18520	Environ 1 journée	Quelques heures	24,4 +/- 5,4%	non	8	concentration par variant

Par ailleurs, à la marge de cette étude, le dosage par HPLC-ESI-MS/MS a été testé sur un échantillon directement collecté au sein d'un bloom de cyanobactérie sur la jetée du port de Parentis, pour tester sa validité pour des concentrations élevées dans des matrices naturelles. Nous avons trouvé des concentrations de MC-LR $> 60 \mu\text{g.L}^{-1}$, RR $> 45 \mu\text{g.L}^{-1}$ et YR $> 3,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ et des concentrations légèrement supérieures à leurs LQ respectives pour MC-LY, LF et LW. Les effets matriciels semblent aussi plus importants, ce qui est en lien avec une matrice plus chargée possédant une quantité de biomasse plus importante. Dans ce cas, il sera nécessaire d'adapter le protocole (revoir la purification, la dilution de l'extrait avant analyse, etc.).

Ces résultats sont en accord avec l'interdiction de baignade et de pratique d'activités nautiques liée au niveau III du programme de surveillance (Tableau 1). Actuellement, seule la microcystine LR est dosée alors que dans ce cas-là, les variants RR et YR sont aussi présents et contribuent fortement à la concentration totale en cyanotoxine, un simple test ELISA n'aurait pas pu discriminer ainsi la part attribuée à chaque variant. De plus, au vu des très hautes concentrations retrouvées et comme l'étalonnage n'est pas linéaire, l'ELISA aurait été hors gamme.

La méthode SPE-ESI-HPLC-MS/MS développée et validée aux cours de ces 6 mois permet d'obtenir des informations supplémentaires par rapport au test ELISA utilisé habituellement. En effet c'est une méthode séparative qui donne, non plus, la concentration totale en microcystine et nodularines, mais la concentration de chaque variant présent dans l'échantillon. Le protocole de préparation des échantillons (filtration, SPE, élution, évaporation) permet une pré-concentration d'un facteur de 200 et ce facteur pourra être ajusté en fonction de la concentration réelle du milieu. Ainsi, cela évitera d'être hors gamme pour des concentrations élevées comme avec le test ELISA. Une fois toutes les étapes du protocole optimisées, la validation en étalonnage externe a été réalisée et a porté sur 4 critères :

- **La linéarité** : Pour toutes les molécules, la régression est acceptable et le domaine d'étalonnage est validé en linéaire et en quadratique pour des concentrations comprises entre 5 et 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$;
- **La spécificité** : Elle est validée pour toutes les molécules ;
- **Les rendements d'extraction** : Ils sont en moyenne de 80 % avec un C.V moyen de 23.5%. dans notre cas, cela montre qu'il n'y a pas d'effets matriciels significatifs ;
- **Les limites de quantifications** : Les LQ sont en moyenne de 24.4 ng.L^{-1} avec un coefficient de variation moyen de 8.2 % ce qui est bien inférieur à la limite de quantification de l'ELISA qui est de 50 ng.L^{-1} .

La méthode de dosage développée et validée lors de mon stage sera appliquée dès cet été au projet CYANALERT (Système de surveillance et d'Alerte des cyanobactéries des zones de baignades des étangs des pays du Born par sonde fluorimétrique) porté par l'unité REBX d'Irstea ainsi que par les Communautés de communes des grands lacs (CCGL) et de Mimizan. Il faudra auparavant, trouver un autre traceur que la leucine et refaire une spécificité pour s'adapter aux nouvelles matrices représentées par ces lacs puisque le programme porte sur l'étang d'Aureilhan en plus des lacs de Cazaux-Sanguinet et de Parentis-Biscarrosse.

Ce programme permettra entre autre le croisement des résultats obtenus par différentes méthodes (comptage phytoplanctonique, dosage de chlorophylle, dosage de cyanotoxines par ELISA et SPE-HPLC-MS/MS) afin d'en évaluer les avantages et inconvénients.

BIBLIOGRAPHIE

- Afssa, Afsset, (2006) Rapport commun sur les risques sanitaires liés à la présence de cyanobactéries dans l'eau,
- Antoniou, M.-G, Shoemaker, J-A, De la Cruz, A-A, Dionysiou, D-D, (2008) LC/MS/MS structure elucidation of reaction intermediates formed during the TiO₂ photocatalysis of microcystin-LR, *Toxicon* 51, 1103-1118,
- Babica, P, Kohoutek, J, Blaha, L, Adamovsky, O, Marsalek, B, (2006) Evaluation of extraction approaches linked to ELISA and HPLC for analyses of microcystin-LR, -RR and -YR in freshwater sediments with different organic material contents, *Anal Bioanal Chem* 385, 1545-1551,
- Beaudry, F, Vachon, P (2006) Electrospray ionization suppression, a physical or a chemical phenomenon? *Biomedical Chromatography* 20, 200-205,
- Beltran, E, Ibanez, M, Sancho, J.V, Hernandez, F, (2012) Determination of six microcystins and nodularin in surface and drinking waters by on-line solid phase extraction-ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry., *Journal of Chromatography A* 1266, 61-68,
- Cong, L, Huang, B, Chen, Q, Lu, B, Zhang, J, Ren, Y, (2006) Determination of trace amount of microcystins in water samples using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 569, 157-168,
- Draper, W-M, Xu, D, Perera, S-K, (2009) Electrolyte-Induced Ionization Suppression and Microcystin Toxins: Ammonium Formate Suppresses Sodium Replacement Ions and Enhances Protonated and Ammoniated Ions for Improved Specificity in Quantitative LC-MS-MS. *Analytical Chemistry*, 81, 4153-4160,
- Laplace-Treytore, C, Barbe, J, Dutartre, A, Druart, J-C, Rimet, F, Anneville, O, (2009) Protocole standardisé d'échantillonnage, de conservation, d'observation et de dénombrement du phytoplancton en plan d'eau pour la mise en œuvre de la DCE : version 3.3.1. 44 p.,
- Meriluoto, J, Codd., G-A, (2005) TOXIC Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis,
- Reemtsma, T, (2001) The use of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in water analysis – Part II: Obstacles, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 20, 533-542,
- Rivasseau, C, Martin, S, Hennion, M,C (1998) Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 799, 155-169,
- Soares, R-M, Yuan, M, Servaites, J-C, Delgado, A, Magalhaes, V-F, Hilborn, E-D, Carmichael, W-W, Azevedo, S-M, (2006) Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil, *Environ Toxicol* 21, 95-103,
- Triantis, T, Tsimeli, K, Kaloudis, T, Thanassoulas, N, Lytras, E, Hiskia, A, (2010) Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters, *Toxicon* 55, 979-989,
- Wang, J, Pang, X, Ge, F, Ma, Z, (2007) An ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of microcystins occurrence in surface water in Zhejiang Province, China, *Toxicon* 49, 1120-1128,
- Xu, W, Chen, Q, Zhang, T, Cai, Z, Jia, X, Xie, Q, Ren, Y, (2008) Development and application of ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem triple quadrupole mass spectrometry for determination of seven microcystins in water samples, *Analytica Chimica Acta* 626, 28-36,
- Yuan, M, Namikoshi, M, Otsuki, A, Watanabe, M-F, Rinehart, K-L, (1999) Electrospray ionization mass spectrometric analysis of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins: modulation of charge states and [M + H]⁺ to [M + Na]⁺ ratio, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10, 1138-1151,

MATÉRIELS CONTENUS DANS LE KIT MICROCYSTINS-ADDA ELISA DE CHEZ ABRAXIS.

1. Plaque de puits contenant un antigène spécifique.
2. Solutions de standards (0, 0,15, 0,40, 1,0, 2,0, 5,0 ppb) et de contrôle à $0,75 \pm 0,185$ ppb.
4. Solution d'Anticorps
5. Solution d'enzyme conjuguée
6. Solution de lavage
7. Solution de substrat
8. Solution stop

PROTOCOLE :

Ajouter 50 µL de standards (0 ; 0.05 ; 0.1 ; 0.2 ; 0.4 ; 1 ; 2 ; 5ppb), de contrôle (0.75 ppb), ou d'échantillon dans les puits de la plaque du kit. Le tout en duplicat.

Ajouter 50 µL de la solution d'anticorps dans les puits. Agiter doucement pendant 30 secondes en faisant bien attention de ne pas renverser le contenu des puits. Laisser incuber pendant 90 min à température ambiante.

Vider les puits et rincer les 3 fois avec la solution de lavage en veillant à ne pas faire de bulles d'air dans les puits. Eliminer le restant de solution de lavage en tapant légèrement les plaques de puits sur une feuille en papier.

Ajouter 100 µL de la solution d'enzyme conjuguée dans les puits. Agiter doucement pendant 30 secondes en faisant bien attention de ne pas renverser le contenu des puits. Laisser incuber pendant 30 min à température ambiante.

Vider les puits et rincer les 3 fois avec la solution de lavage en veillant à ne pas faire de bulles d'air dans les puits. Eliminer le restant de solution de lavage en tapant légèrement les plaques de puits sur une feuille en papier.

Ajouter 100 µL de solution de substrat dans les puits. Agiter doucement pendant 30 secondes en faisant bien attention de ne pas renverser le contenu des puits. Laisser incuber pendant 20-30 min à température ambiante. Ne pas oublier de protéger les puits de la lumière.

Ajouter 50 µL de solution stop dans les puits en suivant le même ordre de remplissage que pour l'étape précédente

Lire l'absorbance à 450 nm avec un spectrophotomètre 15 min après avoir ajouté la solution stop.

SOLVANT ET STANDARDS

Leucine Enképhaline de chez Sigma–Aldrich (CAS : 81678-16-2).

Microcystines LA, LR, RR, LW, LF, YR, LY et nodularine en 100 µg de chez EnzoLife science.

Eau ultra pure, acétonitrile grade HPLC (ACN), méthanol absolu grade HPLC (MeOH), acide formique (HCOOH) glacial (100 %) et acétate d'ammonium (pour analyses).

CONSOMMABLES

Filtres en fibres de verre GF/F 90 mm de diamètre.

Cartouche Oasis HLB 6 mL, 150 mg de chez Waters.

Filtres seringues cellulose régénérée (RC), porosité = 0.45 µm, diamètre de 30 mm.

APPAREILLAGES

HPLC utilisée : Ultimate 3000 (Dionex).

- Colonne Ultra Aqueous C₁₈ (Restek) ; 100 x 2.1mm, granulométrie 3 µm,
- précolonne Gemini NX C₁₈ (Phenomenex) ; 14 x 2mm.

MS utilisée : API 2000 (AB/Sciex).

CONDITIONNEMENT :

- Ajouter l'étalon interne soit 125 ng.L^{-1} soit $50 \mu\text{l}$ d'une solution de leucine à $500 \mu\text{g.L}^{-1}$;
- Filtrer 200 ml d'échantillon d'eau sur un filtre en fibres de verres GF/F et conserver le filtrat ;
- Récupérer, découper et placer le filtre dans un tube à élution de 15 ml, ajouter 10 ml de méthanol pur ;
- Placer le tube dans le bain à ultra-son pendant 20 minutes à $25 \text{ }^\circ\text{C}$;
- Prélever les 10 ml de méthanol du tube à élution et les rajouter au filtrat (environ 5 % de solvant, ce qui est sans incidence lors de l'étape de percolation en SPE).

EXTRACTION (SPE) :

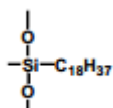
- Tasser et installer les cartouches OASIS HLB sur le Visiprep et mettre sous vide ;
- Conditionnement des cartouches avec 5 mL de MeOH, puis 5mL EUP ;
- Faire percoler l'échantillon (200 mL de filtrat + 10 mL de méthanol issus de l'extraction du filtre) ;
- Rincer la cartouche avec 10 mL de solution MeOH/EUP 30 :70 (v/v) ;
- Sécher sous azote pendant 45 minutes.

ELUTION :

- Prendre des tubes d'élution en verre de 15 ml et les rincer avec 1 mL de MeOH, puis les placer sur un portoir dans le Visiprep ;
- Tasser et installer les cartouches de SPE sur le Visiprep ;
- Ajouter 2 x 3 ml de MeOH pur sur les cartouches, une fois ce volume élué, mettre le vide pour récupérer les derniers μL de MeOH ;
- Jeter les cartouches ;
- Mettre les tubes contenant l'éluat filtré sous un flux d'azote jusqu'à évaporation ;
- Reprendre le résidu avec 1 ml de solution EUP/ACN 90 : 10 (v/v) et agiter ;
- Filtrer au moyen d'une seringue en verre de 2 ml équipée d'un filtre seringue RC ;
- Transférer les 1 mL filtrés dans un vial.

Procéder à l'analyse HPLC-ESI-MS/MS

Nous allons procéder à une chromatographie de partage en phase inverse donc la phase stationnaire de la colonne doit être apolaire et la phase mobile polaire. La colonne choisie contient une phase stationnaire de type octadécyle. Ainsi les composés les plus apolaires auront une plus forte interaction avec les chaînes alkyles de la phase stationnaire.



Composition et programmation linéaire du gradient utilisées pour le dosage des cyanotoxines :

Temps (min)	% ACN	% EUP+0.1% HCOOH + 5 mM d'acétate d'ammonium	Débit ($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)
0	30	70	300
0.5	30	70	300
3.7	55	45	300
4.2	80	20	300
5.8	80	20	300
6	30	70	300
9	30	70	300

Pendant toute la durée de l'analyse la colonne est maintenue à 40 °C et 50 μL d'échantillon sont prélevé et analysé pendant cette séquence de 9 minutes.

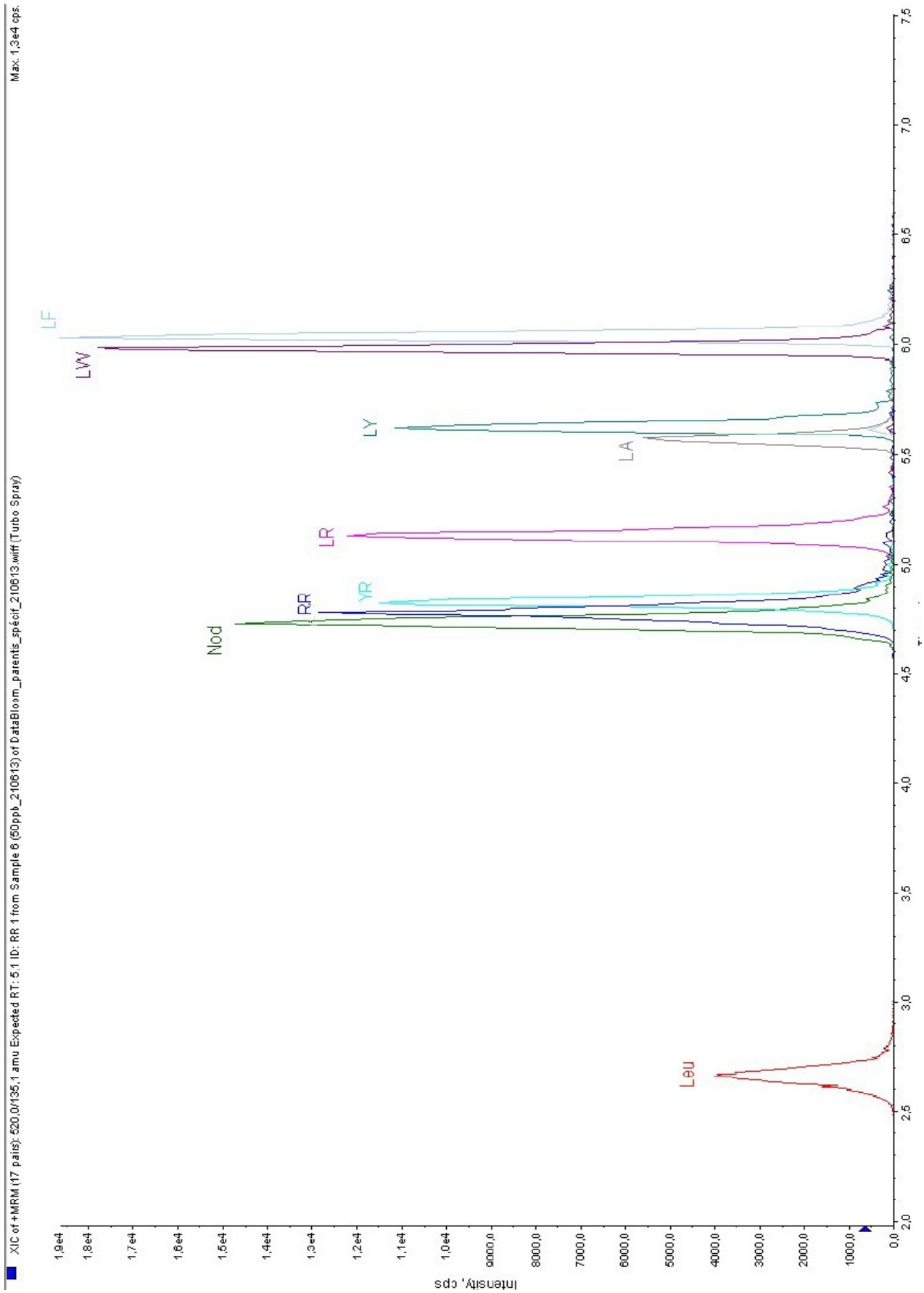
Paramètres de la source :

Tension de capillaire	5.5 eV
Débit de gaz séchant	12 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
Débit de gaz de collision	6 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
Température	450°C

ANNEXE V : PARAMÈTRES D'IONISATION ET TRANSITIONS

Molécules et transitions	Q1/Q3	RT	DP (volt)	CE (volt)	CXP (volt)
Leucine Transition de quantification	556,2/136,2	2,8	21	57	8
Nod Transition de quantification	825,3/135,1	4,8	116	75	4
Nod Transition de confirmation	825,3/105,5	4,8	116	119	6
LA Transition de quantification	910,4/135,1	5,6	91	71	6
LA Transition de confirmation	910,4/107,1	5,6	91	107	4
LY Transition de quantification	1002,5/135,2	5,7	91	85	4
LY Transition de confirmation	1002,5/107	5,7	91	115	4
LW Transition de quantification	1025,5/135,3	6	101	85	8
LW Transition de confirmation	1025,5/107	6	101	123	4
LF Transition de quantification	986,5/135,2	6,1	91	89	8
LF Transition de confirmation	986,5/107	6,1	91	113	6
RR Transition de quantification	519,9/135,1	5,1	35	39	6
RR Transition de confirmation	519,9/103,1	5,1	35	83	2
LR Transition de quantification	995,5/135	5,2	136	91	6
LR Transition de confirmation	995,5/103	5,2	136	129	6
YR Transition de quantification	1045,6/135,2	4,9	146	93	4
YR Transition de confirmation	1045,6/107,2	4,9	146	121	4

Chromatogramme d'un mélange de microcystines à 50 µg.L-1



Les cyanobactéries aussi appelées « algues bleues » ont la capacité de synthétiser des cyanotoxines. Leurs proliférations peuvent affecter la sécurité sanitaire des plans d'eau, notamment quand des activités nautiques y sont implantées. C'est le cas sur les quatre grands lacs aquitains surveillés dans le cadre du programme phytoplancton-lacs-aquitains. Ce programme a pour but d'approfondir les connaissances des communautés de phytoplancton présentes. Un volet de ce programme comprend le développement d'une technique analytique pour le dosage des différentes cyanotoxines couplant une séparation chromatographique à une détection par spectrométrie de masse en tandem.

Le test ELISA actuellement utilisé, est une méthode non séparative qui ne donne accès qu'à la concentration totale dite « en équivalent MC-LR » car ce test dose le fragment ADDA que toutes les microcystines et nodularines possèdent. La chromatographie a l'avantage de fournir les concentrations de chaque variant de toxine et permet de savoir lesquels sont les plus présents dans les lacs étudiés. Le dosage SPE-HPLC-ESI-MS/MS a été optimisé puis validé en se basant sur la norme AFNOR : Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire. Les résultats de cette validation montrent que le domaine d'étalonnage est validé entre 5 et 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en linéaire et en quadratique, que les LQ, plus basses qu'en ELISA, sont d'environ 24.4 ng.L^{-1} et que la méthode est spécifique et avec des rendements ne montrant pas d'effets matriciels significatifs pour chaque molécule. Les quantifications de ces molécules et leurs occurrences sur les plans d'eau aquitains permettront d'en estimer les risques sanitaires.

Mots clefs : cyanotoxine, microcystine, chromatographie liquide, ESI, spectrométrie de masse, ELISA, validation, quantification.

Cyanobacteria also called "blue-green algae" have the ability to synthesize cyanotoxins. Their blooms can affect the safety of water bodies, especially when water activities exist. It is the case of the four largest Aquitaine's lakes monitored in the phytoplankton-Aquitaine's lakes program. This program aims to increase knowledge of phytoplankton communities present and to analyze their dynamics. Part of this program includes the development of an analytical technique for the assay of different cyanotoxins which associated chromatographic separation with detection by tandem mass spectrometry.

The ELISA test currently used is a no-separative method that gives access only to the total concentration of so-called "MC-LR equivalent" because the test measures the ADDA fragment present in all microcystins and nodularins. Chromatography has the advantage of providing the concentrations of each toxin variant and helps to know which are the most occurred in the lakes studied. The developed assay by SPE-HPLC-ESI-MS/MS was optimized and validated based on standard AFNOR: Protocol for the initial method performance assessment in a laboratory. The results of this validation show that the calibration is validated in range of 5 to 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ in linear and in quadratic regression, LQ, lower than in ELISA are around 24.4 ng.L^{-1} and the method is specific and yields showing no significant matrix effects for each molecule. The quantification of these molecules and their occurrences in the Aquitaine's lakes will assess health risks.

Keywords : cyanotoxin, microcystin, liquid chromatography, mass spectrometry, ELISA, ESI, validation, quantification.