

Étude portant sur la recherche d'une procédure alternative
pour la détection des cyanobactéries et des cyanotoxines

par

José Audet-Lecouffe

Mémoire présenté au Département de chimie en vue
de l'obtention du grade de maître en environnement (M.Env.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, janvier 2013

Membres du jury

M. Patrick Ayotte
Directeur
Département de chimie

M. Hubert Cabana
Co-directeur
Département de génie civil

M. Olivier Thomas
Co-directeur
Anciennement : Observatoire de l'environnement et
du développement durable

M. David Bird
Examineur externe
Département des sciences biologiques, UQAM

M. Roland Leduc
Président-rapporteur
Département de génie civil

Sommaire

L'objectif de la présente étude était de proposer des outils de détection des cyanobactéries et des cyanotoxines pouvant être utilisés par les gestionnaires de l'eau directement sur le site dans le but d'améliorer la procédure de détection ainsi que de parfaire les connaissances liées à l'utilisation de méthodes alternatives. En premier lieu, une revue des méthodes de détection disponibles a permis d'évaluer le potentiel de chacune à être intégrée dans une procédure alternative de détection. La comparaison de ces méthodes à l'aide d'un tableau servant d'aide à la décision a permis d'identifier deux outils prometteurs : la fluorimétrie et les tests immunoenzymatiques. Le premier vise à évaluer l'abondance des cyanobactéries via la mesure de la concentration de phycocyanine (pigment associé aux cyanobactéries, alors que le deuxième vise à quantifier les toxines. Les critères retenus pour cette comparaison étaient la facilité d'utilisation, le coût du matériel, la rapidité des analyses, la sensibilité des tests ainsi que la fiabilité des résultats. En second lieu, une évaluation de quatre trousse de quantification des microcystines, toxines produites par les cyanobactéries, a été effectuée. Les trousse de microplaques des compagnies Abraxis et Enviroligix ainsi que les trousse en éprouvettes des deux mêmes compagnies ont été comparées selon 14 critères divisés dans trois catégories : les critères de gestion, d'utilisation et d'analyse. Il en ressort que la trousse en microplaques d'Abraxis est la plus fiable et la plus ergonomique. Sa sensibilité élevée, le nombre élevé de variantes de microcystines détectées ainsi que la grande gamme de concentrations détectées par cette trousse ont également fait de celle-ci l'outil le plus adéquat pour la quantification des microcystines parmi les trousse étudiées. En troisième lieu, la présente étude met en relation les paramètres physicochimiques de l'eau ainsi que les mesures de la concentration de phycocyanine par fluorimétrie et de la concentration des microcystines par test immunoenzymatique afin d'identifier les paramètres importants à intégrer dans la procédure de détection des cyanobactéries et des microcystines. Selon les modèles quantitatifs créés, les deux paramètres qui expliquent le plus la concentration des microcystines sont la concentration de la phycocyanine et la saturation de l'oxygène mesurée à la surface de l'eau. Le modèle qualitatif, beaucoup plus intéressant et applicable sur le terrain, a permis de déterminer qu'à partir d'un seuil de concentration de phycocyanine de 0,02 RFU, il est possible de déterminer s'il est nécessaire d'analyser la concentration des microcystines de l'échantillon. L'utilisation du fluorimètre et l'intégration de ce dernier modèle dans le suivi des cyanobactéries et des microcystines permettraient aux gestionnaires de l'eau d'améliorer la procédure de détection autant sur le plan financier que sur celui de la qualité des données obtenues.

Remerciements

J'aimerais remercier en premier lieu M. Barry Husk, président de la compagnie BlueLeaf inc., qui m'a permis de mener à terme ce projet de recherche en finançant les campagnes d'échantillonnage, en me procurant le matériel nécessaire aux analyses et en me donnant le privilège de toucher à tous les aspects du travail de chargé de projet.

Mes remerciements vont également à mes trois co-directeurs de recherche, Patrick Ayotte, Hubert Cabana et Olivier Thomas, qui ont bien voulu me guider comme étudiant, m'encourager et m'apprendre les rudiments de la recherche scientifique. Cette maîtrise a été un projet fastidieux, mais j'ai toujours pu compter sur votre précieuse aide.

Aussi, je tiens à remercier l'ancienne équipe de l'Observatoire de l'environnement et du développement durable, Olivier Thomas, Estelle Baurès, Guillaume Junqua et Mireille Dussault, qui m'a donné la chance de participer à un projet qui me tenait à cœur et qui m'a orienté au début de ma maîtrise.

Merci à Claude Legault, Alain Lévesque, Gilles Grondin et Serge Bérubé qui ont bien voulu prendre de leur temps pour participer à mes expérimentations laboratoires.

Je tiens à remercier ma mère, Suzanne, qui a bien voulu corriger mes textes et qui m'a supporté durant tout ce projet. Également, merci à Claude Laberge, oncle et statisticien, pour sa précieuse aide dans un domaine plutôt complexe.

Également, merci à Mariette Lambert qui m'a endurée, moi et mes échantillons, jusqu'à la toute fin.

Merci à la compagnie BlueLeaf et son président Barry Husk pour le soutien financier important, de même qu'à l'Université de Sherbrooke pour les bourses reçues en début de mandat.

Table des matières

Sommaire.....	iii
Remerciements.....	iv
Liste des acronymes.....	xi
Introduction générale.....	1
Chapitre 1 : Revue de littérature pour la sélection des outils de détection des cyanobactéries et des cyanotoxines.....	3
Sommaire du chapitre 1 :.....	3
1 Introduction.....	4
1.1 Genres de cyanobactéries d'intérêt au Québec.....	7
1.2 Toxines d'intérêt au Québec.....	8
1.2.1 Hépatotoxines.....	9
1.2.2 Neurotoxines.....	11
1.2.3 Irritants cutané.....	11
1.3 Élaboration d'une procédure de détection.....	12
1.3.1 Inspection visuelle du site.....	13
1.3.2 Mesure du phosphore total.....	15
1.3.3 Mesure de l'abondance des cyanobactéries.....	16
1.3.4 Mesure de la quantité de cyanotoxines.....	16
2 Détection des cyanobactéries.....	16
2.1 Approche biologique.....	16
2.1.1 Tests par Polymerase Chain Reaction (PCR).....	16
2.2 Approche physicochimique.....	18
2.2.1 Tests par fluorescence.....	18
2.2.2 HPLC + programme CHEMTAX.....	21
2.3 Approches physiques.....	21
2.3.1 Identification et comptage au microscope.....	21
2.3.2 Télédétection.....	22
2.3.3 Synthèse des caractéristiques des méthodes de détection des cyanobactéries.....	23
3 Détection des cyanotoxines.....	24
3.1 Approches biochimiques.....	24
3.1.1 Immunoessais (tests ELISA).....	24
3.1.2 Tests de toxicité.....	25
3.2 Approches chimioanalytiques.....	30
3.2.1 Chromatographie liquide (LC) et spectrophotométrie UV.....	31
3.2.2 Chromatographie liquide (LC) et spectrométrie de masse (MS).....	33
3.2.3 Chromatographie liquide (LC) et spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).....	34
3.2.4 Synthèse des caractéristiques des méthodes de détection des cyanotoxines.....	35
4 Synthèse et recommandations.....	36
4.1 Mesure de la quantité de cyanobactéries.....	37
4.2 Mesure de la quantité de cyanotoxines.....	39

Chapitre 2 : Sélection d'une trousse commerciale d'immunoessai (ELISA) pour la quantification des microcystines	42
Sommaire du chapitre 2 :	42
5 Introduction	43
5.1 Caractéristiques générales des tests ELISA.....	43
6 Méthodologie	45
6.1 Localisation et fréquence d'échantillonnage	45
6.2 Échantillonnage.....	46
6.3 Estimation de la concentration de microcystines au moyen des tests ELISA.....	47
6.4 Évaluation des troussees	50
7 Résultats de la comparaison entre les troussees	51
7.1 Critères de gestion	51
7.1.1 Coût d'acquisition	51
7.1.2 Coûts d'exploitation	52
7.1.3 Durabilité de l'appareillage	53
7.1.4 Pertinence du résultat.....	53
7.1.5 Aide à la décision	53
7.2 Critères d'utilisation	54
7.2.1 Facilité d'utilisation	54
7.2.2 Fiabilité	55
7.2.3 Délai de réponse	56
7.2.4 Robustesse	56
7.2.5 Entretien.....	57
7.3 Critères d'analyse	58
7.3.1 Sensibilité	58
7.3.2 Caractérisation qualitative	58
7.3.3 Caractérisation quantitative	59
7.3.4 Fiabilité de la méthodologie	61
8 Discussion et conclusion.....	61
Chapitre 3 : Modélisation de la concentration de microcystines et caractérisation des milieux contaminés par les cyanobactéries.....	64
Sommaire du chapitre 3 :	64
9 Introduction.....	65
9.1 Paramètres de l'eau étudiés.....	66
9.1.1 Phycocyanine	66
9.1.2 Chlorophylle a	67
9.1.3 Phosphore.....	67
9.1.4 Azote	68
9.1.5 Transparence de l'eau.....	69
9.1.6 Température de l'eau	69
9.1.7 pH de l'eau et source de carbone	69
9.1.8 Oxygène dissous dans l'eau	70
9.1.9 Autres facteurs	70
10 Méthodologie	71
10.1 Localisation et fréquence d'échantillonnage	71
10.2 Échantillonnage.....	73
10.3 Analyses sur site	74
10.4 Quantification des microcystines	74
10.5 Mesures de la concentration de chlorophylle a et de phycocyanine	75
10.6 Analyses complémentaires	75
10.7 Analyses statistiques.....	76

11	Résultats.....	76
11.1	Classification hiérarchique	77
11.2	Caractérisation des milieux faiblement, moyennement et fortement contaminés par les cyanobactéries	77
11.2.1	Stations faiblement contaminées par les cyanobactéries.....	79
11.2.2	Stations moyennement contaminées par les cyanobactéries.....	79
11.2.3	Stations fortement contaminées par les cyanobactéries	80
11.3	Analyse en composantes principales (ACP).....	80
11.4	Corrélations avec la concentration en microcystines	85
11.4.1	Autres corrélations.....	87
11.5	Modèles prévisionnels pour la quantification des microcystines	87
11.5.1	Modèle A	88
11.5.2	Modèle B	91
11.6	Modèle qualitatif	93
12	Discussion	95
12.1	Caractérisation des milieux faiblement, moyennement et fortement contaminés par les cyanobactéries	95
12.2	ACP et corrélations	96
12.3	Modèles quantitatifs	99
12.4	Modèle qualitatif	101
13	Conclusion et recommandations	101
	Conclusion générale.....	104
	Références.....	107
	Annexe 1: Toxines, caractéristiques et maxima d'absorbance UV.....	114
	Annexe 2: Fournisseurs des produits commerciaux.....	115
	Annexe 3 : Protocoles de lyse cellulaire	116
	Annexe 4 : Modes opératoires des quatre trousses testées.....	117
	Annexe 5 : Données brutes de la phase de comparaison des trousses.....	121
	Annexe 6 : Date d'échantillonnage et analyses complémentaires effectuées lors de la phase de modélisation	126
	Annexe 7 : Copie de la feuille Excel utilisée pour le calcul des concentrations de microcystines avec la régression non-linéaire à quatre paramètres	127
	Annexe 8 : Détails de l'analyse ANOVA	128
	Annexe 9 : Détails de l'analyse en composantes principales	130
	Annexe 10 : Tableaux des corrélations.....	131
	Annexe 11 : Détails des modèles de régression linéaire multiple.....	135

Liste des figures

Figure 1 : Microscopies de quatre principaux genres cyanobactériens a) <i>Microcystis</i> ; b) <i>Anabaena</i> ; c) <i>Oscillatoria</i> ; d) <i>Nostoc</i>	8
Figure 2 : Structure moléculaire générale des microcystines	10
Figure 3 : Structures moléculaires A) Anatoxine-a ; B) Saxitoxine	11
Figure 4 : Structure moléculaire des lipopolysaccharides (LPS),	12
Figure 5 : Schéma de la procédure de détection des cyanobactéries	13
Figure 6 : Fleurs d'eau de cyanobactéries sous forme d'écume.....	14
Figure 7 : Formation d'écume de cyanobactéries par l'action du vent.....	14
Figure 8 : Chromatogramme HPLC (238nm) d'extraits cellulaires de <i>Microcystis aeruginosa</i> spectres de masse associés à A) microcystine-LR et microcystine-dMeLR, B) microcystine-dMeLW et C) microcystine-LW et microcystine-dMeLF	32
Figure 9 : Structure moléculaire de la microcystine-LR.....	35
Figure 10. Principales étapes du mode opératoire des tests ELISA.....	49
Figure 11 : Représentation graphique de l'équilibre du carbonate dissous dans l'eau selon le pH.....	70
Figure 12 : Localisation des stations d'échantillonnage	73
Figure 13 : Représentation graphique des vecteurs de l'ACP pour les composantes 1 et 2....	82
Figure 14 : Représentation graphique des stations d'échantillonnage en fonction des composantes 1 et 2.....	84
Figure 15 : Concentration en microcystines en fonction.....	89
Figure 16: Valeurs résiduelles standardisées du modèle A en fonction de la valeur de la variable explicative	90
Figure 17 : Valeurs résiduelles non standardisées en fonction de la concentration en microcystines pour le modèle quantitatif A	91
Figure 18 : Valeurs résiduelles non standardisées en fonction de la concentration en microcystines pour le modèle quantitatif B	92
Figure 19 : Concentration des microcystines en fonction de la concentration de phycocyanine	94

Liste des tableaux

Tableau 1 : Nombre de plans d'eau touchés au Québec	5
Tableau 2 : Nombre de plans d'eau touchés par les fleurs d'eau de cyanobactéries de 2004 à 2008 dans le bassin versant de la rivière Saint-François	5
Tableau 3 : Cyanotoxines, cyanobactéries associées et concentrations limites acceptables	9
Tableau 4 : Facteurs de toxicité équivalente des variantes moléculaires de microcystines	10
Tableau 5 : Synthèse des caractéristiques des méthodes de détection des cyanobactéries...	23
Tableau 6 : Synthèse des caractéristiques des méthodes de détection des cyanotoxines	36
Tableau 7 : Évaluation sommaire des méthodes de détection des cyanobactéries.....	37
Tableau 8 : Cyanotoxines et méthodes de détection possibles.....	39
Tableau 9 : Évaluation sommaire des méthodes de détection des cyanotoxines	40
Tableau 10 : Recommandations relatives à la concentration de microcystines maximale acceptable au Québec selon l'utilisation de l'eau	44
Tableau 11 : Emplacement des stations d'échantillonnage pour la phase de comparaison des trousses	46
Tableau 12 : Présentation des critères retenus.....	50
Tableau 13 : Coût d'acquisition du matériel réutilisable	51
Tableau 14 : Coûts d'exploitation pour les différents tests ELISA	52
Tableau 15 : Nombre de dépassements des valeurs limites des coefficients de variation.....	56
Tableau 16 : Limites de détection et de quantification des différents tests	58
Tableau 17 : Spécificité des tests ELISA d'Envirologix et d'Abraxis	59
Tableau 18 : Réactivité des tests ELISA d'Envirologix et d'Abraxis	60
Tableau 19 : Évaluation des quatre trousses ELISA selon 14 critères	62
Tableau 20 : Facteurs favorisant la prolifération des cyanobactéries	71
Tableau 21 : Emplacement et coordonnées géographiques des stations d'échantillonnage ...	72
Tableau 22 : Caractéristiques de la trousse de microplaque ELISA d'Abraxis	75
Tableau 23 : Classification hiérarchique des stations selon leur niveau de contamination par les cyanobactéries	77
Tableau 24 : Tableau récapitulatif des analyses ANOVA selon le niveau de contamination des groupes de station	78
Tableau 25 : Contribution de chaque paramètre à la formation des trois composantes principales de l'analyse ACP	81
Tableau 26 : Variance totale et variance totale cumulative expliquées par les trois composantes principales de l'ACP	82
Tableau 27 : Description des corrélations entre la concentration en microcystines et les paramètres mesurés	86
Tableau 28 : Fréquences des observations de la concentration de phycocyanine en fonction de la concentration des microcystines selon les seuils établis	94
Tableau 29 : Fréquences relatives des observations de la concentration de phycocyanine en fonction de la concentration des microcystines selon les seuils établis	95
Tableau 30 : Tableau récapitulatif des toxines et leur maxima en spectrophotométrie UV	114
Tableau 31 : Trousse commerciale et fournisseurs	115
Tableau 32 : Sonde commerciale et fournisseur	115
Tableau 33 : Étalons de cyanotoxines et fournisseurs	115
Tableau 34 : Concentrations de microcystine calculées par une régression non-linéaire à 4 paramètres	121
Tableau 35 : Statistiques descriptives de l'ANOVA	128
Tableau 36 : Résultats de l'ANOVA	129
Tableau 37 : Variance totale expliquée par les composantes de l'ACP	130
Tableau 38 : Matrice du test anti-image de l'ACP	130

Tableau 39 : Corrélations de Pearson entre les paramètres	131
Tableau 40 : Corrélations non-paramétrique de Spearman entre les paramètres	132
Tableau 41 : Corrélations de Pearson entre la concentration en microcystines et le logarithme en base 10 des paramètres	133
Tableau 42 : Corrélations de Pearson entre le logarithme en base 10 de la concentration des microcystines et les autres paramètres	134
Tableau 43 : Sommaire du modèle quantitatif A	135
Tableau 44 : Coefficients du modèle quantitatif A	135
Tableau 45 : Sommaire du modèle quantitatif B	135
Tableau 46 : Coefficients du modèle quantitatif B	135

Liste des équations

Équation 1 : Modèle quantitatif A	88
Équation 2 : Modèle quantitatif B	92

Liste des acronymes

AChE : Acétylcholinestérase

ACP : Analyse en composantes principales

APHA : *American public health association*

CEAEQ : Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec

Chl : Chlorophylle

CMA : Concentration maximale acceptable

COT : Carbone organique total

DFES : *Delayed fluorescence excitation spectroscopy*

ELISA : Immunoessai (*Enzyme linked immunosorbent assay*)

ESI : Ionisation par électrospray

FTE : Facteur de toxicité équivalente

HPLC : Chromatographe liquide haute performance (*High performance liquid chromatography*)

IC : Intervalle de confiance

LPS : Lipopolysaccharide

MALDI-TOF : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight*

MDDEP : Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs

MS : Spectrométrie de masse (*Mass spectrometry*)

NTK : Azote total Kjeldahl (*Nitrogen total Kjeldahl*)

OMS : Organisation mondiale de la santé

PC : Phycocyanine

PC/Chl : Rapport de la concentration de phycocyanine sur la concentration de chlorophylle

PCR : *Polymerase chain reaction*

PP : Protéine phosphatase

PPIA : *Protein phosphatase inhibition assay*

Ptot : Phosphore total

RFU : Unité relative de fluorescence (*Relative fluorescence unit*)

RSVL : Réseau de surveillance volontaire des lacs

TDS : Solides totaux dissous (*Total dissolved solids*)

UV : Ultraviolet

Introduction générale

La présence des cyanobactéries en quantité excessive dans les lacs et rivières du monde entier constitue un problème auquel n'échappe pas le Québec (World Water Assessment Program, 2009). Les toxines que produisent plusieurs cyanobactéries peuvent affecter sérieusement le système digestif, le système nerveux ainsi que causer des irritations cutanées aux humains et aux animaux exposés (Santé Canada, 2008). Actuellement au Québec, les méthodes utilisées pour évaluer le risque sanitaire que représente la présence de ces organismes nuisibles ne sont pas accessibles aux gestionnaires de l'eau que sont les municipalités, les organismes de bassin versant et les associations de riverains à cause du coût des appareils et de l'expertise nécessaire pour effectuer les analyses. De plus, dans notre province, un seul laboratoire est accrédité pour faire l'analyse des concentrations de cyanobactéries et des cyanotoxines.

Une procédure de détection pouvant être effectuée sur le site par les gestionnaires de l'eau locaux permettrait d'effectuer un suivi efficace des cyanobactéries, d'évaluer rapidement le risque sanitaire lié à la présence des cyanobactéries, de limiter la quantité d'échantillons envoyés au laboratoire accrédité et d'impliquer les citoyens dans la surveillance de leurs lacs et rivières. Afin de fournir à ceux-ci quelques outils pour évaluer l'état des lacs du Québec et pour suivre leur évolution dans le temps, le Ministère du développement durable de l'environnement et des parcs (MDDEP) a mis sur pied en 2004 le programme de Réseau de surveillance volontaire des lacs (RSVL) (MDDEP, 2002). En ce qui a trait aux cyanobactéries, le protocole issu de ce programme propose un suivi visuel des fleurs d'eau (MDDEP, 2009). Les données recueillies sont qualitatives et ne permettent pas aux gestionnaires de l'eau d'obtenir l'information nécessaire pour une prise de décision éclairée concernant la protection du public face au risque que représente la présence de cyanobactéries. Dans ce contexte, la recherche d'une procédure de détection capable d'évaluer ce risque directement sur le site est nécessaire. Les objectifs du présent document sont de proposer une procédure incluant l'utilisation d'outils de quantification faciles à utiliser, rapides, accessibles et abordables ainsi que de fournir les informations nécessaires pour évaluer adéquatement le risque sanitaire lié à la présence des cyanobactéries.

Pour ce faire, ce mémoire présente, au chapitre 1, une revue des méthodes disponibles pour la détection des cyanobactéries et de leurs toxines. Au chapitre 2, quatre trousseaux immunoenzymatiques disponibles commercialement sont évalués. Au chapitre 3, les

analyses statistiques ainsi que l'élaboration de trois modèles mettent en relation les paramètres mesurés avec la concentration des microcystines.

Chapitre 1 : Revue de littérature pour la sélection des outils de détection des cyanobactéries et des cyanotoxines

Sommaire du chapitre 1 :

Une des conséquences de la dégradation des milieux aquatiques est la surabondance des cyanobactéries aussi appelées algues bleu-vert en raison de leur teinte verte ou bleutée. L'ingestion par les humains et les animaux des toxines produites par les cyanobactéries est associée à plusieurs malaises et maladies; elle peut causer notamment des vomissements, diarrhées, gastroentérites et des pneumonies. Actuellement au Québec, les méthodes utilisées pour évaluer le risque que représente la présence de ces organismes nuisibles ne sont pas accessibles aux gestionnaires de l'eau que sont les municipalités, les organismes de bassin versant et les associations de riverains à cause du coût des appareils et de l'expertise nécessaire pour effectuer les analyses.

Une revue des méthodes de détection des cyanobactéries et de leurs toxines est effectuée avec comme objectif de proposer des outils alternatifs pour le suivi des cyanobactéries. La comparaison de ces méthodes à l'aide d'un tableau servant d'aide à la décision a permis d'identifier deux outils prometteurs : la fluorimétrie et les tests immunoenzymatiques. Le premier vise à évaluer l'abondance des cyanobactéries alors que le deuxième vise à quantifier les toxines. Les critères retenus pour cette comparaison étaient la facilité d'utilisation, le coût du matériel, la rapidité des analyses, la sensibilité des tests ainsi que la fiabilité des résultats. Ces outils se veulent faciles d'utilisation, peu coûteux, sensibles, rapides et fiables.

1 Introduction

La qualité des cours d'eau se dégrade partout dans le monde à cause des pressions de plus en plus intenses exercées par les populations humaines sur le milieu aquatique. Cette situation entraîne une multitude de problèmes liés à l'utilisation de l'eau, notamment la pollution des sources d'eau potable, le vieillissement prématuré des cours d'eau et la perte de biodiversité (World Water Assessment Program, 2009).

L'accumulation des substances nutritives dans l'eau favorise la prolifération des plantes aquatiques, des algues et du plancton, qui se nourrissent de ces nutriments. Lorsque ceux-ci meurent, ils participent à la formation, dans le fond du plan d'eau, de vase riche en nutriments. Cette source de nutriments favorise la prolifération des plantes aquatiques et d'une multitude de groupes de phytoplancton (World Water Assessment Program, 2009 ; MDDEP, 2000).

Une des conséquences de la dégradation des milieux aquatiques est la surabondance des cyanobactéries aussi appelées algues bleu-vert en raison de leur teinte verte ou bleutée (World Water Assessment Program, 2009). Il faut voir que ces organismes microscopiques sont naturellement présents (moins de 20 000 cellules/mL) dans le milieu aquatique sans qu'aucun problème n'y soit associé (Blais, 2002). Les problèmes surviennent lorsque les cyanobactéries prolifèrent de façon excessive et forment à la surface de l'eau des fleurs d'eau, aussi appelées efflorescence. C'est que les cyanobactéries produisent des toxines appelées cyanotoxines qui sont massivement libérées dans l'eau lorsque les cellules cyanobactériennes meurent à la suite d'une fleur d'eau.

L'ingestion de ces toxines par les humains et les animaux est associée à plusieurs malaises et maladies; elle peut causer notamment des vomissements, diarrhées, gastroentérites et des pneumonies (Santé Canada, 2008). Van Apeldoorn *et al.* (2007) considèrent également que l'exposition prolongée à de petites quantités (moins de 1 µg/L) de certaines toxines favoriserait l'apparition de tumeurs cancéreuses au niveau du foie. Quelques cas de décès chez l'homme ont même été reportés. L'incident le plus marquant s'est produit en 1996 au Brésil où 76 personnes sont mortes dans un centre de dialyse qui utilisait de l'eau contaminée aux cyanotoxines (Yuan *et al.*, 2006). De nombreux cas d'empoisonnement chez des animaux qui avaient consommé de l'eau contaminée aux cyanotoxines ont aussi été rapportés (Svrcek et Smith, 2004).

Le Québec n'échappe pas au phénomène : la présence de fleurs d'eau de cyanobactéries est en augmentation dans ses lacs. En effet, le nombre de plans d'eau où ont été observées des fleurs d'eau de cyanobactéries a crû considérablement de 2004 à 2008. En une seule année, soit de 2005 à 2006, il a augmenté de 40 %. En 2008, c'est dans 138 lacs qu'ont été observées ces fleurs d'eau. Notons que la médiatisation du phénomène des fleurs d'eau a certainement contribué à l'augmentation des observations (MDDEP 2008).

Le Tableau 1 présente le nombre de plans d'eau touchés au Québec de 2004 à 2008 selon les données du ministère du Développement durable de l'Environnement et des Parcs (MDDEP) (MDDEP, 2008a).

Tableau 1 : Nombre de plans d'eau touchés au Québec par des fleurs d'eau de cyanobactéries de 2004 à 2008

Année	Nombre de lacs touchés
2004	21
2005	29
2006	62
2007	156
2008	138

Le Tableau 2 présente les données relatives au bassin de la rivière Saint-François, secteur où se trouvent les rivières et les lacs ayant fait l'objet des chapitres 2 et 3 du présent mémoire (MDDEP, 2008a).

Tableau 2 : Nombre de plans d'eau touchés par les fleurs d'eau de cyanobactéries de 2004 à 2008 dans le bassin versant de la rivière Saint-François

Année	Nombre de lacs touchés
2004	4
2005	5
2006	12
2007	15
2008	16

Des méthodes préventives et curatives sont utilisées dans la lutte contre les crises de cyanobactéries. Les premières, comme la suppression des apports d'éléments nutritifs, azote et phosphore se retrouvant dans les cours d'eau, constituent les moyens les plus efficaces et les plus durables pour empêcher la prolifération des cyanobactéries. En effet, l'application des méthodes préventives vise à freiner la prolifération des cyanobactéries en s'attaquant directement à la source du problème : les apports en nutriments qui soutiennent la croissance des cyanobactéries. Cependant, elle nécessite d'importants efforts de la part de la population, qui doit notamment modifier ses pratiques agricoles, restaurer les berges et réhabiliter les fosses septiques désuètes (Chorus et Mur, 1999) et attendre les retombées, car les premiers résultats significatifs ne peuvent être observés qu'à long terme (Chorus et Mur, 1999). Les méthodes curatives, comme le traitement des sédiments pour éliminer les nutriments déjà présents dans le lit des lacs et des rivières, sont, d'après Chorus et Mur (1999), coûteuses et doivent être couplées à des mesures de réduction des nutriments provenant de sources externes au plan d'eau (érosion, égouts, lessivage des sols agricoles). Le document réalisé par Devidal (2007) présente une revue des méthodes curatives visant principalement la réduction de la concentration du phosphore dans l'eau pour restaurer les lacs.

Pour identifier et quantifier la présence des cyanobactéries, plusieurs outils et méthodes de détection ont été mis au point. Les cyanobactéries présentes en petite quantité sont difficiles, voire impossibles, à détecter par observation directe. L'utilisation d'outils de détection se veut donc incontournable.

Actuellement, l'identification des cellules cyanobactériennes et leur comptage par microscopie est une méthode largement utilisée pour évaluer l'abondance des cyanobactéries. Cependant, les analyses microscopiques nécessitent le recours à un personnel hautement qualifié et à un laboratoire spécialisé, ce qui s'avère très onéreux (de 85 \$ à 280 \$ par échantillon) (Ellis, 2008). Pour la quantification des cyanotoxines, la chromatographie liquide haute performance (HPLC), suivie d'une détection par spectrométrie de masse (MS) ou par spectrométrie ultraviolette (UV) sont considérées comme des méthodes de référence. Or, encore là, l'équipement nécessaire coûte cher et le travail également puisqu'il ne peut être exécuté que par du personnel hautement qualifié. Les analyses de la concentration de toxines coûtent 280 \$ par échantillon envoyé au CEAEQ (Ellis, 2008).

Des recherches sur l'élaboration et la standardisation de méthodes dites alternatives sont actuellement en cours. Ces méthodes visent l'amélioration des outils de détection des cyanobactéries en termes de temps d'analyse, de simplicité d'exécution et de coût d'analyse. L'objectif est de permettre aux utilisateurs de l'eau d'effectuer eux-mêmes certaines analyses. Plusieurs auteurs soulignent l'importance de la recherche visant l'évaluation de l'applicabilité et la validation de méthodes alternatives (Lawton et Edwards, 2008) ; McElhiney et Lawton, 2005 ; Lopez *et al.*, 2008). Selon Lawton et Edwards (2008), les méthodes de détection appropriées devraient être sélectionnées sur la base de leur applicabilité, de l'équipement nécessaire et du coût d'utilisation. Hawkins *et al.* (2005) ont retenu le coût d'utilisation, la fiabilité des résultats et la simplicité de l'opération comme critères pour classer les méthodes de détection.

Ce chapitre présente les différentes méthodes de détection (des cyanobactéries et des cyanotoxines) existantes, de référence ou alternatives, disponibles commercialement ou encore testées en laboratoire.

La première partie porte sur les genres de cyanobactéries et les familles de cyanotoxines d'intérêt. La deuxième passe en revue les caractéristiques, les avantages et les inconvénients liés aux différentes méthodes de détection des cyanobactéries tandis que le troisième volet passe en revue les caractéristiques, les avantages et les inconvénients se rattachant aux différentes méthodes de détection des cyanotoxines. Enfin le dernier volet présente les recommandations élaborées à la suite de la présente étude relativement au choix de méthodes dites alternatives qui pourraient être utilisées par les gestionnaires de l'eau.

1.1 Genres de cyanobactéries d'intérêt au Québec

Une procédure de détection devrait être en mesure de fournir des informations sur l'abondance des cyanobactéries ainsi que sur la concentration des toxines d'intérêt. Il existe 150 genres et 2000 espèces de cyanobactéries (Van Apeldoorn *et al.*, 2007). Van Apeldoorn *et al.* (2007) estiment que 40 genres sont producteurs de toxines. Les genres toxiques retrouvés en eau douce au Québec sont : l'*Anabaena*, l'*Aphanizomenon*, le *Cylindrospermopsis*, le *Lyngbya*, le *Microcystis*, la *Nodularia*, le *Nostoc* et l'*Oscillatoria*. Dans le bassin de la rivière Yamaska, par exemple, les genres *Anabaena*, *Microcystis* et *Aphanizomenon* ont été identifiés (Chevalier, 2001). La Figure 1 présente des images microscopiques de quatre genres de cyanobactéries identifiés au Québec.

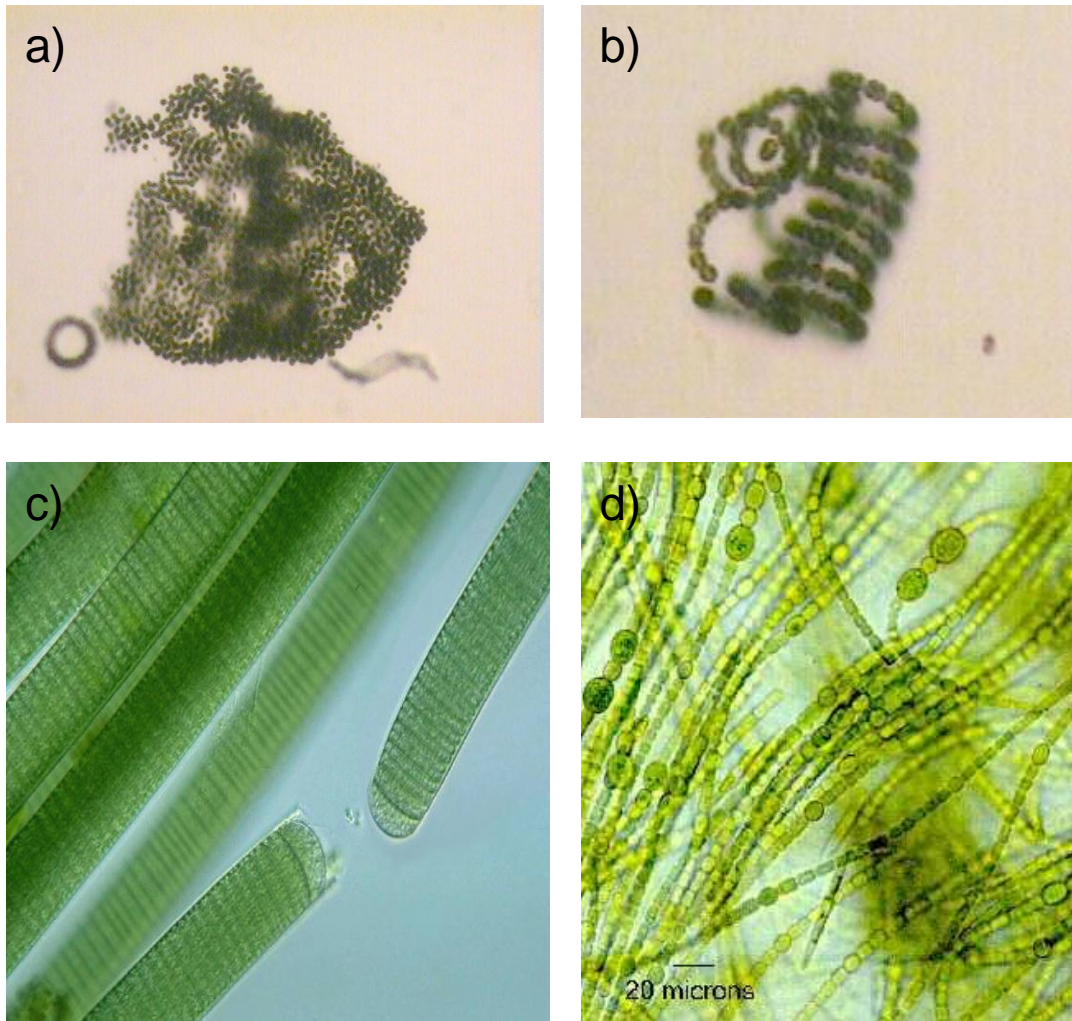


Figure 1 : Microscopies de quatre principaux genres cyanobactériens a) *Microcystis* (www.biology.missouristate.edu); b) *Anabaena* (www.biology.missouristate.edu); c) *Oscillatoria* (www.nostoc.pt/ensaio.html); d) *Nostoc* (www.ebc.uu.se)

Une fleur d'eau peut contenir plusieurs espèces de cyanobactéries, mais elle est, la majorité du temps, dominée par une ou deux espèces (Lavoie *et al.*, 2007). Une clé d'identification est disponible dans l'ouvrage de l'APHA (2005) et celui de Wehr *et al.* (2002).

1.2 Toxines d'intérêt au Québec

Il existe également une grande diversité de cyanotoxines. Celles-ci sont classées selon leur structure et leur mode d'action. Ainsi, il existe trois grands groupes de cyanotoxines : les hépatotoxines, les neurotoxines et les irritants cutanés (Van Apeldoorn *et al.*, 2007). Le Tableau 3 présente les cyanotoxines et les genres de cyanobactéries qui leur sont associés.

Tableau 3 : Cyanotoxines, cyanobactéries associées et concentrations limites acceptables

Groupe de toxine	Genre de cyanobactérie associée	Concentration maximale acceptable
Hépatotoxines		
Microcystines	<i>Anabaena, Anabaenopsis, Aphanocapsa, Hapalosiphon, Microcystis, Nostoc, Oscillatoria</i>	Microcystine-LR : (Groupe scientifique sur l'eau, 2005) - 1,5 µg/L pour l'eau potable - 16 µg/L pour la baignade Microcystine-LR : 1,0µg/L (OMS, 1998)
Nodularines	<i>Nodularia</i> (eaux saumâtres surtout)	N/D
Cylindrospermopsine	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Umezakia</i>	N/D
Neurotoxines		
Anatoxine-a	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Oscillatoria</i>	3,7 µg/L (Groupe scientifique sur l'eau, 2005)
Anatoxine-a(S)	<i>Anabaena, Oscillatoria</i>	N/D
Saxitoxines (PSP)	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Lyngbya</i>	N/D
Lipopolysaccharides (LPS)	Tous les genres	N/D

1.2.1 Hépatotoxines

Les cyanotoxines les plus communes en eau douce sont les hépatotoxines de la famille des microcystines (Lavoie *et al.*, 2007). Les hépatotoxines s'attaquent au foie en inhibant l'action d'enzymes appelées protéines phosphatases 1 (PP1) et 2A (PP2A). Il existe de nombreuses variantes moléculaires de ces toxines. La plus connue et la plus étudiée est la microcystine-LR, les lettres L et R signifiant que les acides aminés présents sont la leucine (L) et l'arginine (R) (Figure 2).

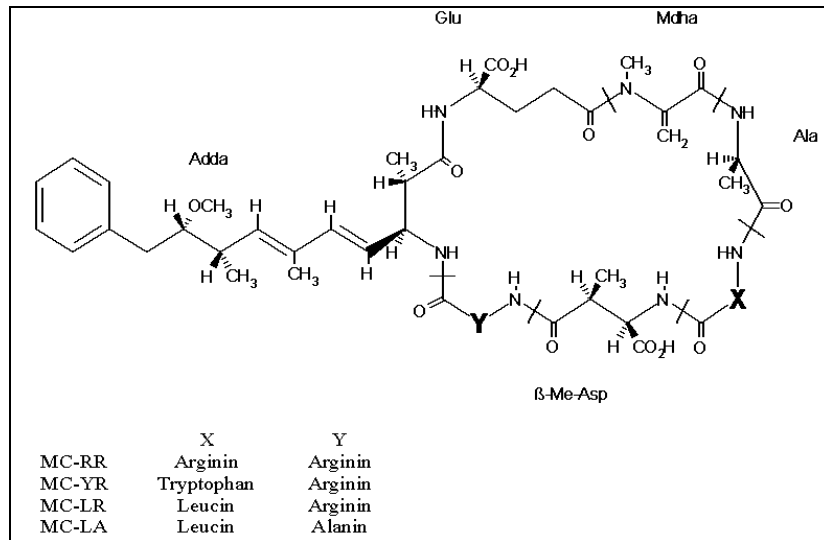


Figure 2 : Structure moléculaire générale des microcystines
(www.cyanobacteria-platform.com)

La microcystine-LR est également la plus commune et elle constitue l'une des variantes les plus toxiques des microcystines. Il existe plus de 80 variantes moléculaires des microcystines. La mesure des hépatotoxines est généralement exprimée en équivalent de microcystine-LR (Svcrek et Smith, 2004). En effet, le groupe scientifique sur l'eau (2005) a établi des facteurs de toxicité équivalente (FTE) pour plusieurs variantes (Tableau 4) selon les données obtenues dans la littérature.

Tableau 4 : Facteurs de toxicité équivalente des variantes moléculaires de microcystines

Variants moléculaires	Facteur de toxicité équivalente (FTE)
Microcystine-LR	1,0
Microcystine-LA	1,0
Microcystine-YR	1,0
Microcystine-YM	1,0
Microcystine-RR	0,1

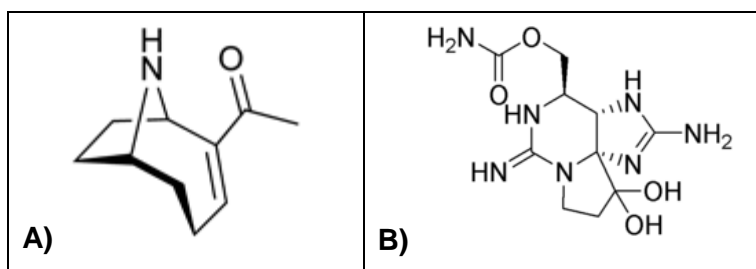
Ce tableau montre que les microcystines-LR, LA, YR et YM ont une toxicité équivalente alors que la microcystine-RR est 10 fois moins toxique que celles-ci. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (OMS, 1998), la concentration maximale acceptable, en termes d'équivalent de microcystine-LR, est de 1,0 µg/L en ce qui concerne la consommation de l'eau potable (Svcrek et Smith, 2004). Au Québec, la concentration maximale acceptable

relativement à la consommation de l'eau potable est de 1,5 µg/L et celle relative à la baignade de 16 µg/L) (Groupe scientifique sur l'eau, 2005).

1.2.2 Neurotoxines

Les neurotoxines incluent l'anatoxine-a, l'anatoxine-a(S) et la saxitoxine aussi connue sous le nom de *paralytic shellfish poison* ou PSP (Figure 3) (Svcrek et Smith, 2004)

Figure 3 : Structures moléculaires A) Anatoxine-a ; B) Saxitoxine
(tiré de Svcrek et Smith, 2004)

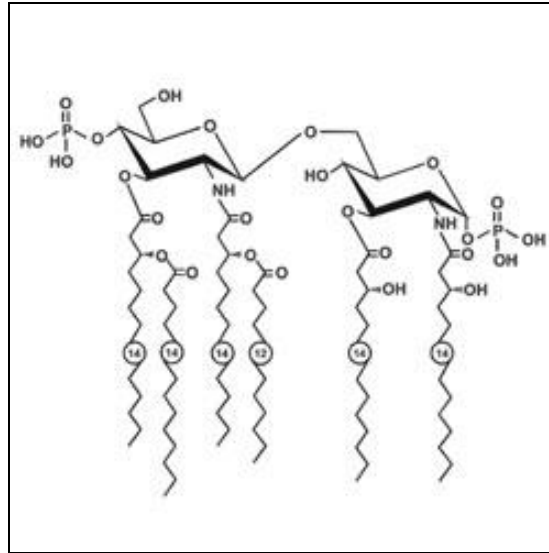


Comme leur nom l'indique, les neurotoxines s'attaquent au système nerveux. Elles ne sont pas aussi communes dans les plans d'eau douce que les hépatotoxines et ne représentent pas, par conséquent, une menace aussi grande pour la santé humaine (Svcrek et Smith, 2004). Par contre, l'ingestion de ces toxines peut être létale à très faible dose. Aucune indication officielle n'a été publiée quant à la concentration maximale acceptable de ces toxines dans l'eau potable. Cependant, l'Institut national de santé du Québec recommande de ne pas consommer l'eau si elle contient plus de 3,7 µg/L d'anatoxine-a (Robert, 2007).

1.2.3 Irritants cutané

Des irritants cutané sont produits par plusieurs genres cyanobactériens. Il s'agit de lipopolysaccharides (LPS) présents dans la membrane des cellules (Keleti et Sykora, 1982). Bien qu'elles ne soient pas mortelles, ces toxines ont un grand pouvoir inflammatoire lorsqu'elles entrent en contact direct avec la peau, qu'elles sont ingérées ou inhalées (Svcrek et Smith, 2004).

La Figure 4 montre la structure moléculaire générale des LPS.



**Figure 4 : Structure moléculaire des lipopolysaccharides (LPS),
tiré de www.landesbioscience.com**

Peu de recherches ont été effectuées sur les endotoxines au Québec et l'information les concernant est rare.

1.3 Élaboration d'une procédure de détection

La détection des cyanobactéries devrait s'effectuer selon les quatre étapes proposées par Codd *et al.* (1999) (Figure 5). Ces étapes, l'inspection visuelle du site, la mesure du phosphore total, la mesure de l'abondance des cyanobactéries et la celle de la quantité de cyanotoxines, permettent de sélectionner les méthodes de détection adéquates et de déterminer le lieu et la fréquence de l'échantillonnage.

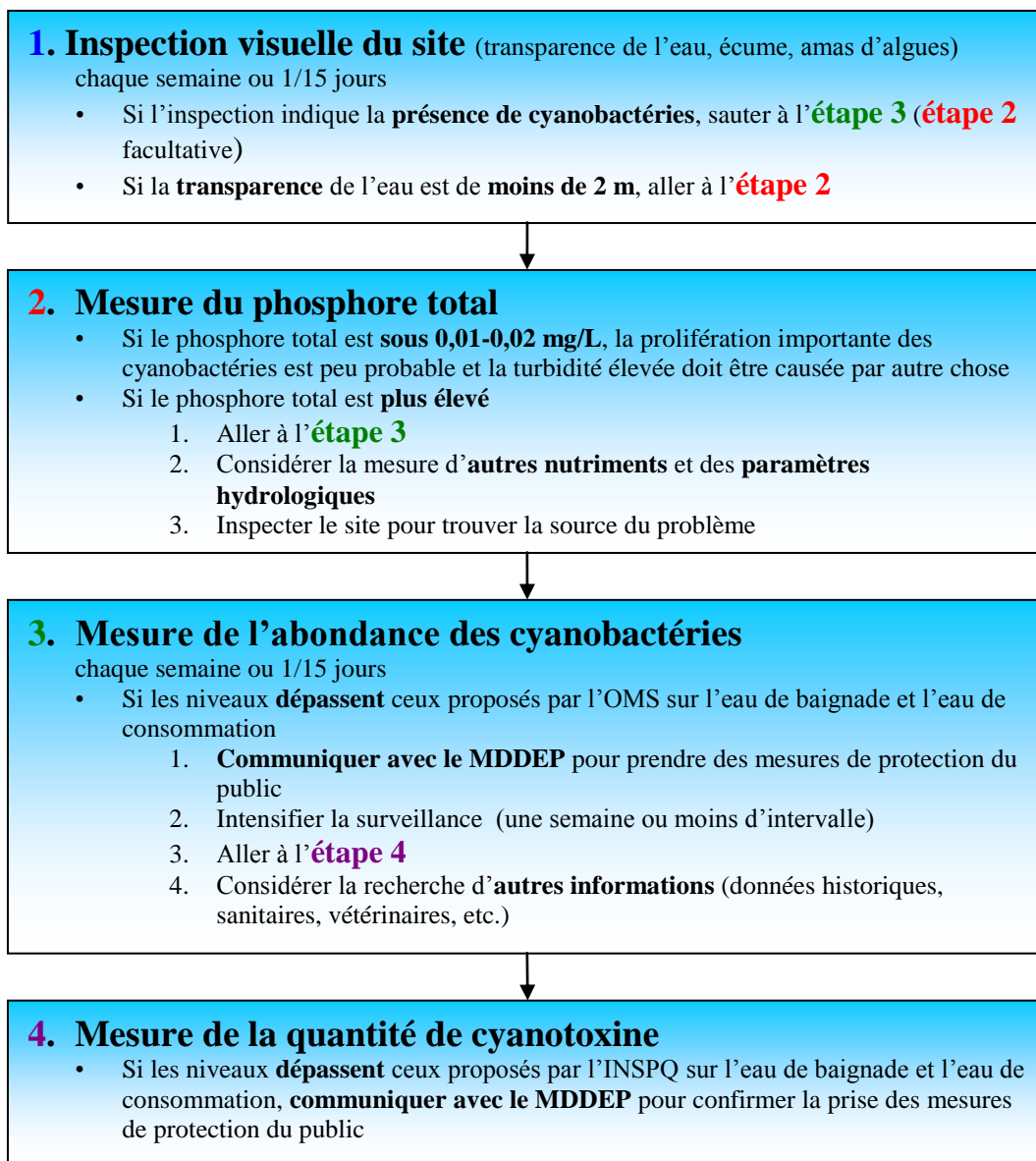


Figure 5 : Schéma de la procédure de détection des cyanobactéries (modifié de Codd *et al.*, 1999)

1.3.1 Inspection visuelle du site

L'inspection visuelle d'un site permet d'identifier les zones où des fleurs d'eau de cyanobactéries risquent de se développer et les zones où la présence de fleurs d'eau constituerait une menace. L'inspection visuelle consiste à repérer les signes de la présence potentielle des cyanobactéries par la transparence de l'eau, la présence d'écume ou la présence d'amas algaux.

La transparence de l'eau peut-être mesurée avec un disque de Secchi (MDDEP, 2007). La transparence est la profondeur d'eau où un objet est encore visible de la surface.

La présence d'écume (Figure 6) est habituellement associée à une toxicité importante (Falconer *et al.*, 1999). Les genres *Microcystis* et *Anabaena* forment souvent ce type de fleurs d'eau. Les écumes se forment généralement sous l'action du vent et cette formation peut être très rapide, parfois quelques heures suffisent pour qu'elles n'apparaissent (Falconer *et al.*, 1999) (Figure 7). Les amas d'algues peuvent être caractérisés par une coloration verte ou bleu-vert de l'eau.



Figure 6 : Fleurs d'eau de cyanobactéries sous forme d'écume
(photo de Liette Fontaine MDDEP) (Blais, 2006)

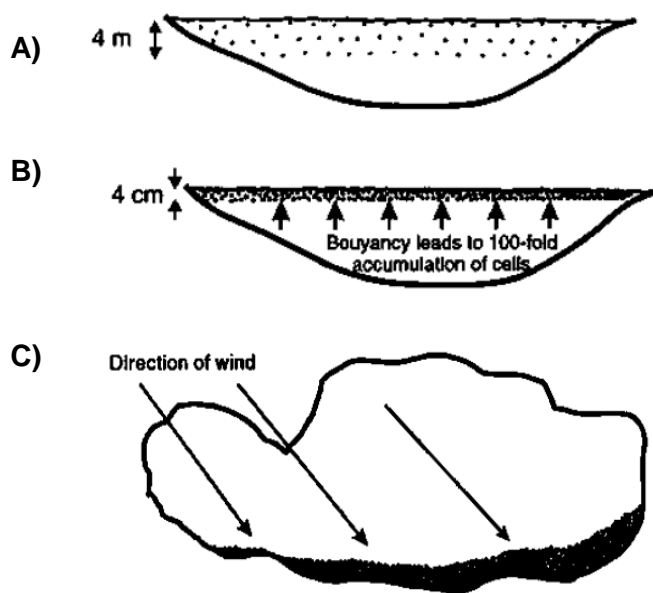


Figure 7 : Formation d'écume de cyanobactéries par l'action du vent

A) cyanobactéries dispersées dans la colonne d'eau ; B) regroupement des cyanobactéries à la surface ; C) agglomération des cyanobactéries par l'effet du vent (tiré de Falconer *et al.*, 1999)

Ces prises de mesures nécessitent très peu d'expertise, peu d'équipement (possiblement un bateau); elles peuvent donc être effectuées par un bénévole d'une association de protection du lac, un patrouilleur nautique ou autres. Parmi les sites à inspecter, les zones de baignade publique et les environs des prises d'eau potable sont certainement les plus importants. Mais avant de faire son inspection, le préposé devrait avoir consulté le guide d'identification des fleurs d'eau (Blais, 2006).

Notons que la télédétection ou les images aéroportées peuvent aussi être utiles à cette étape (Vincent *et al.*, 2004). Dans les cas où le territoire à couvrir est grand, la détection des fleurs d'eau de cyanobactéries peut être effectuée plus rapidement. En analysant les images des années précédentes, il est possible de comprendre la dynamique de dispersion des fleurs d'eau dans le temps et dans l'espace et d'identifier les zones à risque.

1.3.2 Mesure du phosphore total

La mesure de la concentration en phosphore total (i.e. forme soluble et particulaire) n'est pas en lien direct avec la quantité de cellules cyanobactériennes (Downing *et al.*, 2001) et ne devrait donc pas être utilisée pour quantifier les cyanobactéries. Cependant, elle permet d'évaluer si le site est favorable ou non à la prolifération des cyanobactéries. En effet, selon Codd *et al.* (1999), il y a peu de risque de prolifération de fleurs d'eau si la concentration de phosphore total est sous 10-20 µg/L. Par contre, il y a risque de dominance par les cyanobactéries lorsque le phosphore total est de 30 µg/L ou plus. Tel est du moins le seuil connu en ce domaine (Downing *et al.*, 2001). Il s'agit d'un facteur clé pour évaluer le risque de prolifération des cyanobactéries (Downing *et al.*, 2001, Ellis, 2008). Une fois le risque évalué, il devient possible d'établir une liste des sites à surveiller et à inspecter en priorité.

À cette étape, il est pertinent de recueillir des données physiques (présence d'une stratification thermique, température, direction et vitesse du vent, etc.), chimiques (pH, conductivité, oxygène dissout, etc.) et hydrologiques (temps de résidence de l'eau, etc.). Mesurer la biomasse totale et la concentration d'azote peut être d'une grande utilité pour comprendre la formation des fleurs d'eau (Codd *et al.*, 1999). Des données physiques comme la température de l'eau et la persistance de la stratification thermique permettent de vérifier si les conditions physiques du milieu sont favorables ou non à la prolifération des cyanobactéries. Les données hydrologiques, surtout le temps de résidence de l'eau du lac et le débit d'une rivière, sont utiles pour déterminer si le risque de développer des fleurs d'eau est important. Un lac dont le

temps de résidence de l'eau est de moins de 5 à 10 jours et une rivière à fort débit risquent moins de développer des fleurs d'eau (Codd *et al.*, 1999).

1.3.3 Mesure de l'abondance des cyanobactéries

Cette étape consiste à identifier les cyanobactéries présentes et à les quantifier. Il est important de connaître les genres cyanobactériens présents pour pouvoir ensuite sélectionner la ou les méthodes de détection des cyanotoxines appropriées. Par exemple, en présence du genre *Microcystis*, il faut choisir une méthode qui détecte les microcystines (voir Tableau 3). L'identification des cyanobactéries s'effectue généralement au microscope. Il n'est pas nécessaire d'identifier les cyanobactéries au niveau de l'espèce; la détermination du genre suffit habituellement (Lawton *et al.*, 1999).

1.3.4 Mesure de la quantité de cyanotoxines

Une fois le site identifié, le potentiel de prolifération des cyanobactéries évalué, l'identification des genres et le comptage des cellules faits, une fois que tous les signes indiquent une possible présence de toxines, il faut quantifier celles-ci. Comme les microcystines sont certainement les toxines les plus communes en eau douce (Svcrek et Smith, 2004), les méthodes choisies devraient être en mesure de les détecter.

La détection des cyanotoxines se fait en deux étapes. La première étape consiste en un examen simple et rapide au moyen d'une méthode de détection. La seconde consiste en la validation des résultats obtenus à l'aide d'une méthode de référence (Svcrek et Smith, 2004).

2 Détection des cyanobactéries

Les méthodes décrites dans cette section peuvent être utilisées pour évaluer l'abondance des cyanobactéries lors de l'étape 3 de la procédure de détection (Figure 5). Elles sont présentées ici selon l'approche analytique soit biologique, physicochimique et physique.

2.1 Approche biologique

2.1.1 Tests par Polymerase Chain Reaction (PCR)

Les tests génétiques, dont fait partie la PCR, permettent d'estimer l'abondance d'une espèce de cyanobactéries (Litaker et Tester, 2002) et de discriminer les différents génotypes de la

communauté cyanobactérienne (Sangolkar *et al.*, 2006). Leur utilisation, pourtant, n'est pas très répandue dans la détection des cyanobactéries, même si plusieurs méthodes utilisant des protocoles et du matériel différent ont été décrites dans la littérature. En général, les tests par PCR se basent sur la réplication d'une séquence d'ADN ou d'ARN spécifique à une espèce ou à un groupe, laquelle permet de détecter la présence d'un groupe plus ou moins spécifique de cyanobactéries (Litaker et Tester, 2002). Janse *et al.* (2004) ont caractérisé des colonies de *Microcystis* dans des populations naturelles en appliquant une telle méthode (Sangolkar *et al.*, 2006).

Afin d'effectuer la PCR, l'ADN est extrait à partir de l'échantillon. La séquence ciblée est ensuite polymérisée par PCR en utilisant l'amorce adéquate (Hisbergues *et al.*, 2003). Plusieurs séquences génétiques ont été utilisées dans la détection des cyanobactéries. Notamment, la séquence de l'espaceur intergénique de la phycocyanine (PC-IGS) et le segment d'ARN ribosomal 16s rARN. La première permet la détection des cyanobactéries en général et le second permet de distinguer les souches d'une espèce ou d'un genre (Sangolkar *et al.*, 2006). Les gènes liés à la biosynthèse des toxines sont également utilisés pour discriminer les lignées cyanobactériennes toxiques des lignées non toxiques (Dittmann et Börner, 2005).

Selon Hawkins *et al.*, (2005), la technique est très sensible et peu coûteuse soit environ 8 \$ américains par échantillon. Rantala *et al.* (2006) ont utilisé la PCR avec succès dans la détection des producteurs potentiels de microcystines dans les lacs finlandais. Leur méthode permet d'évaluer le potentiel toxique des cyanobactéries et pourrait être utilisée comme un dépistage précoce des fleurs d'eau de cyanobactéries (Rantala *et al.*, 2006). Par contre, la technique utilisée par Hawkins *et al.* (2005) est sujette à de faux négatifs à forte concentration cellulaire. De plus, les résultats obtenus sont généralement qualitatifs et parfois semi quantitatifs (Dittmann et Börner, 2005). En effet, la quantité de produit de la PCR dépend de plusieurs facteurs et peut ne pas refléter la quantité relative des cyanobactéries productrices de toxines de l'échantillon (Hisbergues *et al.*, 2003).

En somme, les tests génétiques utilisant la PCR sont des techniques en émergence, il est donc important de les utiliser avec précaution; ils ont besoin d'être testés quant à leur spécificité et à leur fiabilité (Litaker et Tester, 2002). D'autres techniques génétiques notamment la *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD) et la *Restriction fragment length*

polymorphism (RFLP) sont utiles pour différencier les géotypes d'une communauté cyanobactérienne (Sangolkar *et al.*, 2006).

2.2 Approche physicochimique

2.2.1 Tests par fluorescence

Les tests par fluorescence se basent sur la mesure de la concentration de pigments photosynthétiques pour estimer l'abondance des cyanobactéries. Deux méthodes sont abordées dans cette section : la fluorimétrie et la DFES (*Delayed Fluorescence Excitation Spectroscopy*).

2.2.1.1 Fluorimétrie

La fluorimétrie, méthode employée par Lehman (2007) et par Gregor *et al.* (2007), détecte la phycocyanine, pigment photosynthétique présent chez les cyanobactéries, cela dans le but d'évaluer l'abondance des cellules cyanobactériennes. Comme la phycocyanine est présente chez la plupart des espèces de cyanobactéries d'eau douce, l'analyse fluorimétrique de la phycocyanine détecte les cyanobactéries sans discerner toutefois leur espèce ou leur genre. Cette méthode permet donc d'évaluer la quantité de cyanobactéries, mais pas d'identifier des espèces ou des genres (Gregor *et al.*, 2007).

La méthode est fondée sur la mesure de l'émission du pigment (phycocyanine) après son excitation par une lumière monochromatique (Izydorczyk *et al.*, 2005). Dans les méthodes utilisées par Lehman (2007) et Izydorczyk *et al.* (2005), la phycocyanine est détectée à l'aide d'un fluorimètre avec un filtre d'excitation à 630 nm et un filtre d'émission à 660 nm. Gregor *et al.* (2007) utilisent plutôt un lecteur de microplaques avec deux filtres d'excitation à 485 et à 590 nm respectivement pour la détection des algues eucaryotes et des cyanobactéries. La méthode permet donc de différencier les deux groupes. Les émissions fluorescentes sont mesurées à 680 nm.

Soulignons que la mesure de la concentration de phycocyanine par fluorescence est simple, rapide et sensible, car elle permet de détecter de très petites quantités de cyanobactéries (10 cellules/mL) (Gregor *et al.*, 2007). Il s'agit également d'une méthode fiable : Gregor *et al.* (2007) ont trouvé que la corrélation entre la fluorescence et l'abondance mesurée par un

comptage au microscope est modérée ou forte, lesquels résultats sont corroborés par Lee *et al.*, (1994) ainsi que par Izydorczyk *et al.* (2005).

Toutefois, la méthode est sujette à de faux positifs, et ce, dans deux cas notamment : lorsqu'il y a présence d'algues du groupe des cryptophytes et quand une grande quantité d'algues eucaryotes se trouve dans l'échantillon. En effet, le groupe zooplanctonique des cryptophytes possède lui aussi le pigment phycocyanine, ce qui risque d'augmenter faussement la mesure de la quantité de cyanobactéries (Lehman, 2007).

Quant à l'interférence causée par la présence d'une grande quantité d'algues eucaryotes dans l'échantillon, elle peut être évitée : il suffit d'utiliser deux longueurs d'ondes (590 nm et 485 nm) comme lumière d'excitation. Il est ensuite possible d'établir le ratio de cyanobactéries et d'algues eucaryotes. Notons que les cyanobactéries sont de 10 à 11 fois plus excitées par la lumière à 590 nm que par celle à 485 nm alors que le contraire se produit pour les algues eucaryotes (Gregor *et al.*, 2007).

Plusieurs auteurs ont observé que les périodes où l'on observe des concentrations élevées de toxines semblaient toujours suivre les périodes d'abondance de cyanobactéries (Lehman, 2007; Watanabe *et al.*, 1989; Orr et Jones, 1998). Selon les résultats obtenus par Lehman (2007), les périodes de concentration élevées de phycocyanine précédaient typiquement de une à deux semaines les périodes de concentration élevées de toxines. Cette dynamique n'est cependant pas observée par tous (Lehman, 2007). Selon Gregor *et al.* (2007), cette technique est efficace pour la détection précoce de la présence des cyanobactéries dans l'eau. Puisque toutes les cyanobactéries sont détectées indépendamment de leur genre ou de leur espèce, cette méthode constitue un outil utile pour la détection précoce d'un danger potentiel dû à la présence des cyanobactéries. De plus, il est possible de faire la détection par fluorescence en temps réel (Gregor *et al.*, 2007). Cette caractéristique est d'autant plus intéressante puisque les fleurs d'eau de cyanobactéries sont caractérisées par des changements hautement dynamiques qui varient de façon saisonnière autant que dans un court laps de temps (quelques heures) dû au changement de la météo locale (Izydorczyk *et al.*, 2005).

2.2.1.2 DFES (delayed fluorescence excitation spectroscopy)

L'objectif de cette méthode est de déterminer la composition en phytoplancton d'un échantillon naturel. Elle permet de distinguer quatre classes de phytoplancton : les cyanobactéries, les

cryptophytes, les algues vertes et les algues chromophytes (Bodemer, 2004). La méthode est basée sur la mesure de la fluorescence retardée survenant après l'excitation par une lumière monochromatique d'un matériel faisant de la photosynthèse, matériel présent chez les cyanobactéries. Chaque classe phytoplanctonique génère un spectre d'excitation différent lorsqu'il est excité par une lumière monochromatique dû à la différence dans leur composition en pigment photosynthétique : la chlorophylle, les pigments accessoires et les phycobiliprotéines (Bodemer, 2004). La composition phytoplanctonique et l'estimation de la biomasse de plusieurs lacs et rivières ont été déterminés à l'aide de cette méthode : lac Kinneret en Israël, le Danube, le Rhin en Allemagne (Bodemer, 2004).

Après avoir placé les échantillons d'eau dans le noir pendant un certain temps, les cellules de l'échantillon sont excitées par une lumière monochromatique (400 à 730 nm). Les pigments photosynthétiques actifs absorbent des photons et émettent par fluorescence 0.2 à 1 seconde après l'excitation. Cette émission est mesurée par un spectromètre d'excitation fluorescente qui compte les photons émis et permet une estimation rapide de la concentration des pigments. Pour le genre *Microcystis*, la contribution de chacun des pigments de phycocyanine, phycoérythrine, allophycocyanine et chlorophylle *a* à la fluorescence est respectivement de 44,38%, 0,17 %, 16,91 % et 8,54 % (Bodemer, 2004).

La DFES est une méthode *in vivo* rapide. Cependant, le ratio des différentes phycobiliprotéines varie à l'intérieur même d'une espèce et dépend des conditions de nutriments et de lumière auxquelles la cellule a été exposée, rendant ainsi l'identification des espèces plus difficile. Des erreurs d'identification peuvent survenir puisque les cryptophytes partagent certains pigments avec les cyanobactéries. Il est donc important d'utiliser un spectre de calibration reflétant la signature particulière de l'espèce de cyanobactérie dominante dans le programme de déconvolution afin d'identifier les bonnes espèces (Bodemer, 2004).

Chez les cyanobactéries, environ 90 % de la fluorescence est due à l'absorption de photon par les phycobiliprotéines. Par contre la contribution d'un seul pigment varie, ce qui implique que le ratio phycocyanine : phycoérythrine : allophycocyanine : chlorophylle *a* est différent d'une espèce de cyanobactérie à l'autre. La contribution des phycobiliprotéines détectée par fluorescence ne reflète pas nécessairement la composition stœchiométrique chez les cyanobactéries (Bodemer, 2004).

2.2.2 HPLC + programme CHEMTAX

Cette technique permet de détecter la présence d'un groupe planctonique dans un échantillon et d'en évaluer la biomasse. Elle se base sur le ratio de la quantité d'un pigment caractéristique sur la quantité de chlorophylle *a* pour déterminer la composition de la communauté planctonique d'un lac (Schlüter et Møhlenberg, 2003). Après extraction, les pigments sont quantifiés par la méthode HPLC et détection en UV. Les ratios des différents pigments sont déterminés pour chacune des espèces de plancton ciblées à partir de cultures de celles-ci (Schlüter *et al.*, 2006). La concentration en pigment caractéristique a été démontrée comme étant corrélée avec l'abondance des groupes phytoplanctoniques. Dans le cas où l'analyse porte sur les cyanobactéries, le ratio du pigment caractéristique zeaxanthine sur la chlorophylle *a* sert à évaluer l'abondance des cyanobactéries (Schlüter et Møhlenberg, 2003).

Le programme CHEMTAX calcule la contribution de différents groupes planctoniques au total de la chlorophylle *a* à partir des concentrations mesurées par HPLC. Par contre, il faut savoir que ce ratio ainsi que la quantité de pigment d'une cellule varient selon l'espèce et les conditions de lumière et de nutriments. De plus, il faut procurer au programme les ratios standards associés aux différents groupes planctoniques pour effectuer une bonne analyse (Schlüter *et al.*, 2006).

2.3 Approches physiques

2.3.1 Identification et comptage au microscope

Dans la plupart des pays, les méthodes standards de détection des cyanobactéries incluent l'identification et le comptage au microscope (Lawton *et al.*, 1999). La microscopie permet de déterminer la densité, la diversité et la composition de la communauté cyanobactérienne (Sangolkar *et al.*, 2006).

La méthode consiste à faire le décompte des cellules potentiellement toxiques et d'évaluer leur abondance dans l'échantillon (Hawkins *et al.*, 2005). La méthode est décrite dans APHA (2005). Il est possible d'utiliser un microscope standard ou au microscope renversé avec des objectifs de 10 et 40X (Lawton *et al.*, 1999).

Cette méthode est simple et peu coûteuse (Hawkins *et al.*, 2005). Cependant, elle peut prendre beaucoup de temps et est sujette à des erreurs méthodologiques significatives (Gregor *et al.*, 2007). Il se peut que certaines souches d'une espèce considérées toxiques ne le soient pas en réalité, puisque les souches toxiques et non toxiques de cyanobactéries peuvent s'avérer très semblables (Sangolkar *et al.*, 2006). Il est donc difficile de les différencier sur la base de leur morphologie (Hisbergues *et al.*, 2003). La technique est donc susceptible de produire de faux résultats positifs (Hawkins *et al.*, 2005).

2.3.2 Télédétection

L'objectif de la télédétection est de repérer les fleurs d'eau de cyanobactéries via l'imagerie satellite afin d'observer leur distribution et d'évaluer leur concentration dans un plan d'eau. La détection est basée sur une signature spectrale unique produite par la présence de phycocyanine, pigment photosynthétique présent chez toutes les cyanobactéries (Vincent *et al.*, 2004).

La télédétection a beaucoup été utilisée pour la détection des communautés de phytoplancton dans le milieu halieutique notamment dans la mer Baltique où les fleurs d'eau de cyanobactéries couvrent environ 100 000 km² à chaque été (Kutser *et al.*, 2006). Selon Kutser *et al.* (2006), la télédétection utilisée pour la détection des cyanobactéries n'est efficace que lorsqu'il y a abondance élevée de celles-ci. Il n'est donc pas indiqué d'utiliser cette technologie pour effectuer une détection précoce des fleurs d'eau en émergence (Kutser *et al.*, 2006).

Il a été démontré qu'effectuer une cartographie quantitative des cyanobactéries est possible pendant les périodes de fleur d'eau en utilisant des instruments hyperspectraux comme le capteur Hyperion. Le problème avec cette technologie est que la couverture spatiale et temporelle d'Hyperion ne permet pas son usage régulier dans la détection des fleurs d'eau potentiellement toxiques (Kutser *et al.*, 2006).

Ainsi, Kutser *et al.* (2006) ont testé la capacité des capteurs comme MODIS, MERIS et SeaWiFS à procurer des données cartographiques quantitatives sur les cyanobactéries et à différencier les fleurs d'eau de cyanobactéries des autres fleurs d'eau. Selon eux, les capteurs multispectraux comme ALI, Landsat et MODIS ne sont certainement pas en mesure de différencier les cyanobactéries des autres espèces algales puisque ces capteurs ne peuvent pas détecter la phycocyanine. De tous les capteurs testés, seul le capteur MERIS pourrait

être utilisé pour identifier les cyanobactéries si elles sont présentes en grande quantité (Kutser *et al.*, 2006). Il est cependant important de considérer que l'étude de Kutser *et al.* (2006) a été effectuée en mer Baltique, donc en milieu marin. Vincent *et al.* (2004) ont été en mesure de d'utiliser avec succès les images Landsat afin de détecter et d'observer les fleurs d'eau de cyanobactéries sur le lac Érié.

En définitive, les données chronologiques fournies par les images satellites sont particulièrement utiles à l'identification des sites où débutent les fleurs d'eau de cyanobactéries et à l'étude de leurs dynamiques (ASC, 2003).

2.3.3 Synthèse des caractéristiques des méthodes de détection des cyanobactéries

Dans l'objectif d'évaluer les méthodes à utiliser pour la quantification de la biomasse cyanobactérienne, le Tableau 5 présente une synthèse des méthodes de détection des cyanobactéries.

Tableau 5 : Synthèse des caractéristiques des méthodes de détection des cyanobactéries

Méthode	Objet de détection	Limite de détection	Avantages	Inconvénients
Tests par PCR	ADN ou ARN des cyanobactéries	N.D.	Sensibilité élevée; Peu coûteux	Faux négatifs; Résultats semi-quantitatifs; En émergence
Fluorimétrie	Phycocyanine (pigment)	10 cellules/mL	Simple; Rapide; Sensible Détection précoce; Détection temps réel	Interférences possibles.
DFES	Plusieurs pigments	N.D.	Distingue 4 classes phytoplancton; Rapide	Interférences possibles; Standards requis.
Microscopie	Cellules cyanobactériennes	N.D.	Méthode standard; Peu coûteux; Identification espèces	Erreurs statistiques; Variantes toxiques et non toxiques; Opération longue.
Téledétection	Phycocyanine (pigment)	N.D.	Couvre large territoire, vue d'ensemble, suivi de dynamique des fleurs d'eau	Quantification peu précise, peu adapté pour lacs, coûteux.

3 Détection des cyanotoxines

Afin d'évaluer la concentration des cyanotoxines lors de l'étape 4 de la procédure de détection (Figure 5), les méthodes décrites dans cette section peuvent être utilisées. Elles sont présentées selon leur approche méthodologique soit biochimique ou chimioanalytique. Notons que lors de l'analyse des cyanotoxines, il est important de détecter à la fois les toxines intra et extracellulaires. Afin de déterminer la quantité totale de cyanotoxines, il faut provoquer la lyse cellulaire, généralement par congélation-décongélation, de l'échantillon d'eau. Cette procédure permet de libérer les toxines présentes à l'intérieur des cellules (Svrcek et Smith, 2004). Cependant, selon De Blois (2007), la lyse cellulaire n'est que partielle en utilisant la méthode de congélation-décongélation. Au laboratoire du CEAEQ, la lyse est plutôt provoquée par l'ajout de solutions d'extraction à base de méthanol et d'eau et par la sonification (De Blois, 2007).

3.1 Approches biochimiques

Les tests immunoenzymatiques (ELISA), les bioessais, les tests d'inhibition enzymatique (PPIA), les tests à l'Acétylcholinestérase (AChE) et le test sur neuroblastome sont utilisés pour détecter les cyanotoxines.

3.1.1 Immunoessais (tests ELISA)

Les tests ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) permettent l'identification et la quantification des hépatotoxines et des neurotoxines (Robillot et Hennion, 2001). Cette méthode est basée sur la reconnaissance antigène-anticorps, l'antigène étant la toxine. La coloration du complexe toxine-anticorps permet de quantifier la toxine par photométrie (Robillot et Hennion, 2001). Notons qu'il existe plusieurs types de test ELISA avec des caractéristiques différentes.

Les échantillons d'eau congelés sont dégelés et ajoutés avec une solution tampon (tampon phosphate salin) aux tubes enduits d'anticorps polyclonaux (Lehman, 2007) ou monoclonaux (Sangolkar *et al.*, 2006) de microcystine. Carmichael et An (1999) ont utilisé cette méthode pour la détection des nodularines. En effet, les anticorps de microcystine-LR qu'ils ont utilisés

montrent une bonne réactivité avec les microcystines et les nodularines. La lecture de la couleur, générée par le complexe toxine-anticorps, se fait par spectrophotométrie à 450 nm (maximum d'absorbance) et avec une longueur d'onde différentielle à 650 nm (Lehman, 2007).

Cette méthode est sensible à de faibles concentrations de microcystine et peut être appliquée à un échantillon d'eau sans filtration ou extraction (Lehman, 2007). De plus, le test est hautement spécifique et rapide (Sangolkar *et al.*, 2006).

Cependant, selon Lehman (2007) ce test peut être sujet à de faux négatifs. Ainsi, le résultat d'un test ELISA peut indiquer que la toxine mesurée est absente de l'échantillon, alors qu'elle s'y trouve en réalité. Le test ne peut pas distinguer les différentes microcystines dans un échantillon d'eau naturelle et toutes les quantités de microcystines sont exprimées en équivalent de microcystine-LR. Ainsi, certains analogues non-toxiques des microcystines ou nodularines sont reconnus avec une grande affinité par l'anticorps, alors que d'autres anticorps réagissent moins avec des microcystines et nodularines hautement toxiques (Carmichael et An, 1999). De plus, la grande variété de microcystines pourrait poser un problème puisque la réactivité des anticorps avec différentes microcystines est variable et n'est pas en corrélation avec la toxicité des microcystines (Sangolkar *et al.*, 2006 ; Msagati *et al.*, 2006). Ceci indique que le test ELISA est susceptible de sous-estimer la concentration de certaines variantes de microcystines (Msagati *et al.*, 2006).

La limite de détection de cette méthode se situe entre 0.05 ppm et 0.5 ppm. Elle est donc assez sensible pour détecter la présence de microcystine à une concentration de 1 ppm (Carmichael et An, 1999). Plusieurs chercheurs ont créé des anticorps contre les microcystines. Tous ces anticorps n'ont pas la même efficacité de détection des toxines et de leurs variantes. Toutefois, le test ELISA a été utilisé avec succès afin de déterminer la concentration de microcystines d'échantillons d'eau (Msagati *et al.*, 2006). Hawkins *et al.* (2005) ont classé les tests ELISA parmi les meilleures techniques de détection des microcystines selon les critères de la limite de détection, la sélectivité pour les microcystines, le coût de l'analyse, les compétences requises pour l'analyse et le temps d'opération.

3.1.2 Tests de toxicité

Les méthodes bioanalytiques sont basées sur le potentiel toxique des cyanotoxines et mesurent l'hépatotoxicité, la neurotoxicité, la cytotoxicité, l'activité enzymatique et les

interactions immunologiques (Robillot et Hennion, 2001). Elles sont simples et rapides (McElhiney et Lawton, 2005). Les bioessais, les tests PPIA, les tests à l'AChe et sur neuroblastomes font partie des méthodes qui mesurent directement la toxicité d'un échantillon.

3.1.2.1 Bioessais avec souris

Les bioessais avec des souris permettent le dépistage rapide de toutes les cyanotoxines (Van Apeldoorn *et al.*, 2007). Le test est généralement utilisé d'une manière qualitative afin de déterminer si une fleur d'eau est toxique ou non. Il est cependant possible de déterminer la classe de cyanobactérie selon les symptômes de la souris. Après extraction des toxines, celles-ci sont administrées par injection à la souris. Les souris sont observées pendant 24 heures et ensuite tuées. Dans le cas où on suspecte la présence de cylindrospermopsine, le temps d'observation s'étend à sept jours. La mortalité, les symptômes observés et l'examen post mortem permettent de déterminer quelle classe de cyanobactéries a causé la mort. Lorsqu'il y a présence de plusieurs toxines, celle ayant l'action la plus rapide est susceptible de masquer les symptômes des autres toxines (Msagati *et al.*, 2006).

Cette méthode comporte de nombreux désavantages. En plus de soulever plusieurs questions éthiques (Sangolkar *et al.*, 2006), elle nécessite un certain nombre de rats et une licence ou un permis dans plusieurs pays (Msagati *et al.*, 2006). De plus, elle n'est pas très indiquée pour les échantillons d'eau en raison de sa faible précision et sa faible sensibilité (McElhiney et Lawton, 2005 ; Msagati *et al.*, 2006). En effet, les concentrations autour de 1-2 µg/L sont indétectables, alors que l'Organisation mondiale de la Santé recommande de ne pas s'approvisionner d'une eau contenant 1 µg/L. De plus, il est impossible de déterminer la toxicité d'une toxine particulière dans un échantillon d'eau contenant un mélange de toxines et de produits chimiques (Msagati *et al.*, 2006).

Il est également possible d'utiliser *Artemia salina*, petit crustacée d'eau salée, comme animal indicateur de la présence de toxines. Toutefois, comme pour le bioessai avec souris, le test n'est pas spécifique et peut être grandement influencé par les composantes de l'échantillon autres que les cyanotoxines (McElhiney et Lawton, 2005).

3.1.2.2 Tests d'inhibition enzymatique (PPIA)

Cette méthode est utilisée pour l'analyse des hépatotoxines (Robillot et Hennion, 2001). Elle permet la quantification de celles-ci, mais nécessite l'utilisation complémentaire d'une méthode chimioanalytique comme la chromatographie liquide avec détection en ultraviolet (LC-UV) ou la chromatographie liquide avec détection par spectre de masse (LC-MS) pour l'identification des toxines et la validation des résultats (Rivasseau *et al.*, 1999).

Les hépatotoxines agissent spécifiquement sur les protéines phosphatases (PP) de type 1 et 2A (PP1 et PP2A) (Robillot et Hennion, 2001). Les microcystines et nodularines sont connues comme étant les inhibiteurs de phosphatases les plus fréquemment trouvés dans l'environnement naturel (Carmichael et An, 1999). Ces toxines se lient avec l'unité catalytique de la PP1 et PP2A de manière irréversible et non compétitive (Robillot et Hennion, 2001). Plus la quantité d'hépatotoxine est élevée, plus la PP1 et la PP2A sont inhibées formant un produit jaune (paranitrophénol). Ensuite, l'activité des phosphatases peut être évaluée en mesurant le taux de production de couleur jaune par colorimétrie, la couleur étant mesurée par l'absorbance à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à pH élevé (Robillot et Hennion, 2001 ; Rivasseau *et al.*, 1999 ; Carmichael et An, 1999). Plus la couleur jaune est intense, plus il y a de phosphorylation, donc moins la concentration en hépatotoxine est élevée (Carmichael et An, 1999). Il est également possible d'utiliser un substrat radioactif plutôt que la colorimétrie pour la quantification de l'activité des protéines phosphatases (Sangolkar *et al.*, 2006 ; Msagati *et al.*, 2006). Cependant cette technique entraîne plusieurs problèmes. En effet, le phosphore radioactif utilisé comme marqueur possède un temps de demi-vie court. Il faut donc préparer ces marqueurs sur une base régulière et plusieurs laboratoires ne sont pas équipés pour la manipulation de matériel radioactif (Msagati *et al.*, 2006).

Il est également possible d'utiliser la fluorescence pour détecter la présence de toxines avec cette méthode (Msagati *et al.*, 2006). L'activité de l'enzyme PP2A est mesurée par la formation de composés fluorescents. L'utilisation de ces composés permet d'atteindre un niveau de sensibilité deux fois plus élevé qu'avec la détection par colorimétrie et d'effectuer des tests de toxicité plus reproductibles (McElhiney et Lawton, 2005).

La méthode a été employée par Carmichael et An (1999) pour la détection des microcystines et nodularines dans des échantillons naturels. Les toxines sont extraites des cellules algales. Ensuite une purification à l'aide d'une silice greffée C18 est effectuée. Il y a trois avantages à

cette purification. Premièrement, ceci permet de réduire la quantité de pigment pouvant causer des interférences. Deuxièmement, cela élimine les composés inorganiques, notamment le NaF, qui sont également des inhibiteurs de protéine phosphatase et qui pourraient entraîner de faux résultats négatifs. Troisièmement, la silice greffée aide à concentrer les toxines. Les échantillons sont mis en présence des protéines phosphatases et des autres réactifs et la production de couleur jaune est mesurée à 405 nm à chaque cinq minutes. La concentration de toxines dans l'échantillon est ensuite calculée à partir d'une courbe d'inhibition construite à partir des standards de toxine (Carmichael et An, 1999). Rivasseau *et al.* (1999) décrivent deux procédures différentes de la PPIA. McElhiney et Lawton (2005) notent que les essais utilisant la PP2A sont environ 50 fois plus sensibles que ceux utilisant la PP1.

L'avantage majeur du test d'inhibition enzymatique est son habilité à détecter directement la bioactivité des microcystines et nodularines (Carmichael et An, 1999 ; McElhiney et Lawton, 2005). Contrairement aux tests ELISA, le test est basé sur l'activité fonctionnelle plutôt que sur la reconnaissance d'une composante structurale de la toxine. Ceci est d'autant plus intéressant puisque la toxicité de ces toxines est directement liée à leur activité inhibitrice des protéines phosphatase (Carmichael et An, 1999). Le test est simple, rapide (les résultats sont prêts en une heure), reproductible et peu de manipulations sont nécessaires (Rivasseau *et al.*, 1999). De plus, la PPIA est économiquement intéressante puisque de l'équipement coûteux n'est pas nécessaire et que 800 à 1000 expérimentations peuvent être faites en utilisant le même lot d'enzyme (Rivasseau *et al.*, 1999). Par contre, les enzymes purifiées disponibles sur le marché peuvent être dispendieuses (McElhiney et Lawton, 2005). La PPIA est également assez sensible pour détecter des niveaux de microcystines sous le seuil recommandé par l'Organisation mondiale de la santé sans avoir recours à la préconcentration de l'échantillon et sa performance est bonne dans une variété de types d'échantillons (McElhiney et Lawton, 2005).

Cependant, toutes les variantes de microcystines ne réagissent pas avec la même intensité avec les protéines phosphatases et le test est également sensible aux inhibiteurs autres que les microcystines, notamment l'acide okadaïque et la calyculine A (McElhiney et Lawton, 2005). De plus, l'échantillon lui-même peut contenir une certaine activité de phosphatase ce qui pourrait masquer la présence de toxines (Sangolkar *et al.*, 2006).

Les variantes non-toxiques des hépatotoxines ne sont pas détectées (Robillot et Hennion, 2001). Ce test montre une forte corrélation ($r^2=0.93$) avec les analyse par LC-UV-MS (Robillot et Hennion, 2001) de même qu'avec l'analyse des microcystines au chromatographe liquide haute performance (HPLC) (Carmichael et An, 1999). La sensibilité de cette technique s'apparente à celle des tests ELISA (Carmichael et An, 1999). L'habilité du test à indiquer la toxicité globale de l'échantillon fait de la PPIA un outil utile dans le suivi et l'identification des échantillons qui nécessitent une analyse plus poussée par des techniques chimiques (McElhiney et Lawton, 2005). Hawkins *et al.* (2005) ont classé la PPIA parmi les meilleures techniques de détection des microcystines selon la limite de détection, la sélectivité pour les microcystines, le coût de l'analyse, les compétences requises pour l'analyse et le temps d'opération.

3.1.2.3 Test à l'acétylcholinestérase (AChE)

Les tests à l'acétylcholinestérase servent à l'identification et à la quantification de la neurotoxine anatoxine-a(s) (Devic *et al.*, 2002 ; Mahmood et Carmichael, 1987 ; Henriksen *et al.*, 1997). L'action toxique de l'anatoxine-a(s) repose sur son potentiel à inhiber l'activité de l'acétylcholinestérase, composante essentielle à la transmission d'influx nerveux à travers les neurones (Devic *et al.*, 2002). En effet, en présence de l'anatoxine-a(s), le substrat d'acétylthiocholine s'hydrolyse et forme la thiocholine qui, en présence d'un réactif (DTNB), produit un complexe de couleur jaune (Ellman *et al.*, 1961). Le résultat de la présence d'anatoxine-a(s) est la perturbation importante du flux nerveux et la mort de l'organisme touché (Dittmann et Wiegand, 2006).

La méthode peut être appliquée à une suspension de cellules sanguines ou *in vitro* par détection colorimétrique. Selon la méthode, après avoir extrait l'anatoxine, celle-ci est mise soit en présence d'une suspension de cellules sanguines (Ellman *et al.*, 1961 ; Mahmood et Carmichael, 1987) ou d'une solution d'acétylcholinestérase animale (Ellman *et al.*, 1961 ; Mahmood et Carmichael, 1987 ; Henriksen *et al.*, 1996) ou son analogue l'acétylthiocholine (Ellman *et al.*, 1961). Dans tous les cas, la détection se fait par absorbance à 412 nm (Mahmood et Carmichael, 1987 ; Henriksen *et al.*, 1996). Le test est décrit par Ellman *et al.* (1961).

Cependant, tous les pesticides organophosphorés connus inhibent également l'acétylcholinestérase et sont donc détectés comme l'anatoxine-a(s). Le test est donc non

spécifique (Van Apeldoorn *et al.*, 2007 ; Devic *et al.*, 2002). Pour contrer ce problème, Devic *et al.* (2002) ont mis au point un biosenseur utilisant 4 mutants d'acétylcholinestérase permettant de distinguer l'action des pesticides de celle des toxines.

3.1.2.4 Test cellulaire sur neuroblastomes

Ce test est utilisé pour la détection des neurotoxines de la famille de saxitoxines dont le mode d'action consiste à bloquer les canaux sodiques et empêcher l'entrée de sodium (Robillot et Hennion, 2001). Le test permet la quantification, mais pas l'identification des toxines. Tous les dosages sont exprimés en équivalents de saxitoxine (Testé *et al.*, 2002). Il détecte les substances modulatrices de l'activité des canaux sodiques (Robillot et Hennion, 2001) en mesurant la survie cellulaire en présence des échantillons (Testé *et al.*, 2002).

Des cellules de souris sont introduites dans les puits d'une microplaque. Dans les puits sont notamment ajoutés les toxines extraites de l'échantillon, une dose connue d'une solution antagoniste aux toxines (ouabain/veratridine) et une substance servant à mesurer la capacité de réduction des cellules, le MTT (3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide). La réduction du MTT par les déshydrogénases mitochondriales amène la formation de cristaux formazan insolubles et colorés qui sont ensuite dissous. L'absorbance est mesurée à 540 nm sur un lecteur de plateau à micro-titrage. Une plus grande absorbance correspond à la présence de toxines dans l'échantillon (Testé *et al.*, 2002).

La sensibilité de ce test est plus élevée que celle du HPLC (Testé *et al.*, 2002). Cependant, des substances extraites avec les toxines pourraient affecter les valeurs déterminées par ce test. En effet, ces substances pourraient provoquer la lyse des neuroblastomes ou simplement avoir un effet sur les canaux sodiques (Testé *et al.*, 2002). Il faut noter qu'un pH bas (< 7) a un effet cytotoxique sur les neuroblastomes (Testé *et al.*, 2002).

3.2 Approches chimioanalytiques

La chromatographie liquide (LC) avec détection en lumière ultraviolette (UV), avec spectre de masse (MS) et avec spectre de masse en tandem (MS/MS) sont utilisées pour détecter les cyanotoxines. La LC-UV et LC-MS sont des méthodes de détection en chimie analytique qui sont utilisées comme méthodes de références dans la plupart des pays.

3.2.1 Chromatographie liquide (LC) et spectrophotométrie UV

La détection par spectrophotométrie UV est utilisée pour la détection de plusieurs toxines dont les microcystines, les nodularines, de l'anatoxine-a (Robillot et Hennion, 2001 ; Sangolkar *et al.*, 2006). Cette méthode permet l'identification ainsi que la quantification des toxines (Sangolkar *et al.*, 2006). La séparation des toxines se fait par chromatographie en phase liquide (LC) et est suivie d'une caractérisation par spectrophotométrie UV (Robillot et Hennion, 2001). Le temps de rétention, le spectre UV et le maximum d'absorbance des standards commerciaux constituent la base de l'identification et de la quantification des microcystines (Sangolkar *et al.*, 2006). Pour la LC avec les microcystines, la phase stationnaire est généralement une silice greffée C18 et la phase mobile est un mélange eau-acétonitrile qu'on ajuste à un pH acide avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) ou de l'acide formique (Sangolkar *et al.*, 2006). Avec les toxines de la famille des anatoxines, c'est une phase mobile isocratique qui est plutôt utilisée. La méthode est décrite par James *et al.* (1998).

Certains produits d'un échantillon peuvent interférer dans le spectre UV, entraînant une mauvaise interprétation des résultats (Ortea *et al.*, 2004). La capacité à distinguer les variantes de microcystines est limitée puisque la plupart ont un spectre UV similaire entre 200 et 300 nm (Sangolkar *et al.*, 2006). De plus, les toxines de la famille des saxitoxines ne sont pas détectables par UV (Robillot et Hennion, 2001).

Un problème important de la détection UV est le manque de standards sur le marché. Sur 80 variantes de microcystines, seulement quelques standards commerciaux sont disponibles sur le marché (Sangolkar *et al.*, 2006). En l'absence de standards, la quantification des microcystines est généralement exprimée en équivalent de microcystine-LR (Sangolkar *et al.*, 2006 ; McElhiney et Lawton, 2005). Cet équivalence est possible car la majorité des microcystines ont un spectre UV similaire avec un maximum à 238 nm (Figure 8) (Robillot et Hennion, 2001 ; Msagati *et al.*, 2006). Les spectres UV permettent de différencier les variantes contenant de la tyrosine ou du tryptophane qui présentent un maximum respectivement à 232 nm et 223 nm (Robillot et Hennion, 2001) ou 222 nm selon plusieurs auteurs (Msagati *et al.*, 2006 ; McElhiney et Lawton, 2005).

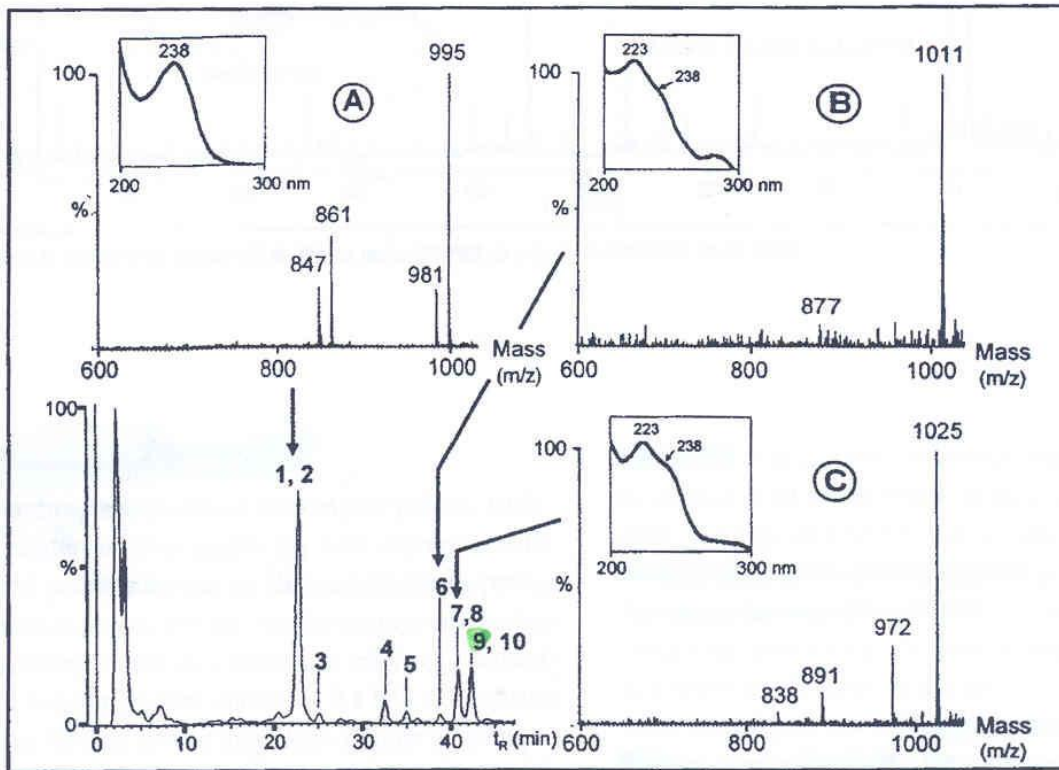


Figure 8 : Chromatogramme HPLC (238nm) d'extraits cellulaires de *Microcystis aeruginosa* spectres de masse associés à A) microcystine-LR et microcystine-dMeLR, B) microcystine-dMeLW et C) microcystine-LW et microcystine-dMeLF (tiré de Robillot et Hennion, 2001)

Ces maxima peuvent varier dans la littérature selon les méthodes utilisées (Sangolkar *et al.*, 2006). Le Tableau 30 de l'annexe 1 présente les maxima d'absorbance UV associés à chaque toxine. La limite de détection des microcystines se situe sous le seuil de 1 µg/L proposé par l'Organisation mondiale de la santé lorsque les techniques de concentration et de purification appropriées sont appliquées (Msagati *et al.*, 2006).

De plus, la préparation de l'échantillon pour la LC est laborieuse. En effet, il faut effectuer une extraction sur phase solide (SPE). À cette étape, il est possible de perdre une certaine quantité de toxine et la qualité de l'extraction peut varier selon les produits utilisés. Un test de qualité est nécessaire afin de déterminer le rendement de la phase d'extraction et des ajustements doivent être apportés au besoin (Cabana, 2009). La même préparation est nécessaire pour toutes les méthodes mettant en œuvre la LC.

3.2.2 Chromatographie liquide (LC) et spectrométrie de masse (MS)

La détection par spectrométrie de masse (MS) est utilisée dans l'analyse simultanée de plusieurs microcystines, de la nodularine, de l'anatoxine-a et de la saxitoxine (Robillot et Hennion, 2001 ; Sangolkar *et al.*, 2006). Cette méthode permet l'identification et la quantification de ces toxines (Sangolkar *et al.*, 2006). Elle peut être employée lorsqu'une confirmation et une identification plus poussées sont nécessaires (Msagati *et al.*, 2006).

La spectroscopie de masse convertit les molécules en ions, lesquels sont analysés sur la base de leur masse et de leur charge (Sangolkar *et al.*, 2006). Ainsi, il est possible d'identifier les toxines sur la base des ions caractéristiques produits et exprimés dans le spectre de masse (Msagati *et al.*, 2006). La MS fournit des informations structurales agissant comme une empreinte digitale pour les toxines individuelles et la technique peut servir à la confirmation de la présence d'une toxine après détection par spectrophométrie UV (McElhiney et Lawton, 2005).

La chromatographie se fait sur une colonne de silice greffée C18 de 1mm de diamètre interne éluée par un gradient d'eau et d'acétonitrile acidifié par 0,1% d'acide acétique (Robillot et Hennion, 2001). Une variété d'interface et de configurations d'ionisation a été utilisée avec la MS avec des limites de détection d'environ 0.02 µg/L (Msagati *et al.*, 2006). Plusieurs techniques ont été ainsi développées pour l'analyse des microcystines, incluant le Fast atom bombardment (FAB), l'ionisation par electrospray (ESI-MS) et le Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight (MALDI-TOF) (McElhiney et Lawton, 2005). L'ionisation à pression atmosphérique (API) par electrospray (ES) ou ionspray (IS), s'est avérée très efficace pour la détection des peptides comme les microcystines (Robillot et Hennion, 2001). La LC-ESI-MS est une technique simple, sensible et adéquate pour le suivi et l'identification d'une grande variété de microcystines d'un échantillon d'eau naturel (Sangolkar *et al.*, 2006). Elle permet d'indiquer facilement qu'un pic contient deux substances différentes (Robillot et Hennion, 2001). Elle fournit une analyse robuste (Msagati *et al.*, 2006). Robillot *et al.* (2000) ont utilisé avec succès la spectrométrie de masse avec la technique MALDI-TOF pour la détection des microcystines. Un avantage de la MS-MALDI-TOF est qu'elle permet l'analyse complète d'un petit échantillon sans purification préalable (Sangolkar *et al.*, 2006). En connaissant le poids moléculaire des variantes des toxines, la LC-MS possède l'avantage de pouvoir cibler une masse spécifique, de détecter la toxine désirée et de l'identifier par son

temps de rétention (Sangolkar *et al.*, 2006). Selon McElhiney et Lawton (2005) l'identification des microcystines est plus précise avec la détection par MS que par UV.

Par contre, l'identification des variantes structurales est délicate et nécessite souvent des techniques de spectrométrie de masse plus performantes (Robillot et Hennion, 2001). En effet, les toxines différentes donnent des spectres différents. Ainsi, la concentration d'une toxine inconnue, pour laquelle des standards ne sont pas disponibles, ne peut être estimée de façon fiable avec cette technique (Msagati *et al.*, 2006).

3.2.3 Chromatographie liquide (LC) et spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

Cette méthode permet l'identification des microcystines lorsque aucun standard n'est disponible ou lorsqu'une nouvelle variante de microcystine est présente dans l'échantillon (Sangolkar *et al.*, 2006). Elle est basée sur la fragmentation moléculaire spécifique en plus petits peptides, dans lesquels peuvent être identifiés les acides aminés présents (Sangolkar *et al.*, 2006). De plus, la MS/MS permet d'identifier des composés inconnus comme de nouvelles variantes de microcystines (Sangolkar *et al.*, 2006). La MS/MS, comparativement à la spectrométrie de masse en une seule étape, améliore le ratio du signal reçu sur le bruit de fond (Ortea *et al.*, 2004). La MS/MS permet d'obtenir des informations sur la structure des toxines. Le fragment le plus utile pour la détection des microcystines et nodularines est l'ion $[\text{PhCH}_2\text{CH}(\text{OMe})]^+$ à m/z (masse/charge) 135, ion généré à partir du fragment Adda (Ortea *et al.*, 2004). La Figure 9 présente la structure moléculaire de la microcystine-LR qui contient le groupement ADDA.

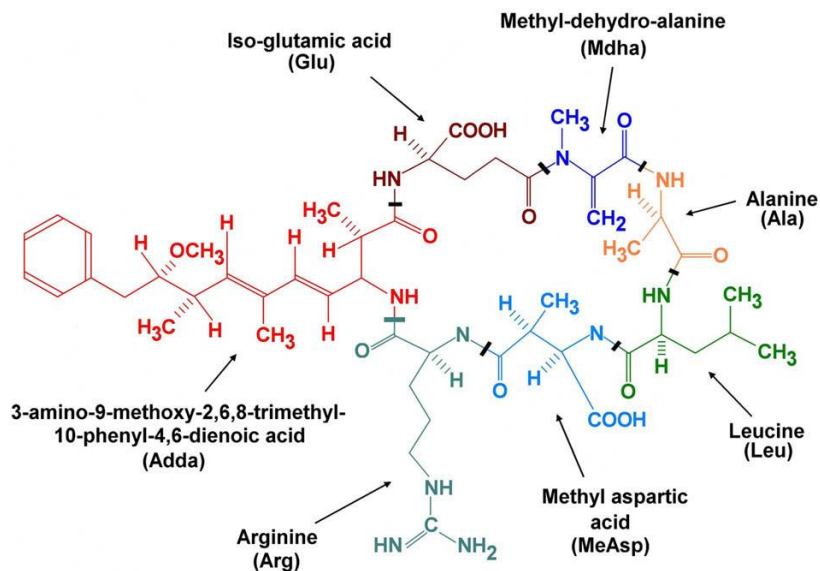


Figure 9 : Structure moléculaire de la microcystine-LR (tiré de Merel *et al.*, 2009)

Les fragment ADDA est présente chez toutes les variantes de microcystine (Ortea *et al.*, 2004).

3.2.4 Synthèse des caractéristiques des méthodes de détection des cyanotoxines

Dans l'objectif d'évaluer les méthodes à utiliser pour la quantification des cyanotoxines, le Tableau 6 présente une synthèse des méthodes de détection des cyanotoxines.

Tableau 6 : Synthèse des caractéristiques des méthodes de détection des cyanotoxines

Méthode	Substance analysée	Limite de Détection*	Avantages	Inconvénients
ELISA	Microcystines; Saxitoxine;	0,5 µg/L	Peu d'expertise requis; Hautement spécifique.	Sous-estimation possible; Variantes non-toxiques détectées, Faux négatifs
Bioessais sur souris	Toutes substances toxiques	1 à 200 µg	Simple	Non sélectif; Peu éthique; Peu sensible
PPIA	Hépatotoxines	0,3 µg/L	Peu d'expertise requis; Peu coûteux; Mesure direct de toxicité	Interférences possibles; pas d'identification des toxines individuelles.
Test AChE	Anatoxine-a(s)	N.D	Mesure direct de toxicité	Interférences possibles; Non spécifique
Test neuroblastomes	Saxitoxines	N.D	Sensibilité élevée	Interférences possibles.
LC-UV	Microcystines; Nodularine; Anatoxine-a	0,02 µg/L	Expertise modeste requis; Très précis	Étalons requis; Surestimation possible.
LC-MS	Microcystines; Nodularine; Anatoxine-a; Saxitoxine	0,02 µg/L	Expertise modeste requis	Équipement coûteux; Étalons requis
LC-MS/MS	Microcystines; Cylindrospermopsine	0,02 µg/L	Spécifique; Sans préparation.	Équipement coûteux; Étalons requis

* les limites de détection peuvent varier selon le matériel employé

4 Synthèse et recommandations

La présence des cyanobactéries constitue une menace qui n'est pas près d'être enrayée. Pour prendre des mesures de protection du public, la détection de ces microorganismes nuisibles est nécessaire. Les méthodes de détection utilisées actuellement ne sont pas accessibles aux gestionnaires de l'eau notamment les municipalités, les associations de protection des lacs et les propriétaires riverains. La recherche de méthodes simples, rapides et peu coûteuses a pour objectif de permettre à la population de s'impliquer dans la surveillance de la qualité de l'eau et d'obtenir des informations sur les cyanobactéries à moindre coût. Ainsi, il serait possible d'effectuer certaines analyses afin d'avoir une idée rapide du risque associé à l'utilisation de l'eau et d'envoyer seulement les échantillons qui contiennent ou qui sont susceptibles de contenir des toxines pour la confirmation des résultats par des laboratoires accrédités pour ce genre d'analyses (ex : le CEAEQ).

4.1 Mesure de la quantité de cyanobactéries

Cette étape consiste à identifier les cyanobactéries présentes et à les quantifier. Il est important de connaître les genres cyanobactériens présents pour pouvoir ensuite sélectionner la ou les méthodes de détection des cyanotoxines appropriées. Par exemple, en présence du genre *Microcystis*, il faut choisir une méthode qui détecte les microcystines (Tableau 3). L'identification des cyanobactéries est généralement faite au microscope. Il n'est pas nécessaire d'identifier les cyanobactéries au niveau de l'espèce, le genre suffit habituellement (Lawton *et al.*, 1999). Pour la quantification des cyanobactéries, le comptage au microscope, les tests génétiques, la fluorimétrie, la DFES, la HPLC-programme Chemtax ainsi que l'utilisation d'images satellites ou aéroportées peuvent être utilisées.

Le Tableau 7 présente une évaluation sommaire des méthodes de détection des cyanobactéries. Les notes sont attribuées comme suit :

- 1 : très bien
- 2 : correct
- 3 : problématique

La somme la plus basse correspond donc à la méthode ayant la meilleure évaluation.

Tableau 7 : Évaluation sommaire des méthodes de détection des cyanobactéries

Méthodes de détection	Critères					Somme
	Simplicité	Rapidité	Coût	Sensibilité	Fiabilité	
Microscopie	3	2	1	1	2	9
PCR	2	2	2	1	3	10
Fluorimétrie	1	1	1	1	2	6
DFES	1	1	1	1	2	6
HPLC-programme Chemtax	3	1	3	1	1	9
Téledétection	2	3	2	3	2	12

La microscopie présente certains avantages par rapport aux autres méthodes. Le matériel nécessaire n'est pas très dispendieux, la méthode est largement utilisée et elle permet

d'identifier les espèces ou les genres de cyanobactéries présents. Cependant, la méthode nécessite de bonnes connaissances taxonomiques afin d'effectuer correctement l'identification et le comptage et n'est donc pas accessible aux néophytes. De plus, le comptage est sujet à un biais inter-laboratoire important et les erreurs méthodologiques sont fréquentes. La microscopie n'est donc pas très indiquée pour un suivi à grande échelle des cyanobactéries où plusieurs gestionnaires de l'eau effectueraient les analyses. Il serait alors difficile de comparer les résultats d'un laboratoire à un autre. Par contre, il est pertinent d'effectuer des analyses auprès du MDDEP lors d'épisodes de fleurs d'eau afin de connaître les genres de cyanobactéries présents dans le plan d'eau étudié.

Les tests génétiques appliqués à la détection des cyanobactéries sont en pleine émergence et doivent donc être validés avant d'être utilisés. La fiabilité de ces tests est encore à déterminer et ils ne sont actuellement pas disponibles sur le marché sous forme de trousse facilement utilisables (Litaker et Tester, 2002).

Pour une quantification rapide des cyanobactéries, les méthodes de détection par fluorimétrie (fluorimétrie ou DFES) sont probablement les plus appropriées. Utilisant le principe de la fluorescence, plusieurs sondes sont disponibles sur le marché. Ces sondes sont faciles d'utilisation, sont relativement peu dispendieuses et sont sensibles à de faibles quantités de cyanobactéries (Gregor *et al.*, 2007). De plus, l'appareil peut être utilisé directement sur le site et donne des résultats rapidement. L'utilisation d'un fluorimètre peut facilement être intégrée à la procédure de détection. Selon la sonde utilisée, il peut être possible d'effectuer des lectures ponctuelles, mais également des lectures en continue et la cartographie horizontale et verticale d'un plan d'eau. Les compagnies YSI, AquaMS et Turner Design offrent des fluorimètres à des prix variant de 1000\$ à 30 000\$ (Annexe 2). Notons que le CEAEQ effectue des analyses sur la validation d'une telle sonde afin d'améliorer la procédure de détection des cyanobactéries. En effet, Ellis (2008) considère que le suivi de la concentration de phycocyanine par fluorimétrie *in vivo* constitue l'alternative la plus adéquate au comptage au microscope.

L'utilisation de la LC et du programme Chemtax nécessite l'achat d'appareils très dispendieux donc inaccessibles à la plupart des gestionnaires de l'eau. De plus, l'utilisation de cette méthode nécessite la présence de personnel qualifié (Schlüter et Møhlenberg, 2003).

L'utilisation d'images satellites et aéroportées est plus appropriée pour la détection des cyanobactéries sur de grandes étendues d'eau. La méthode ne permet pas d'obtenir des résultats dans un court laps de temps et sa sensibilité est très faible. Par contre, lorsque le territoire à couvrir est très vaste, la télédétection peut constituer un outil efficace de détection (Kutser *et al.*, 2006).

4.2 Mesure de la quantité de cyanotoxines

Lorsque les résultats de la mesure de l'abondance des cyanobactéries indique la possibilité qu'il y ait présence de toxines, il faut les quantifier. Le Tableau 8 présente les méthodes pouvant être utilisées selon les toxines potentiellement présentes. Notons que les microcystines sont certainement les toxines les plus communes en eau douce (Svcrek et Smith, 2004) et les méthodes choisies devraient être en mesure de les détecter.

Tableau 8 : Cyanotoxines et méthodes de détection possibles

Cyanotoxines	ELISA	Bioessai	PPIA	Test à l'AChE	Tests cellulaires sur neuroblastomes	LC-UV	LC-MS et MS/MS
Microcystines et nodularines	X	X	X			X	X
Anatoxine-a	X	X				X	X
Anatoxine-a(S)		X		X			X
Saxitoxines	X	X			X		X
Cylindrospermopsine		X				X	X

Selon Robillot et Hennion (2001), la détection des cyanotoxines devrait se faire en deux étapes. Dans la première étape, les tests biologiques permettent d'effectuer un examen simple et rapide. Dans la deuxième étape, lorsque les résultats des analyses précédentes indiquent la présence possible de cyanobactéries et de cyanotoxines, une validation devrait être effectuée à l'aide d'analyses en chimie analytique (LC-UV, MS, MS/MS).

Le Tableau 9 présente une évaluation sommaire des différentes méthodes de quantification des cyanotoxines. Les notes sont attribuées de la même manière qu'au Tableau 7.

Tableau 9 : Évaluation sommaire des méthodes de détection des cyanotoxines

Méthodes de détection	Critères					Somme
	Simplicité	Rapidité	Coût	Sensibilité	Fiabilité	
ELISA	1	1	2	1	2	7
Bioessais sur souris	2	3	1	3	3	12
PPIA	1	1	2	1	2	7
Test AChE	1	2	1	1	2	7
Test sur neuroblastome	1	2	3	1	2	9
LC-UV	3	2	3	1	1	10
LC-MS	3	2	3	1	1	10
LC-MS/MS	3	2	3	1	1	10

Les bioessais ne sont pas recommandés en raison de leur faible spécificité et de leur faible sensibilité. De plus, le choix des souris, animal largement utilisé dans les analyses de toxicité des cyanobactéries, soulève bien des questions éthiques (Sangolkar *et al.*, 2006). Les tests de toxicité comme le PPIA, le test à l'AChE et le test sur neuroblastomes sont très sensibles et détectent la concentration des toxines sous les valeurs de concentration acceptables permettant la détection de celles-ci avant que leur concentration ne devienne une menace à la santé. Leur capacité à mesurer directement la toxicité de l'échantillon et à détecter un groupe de cyanotoxines (ex : hépatotoxines) plutôt qu'une variante particulière en font de bons outils de surveillance (Robillot et Hennion, 2001). Cependant, ces tests ne sont pas disponibles sur le marché et leur utilisation nécessite donc la collaboration d'un laboratoire spécialisé.

Selon l'évaluation des différentes méthodes (Tableau 7 et Tableau 9), les tests ELISA représentent la méthode la plus adéquate offerte aux gestionnaires de l'eau pour quantifier les cyanotoxines. Les tests ELISA reconnaissent plus spécifiquement une ou quelques variantes des toxines selon les anticorps utilisés. Pour surveiller la qualité de l'eau, il est préférable d'utiliser des anticorps capables de reconnaître plusieurs variantes de toxine afin d'évaluer le risque dans son ensemble. Les tests ELISA ont l'avantage d'être disponibles sur le marché (annexe 2) sous forme de trousse et l'analyse peut être effectuée sur place ou en laboratoire selon la trousse choisie. Ils sont simples, rapides d'utilisation et sensibles à de faibles quantités de toxine. Il faut toutefois connaître la limite de détection des anticorps utilisés

(Sangolkar *et al.*, 2006). Notons que Hawkins *et al.* (2005) ont classé les tests ELISA parmi les meilleures méthodes de détection des cyanotoxines.

Les tests biologiques sont plus rapides et plus simples à mettre en œuvre que les méthodes chimiques. Il est toutefois préférable de valider les résultats à l'aide de tests chimiques. Ces derniers sont également utiles pour mieux comprendre la production de cyanotoxines, les facteurs environnementaux influençant cette production, le développement des toxines dans l'environnement ainsi que l'abondance des différentes formes de toxines dans les milieux étudiés (Robillot et Hennion, 2001). Il est donc conseillé, dans une deuxième étape, d'analyser les échantillons qui donnent des résultats positifs avec les méthodes chimioanalytiques (LC-UV, MS, MS/MS) pour valider les résultats obtenus. La fiabilité de ces méthodes de détection est comparable, mais l'utilisation d'un détecteur en spectrométrie de masse est conseillée. Cela permet de quantifier avec exactitude la concentration des toxines et de comparer ces concentrations avec les valeurs recommandées par l'OMS ou Santé Canada. Notons que la détection des cyanotoxines devrait tenir compte de la quantité totale de toxine en terme d'équivalent de microcystine-LR pour les hépatotoxines (Sangolkar *et al.*, 2006).

En terminant, l'élaboration d'une procédure de détection des cyanobactéries doit nécessairement inclure la validation par un laboratoire accrédité (ex : CEAEQ). Cette procédure devrait au moins inclure une méthode de détection des cyanobactéries. Selon les informations amassées dans ce chapitre, la fluorimétrie constitue une méthode adéquate pour la mesure des cyanobactéries. Ellis (2008) suggère d'utiliser la fluorimétrie comme une méthode semi-quantitative plutôt que quantitative. Pour la quantification des cyanotoxines, les tests ELISA, constituent une méthode de choix. Il est certain que l'utilisation de ces méthodes comporte certains désavantages et elles ne sont peut-être pas aussi fiables que les méthodes de référence. Néanmoins, il faut tenir compte de l'accessibilité et de l'applicabilité dans le choix des méthodes de détection afin de permettre aux gestionnaires de l'eau d'effectuer certaines analyses préliminaires à l'envoi d'échantillons à un laboratoire accrédité.

Chapitre 2 : Sélection d'une trousse commerciale d'immunoessai (ELISA) pour la quantification des microcystines

Sommaire du chapitre 2 :

Le chapitre précédent a mis en lumière une méthode qui s'avère fort intéressante pour la détection des cyanotoxines et qui se veut rapide, accessible et peu coûteuse : les immunoessais (ELISA). Puisque ceux-ci sont disponibles sur le marché sous plusieurs formes et chez plusieurs fabricants, quatre trousse commerciales de type ELISA ont été évaluées selon 14 critères de gestion, d'utilisation et d'analyse. Les tests en microplaques des compagnies Abraxis et Envirologix ainsi que les tests en éprouvette de ces deux mêmes compagnies ont ainsi été comparés en évaluant les résultats d'analyses sur des échantillons d'eau de surface. Les tests en microplaques d'Abraxis ont obtenu la meilleure note. La trousse a été sélectionnée comme étant la plus fiable et la plus ergonomique. Sa sensibilité élevée, le nombre élevé de variantes de microcystines détectées ainsi que la grande gamme de concentrations détectées par cette trousse ont également fait de celle-ci l'outil le plus adéquat pour la quantification des microcystines parmi les trousse étudiées.

5 Introduction

Le chapitre précédent a mis en lumière deux méthodes qui s'avèrent fort intéressantes pour la détection rapide, accessible et peu coûteuse des cyanobactéries et des cyanotoxines: la fluorimétrie et les immunoessais (ELISA). Rappelons que la première sert à quantifier les cyanobactéries; les seconds, les cyanotoxines. Les deux types d'outils nécessaires à leur application, le fluorimètre et les trousseaux ÉLISA, sont offerts sur le marché par différents fabricants.

Le présent chapitre a trait à la performance de quatre trousseaux commerciaux ELISA dans la quantification des microcystines. Le but visé est de voir laquelle, en raison de son efficacité à évaluer rapidement la concentration des microcystines, devrait être intégrée à une procédure alternative de détection des cyanobactéries et des cyanotoxines.

Il faut préciser ici que la discrimination entre les fluorimètres vendus sur le marché ne saurait être traitée dans la présente étude. C'est que leur achat aurait nécessité des déboursés trop importants pour les moyens disponibles. Le sujet pourrait aisément faire l'objet de recherches ultérieures. L'idée est lancée, à tout le moins.

Les sections qui suivent porteront successivement sur les caractéristiques générales que présentent chacune des quatre trousseaux ELISA évaluées, sur la méthodologie employée pour effectuer la comparaison entre les trousseaux et sur les résultats auxquels elle a mené. S'ensuivra une discussion sur les résultats obtenus et sur les conclusions qu'il est permis d'en tirer.

5.1 Caractéristiques générales des tests ELISA

Les tests ELISA se fondent sur la reconnaissance antigène-anticorps, l'antigène étant la toxine. Voyons ici que les microcystines sont les toxines les plus communes en eau douce (Svcrek et Smith, 2004). Les méthodes choisies pour les quantifier devraient forcément être en mesure de les détecter, peu importe la variante. La mesure de la concentration des microcystines s'exprime généralement en équivalent de microcystine-LR (Svcrek et Smith, 2004).

Avant que soient abordées les caractéristiques des trousse ELISA comme telles, il semble opportun de présenter ici les seuils de concentration de microcystines acceptables pour l'utilisation de l'eau à des fins de consommation et de récréation. Le Tableau 10 reproduit les seuils établis au Québec par le Groupe scientifique sur l'eau (2005).

Tableau 10 : Recommandations relatives à la concentration de microcystines maximale acceptable au Québec selon l'utilisation de l'eau (Groupe scientifique sur l'eau, 2005)

	Recommandations
Eau de consommation	1,5 µg/L d'équivalent microcystine-LR
Eau de baignade	16 µg/L d'équivalent microcystine-LR

Les tests ELISA utilisent des anticorps polyclonaux ou monoclonaux afin de quantifier les toxines (Mehto et *al.*, 2001). Les anticorps polyclonaux ont été mis au point dans une perspective de commercialisation. Ils permettent de détecter une large gamme de variantes de microcystines. Cette caractéristique est essentielle puisqu'il existe plus de 80 variantes moléculaires des microcystines (Svcrek et Smith, 2004). Elle est d'autant plus intéressante que l'objectif visé dans la présente recherche est d'évaluer la présence des microcystines au moyen d'un outil rapide qui puisse reconnaître un grand nombre de leurs variantes.

Selon Lavoie et *al.* (2007), les tests ELISA devraient être utilisés comme outil de détection précoce et les résultats devraient être validés à l'aide de méthodes plus robustes comme la chromatographie liquide suivie d'une détection par spectrométrie de masse. Les tests ELISA permettent à tout le moins d'effectuer une quantification préliminaire des microcystines et de déterminer quels échantillons devront être soumis à des analyses plus complètes.

D'après Ellis (2008), les résultats obtenus au moyen des tests ELISA sont fiables. Les résultats qu'ils ont produit ont été comparés avec ceux obtenus au Centre d'Analyse en Environnement du Québec (CEAEQ). Il faut voir qu'aucun faux positif ni faux négatif n'ont été observés. Mais encore, les performances des tests ELISA soutenaient bien la comparaison avec les autres; les résultats obtenus avec ELISA étaient égaux ou supérieurs à ceux-ci en termes de concentration en microcystines.

Ces résultats supposent qu'ils constituent un bon outil pour une détection rapide des microcystines, puisqu'ils permettent de les détecter dans tous les cas où elles sont présentes.

Notons que des résultats semblables ont été obtenus lors d'une étude effectuée par l'équipe de l'Observatoire de l'environnement et du développement durable (OEDD) (équipe composée d'Estelle Baurès, de Guillaume Junqua et de l'auteur du présent mémoire, tous sous la supervision d'Olivier Thomas) en collaboration avec la Direction régionale de l'Estrie du ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs (MDDEP). Par contre, le nombre d'échantillons analysés, qui était insuffisant, n'a pas permis de tirer des conclusions solides à ce sujet (Thomas, 2007).

Selon Harada et *al.* (1999), l'utilisation des tests ELISA représente la méthode la plus prometteuse pour la détection rapide des microcystines en raison de leur grande sensibilité, spécificité et facilité d'utilisation.

6 Méthodologie

6.1 Localisation et fréquence d'échantillonnage

À des fins de comparaison, des échantillons d'eau de surface provenant de 11 stations ont été analysés à l'aide des quatre trousseles ELISA choisies. Cette étude a débuté la semaine 25 (soit celle du 18 au 22 juin 2007) pour s'achever la semaine 29 (c'est-à-dire celle du 16 au 20 juillet de la même année). Les prélèvements ont été effectués à raison d'un échantillonnage par semaine.

Le Tableau 11 indique l'emplacement des stations d'échantillonnage.

Tableau 11 : Emplacement des stations d'échantillonnage pour la phase de comparaison des trousses

Code de la station	Lacs échantillonnés	Municipalité	Emplacement
ARG	Lac d'Argent	Eastman	Terrain privé, anonyme
BOI	Lac Boissonneault	Saint-Claude	Baie Nord, 8 ^e rang
BPN	Petit lac Brompton	Saint-Denis-de-Brompton	Descente de bateau municipale
BRO	Lac Brome	Ville de Lac-Brome	Plage Douglas
BRM	Lac Brome	Ville de Lac-Brome	Ruisseau Tiffany
MAC	Lac Massawippi	Ayer's Cliff	Halte touristique
MEM	Lac Memphrémagog	Magog	Plage publique rue Cabana
MNH	Lac Massawippi	North Hatley	Descente de bateau
PAR	Lac Parker	Eastman	Parc Marc-Aurèle
PSF	Petit lac Saint-François	Saint-François-Xavier-de-Brompton	Parc municipal
WAT	Lac Waterloo	Ville de Waterloo	Plage municipale

6.2 Échantillonnage

Les prélèvements ont été effectués à chaque station de façon ponctuelle dans les 30 premiers centimètres de la colonne d'eau. Les échantillonnages ont été faits à la main et ont respecté les exigences du *Guide d'échantillonnage* du MDDEP (2008b). Les flacons utilisés étaient en verre brun et les bouchons étaient doublés de papier d'aluminium, afin d'éviter des problèmes d'adsorption des microcystines sur des parties organiques (par exemple, sur la partie du couvercle faite de plastique) (Bolduc, 2007).

Le transport des échantillons vers le laboratoire s'est fait dans la journée même, et ce, le plus rapidement possible. Les flacons étaient conservés à basse température dans une glacière. Dès leur arrivée au laboratoire de géologie de l'Université de Sherbrooke, ils étaient placés dans un congélateur à -20°C.

Après son arrivée au laboratoire, l'échantillon est homogénéisé par inversion, puis de 5 à 10 mL environ sont versés dans un petit flacon de verre. Celui-ci est ensuite congelé à -20°C, puis décongelé 5 minutes à la température ambiante avant d'être plongé dans l'eau chaude à 35°C environ pendant au moins 10 minutes. L'opération est effectuée trois fois.

Il est primordial d'utiliser des flacons de verre résistants pour éviter l'éclatement une fois déposés dans le congélateur et d'ajouter du papier d'aluminium sur le dessus pour éviter tout contact de l'échantillon avec le bouchon de plastique. Ce qui reste de l'échantillon est également mis au congélateur pour être conservé. Comme les analyses se font toutes sur ce même échantillon, quel que soit le test utilisé, aucune différence quant à la fiabilité de la méthodologie n'est à noter pour les deux premières étapes que sont le prélèvement et la congélation.

Afin de déterminer la concentration totale en cyanotoxines d'un échantillon, il est nécessaire de provoquer une lyse des cyanobactéries présentes (Loftin *et al.*, 2008). La procédure choisie comporte trois phases de congélation à -20°C et décongélation de l'échantillon (Loftin *et al.*, 2008). Elle est décrite dans l'annexe 3.

6.3 Estimation de la concentration de microcystines au moyen des tests ELISA

Les quatre troussees retenues sont les microplaques et les tests en éprouvettes de la compagnie Abraxis (Abraxis Inc., Warminster, États-Unis) et ceux de la compagnie Envirologix (Envirologix Inc., Portland, États-Unis).

Les détails de chacune des troussees sont présentés ci-dessous :

Microplaques Abraxis

- nom du produit : Microcystins-ADDA ELISA Microtiter Plate
- numéro de catalogue : 5220011
- nombre de puits/épipettes : 96 puits
- gamme de concentrations détectées : 0,15 à 5 µg/L
- 5 solutions étalon : 0,15; 0,4; 1,0; 2,0; 5,0 µg/L et solution contrôle de 0,75 µg/L
- utilisation : laboratoire

Éprouvettes Abraxis

- nom du produit : Microcystin Tub Kit
- numéro de catalogue : 520012
- nombre de puits/éprouvettes : 40 éprouvettes
- gamme de concentrations détectées : 0,15 à 5 µg/L
- 5 solutions étalon : 0,15; 0,4; 1,0; 2,0; 5,0 µg/L et solution contrôle de 0,75 µg/L
- utilisation : laboratoire

Microplaques Envirologix

- nom du produit : QuantiPlate Kit for Microcystins
- numéro de catalogue : EP 022
- nombre de puits/éprouvettes : 96 puits
- gamme de concentrations détectées : 0,16 à 2,5 µg/L
- 3 solutions étalon : 0,16; 0,6; 2,5 µg/L
- utilisation : laboratoire

Éprouvettes Envirologix

- nom du produit : QuantiTube Kit for Microcystins
- numéro de catalogue : ET 039
- nombre de puits/éprouvettes : 40 éprouvettes
- gamme de concentrations détectées : 0,4 à 2,5 µg/L
- 3 solution étalons : 0,4; 1,0; 2,5 µg/L
- utilisation : terrain et laboratoire

Les modes opératoires de chacune de ces trousse sont présentés en annexe 4.

Soulignons ici que les prix, les limites de détection et de quantification, les différentes variantes de microcystines détectées (voir section 1.2.1) et la réactivité vis-à-vis chaque variante sont présentés dans la section 7.3 du présent chapitre. Mentionnons également que ces tests ont été comparés à l'aide d'une grille d'évaluation constituée de 14 critères (voir à ce sujet les sections 7 et 8).

La Figure 10 présente les principales étapes du mode opératoire général de ces tests ELISA.

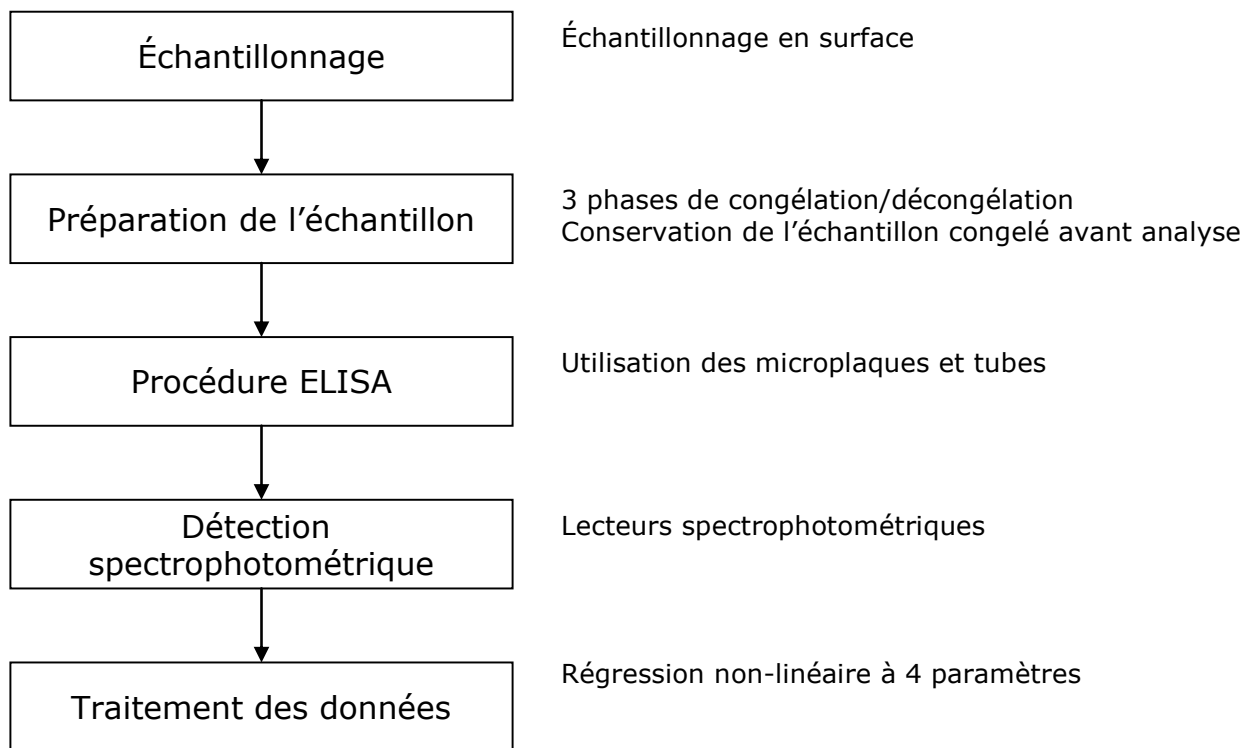


Figure 10. Principales étapes du mode opératoire des tests ELISA

L'application des procédures ELISA respecte les consignes et le mode opératoire fournis avec le mode d'emploi des différentes trousse, lesquelles suivent les mêmes grandes étapes que celles qui apparaissent dans le schéma ci-dessus. Les tests en microplaques sont effectués en triplicats et les tests en éprouvettes le sont en duplicats.

La lecture des microplaques a été faite avec un lecteur Starfax 303 PLUS Microstrip Reader (Awareness Technology Inc., Palm City, Etats-Unis) en mode Absorbance à 450 nm avec une longueur d'onde différentielle de 630 nm et un lecteur d'éprouvettes spectrophotométriques. Celle des éprouvettes a été effectuée avec un lecteur d'éprouvette Smart Spectro 2000 spectrophotometer (LaMotte Inc., Chestertown, Etats-Unis) en mode absorbance à 450 nm. Le traitement des données a été effectué selon la régression non linéaire dite « à 4 paramètres », méthode décrite par Sasaki et Mitchell (2003). Cette méthode tient compte des 4 paramètres suivants : la pente de la courbe standard, la concentration inhibitrice à 50% de concentration

(Cl_{50}) ainsi que les valeurs de concentration maximale et minimale prédite. Elle est utilisée lorsque le taux d'absorbance varie en fonction de la concentration (voir annexe 7).

6.4 Évaluation des trousse

Pour effectuer une comparaison entre les trousse ELISA qui soit complète et pour déterminer laquelle est la meilleure dans l'évaluation de la concentration des microcystines dans des échantillons d'eau de surface, trois types de critères ont été retenus. Ils concernent respectivement la gestion du matériel (5), son utilisation (5) et la valeur des analyses (4). Ils ont été choisis à partir de l'étude de Gagnon (2007) et de la propre expérience de l'équipe de l'OEDD. Ils sont présentés succinctement dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Présentation des critères retenus

Critères de gestion	Critères d'utilisation	Critères d'analyse
Coût d'acquisition	Facilité d'utilisation	Sensibilité (LD, LQ)
Coût d'exploitation	Fiabilité	Critères qualitatifs
Durabilité	Vitesse	Critères quantitatifs
Pertinence de l'indicateur	Robustesse	Fiabilité de la méthodologie
Aide à la décision	Maintenance	

Ces paramètres sont expliqués en détail dans la section 7 du présent chapitre.

C'est à partir d'une grille d'évaluation comportant ces 14 critères (elle est présentée à la section 8) que s'est effectuée la comparaison entre les trousse et la sélection de l'une d'entre elles. Elle a été choisie pour être utilisée comme un outil d'aide à la décision.

Chaque critère a une pondération relative allant de 1 à 3; 1 étant un critère de moindre importance et 3, celui qui a la plus grande importance. Par la suite, chacune des trousse a reçu une note de 1 à 3 en fonction de chaque critère; 1 étant la note la plus faible et 3 la plus forte. Chacune des notes a été multipliée par la pondération relative de chaque critère et le total des points a été comptabilisé pour chaque trousse. La trousse ayant obtenu la plus haute note a été considérée comme la plus adéquate pour être intégrée à une procédure alternative de détection des cyanobactéries et des cyanotoxines.

7 Résultats de la comparaison entre les trousse

7.1 Critères de gestion

Les critères de gestion intéressent plus particulièrement le service responsable du matériel, de l'exploitation et de la diffusion des résultats. Le coût d'acquisition du matériel de laboratoire, le coût d'exploitation des trousse, la durabilité de l'appareillage, la pertinence des résultats obtenus et leur capacité d'aider à une prise de décision éclairée font partie des critères de gestion.

7.1.1 Coût d'acquisition

Les coûts d'acquisition correspondent au coût du matériel de laboratoire nécessaire à l'analyse et réutilisable. Dans le présent cas, il s'agit du coût d'un lecteur de microplaques spectrophotométrique (StatFox 303 Plus d'Awareness Technology Inc), celui d'un lecteur d'éprouvettes spectrophotométrique (Smart Spectro 2000 spectrophotometer de LaMotte Inc), celui des micropipettes et du matériel courant de laboratoire.

Le Tableau 13 présente leur coût d'achat respectif.

Tableau 13 : Coût d'acquisition du matériel réutilisable

Prix : \$ CAN*	Réfrigérateur Congélateur	Flacons de congélation décongélation	Micropipettes	Verrerie**	Lecteurs spectrophotométriques	Total
Tests en microplaques	250	85	532	300	2766	3937
Tests en éprouvettes	250	85	372	300	2200 (avec batterie)	3207

*Prix indiqué dans le catalogue, en dollars canadiens, hors taxes

** Verrerie de laboratoire : fioles jaugées 500 mL, fioles jaugées 10 mL

Le coût d'investissement est considéré comme similaire en ce qui concerne les microplaques d'Abraxis et d'Envirologix, d'une part, et les éprouvettes d'Abraxis et d'Envirologix, d'autre part. Les tests en microplaques nécessitent un investissement plus élevé que les tests en éprouvettes. Cependant, pour les deux tests, l'investissement total est inférieur à 5 000 \$CAN, ce qui est un prix très compétitif par rapport aux autres types de test (Tableau 19). Ce critère

étant d'importance moyenne (pondération 2), la note des tests en éprouvettes est de 4 et celle des microplaques de 6. La section 8 de ce chapitre présente une analyse comparative des trousse.

7.1.2 Coûts d'exploitation

Les coûts d'exploitation correspondent aux coûts :

- des trousse d'analyse, qui comprennent les réactifs, les microplaques ou les éprouvettes;
- des consommables : embouts à pipette, gants jetables, papier essuie-tout, électricité, eau, eau ultra pure, etc (ils apparaissent dans la colonne *Divers* du Tableau 14);
- de la main-d'œuvre nécessaire à la réalisation des analyses (Tableau 14) :

Tableau 14 : Coûts d'exploitation pour les différents tests ELISA

Prix : \$ CAN	Main d'œuvre*	Trousse	Divers**	Total
Test en microplaques Abraxis	68	500 5/puit	85	653 7/puit
Test en microplaques Envirologix	53	475 5/puit	81	624 7/puit
Test en éprouvettes Abraxis	45	450 11/épreuve	74	569 14/épreuve
Test en éprouvettes Envirologix	45	425 11/épreuve	70	540 14/épreuve

*Calculé en considérant une analyse en triplicata pour les microplaques et en duplicata pour les éprouvettes

**Calculée selon l'hypothèse que ce coût est égal à 15 % du coût de la main d'œuvre et de la trousse (Thomas, 2007)

Le coût de la main d'œuvre est calculé selon un taux horaire de 15 \$. Le temps nécessaire pour effectuer un test en microplaques d'Abraxis est d'environ quatre heures trente minutes; pour les tests en microplaques d'Envirologix, il est de trois heures trente minutes ; et pour les tests en éprouvettes d'Abraxis et d'Envirologix, de trois heures.

Au total, les tests en microplaques coûtent 50 \$ de plus que les tests en éprouvettes. Cependant, il faut considérer que chaque test en microplaques contient 96 puits contre 40 pour ce qui est des tests en éprouvettes. Les tests en microplaques permettent donc un plus grand nombre d'analyses que les tests en éprouvettes. Pour cette raison, les tests en

éprouvettes ne sont pas adéquats pour effectuer des analyses en triplicata. Étant donné que les analyses en triplicata sont beaucoup plus sûres et plus précises que les analyses en duplicata, l'utilisation des tests en microplaques est recommandée. En outre, elle est plus économique. Même si les coûts d'exploitation totaux des microplaques sont supérieurs, il reste tout de même plus avantageux de les utiliser, le nombre d'analyses possibles étant plus élevé. La pondération de ce critère est de 3 (haute importance), la note donnée aux microplaques est de 9 et de 6 pour les tests en éprouvettes.

7.1.3 Durabilité de l'appareillage

La durabilité de l'appareillage correspond à sa durée de vie dans des conditions normales d'opération. Comme il n'existe aucune donnée relative à cette durabilité, il s'avère impossible de différencier les deux appareillages retenus (lecteur à microplaques vs lecteur à éprouvettes). Toutefois, le lecteur utilisé pour faire les tests en éprouvettes étant un appareil portatif, il est considéré comme étant plus résistant que le lecteur de microplaques. La pondération de ce critère étant de 1 (faible importance), les notes sont de 1 pour les tests en microplaques et de 2 pour les tests en éprouvettes.

7.1.4 Pertinence du résultat

La pertinence de l'indicateur correspond à la pertinence de l'information que fournit le test. Les tests ELISA donnent une réponse en équivalent de microcystine-LR et permettent de détecter plusieurs composés de cette famille ainsi que la nodularine. Comme les normes de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) sont établies en fonction de la concentration en microcystine-LR, les tests ELISA sont pertinents. À ce propos, les quatre troussees choisies sont relativement équivalentes. La pondération de ce critère étant de 2 (importance moyenne), la note de tous les tests est de 4.

7.1.5 Aide à la décision

L'aide à la décision correspond à la facilité qu'a un test à fournir une information qui puisse supporter adéquatement la prise de décision. Le gouvernement du Québec et l'OMS ont établi des seuils acceptables pour la baignade et pour la consommation de l'eau en fonction des concentrations en microcystine-LR (Tableau 10). Les quatre tests ELISA permettent de quantifier les microcystines et de déterminer si l'eau est propre ou non à la consommation ou à

la baignade. Les collectivités peuvent donc prendre les mesures nécessaires en tenant compte des résultats qu'ils fournissent. La pondération de ce critère est de 3 (haute importance) et les quatre tests s'équivalent avec une note de 6.

7.2 Critères d'utilisation

Afin de permettre aux gestionnaires de l'eau de s'impliquer convenablement dans la surveillance des cyanobactéries et des cyanotoxines, il est important de déterminer quelle(s) trousse(s) sont les plus susceptibles d'être correctement manipulées et utilisées par ceux-ci. Les trousse(s) ont donc été évaluées selon les caractéristiques liées à leur utilisation. Cette évaluation tient compte de la facilité d'utilisation de l'appareillage, de sa fiabilité, du délai de réponse qu'il nécessite, de sa robustesse et de son entretien. Une trousse dont le mode d'emploi s'avère complexe, sinon compliqué, risque de décourager plus d'un gestionnaire. Pis encore, une trousse mal utilisée peut induire une erreur dans les résultats.

7.2.1 Facilité d'utilisation

La facilité d'utilisation d'une trousse correspond à la facilité qu'elle offre à l'utilisateur de s'en servir adéquatement.

Les tests en microplaques ne peuvent se réaliser qu'en laboratoire. L'utilisation d'une micropipette multicanaux permet cependant de simplifier les opérations. La lecture spectrophotométrique est simple et automatisée. Les tests en microplaques Abraxis sont plus faciles à utiliser que les tests en microplaques d'Envirologix notamment en raison du grand volume de réactif qui doit être mis dans les puits des microplaques Envirologix (annexe 3). L'embout de la pipette est plus susceptible de toucher aux réactifs du puit, et cela a pour conséquence d'augmenter le risque de contamination d'un puit à l'autre lors du pipetage. De plus, la viscosité de certains réactifs de la compagnie Envirologix rend plus difficile leur manipulation (formation de bulles).

Les tests en éprouvettes sont simples à utiliser. La lecture spectrophotométrique se fait manuellement : l'absorbance de chaque éprouvette est mesurée trois fois, en tournant l'éprouvette d'un tiers de tour chaque fois, afin de moyenniser l'erreur due aux hétérogénéités possibles de l'éprouvette. Les éprouvettes d'Envirologix sont légèrement plus faciles à employer que celles d'Abraxis puisque moins d'étalon est utilisé. De plus, les tests en

éprouvettes d'Envirologix contiennent plus de réactifs que ceux d'Abraxis, minimisant les risques de tomber à court de réactif surtout lorsque la même trousse est utilisée pour deux analyses distinctes.

La pondération de ce critère étant de 2 (importance moyenne), les notes sont de 4 pour les microplaques d'Envirologix et les éprouvettes d'Abraxis et de 6 pour les microplaques d'Abraxis et les éprouvettes Envirologix.

7.2.2 Fiabilité

La fiabilité correspond à la crédibilité des résultats obtenus selon la conception du test dans des conditions normales d'utilisation. Plusieurs indices permettent d'évaluer ce critère.

- Premièrement, les tests en microplaques permettent d'obtenir des résultats en triplicata contrairement aux tests en éprouvettes qui sont conçus pour un test en simplicat. Cet avantage des microplaques réduit considérablement l'écart type des résultats. Les éprouvettes présentent aussi de légères rayures pouvant rendre la mesure incertaine, cela malgré une lecture en trois points.
- Deuxièmement, la compagnie Abraxis fournit un échantillon « contrôle » d'une concentration connue dans ses trousse. Ce contrôle permet de vérifier si l'analyse est valide ou si elle doit être rejetée. La compagnie Envirologix n'en propose pas.
- Troisièmement, selon la fiche technique fournie par Abraxis, le coefficient de variation (écart-type sur la moyenne exprimé en pourcentage) des solutions étalons ne devrait pas dépasser 10 % et celui des échantillons 15 %. Envirologix ne donnant aucune information équivalente, les résultats obtenus avec les quatre trousse ont été analysés à l'aide de ces « valeurs repères ». Le

présente le nombre de dépassements (coefficient de variations > 15 % pour les échantillons ou 10 % pour les solutions étalons) relativement aux quatre tests. Rappelons que 55 échantillons ont été analysés avec chaque trousse (11 stations pendant 5 semaines). Les valeurs des incertitudes et des dépassements pour les échantillons sont données dans l'annexe 5 avec les résultats. Remarquons que les éprouvettes Abraxis sont très pénalisées sur ce point.

- Quatrièmement, notons que pour des résultats plus fiables, les valeurs de concentration des échantillons doivent se retrouver entre 20 et 80 % de la courbe d'étalonnage, donc le plus près possible des valeurs centrales. La compagnie Abraxis fournit six solutions étalons couvrant une gamme de concentration plus étendue que les trois solutions étalons d'Envirologix.

Tableau 15 : Nombre de dépassements des valeurs limites des coefficients de variation

	Nombre de dépassements
Éprouvettes Envirologix	4
Microplaques Envirologix	4
Éprouvettes Abraxis	16
Microplaques Abraxis	4

La pondération de ce critère étant de 3 (haute importance), les notes sont de 9 pour les tests en microplaques Abraxis, de 6 pour les tests en microplaques Envirologix et de 3 pour les deux tests en éprouvettes.

7.2.3 Délai de réponse

Le délai de réponse correspond au temps nécessaire pour obtenir les résultats des analyses. L'étape la plus longue, commune aux quatre tests, est la procédure de congélation/décongélation des échantillons afin de provoquer la lyse des cellules. Cette opération dure environ une journée et demie. Par ailleurs, la mise en oeuvre des tests en microplaques est équivalente entre les tests Envirologix et Abraxis (environ quatre heures). La mise en oeuvre des tests en éprouvettes est similaire en durée pour les deux fabricants, mais elle est plus courte que pour celle des microplaques (environ deux heures trente).

La pondération de ce critère étant de 2 (importance moyenne), les notes sont de 4 pour les tests en microplaques et de 6 pour les tests en éprouvettes.

7.2.4 Robustesse

La robustesse dans le type de trousse analysées correspond à la possibilité d'obtenir des résultats sur le terrain ou en ligne en ayant des résultats fiables et en tenant compte du mode d'échantillonnage (en continu ou en prélèvement ponctuel). Les quatre tests concernés par

l'étude ont été mis en oeuvre dans des conditions de laboratoire. Cependant, leur transposition sur le terrain apparaît délicate pour plusieurs raisons :

- la préparation de l'échantillon, en particulier l'opération de lyse des cellules par congélation/décongélation, est longue et non transposable. Cependant, d'autres techniques plus rapides et utilisables sur le terrain pourraient être employées, telles que la lyse cellulaire à l'aide d'un micro-onde (méthode présentée aussi dans l'Annexe 3 avec celle de la congélation/décongélation).
- La durée de la mise en oeuvre des tests ELISA est difficilement compatible avec une analyse sur le terrain (elle est respectivement de quatre heures et de deux heures trente pour les tests en microplaques et les tests en éprouvettes). Ces analyses sont simples à mettre en oeuvre pour un technicien de laboratoire, mais elles requièrent du personnel formé pour la manipulation des micropipettes ou des appareillages.
- Par contre, l'exploitation des données est assez complexe et requiert des connaissances en chimie ou en biologie analytique afin de pouvoir exploiter des courbes d'étalonnage et de vérifier la fiabilité des résultats obtenus. Toutefois, les tests en éprouvettes pourraient être éventuellement transposés sur le terrain pour des applications qualitatives, car Abraxis et Enviroligix proposent des troussees adaptées.

La pondération de ce critère étant de 2 (importance moyenne), les notes sont de 2 pour les tests en microplaques et de 4 pour les tests en éprouvettes.

7.2.5 Entretien

Le critère de l'entretien renvoie à la fréquence, à la complexité et au coût des opérations de maintenance. Peu d'informations sont disponibles sur le sujet. Cependant, les appareils spectrophotométriques sont reconnus pour avoir une maintenance très « légère » et peu coûteuse; elle concerne le plus souvent le changement des lampes (Thomas, 2007).

La pondération de ce critère étant de 1 (faible importance), la note est de 1 pour les quatre tests.

7.3 Critères d'analyse

Les critères d'analyse représentent les caractéristiques analytiques des trousse étudiées. La sensibilité, la caractérisation quantitative, la caractérisation qualitative et la fiabilité de la prise d'essai constituent les critères d'analyse.

7.3.1 Sensibilité

La sensibilité des mesures est estimée à partir des limites de détection (LD) et des limites de quantification (LQ). Ces données ont été fournies par les fabricants Abraxis et Envirologix. Elles sont synthétisées dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Limites de détection et de quantification des différents tests

	Limite de détection (LD) (µg/L)	Limite de quantification (LQ) (µg/L)
Microplaques Abraxis	0,10	0,15
Microplaques Envirologix	0,15	0,18
Éprouvettes Abraxis	0,10	0,15
Éprouvettes Envirologix	0,18	0,70

Comme l'indique le tableau ci-dessus, les limites de détection (fournies par les manufacturiers) pour les deux tests de la compagnie Abraxis sont inférieures à celles des tests d'Envirologix. Ce qui donne un autre avantage à Abraxis. En effet, une plus grande sensibilité permet une détection précoce des épisodes de toxicité liés aux fleurs d'eau de cyanobactéries ainsi que l'obtention de données plus précises.

La pondération de ce critère étant de 3 (haute importance), les notes sont de 9 pour les tests d'Abraxis et de 6 pour les tests d'Envirologix.

7.3.2 Caractérisation qualitative

Rappelons que les microcystines sont présentes dans le milieu aquatique sous plusieurs formes appelées « variantes moléculaires » ou « familles ». Ces variantes peuvent réagir avec plus ou moins d'intensité selon le ou les anticorps utilisés. Chez Abraxis comme chez Envirologix, les anticorps employés sont polyclonaux, c'est-à-dire qu'ils ont été engendrés par des souches différentes de microcystines. Les anticorps polyclonaux permettent donc de détecter une plus grande variété de formes. Dans le cas où l'objectif de l'analyse est

d'effectuer une surveillance de la qualité de l'eau, il est préférable de détecter et de quantifier une grande diversité de variantes.

Le Tableau 17 présente la spécificité des anticorps de chaque fabricant vis-à-vis des différentes microcystines et de la nodularine. Ces informations ont été collectées à partir de la documentation technique et commerciale fournie par les deux compagnies. Abraxis affirme être capable de détecter deux formes supplémentaires de microcystines (LW et LF), lesquelles ne sont pas détectées par Envirologix.

Tableau 17 : Spécificité des tests ELISA d'Envirologix et d'Abraxis

Composé détecté	Test Envirologix	Test Abraxis
Microcystine-LR	Oui	Oui
Microcystine-LA	Oui	Oui
Microcystine-RR	Oui	Oui
Microcystine-YR	Oui	Oui
Microcystine-LW	Non	Oui
Microcystine-LF	Non	Oui
Nodularine	Oui	Oui

Les trousse d'Envirologix sont moins spécifiques que celles d'Abraxis quand vient le temps de poser un diagnostic qualitatif des microcystines présentes dans un échantillon.

La pondération de ce critère étant de 2 (importance moyenne), les notes sont de 4 pour les tests Abraxis et de 2 pour les tests Envirologix.

7.3.3 Caractérisation quantitative

Deux facteurs importants influencent les résultats quantitatifs obtenus :

- la réactivité des variantes moléculaires de microcystines vis-à-vis des anticorps;
- la courbe d'étalonnage utilisée pour la quantification.

Les anticorps fournis par Abraxis et Envirologix n'étant pas les mêmes, la réactivité des variantes diffère selon la trousse employée. Le

Tableau 18 présente la réactivité de plusieurs variantes de cyanotoxines généralement trouvées dans les lacs et les rivières du Québec; elle est exprimée par rapport à la réactivité de la microcystine-LR.

Tableau 18 : Réactivité des tests ELISA d'Envirologix et d'Abraxis

Composé	Test Envirologix		Test Abraxis	
	Microplaque	Éprouvette	Microplaque	Éprouvette
Microcystine-LR	100	100	100	100
Microcystine-LA	62	55	125	125
Microcystine-RR	54	42	91	91
Microcystine-YR	35	48	78	78
Microcystine-LW	0	0	114	114
Microcystine-LF	0	0	108	108
Nodularine	69	77	169	169

Notons que la réactivité relative présentée dans le

Tableau 18 est basée sur une réactivité de 100 % de la microcystine-LR. Ainsi, si l'échantillon contient uniquement de la microcystine-LR (100 % de réactivité), le résultat obtenu correspond à la concentration réelle de l'échantillon. Par contre, si l'échantillon testé avec les microplaques Envirologix, par exemple, contient uniquement de la microcystine-LA (62 % de réactivité), le résultat obtenu correspond à 62 % de la concentration réelle de l'échantillon.

Selon les spécifications des fabricants, les réponses relatives des différentes variantes sont en générale plus importantes pour Abraxis que pour Envirologix. Ceci explique que les concentrations obtenues avec les trousse Abraxis sont plus élevées dans la majorité des cas.

De plus, chez Abraxis, les microcystines LA, LW, LF et les nodularines réagissent plus aux anticorps que la microcystine-LR. En utilisant les trousse Abraxis, il est donc possible que le résultat obtenu surestime la quantité de microcystines alors que les trousse d'Envirologix, les sous-estimeraient. Lorsque l'objectif de l'échantillonnage est d'évaluer le risque sanitaire, il est préférable de surestimer que de sous-estimer la quantité de microcystines.

Selon Sasaki et Mitchell (2003), afin d'obtenir une valeur de concentration fiable avec l'analyse ELISA de type compétitif, la valeur d'absorbance de l'échantillon doit se situer entre 20 et 80 % de la courbe. Cette section de la courbe est la plus fiable. Puisque la gamme de concentrations des solutions étalons fournies par Abraxis (de 0,15 à 5 µg/L) est plus grande que celle fournie par Envirologix (de 0,16 à 2,5 µg/L pour les éprouvettes et de 0,4 à 2,5 µg/L

pour les plaques), la quantification par les trousseaux Abraxis devrait être plus précise et plus fiable.

La pondération de ce critère étant de 3 (haute importance), les notes sont de 9 pour les tests en microplaques Abraxis, de 6 pour les tests en microplaques Envirologix et les éprouvettes Abraxis et de 3 pour les tests en éprouvettes Envirologix.

7.3.4 Fiabilité de la méthodologie

Pour que la méthodologie proposée par le fabricant soit fiable, la mesure de concentration effectuée sur l'échantillon doit être représentative, c'est-à-dire (théoriquement) égale à la concentration réelle du milieu à surveiller.

Par contre, lors de l'ajout de l'échantillon dans l'éprouvette (lors des tests en éprouvettes), les pertes par « micro éclaboussures » sont difficiles à éviter en raison de la forme et de la profondeur des éprouvettes. L'ajout de l'échantillon dans les puits (lors des tests en microplaques) se fait plus doucement évitant ainsi les pertes qui pourraient engendrer des erreurs d'analyse.

La pondération de ce critère étant de 2 (importance moyenne), les notes sont de 4 pour les tests en microplaques et de 2 pour les tests en éprouvettes.

8 Discussion et conclusion

Le Tableau 19 présente les notes récapitulatives et finales obtenues par les quatre trousseaux ELISA à la suite de leur évaluation.

Tableau 19 : Évaluation des quatre trousse ELISA selon 14 critères

	Microplaques		Tubes		Pondération du paramètre	Microplaques		Tubes	
	Abraxis	Envirologix	Abraxis	Envirologix		Abraxis	Envirologix	Abraxis	Envirologix
Critères de gestion									
Coût d'acquisition (Spectro,...)	2	2	3	3	2	4	4	6	6
Coût d'opération (consommables)	3	3	2	2	3	9	9	6	6
Durabilité de l'appareillage	1	1	2	2	1	1	1	2	2
Pertinence Indicateur	2	2	2	2	2	4	4	4	4
Aide à la décision	2	2	2	2	3	6	6	6	6
Critères utilisateur									
Facilité d'utilisation	3	2	2	3	2	6	4	4	6
Fiabilité	3	2	1	1	3	9	6	3	3
Vitesse	2	2	3	3	2	4	4	6	6
Robustesse	1	1	2	2	2	2	2	4	4
Entretien	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Critères analytiques									
Sensibilité	3	2	3	2	3	9	6	9	6
Caractérisation qualitative	2	1	2	1	2	4	2	4	2
Caractérisation quantitative	3	2	2	1	3	9	6	6	3
Fiabilité de la méthodologie	2	2	1	1	2	4	4	2	2
Total						59	49	52	49

Les microplaques de la compagnie Abraxis arrivent en première position avec une note de 59, suivies des éprouvettes de la même compagnie avec une note de 52. Avec des notes égales de 49, les deux trousse de la compagnie Envirologix se retrouvent en dernière position. Les évaluations effectuées permettent donc de dire que le test en microplaques Abraxis semble la meilleure solution commerciale.

L'utilisation des tests en éprouvettes nécessite un investissement légèrement inférieur en ce qui a trait à l'acquisition du matériel laboratoire (spectrophotomètre, etc.). Cependant, la différence d'environ 700 \$ entre les deux types de trousse est largement compensée par le faible coût d'exploitation des microplaques. En effet, les microplaques possèdent 96 puits comparativement à 40 éprouvettes pour ce qui est des tests en éprouvettes. Les tests microplaques permettent donc d'effectuer plus d'analyses que ne le font ces derniers. La division des coûts du matériel par le nombre d'analyses possibles fait voir que les tests en microplaques sont plus économiques que les tests en éprouvettes (Tableau 14).

Les microplaques Abraxis ont été reconnues comme étant les plus fiables. Avec les microplaques, il est possible d'effectuer l'analyse en triplicata non seulement sur les échantillons, mais aussi sur les solutions étalons qui servent à construire la courbe

d'étalonnage. Cet avantage qu'offrent les microplaques augmente considérablement la précision des résultats et diminue les risques d'erreur. Il faut aussi tenir compte du fait que les éprouvettes étaient souvent couvertes d'égratignures qui auraient pu fausser la lecture du spectrophotomètre.

Les microplaques Abraxis étaient également les plus ergonomiques de par leur facilité d'utilisation. De plus, les réactifs fournis permettent d'obtenir une courbe d'étalonnage plus large et donc d'analyser une plus grande gamme de concentrations de façon plus précise. La sensibilité élevée et la fiabilité de la prise d'essai de ces plaques ont également joué en leur faveur.

Le fait que la compagnie Abraxis fournisse des anticorps réagissant à un grand nombre de variantes de microcystines fait de son test en microplaques un outil de détection adéquat pour une évaluation du risque sanitaire lié à la présence des cyanobactéries dans les lacs et les rivières du Québec.

Notons que la corrélation entre les trousse montrent l'existence d'une relation linéaire entre les résultats obtenus avec les deux trousse d'Envirologix ($R^2 = 0,94$; $n = 39$) et entre ceux obtenus par microplaques Abraxis et Envirologix ($R^2 = 0,85$; $n = 39$). Pour compléter cette dernière observation, il faut noter que la réponse obtenue par le système Abraxis est deux fois plus importante en moyenne (pente de la droite de régression) que celle donnée par le système Envirologix.

En somme, et ce, à la lumière des résultats fournis par les différentes vérifications effectuées, la trousse commerciale de microplaques ELISA de la compagnie Abraxis est la trousse proposée pour analyser rapidement la concentration de microcystines dans l'eau de surface. Elle pourrait donc être employée avantageusement lors d'une procédure de détection alternative des cyanobactéries et des cyanotoxines.

Dans le chapitre suivant, seront traitées les relations entre les résultats des différents outils sélectionnés lors des chapitres 1 et 2 et l'information nécessaire à l'utilisation de ces outils et à l'interprétation des résultats.

Chapitre 3 : Modélisation de la concentration de microcystines et caractérisation des milieux contaminés par les cyanobactéries

Sommaire du chapitre 3 :

Au Québec les municipalités, les associations de riverains ou les autres organisations participant à la protection et la gestion des plans d'eau jouent un rôle de plus en plus important dans la surveillance de la qualité de nos lacs et rivières. Cependant, ces gestionnaires de l'eau ne possèdent ni les outils ni les connaissances nécessaires pour effectuer un suivi adéquat des cyanobactéries et des microcystines. La présente étude met en relation les paramètres physicochimiques de l'eau ainsi que les mesures de la concentration de phycocyanine et des microcystines afin d'identifier les paramètres importants à intégrer dans la procédure de détection des cyanobactéries et des microcystines. L'élaboration de deux modèles quantitatifs ont permis d'identifier deux paramètres, la concentration de la phycocyanine et la saturation de l'oxygène en surface, pouvant expliquer 32,4 et 30,3 % de la concentration des microcystines. Le modèle qualitatif, beaucoup plus intéressant et applicable sur le terrain, a permis de déterminer qu'à partir d'un seuil de concentration de phycocyanine de 0,02 RFU, il est possible de déterminer la nécessité d'analyser la concentration des microcystines de l'échantillon, une analyse coûteuse.

L'utilisation du fluorimètre et l'intégration du modèle qualitatif dans le suivi des cyanobactéries et des microcystines permettraient aux gestionnaires de l'eau d'économiser sur les coûts d'analyse en faisant une sélection des échantillons à envoyer au laboratoire du MDDEP. Rappelons qu'il est nécessaire d'effectuer une analyse dans un laboratoire accrédité afin de mesurer la concentration de cyanotoxines et ainsi poser un diagnostic juste du risque lié à la présence de ces toxines. De plus, cette préselection par la méthode proposée dans le présent mémoire permet au MDDEP d'économiser sur les analyses en évitant de procéder à la quantification des microcystines d'échantillons qui n'en contiennent pas.

9 Introduction

Au Québec, bon nombre de lacs sont sous la surveillance de municipalités, d'associations de riverains ou d'autres organisations participant à la protection et la gestion des plans d'eau. Afin de fournir à ceux-ci quelques outils pour évaluer l'état des lacs du Québec et pour suivre leur évolution dans le temps, le Ministère du développement durable de l'environnement et des parcs (MDDEP) a mis sur pied en 2004 le programme de *Réseau de surveillance volontaire des lacs* (RSVL) (MDDEP, 2002). En ce qui a trait aux cyanobactéries, le protocole issu de ce programme propose un suivi visuel des fleurs d'eau (MDDEP, 2009). Comme il s'agit d'observations, les données recueillies sont qualitatives et ne permettent pas aux gestionnaires de l'eau d'obtenir l'information nécessaire pour une prise de décision éclairée concernant la protection du public face au risque que représente la présence de cyanobactéries. De plus, les méthodes présentement utilisées au Québec et qui sont en mesure de fournir cette information, nécessitent du matériel de laboratoire très coûteux et du personnel qualifié pour effectuer les analyses (voir le chapitre 1). Une procédure alternative de détection des cyanobactéries, mettant en œuvre des méthodes faciles, accessibles, rapides et abordables, serait en mesure de fournir des données quantitatives et pertinentes sur les risques associés aux cyanobactéries.

Lors de l'élaboration d'une procédure de détection des cyanobactéries et de leurs toxines, il est important de bien sélectionner les outils à utiliser. Les chapitres 1 et 2 du présent mémoire ont permis d'identifier deux méthodes adéquates. La fluorimétrie a été identifiée comme un outil rapide, accessible et peu coûteux pour la quantification des cyanobactéries. Les immunoessais (ELISA) ont été identifiés comme des outils rapides, faciles d'utilisation et peu coûteux pour la quantification des cyanotoxines (voir le chapitre 1). Parmi les trousseaux ELISA étudiés, une a été identifiée comme la plus performante et la plus adéquate pour la quantification des microcystines. Cependant, il est primordial de bien connaître les outils et de les employer efficacement afin de fournir les informations pertinentes au gestionnaire de l'eau.

L'objectif premier visé dans la phase trois de cette étude est de mettre en évidence les paramètres et les facteurs qui permettent l'amélioration de la gestion sanitaire des plans d'eau et, ultimement, de proposer une méthode de détection des cyanobactéries qui soit simple, fiable, accessible et abordable.

Les objectifs secondaires sont les suivants :

- identifier les paramètres de l'eau d'intérêt pour l'élaboration d'une procédure de détection des cyanobactéries et des microcystines;
- caractériser et mettre en relation la concentration des microcystines avec les conditions physicochimiques et bactériologiques des milieux étudiés selon leur niveau de contamination par les cyanobactéries;
- présenter un modèle permettant d'évaluer le risque lié à la présence des microcystines dans l'eau à partir de mesures faciles à effectuer directement sur le site.

Le présent chapitre porte sur les caractéristiques propres aux milieux étudiés selon leur niveau de contamination. Il propose également une analyse exploratoire mettant en évidence les liens existant entre les différents paramètres mesurés au cours de cette étude. Enfin, il présente trois modèles permettant d'évaluer le risque lié à la présence des microcystines dans l'eau à partir des paramètres étudiés.

9.1 Paramètres de l'eau étudiés

Il est établi que les caractéristiques des milieux eutrophes contribuent au développement des cyanobactéries (Robillot et Hennion, 2001). Dans les milieux eutrophes, les paramètres comme la température élevée, la turbidité de l'eau, la faible turbulence dans la colonne d'eau et la forte concentration en éléments nutritifs, notamment, favorisent la prolifération de ces organismes nuisibles (Hargreaves, 2003). Afin d'évaluer et de mieux comprendre la prolifération des cyanobactéries, plusieurs paramètres de l'eau peuvent être mesurés. Ici sont présentées les caractéristiques des milieux où prolifèrent les cyanobactéries et les liens qui existent entre les cyanobactéries et les paramètres étudiés.

9.1.1 Phycocyanine

La phycocyanine est un pigment bleu présent chez les cyanobactéries. Il s'agit d'un pigment accessoire à la chlorophylle qui permet l'absorption d'un plus large spectre lumineux pour effectuer la photosynthèse. Des études comparatives ont montré une bonne corrélation entre la mesure de la concentration de phycocyanine et le dénombrement des cyanobactéries par microscopie (Ellis, 2008). Brient *et al.* (2008) ont calculé un coefficient de détermination (R^2) de 0,73 entre la concentration de phycocyanine et un compte cellulaire. La concentration de phycocyanine, qui peut être mesurée par fluorimétrie, permet donc d'évaluer indirectement

l'abondance des cyanobactéries. Rappelons que la phycocyanine et la fluorimétrie sont traités en détails dans le Chapitre 1 du présent mémoire.

Selon Brient *et al.* (2004), les quantités les plus élevées (ex : écume) de cyanobactéries sont associées aux plus fortes concentrations en microcystines, alors que les quantités moyennes peuvent être associées ou non à la présence des microcystines et que les faibles quantités sont rarement liées à la présence de microcystines.

La relation entre ces deux paramètres est complexe et une multitude de facteurs, notamment les mécanismes induisant la production de microcystines, les facteurs de dégradation cellulaire et les vecteurs de migration des toxines, pourraient expliquer en partie la complexité de cette relation.

9.1.2 Chlorophylle a

La chlorophylle *a* est un pigment photosynthétique présent dans le phytoplancton en général. Elle est un des trois paramètres mesurés pour la détermination du niveau trophique d'un lac. Si on considère que les milieux eutrophes sont généralement plus enclins à accueillir des cyanobactéries, la mesure de la chlorophylle *a* s'avère un paramètre intéressant dans une étude portant sur la détection des cyanobactéries (Ellis, 2008). Selon Brient *et al.* (2004), la forte présence de cyanobactéries entraîne une forte concentration de chlorophylle *a*. Cependant, comme la chlorophylle *a* n'est pas spécifique aux cyanobactéries comme l'est la phycocyanine, par exemple, elle ne saurait être un bon indicateur permettant de prédire la concentration de cyanobactéries ou des microcystines qu'elles produisent.

9.1.3 Phosphore

Le phosphore constitue l'élément limitant la prolifération des producteurs primaires, comme les cyanobactéries, dans la plupart des milieux aquatiques (Chevalier *et al.*, 2001 ; MDDEP, 2000). Il est donc possible d'établir un lien entre la prolifération des cyanobactéries et la concentration du phosphore dans un plan d'eau. La mesure du phosphore total (soluble et particulaire) permet d'identifier les cours d'eau à risque de développer une communauté de phytoplancton dominée par les cyanobactéries. Le seuil connu où le risque de dominance par les cyanobactéries devient important est atteint lorsque le phosphore total est de 30 µg/L

(Downing *et al.*, 2001, Ellis, 2008). Selon le MDDEP (2000), il s'agit également du seuil où le phosphore présente un risque pour l'eutrophisation d'un plan d'eau.

Notons que les cyanobactéries ont la capacité d'emmagasiner une grande quantité de phosphore qu'elles peuvent utiliser ultérieurement pour leur reproduction. Les cyanobactéries sont ainsi capables de se diviser durant une période plus ou moins longue de faible concentration en phosphore grâce à leur capacité de stockage. Donc, une forte abondance des cyanobactéries n'est pas nécessairement associée à une forte concentration en phosphore (Blais, 2002 ; Lavoie *et al.*, 2007). Selon plusieurs auteurs (Levine et Schindler, 1999 ; Blais, 2002 ; Chevalier *et al.*, 2001 ; MDDEP, 2000), la réduction des apports en phosphore constitue un moyen de lutte efficace contre la prolifération excessive des cyanobactéries.

9.1.4 Azote

Plusieurs espèces de cyanobactéries ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique à l'aide de structures appelées hétérocystes souvent présents chez les espèces filamenteuses comme les genres *Anabaena*, *Aphanizomenon* et *Nostoc*. Cette capacité constitue un avantage évolutif des cyanobactéries sur le reste de la communauté phytoplanctonique dans un environnement où la quantité d'azote est limitant (Mur *et al.*, 1999). Selon Levine et Schindler (1999), les genres sans hétérocystes comme les *Microcystis* seraient favorisés par un ratio N : P élevé alors que ce ratio n'aurait aucun impact significatif sur les genres qui possèdent des hétérocystes. Cependant, plusieurs études se contredisent quant à l'importance de ce ratio sur l'abondance des cyanobactéries (Lavoie *et al.*, 2007).

Il faut voir, en ce qui a trait à la production de toxines, que le rôle des nutriments, azote et phosphore, n'est pas très clair. En général, les études soutiennent que la quantité d'azote joue un rôle déterminant dans la quantité de microcystines produites. Lorsque l'azote est limitant, une faible augmentation de sa concentration entraîne une augmentation de quatre ordres de grandeur de la concentration en microcystines (Downing *et al.*, 2005 p40 dans Lavoie). D'autres études proposent que l'augmentation de la quantité d'azote, si on la compare à une augmentation de la quantité de phosphore, aurait un impact plus important chez les espèces toxiques de cyanobactéries (Lavoie *et al.*, 2007). Selon Oh (2000), le taux de production de microcystines serait déterminé principalement par le taux de croissance des cellules, lui-même déterminé par la concentration de phosphore.

9.1.5 Transparence de l'eau

La transparence de l'eau est le reflet de l'abondance des producteurs primaires ou de la biomasse algale ainsi que de la quantité de matières inorganiques contenues dans l'eau. Elle constitue d'ailleurs un des trois indices permettant de déterminer l'état trophique d'un lac. Les fleurs d'eau de cyanobactéries sont associées généralement à des milieux eutrophes dont la transparence est faible (Brient *et al.*, 2004).

Mais encore, les cyanobactéries seraient favorisées lorsque la transparence de l'eau est plus faible grâce aux pigments qu'elles possèdent. En effet, les cyanobactéries, en plus d'avoir de la chlorophylle pour effectuer la photosynthèse, possèdent de la phycocyanine. Ce pigment bleu leur permet de capter un spectre lumineux plus large lorsque la transparence de l'eau est faible et que plusieurs longueurs d'ondes ne peuvent pénétrer loin dans la colonne d'eau (Lavoie *et al.*, 2007 ; MDDEP, 2000).

9.1.6 Température de l'eau

Le taux de croissance maximal de la plupart des cyanobactéries est atteint lorsque la température de l'eau s'élève à plus de 25°C avec un optimum entre 25 et 35°C. Cet optimum de croissance se situe à une température nettement supérieure à celle des algues vertes ou des diatomées (Lavoie *et al.*, 2007). La prolifération des cyanobactéries serait donc favorisée lorsque la température de l'eau est élevée.

On a remarqué cependant la présence de fleurs d'eau tôt le printemps alors que la température des plans d'eau est très basse. Aurait même été signalée la présence de fleurs d'eau sous un couvert de glace (Lavoie *et al.*, 2007). Des températures de l'eau basse ne garantissent donc pas l'absence de cyanobactéries.

9.1.7 pH de l'eau et source de carbone

Lorsque l'abondance des cyanobactéries augmente, le pH de l'eau a tendance à augmenter également. Cette tendance s'explique par le fait que les cyanobactéries, comme le reste du phytoplancton d'ailleurs, consomment le CO₂ dissous dans l'eau. Ainsi, l'équilibre existant entre les différentes formes carbonates (H₂CO₃, HCO₃⁻, CO₃²⁻) est déplacé vers une plus forte

concentration des formes déprotonées (vers l'ion carbonate CO_3^{2-}) faisant augmenter le pH de l'eau. Les cyanobactéries sont également capables d'utiliser l'ion bicarbonate HCO_3^- (Lavoie *et al.*, 2007). Elles sont alors favorisées lorsque le pH se situe autour de 8 et que HCO_3^- est la forme de carbonate dissous la plus abondante. La Figure 11 présente l'équilibre des formes de carbonate dissous selon le pH de l'eau.

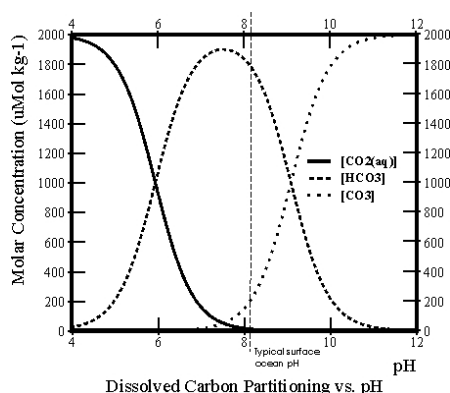


Figure 11 : Représentation graphique de l'équilibre du carbonate dissous dans l'eau selon le pH (tiré de : www.noc.soton.ac.uk/soes/staff/tt/eh/pics/bjerrum.jpg)

Selon Levine et Schindler (1999), l'augmentation du pH et la diminution de la concentration du CO_2 dissous favorisent les cyanobactéries par rapport aux autres groupes de phytoplancton. En d'autres termes, la prolifération des cyanobactéries crée un milieu alcalin qui avantage celles-ci et stimule leur croissance.

9.1.8 Oxygène dissous dans l'eau

Les cyanobactéries étant des producteurs primaires, l'oxygène constitue leur déchet métabolique principal. La présence d'une grande quantité de phytoplancton et/ou de cyanobactéries peut donc entraîner une production considérable d'oxygène dans l'eau et augmenter l'oxygène dissous en surface (Huot, 2009). En revanche, la décomposition des cyanobactéries ainsi que leur respiration nocturne peuvent causer un déficit en oxygène en profondeur (Blais, 2002).

9.1.9 Autres facteurs

Plusieurs autres facteurs peuvent influencer la prolifération de cyanobactéries. Le Tableau 20 en dresse la liste et il fait état des effets qu'ils ont sur celles-ci.

Tableau 20 : Facteurs favorisant la prolifération des cyanobactéries (modifié de Paerl *et al.*, 2001)

Facteurs	Impacts
Physiques	
Lumière	- Certaines espèces tolèrent ou préfèrent une forte intensité lumineuse, d'autres sont adaptées à l'ombre.
Turbulence	- La faible turbulence favorise la croissance de la plupart des espèces.
Temps de résidence de l'eau	- Un long temps de résidence favorise toutes les espèces.
Chimiques	
Fer	- Le fer peut favoriser la croissance des cyanobactéries.
Carbone inorganique dissous (CID)	- Le CID peut limiter la croissance du phytoplancton. - Une limitation en CID et un pH alcalin peut donner un avantage compétitif aux cyanobactéries vis-à-vis de la communauté planctonique.
Carbone organique dissous (COD)	- Plusieurs espèces de cyanobactéries peuvent utiliser le COD. - Les fleurs d'eau de cyanobactéries sont souvent associées à des eaux riches en COD.
Biologiques	
Broutage	- Un fort broutage par les organismes zooplanctoniques favorise les espèces filamenteuses, coloniales et toxiques.
Interactions microbiennes	- Il existe certains virus et certaines bactéries antagonistes aux cyanobactéries qui peuvent limiter leur croissance

La section 10 qui suit traite de la méthodologie employée dans l'échantillonnage, dans les analyses en laboratoires et dans les analyses statistiques ainsi que les résultats des analyses exploratoires et des modèles élaborés. Elles proposent une discussion sur les paramètres à inclure dans la procédure de détection de cyanobactéries et sur la façon d'interpréter les résultats obtenus. Enfin, elles font état des conclusions et des recommandations quant à l'application de ces modèles par les gestionnaires de l'eau.

10 Méthodologie

10.1 Localisation et fréquence d'échantillonnage

Les campagnes d'échantillonnage ont été effectuées sur 25 stations distribuées sur 21 lacs. Elles ont débuté la semaine du 3 juin 2008 pour s'achever la semaine du 13 octobre de la même année. L'emplacement des stations d'échantillonnage est présenté dans le Tableau 21, ci-dessous, et à la Figure 12.

Tableau 21 : Emplacement et coordonnées géographiques des stations d'échantillonnage

Code station	Emplacement	Coordonnées géographiques (NAD 83)
ROX-1-1	Roxton, plage publique	18 T 683700 5036761
WAT-1-2	Waterloo, parc municipal	18 T 694935 5023150
BRO-1-3	Brome, plage Tiffany	18 T 696534 5014432
BRO-2-4	Brome, plage Douglas	18 T 695907 5011163
MEM-1-5	Memphrémagog (baie Verte), terrain de la présidente de l'Association des riverains	18 T 712278 5006533
TRO-1-6	Trouser, plage du camping	18 T 709064 5013898
PAR-1-7	Parker, parc municipal	18 T 710320 5022817
ARG-1-8	d'Argent, terrain du président de l'Association des riverains	18 T 710949 5021534
LEC-1-9	Leclerc, descente de bateau	18 T 719297 5031695
DEN-1-10	Denison, embouchure avant le barrage	18 T 725873 5037285
STF-1-11	Rivière Saint-François, parc Sainte-Thérèse	18 T 695850 5082709
MAG-3-12	Rivière Magog, plage Blanchard	19 T 270790 5031009
MAS-2-13	Massawippi (North Hatley), centre récréatif	19 T 266442 5017325
MAS-1-14	Massawippi(Ayer's Cliff), baie Beacon	18 T 733230 5007900
MEM-3-15	Memphrémagog (plage Weir), quai	18 T 719262 4989258
MEM-2-16	Memphrémagog (baie Fitch), marina	18 T 721686 4998722
LOV-1-17	Lovering, décharge	18 T 723798 5002690
MAG-2-18	Magog (Deauville), plage municipale	18 T 733218 5024395
BPN-1-19	Petit lac Brompton, rue des Tulipes	18 T 725074 5037687
DES-1-20	Desmarais, rue Brême à Saint-Denis-de-Brompton (Vincent Chenier)	18 T 725873 5037285
GLB-1-21	Grand lac Brompton, plage Mackinsy	18 T 723450 5039493
PSF-25-22	Petit lac Saint-François, plage municipale	18 T 730826 5046900
GSF-1-23	Grand lac Saint-François	-
AYL-1-24	Aylmer	-
MON-1-25	MontJoie, rue Mont-Girard à Saint-Denis-de-Brompton	-

Programme de surveillance des cyanobactéries et cyanotoxines
Station échantillonnage 2008

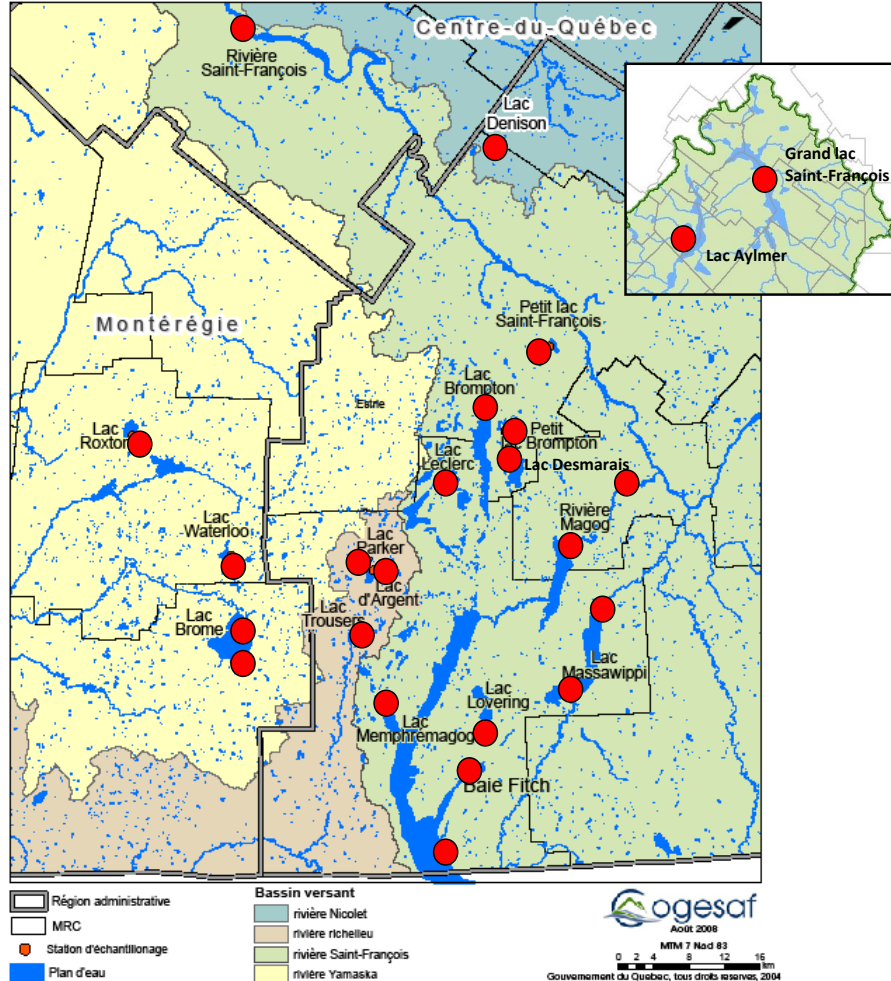


Figure 12 : Localisation des stations d'échantillonnage

10.2 Échantillonnage

Les prélèvements ont été effectués pendant 20 semaines à raison d'un échantillonnage par semaine. Les détails sur les dates de prélèvements sont présentés dans l'annexe 6. Les prélèvements ont été effectués à chaque station de façon ponctuelle dans les 30 premiers centimètres de la colonne d'eau. Les échantillonnages ont été faits à la main. Ils ont respecté les exigences du *Guide d'échantillonnage* du MDDEP (2008b). Les flacons utilisés étaient en verre brun et les bouchons étaient doublés de papier d'aluminium afin d'éviter des problèmes

d'adsorption des microcystines sur des parties organiques (par exemple, sur la partie plastique du couvercle). Les échantillons étaient conservés au réfrigérateur jusqu'aux analyses.

Notons qu'aux stations GSF-1-23 et AYL-1-24, ce sont des bénévoles qui ont effectué l'échantillonnage. Ainsi, les analyses physicochimiques sur le site n'ont pas été effectuées, les bénévoles n'ayant pas accès aux instruments nécessaires.

10.3 Analyses sur site

Les paramètres suivants ont été mesurés sur les sites:

- le pH
- la conductivité
- la température de l'eau
- l'oxygène dissous
- la saturation en oxygène
- les solides totaux dissous (Total Dissolved Solid, TDS)
- la transparence de l'eau.

Soulignons que les six premiers paramètres ont été mesurés à l'aide de la sonde YSI -556 MPS (YSI Inc., Yellow Springs, États-Unis), alors que le dernier, la transparence de l'eau, l'a été avec un tube Secchi (Forestry Suppliers Inc., Jackson, États-Unis) de 1,2 m de long.

10.4 Quantification des microcystines

Les analyses des microcystines ont été réalisées à l'aide des microplaques *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) de la compagnie Abraxis (Abraxis, Warminster, États-Unis) (#5220011) après qu'ait été effectuée une lyse cellulaire avec la trousse Quiklyse (#529911QL) de la même compagnie. La lecture des microplaques a été effectuée avec un lecteur Starfax 303 PLUS Microstrip Reader (Awareness Technology Inc., Palm City, États-Unis) en mode Absorbance à 450 nm avec une longueur d'onde différentielle de 630 nm. Les concentrations ont été déterminées en utilisant une courbe étalon non linéaire à quatre paramètres fournie par la compagnie Abraxis sous Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, États-unis) (annexe 7). L'équation de la courbe étalon est la suivante :

$$Y = (A-D)/(1+(X/C)^B)+D$$

Où A représente la valeur du maximum de la courbe, B la pente à 50% de concentration, C le CI_{50} (voir section 6.3) et D la valeur minimum de la courbe.

Le Tableau 22 présente les caractéristiques de la trousse.

Tableau 22 : Caractéristiques de la trousse de microplaque ELISA d'Abraxis

Type de produit	Limite de la détection	Limites de la quantification	Variantes de microcystines détectées
Microplaque ELISA	0,10 µg/L	0,15 µg/L à 5,00 µg/L	LR, LA, RR, YR, LW, LF, Nodularine

Les tests ont été effectués en triplicats.

10.5 Mesures de la concentration de chlorophylle a et de phycocyanine

Les mesures fluorimétriques de la concentration de chlorophylle et de phycocyanine ont été effectuées en laboratoire le même jour que s'est fait l'échantillonnage. Ces mesures ont été effectuées à l'aide d'un fluorimètre AquaFluor 8000-010-PC-1 de (Turner Designs, Sunnyvale, États-unis). Trois lectures ont été effectuées sur chaque échantillon. Les mesures rapportées sont les moyennes des trois lectures.

10.6 Analyses complémentaires

Les analyses de *E. coli* et de coliformes totaux ont été effectuées avec la méthode d'essai Coliplates (Bluewater Bioscience Inc., Mississauga, Canada). L'analyse de la turbidité a été obtenue à l'aide d'un spectrophotomètre Smart Spectro 2000 spectrophotometer (LaMotte Company, Chestertown, États-unis) selon la méthode proposée par la compagnie.

Certains paramètres chimiques ont été analysés par un laboratoire accrédité afin d'établir un portrait sommaire de la qualité des eaux des stations échantillonnées.

Il s'agit des paramètres suivants :

- le phosphore total (trace) (4 campagnes)

- le carbone organique total (4 campagnes)
- l'azote total Kjeldahl (4 campagnes)
- les nitrite et nitrate (4 campagnes)
- l'azote ammoniacal (4 campagnes)
- la chlorophylle *a* (11 campagnes)

Notons que ces analyses n'ont pas été effectuées sur tous les échantillons. Elles ne l'ont été que sporadiquement en raison de leur coût élevé.

10.7 Analyses statistiques

Les analyses statistiques suivantes ont été effectuées :

- analyse en composantes principales (ACP)
- analyses des corrélations
- regroupement hiérarchique
- analyse de variance ANOVA
- régression linéaire multiple
- analyse par tableau des fréquences

Toutes ces analyses statistiques ont été effectuées à l'aide des logiciels Excel 2002 (Microsoft Corporation, Redmond, États-unis) ou SPSS 16 (SPSS Inc., Chicago, États-unis). Les détails sur celles-ci sont présentés aux annexes 8, 9, 10 et 11.

11 Résultats

La présente section traite tout d'abord de la classification hiérarchique des stations échantillonnées selon leur niveau de contamination par les cyanobactéries. Suit ensuite l'analyse de variance ANOVA permettant de vérifier les différences et les similitudes des paramètres mesurés selon le niveau de contamination des classes de stations déterminées lors de la classification hiérarchique. Après une analyse exploratoire portant sur les composantes principales de la variabilité des observations, l'analyse des corrélations entre les paramètres a été effectuée. Finalement, deux modèles quantitatifs et un modèle qualitatif permettant d'évaluer la concentration des microcystines à partir des paramètres mesurés sur le site sont proposés.

11.1 Classification hiérarchique

À partir des données sur les concentrations de microcystines et de phycocyanine, trois groupes de stations ont été formés. Ces deux paramètres sont statistiquement différents d'un groupe à l'autre ($\alpha = 0,05$). Ainsi, les stations sont regroupées selon leur niveau de contamination par les cyanobactéries soit faiblement, moyennement et fortement contaminées.

Le Tableau 23 présente la composition des trois groupes.

Tableau 23 : Classification hiérarchique des stations selon leur niveau de contamination par les cyanobactéries

Niveau de contamination	Nombre de stations	Stations
Faible Microcystine moy.: 0,18-0,20 µg/L Phycocyanine moy. : 0,005-0,007 RFU	20	ARG-1-8, BPN-1-19, BRO-1-3, BRO-2-4, DEN-1-10, DES-1-20, GLB-1-21, GSF-1-23, LEC-1-9, LOV-1-17, MAG-2-18, MAG-3-12, MAS-1-14, MAS-2-13, MEM-1-5, MEM-3-15, MON-1-25, PAR-1-7, STF-1-11, TRO-1-6
Moyen Microcystine moy. : 0,30-0,95 µg/L Phycocyanine moy. : 0,011-0,090 RFU	2	MEM-2-16, ROX-1-1
Élevé Microcystine moy. : 1,24-2,08 µg/L Phycocyanine moy. : 0,046-0,17 RFU	3	AYL-1-24, PSF-25-22, WAT-1-2

11.2 Caractérisation des milieux faiblement, moyennement et fortement contaminés par les cyanobactéries

À partir des groupes formés lors de la classification hiérarchique, il est possible de voir s'il y a une différence significative entre eux par rapport aux paramètres mesurés.

Le Tableau 24 reproduit les résultats des analyses de variance (ANOVA) effectuées sur tous les paramètres. Les statistiques descriptives pour chaque paramètre sont présentées au Tableau 35 de l'annexe 8 et les résultats complets de l'ANOVA, au Tableau 36 de la même annexe. Notons qu'aux lignes 1, 2, 3 et total du tableau correspondent les statistiques se

rapportant respectivement aux milieux faiblement, fortement, moyennement contaminés et sur l'ensemble de ces groupes.

Tableau 24 : Tableau récapitulatif des analyses ANOVA selon le niveau de contamination des groupes de station

Paramètre	Différence significative ($\alpha=0,05$)	Moyenne et intervalle de confiance (IC) à 95 %		
		Contamination faible (f)*	Contamination moyenne (m)*	Contamination forte (F)*
Microcystine ($\mu\text{g/L}$)	Oui : f-m-F	0,19 (0,18-0,20)	0,63 (0,30-0,95)	1,66 (1,24-2,08)
Phycocyanine (RFU)	Oui : f-m-F	0,006 (0,005-0,007)	0,051 (0,011-0,090)	0,108 (0,046-0,17)
Chlorophylle (RFU) (fluorimétrie)	Oui : (f-m)**-F	4,90 (4,56-5,23)	6,93 (5,22-8,65)	14,67 (11,98-17,35)
Pc/Chl	Oui : f-(m-F)**	0,16 (0,12-0,19)	0,49 (0,31-0,66)	0,58 (0,40-0,77)
Transparence (m)	Oui : (f-m)**-F	1,13 (1,11-1,15)	1,02 (0,92-1,13)	0,59 (0,47-0,71)
Température ($^{\circ}\text{C}$)	Non	20,5 (20,1-20,8)	20,3 (19,2-21,4)	20,8 (19,6-22,0)
Saturation en oxygène (%)	Oui : (f-m)**-F	97,4 (95,9-98,9)	93,6 (89,2-98,1)	108,31 (98,8-117,9)
Oxygène dissous (mg/L)	Oui : (f-m)**-F	8,82 (8,67-8,97)	8,51 (8,05-8,98)	9,71 (8,93-10,48)
pH	Oui : (f-m)**-F	7,79 (7,75-7,83)	7,63 (7,50-7,77)	8,48 (8,21-8,75)
TDS (ppm)	Non	0,092 (0,089-0,096)	0,090 (0,087-0,092)	0,10 (0,097-0,11)
Conductivité ($\mu\text{S/cm}$)	Non	129 (124-134)	125 (122-128)	143 (137-149)
Coliformes totaux (colonies/100mL)	Oui : (f-m)*-F	342 (281-403)	482 (256-708)	657 (415-899)
<i>E. coli</i> (colonies/100mL)	Non	37 (22-53)	65 (0-134)	63 (29-98)
Turbidité (UTN)	Oui : f-m-F	8,13 (7,60-8,65)	14,05 (9,64-18,46)	35,84 (28,29-43,39)
Phosphore (mg/L)	Oui : (f-m)**-F	0,022 (0,019-0,025)	0,033 (0,024-0,043)	0,098 (0,033-0,16)
Chlorophylle a extraite ($\mu\text{g/L}$)	Oui : (f-m)**-F	2,34 (2,00-2,68)	10,04 (0-23,97)	36,21 (20,13-52,29)
NH_4 (mgN/L)	Non	0,08 (0,05-0,11)	0,06 (0,01-0,11)	0,13 (0,03-0,23)
NTK (mgN/L)	Oui : (f-m)**-F	0,17 (0,13-0,21)	0,18 (0,08-0,29)	1,04 (0,34-1,73)
COT (mg/L)	Non	6,38 (5,78-6,99)	6,71 (5,66-7,76)	8,63 (6,04-11,22)

*f, m et F représentent respectivement les stations dont la concentration en microcystines et en phycocyanine est faible (0,18-0,20 $\mu\text{g/L}$; 0,005-0,007 RFU), moyenne (0,30-0,95 $\mu\text{g/L}$; 0,011-0,090 RFU) et forte (1,24-2,08 $\mu\text{g/L}$; 0,046-0,17 RFU) selon un intervalle de confiance à 95 %.

**Aucune différence significative entre les groupes entre parenthèses.

D'après l'analyse ANOVA effectuée, les 25 stations ont été regroupées selon qu'elles étaient faiblement, moyennement ou fortement contaminées par les cyanobactéries. Rappelons que les stations ont été regroupées selon la concentration de microcystines et de la phycocyanine (voir le Tableau 24) et que ces deux paramètres sont statistiquement différents pour chacun des groupes. Les caractéristiques de chaque groupe sont présentées ci-dessous.

11.2.1 Stations faiblement contaminées par les cyanobactéries

Les stations faiblement contaminées sont caractérisées par une concentration faible des microcystines (IC : 0,18 et 0,20 µg/L) et très faible, voire nulle, de phycocyanine (IC : 0,005 - 0,007 RFU). La concentration en chlorophylle mesurée par fluorimétrie est également faible (IC : 4,56 - 5,23 RFU). Le rapport de la phycocyanine sur la chlorophylle est également très faible (IC : 0,12 - 0,19). La transparence est élevée (IC : 1,11 - 1,15 m), la saturation en oxygène moyenne en surface se situe légèrement sous 100 % (IC : 95,9 - 98,9 %) et le pH est légèrement alcalin (IC : 7,75 - 7,83). La concentration en coliformes totaux est faible (IC : 281 - 403 colonies par 100 mL). La turbidité est également faible (IC : 7,60 - 8,65 UTN). Les éléments nutritifs ont des concentrations relativement faibles (voir le Tableau 24).

11.2.2 Stations moyennement contaminées par les cyanobactéries

Les stations moyennement contaminées sont caractérisées par une concentration moyenne des microcystines (IC : 0,30 - 0,95 µg/L), soit en dessous de la CMA (1,5 µg/L de microcystine-LR) pour l'eau potable (Tableau 24). La concentration en phycocyanine se situe à mi-chemin entre les stations faiblement et fortement affectées (IC : 0,011 - 0,090 RFU) tout comme la turbidité (IC : 9,64 - 18,46 UTN). La concentration en chlorophylle mesurée par fluorimétrie (IC : 5,22 - 8,65 RFU) est proche de celle mesurée dans les stations faiblement contaminées. Comme pour les stations faiblement contaminées, la transparence est élevée (IC : 0,92 - 1,13 m), la saturation en oxygène en surface se situe légèrement sous 100 % (IC : 89,2 - 98,1 %) et le pH est légèrement alcalin (IC : 7,50 - 7,77). La concentration des coliformes totaux est également faible (IC : 256 - 708 colonies par 100 mL). Les éléments nutritifs ont des concentrations relativement faibles (voir le Tableau 24), semblables à celles mesurées aux stations peu contaminées.

Cependant, comme pour les stations fortement contaminées, le rapport de la concentration phycocyanine sur celle de chlorophylle est élevé (IC : 0,31 - 0,66).

11.2.3 Stations fortement contaminées par les cyanobactéries

Les stations fortement contaminées par les cyanobactéries sont caractérisées par une concentration élevée des microcystines (IC : 1,24 - 2,08 µg/L) avec une moyenne de 1,66 µg/L soit au dessus de la CMA pour l'eau potable. La concentration en phycocyanine se veut également très élevée avec une moyenne de 0,108 RFU (IC 0,046-0,17 RFU). La concentration moyenne en chlorophylle mesurée par fluorimétrie est plus du double de celle mesurée dans les stations faiblement et moyennement contaminées (moyenne : 14,67 mg/L ; IC : 11,98-17,35 mg/L). Le rapport de la concentration de phycocyanine sur celle de chlorophylle est élevé (IC : 0,40-0,77). La transparence est faible (IC : 0,47-0,71 m), la saturation en oxygène moyenne en surface se situe au dessus de 100 % (moyenne : 108,31 %, IC : 98,8-117,9 %) et le pH est très alcalin avec une moyenne de 8,48 (IC : 8,21-8,75). La concentration en coliformes totaux est plus élevée qu'aux stations des autres groupes avec une moyenne de 657 colonies par 100 mL (IC : 415-899). La turbidité est supérieure à celle des autres groupes avec une moyenne de 35,84 UTN (IC : 28,29-43,39 UTN). Le phosphore et l'azote (mesuré en NTK) présentent des concentrations supérieures à celles mesurées dans les autres groupes avec des moyennes respectivement de 0,098 mg/L (IC : 0,033-0,16 mg/L) et 1,04 mg/L (IC : 0,34-1,73 mg/L).

11.3 Analyse en composantes principales (ACP)

L'objectif de cette analyse est de visualiser la dispersion des observations et les tendances générales des paramètres ainsi que des stations échantillonnées. L'analyse consiste à regrouper les paramètres sous forme de composantes afin de réduire le nombre de données à analyser. Selon les paramètres qui forment ces composantes, celles-ci peuvent ensuite être définies comme un groupe. Par exemple, une composante formée du pH, de la saturation en oxygène et de la conductivité pourrait être définie comme la composante des paramètres physicochimiques de l'eau.

Notons que les stations AYL-1-24 et GSF-1-23 n'ont pu être prises en compte dans cette analyse puisque les mesures des paramètres physicochimiques n'y ont pas été effectuées. De plus, les paramètres de phosphore, de chlorophylle extraite, d'azote ammoniacal, de nitrite, de

nitrate, d'azote total Kjeldahl (NTK) et de carbone organique total n'ont pu être analysés en raison du manque de donnée.

Suite à l'analyse ACP, trois composantes principales ont été retenues. Il s'agit des trois composantes ayant une valeur propre (*eigenvalue*) de plus de 1 comme présenté dans le Tableau 37 de l'annexe 9. Le Tableau 25 présente la contribution de chaque paramètre à la formation des trois composantes principales de l'analyse ACP.

Tableau 25 : Contribution de chaque paramètre à la formation des trois composantes principales de l'analyse ACP

Paramètres	Composantes		
	1	2	3
Turbidité	0,844	0,078	0,311
Chlorophylle (fluorimétrie)	0,837	0,072	0,024
Phycocyanine	0,799	0,137	0,021
Transparence	-0,78	-0,147	-0,363
Microcystine	0,536	0,227	-0,188
Conductivité	-0,117	0,848	0,111
pH	0,399	0,773	-0,028
Saturation en oxygène	0,326	0,556	-0,146
E. coli	0,091	0,05	0,825
Coliformes totaux	0,072	-0,083	0,802

La composante 1 est formée principalement de la turbidité, de la concentration de chlorophylle de la concentration de phycocyanine, de la transparence de l'eau et de la concentration en microcystines. Il est possible de la définir comme la composante représentant la productivité primaire. En effet, la concentration de la phycocyanine et des microcystines est liée à l'abondance des cyanobactéries, la concentration de chlorophylle représente l'abondance du phytoplancton et la turbidité et la transparence sont fortement influencées par la productivité primaire.

La composante 2 est principalement formée de la conductivité, du pH et de la saturation en oxygène. Elle représente les caractéristiques physicochimiques de l'eau.

La composante 3 est principalement formée des *E. coli* et des coliformes totaux. Elle représente les caractéristiques bactériologiques de l'eau.

Le Tableau 26 présente la variance totale expliquée par chaque composante (voir le Tableau 37 de l'annexe 9)

Tableau 26 : Variance totale et variance totale cumulative expliquées par les trois composantes principales de l'ACP

Composante	Variance totale expliquée (%)	Variance totale expliquée cumulative (%)
1	32,4	32,4
2	17,4	49,8
3	16,2	66,0

Ensemble, les trois composantes principales expliquent, 66 % de la variance des observations. Voyons que la composante 1 explique 32,4 % de la variance des observations et que les composantes 1 et 2 en expliquent 49,8 %.

La Figure 13 présente chacun des paramètres étudiés en ACP sous forme de vecteurs positionnés sur un graphique où l'abscisse représente la composante 1 et l'ordonnée, la composante 2. Notons que les paramètres de la température, de l'oxygène dissous et du TDS ont été exclus de l'analyse en raison de leur trop forte corrélation avec d'autres paramètres.

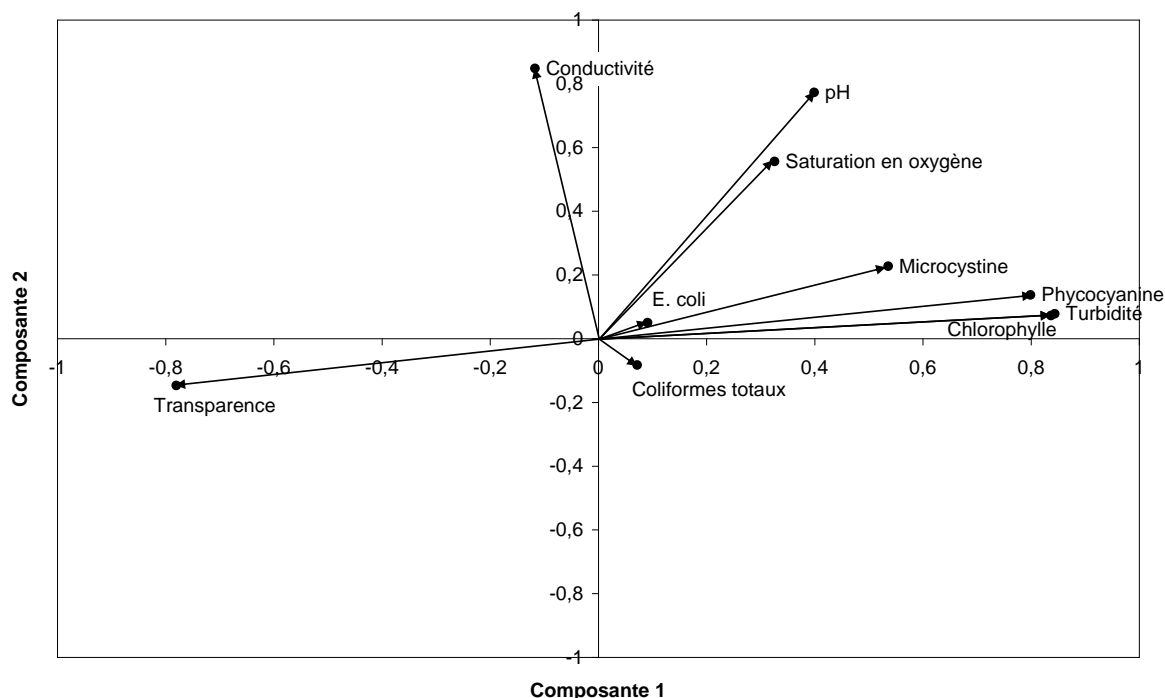


Figure 13 : Représentation graphique des vecteurs de l'ACP pour les composantes 1 et 2

Les vecteurs de la concentration de phycocyanine, de la turbidité de l'eau et de la concentration de chlorophylle sont étroitement corrélés et forment l'essentiel de la composante 1. Cette forte corrélation est illustrée par la proximité de ces vecteurs et de l'axe des x sur la Figure 13. Ces résultats indiquent que les trois paramètres vont dans le même sens et qu'ils sont du même ordre de grandeur. La transparence est également très corrélée avec la composante 1, mais se trouve dans le cadran opposé, signifiant qu'elle varie à l'inverse des autres vecteurs formant la composante 1. Lorsque la turbidité, la concentration de chlorophylle et/ou la concentration de phycocyanine augmentent, la transparence tend à diminuer.

Quant à la composante 2, la conductivité représente le vecteur principal de celle-ci comme illustré par la proximité de ce vecteur et de l'ordonnée (voir la Figure 13).

Bien que la saturation en oxygène et le pH entrent principalement dans la construction de la composante 2, les vecteurs représentant ces paramètres sont à mi-chemin entre la composante 1 et 2 (voir la Figure 13). Cela signifie que ces paramètres physicochimiques peuvent être influencés par la présence du phytoplancton et des cyanobactéries.

Les *E. coli* ainsi que les coliformes totaux sont associés à la composante 3 et ne sont que peu représentés dans ce graphique. Notons que ces deux derniers paramètres ne contribuent que très faiblement à la construction des composantes 1 et 2. Puisque, contrairement à la composante 3, les composantes 1 et 2 sont fortement associées aux paramètres ciblés, soit la concentration de phycocyanine et des microcystines (voir le Tableau 25), les graphiques représentant la composante 3 ne sont pas présentés ici.

Il est d'ailleurs pertinent d'observer les vecteurs des paramètres ciblés, plus particulièrement celui de la concentration en microcystines. Comme illustré à la Figure 13, la concentration des microcystines est grandement liée à la concentration de la phycocyanine, à la turbidité de l'eau et à la concentration de chlorophylle. Selon la Figure 13, la composante 1 représente la productivité primaire. La concentration des microcystines semble donc influencée principalement par celle-ci. Par contre, le vecteur des microcystines se retrouve également près du vecteur de la saturation en oxygène signifiant qu'un lien possible existe entre les deux paramètres.

Dans un autre ordre d'idée, il est intéressant d'observer la distribution des stations d'échantillonnage sur le graphique formé par les deux composantes principales. Cette distribution permet de visualiser les liens qui existent entre les observations faites à chaque station et les composantes principales. Plus la station se situe près d'un des axes et éloignée du centre, plus les observations faites à cette station ont contribué à générer la composante associée à cet axe. La Figure 14 présente la position des stations échantillonnées selon la composante 1 sur l'abscisse et la composante 2 sur l'ordonnée.

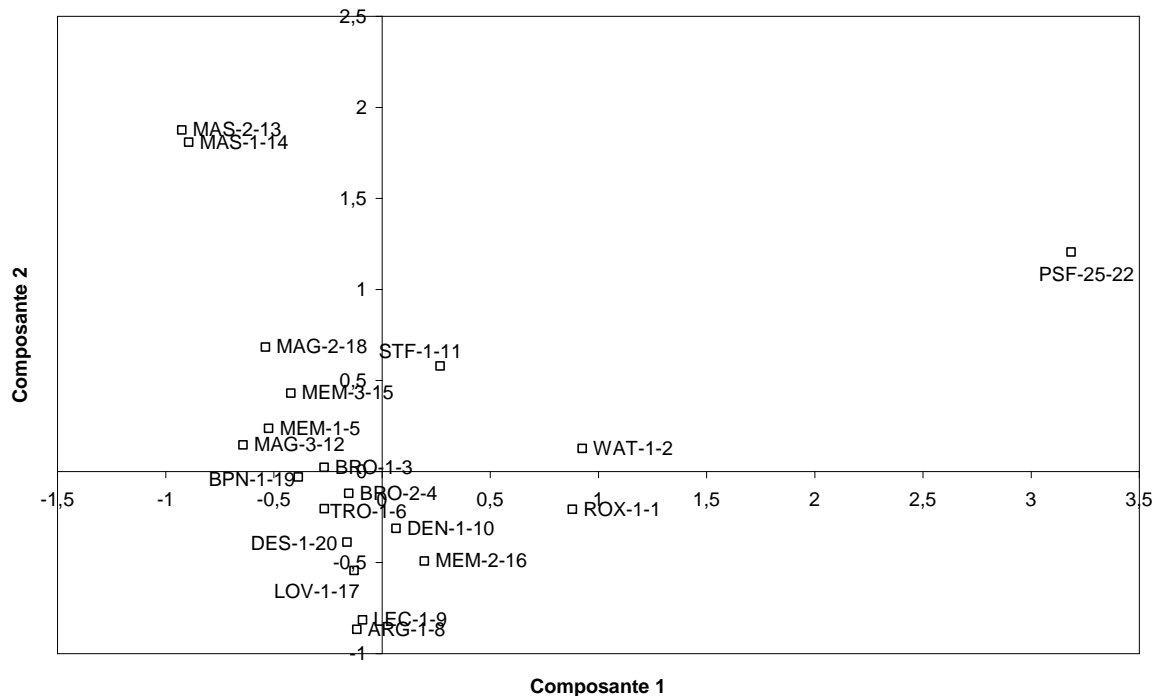


Figure 14 : Représentation graphique des stations d'échantillonnage en fonction des composantes 1 et 2

En comparant la Figure 13 et la Figure 14, on constate que les observations faites aux stations PSF-25-22 et WAT-1-2 ont une grande influence sur la composante 1 et, par le fait même, sur les vecteurs de la concentration des microcystines, de la concentration de phycocyanine, de la turbidité, de la concentration de chlorophylle ainsi que de la transparence. En effet, les mesures prises à ces stations étaient toujours caractérisées par de fortes concentrations en phycocyanine et en chlorophylle, lesquelles sont associées à une turbidité de l'eau élevée et une transparence faible.

Les mesures de conductivité faites aux stations MAS-1-14 et MAS-2-13 étaient toujours élevées. Cette situation est mise en évidence lorsqu'on compare la position de ces stations par rapport au vecteur de la conductivité. Les autres stations sont situées surtout au centre du graphique signifiant que leur contribution à la composition des composantes est certainement moindre que celle des stations citées en premier.

11.4 Corrélations avec la concentration en microcystines

Les Tableau 39, Tableau 40, Tableau 41 et Tableau 42 produits dans l'Annexe 10 présentent les corrélations statistiques entre les différents paramètres étudiés. Ces tableaux montrent respectivement la corrélation de Pearson (linéaire), la corrélation non paramétrique de Spearman, la corrélation de Pearson entre la concentration en microcystines et le logarithme des paramètres et la corrélation entre le logarithme de la concentration en microcystines et les paramètres étudiés. Un résumé des corrélations entre la concentration en microcystines et les paramètres mesurés est présenté dans le Tableau 27. Seules les corrélations significatives à $\alpha = 0,01$ ont été retenues.

Tableau 27 : Description des corrélations entre la concentration en microcystines et les paramètres mesurés

Paramètre	N	Coefficient de corrélation	Sens	Relation
Phycocyanine	462	0,570	+	Logarithmique
Chlorophylle (fluorimétrie)	462	0,434	+	Linéaire
Transparence	437	-0,362	-	Exponentielle
Température de l'eau	442	0,249	+	Non paramétrique
Saturation en oxygène	437	0,227	+	Linéaire
Oxygène dissous	437	0,166	+	Linéaire
pH	438	0,372	+	Linéaire
TDS	438	0,171	+	Non paramétrique
Conductivité	438	0,226	+	Non paramétrique
E. coli	455	0,162	+	Non paramétrique
Turbidité	370	0,410	+	Linéaire
Phosphore	92	0,642	+	Linéaire
Chlorophylle (extraite)	227	0,682	+	Logarithmique
NH ₄	92	0,292	+	Non paramétrique
NTK	92	0,757	+	Linéaire
COT	92	0,402	+	Linéaire

Les corrélations les plus fortes entre la concentration des microcystines et les autres paramètres ont été calculées avec la concentration de phycocyanine, de phosphore, de chlorophylle extraite ainsi que du NTK. Notons que l'effectif des observations pour la concentration de phycocyanine est nettement supérieur (N=462) à celui de la concentration de chlorophylle extraite (N=227) et à celui des autres paramètres mentionnés (N=92).

Les concentrations de phycocyanine et de chlorophylle *a* extraite varient positivement de façon logarithmique avec la concentration en microcystines. Les concentrations du phosphore et du NTK varient positivement de façon linéaire avec la concentration en microcystines. La corrélation la plus forte est avec NTK.

Toutes les corrélations sont positives et varient donc dans le même sens que la concentration en microcystines, excepté la transparence de l'eau qui, elle, varie inversement.

11.4.1 Autres corrélations

Comme l'indiquent les Tableau 39, Tableau 40, Tableau 41 et Tableau 42 de l'Annexe 10, plusieurs paramètres sont étroitement corrélés entre eux. Certaines de ces corrélations peuvent être expliquées par le fait que les paramètres ne sont pas tous indépendants. Par exemple, la transparence et la turbidité de l'eau constituent des mesures de pénétration de la lumière dans l'eau et ne sont donc pas des variables indépendantes. Il en est de même pour la saturation en oxygène et l'oxygène dissous ainsi que les paramètres qui ont des composantes communes (e.g. PC/Chl et chlorophylle extraite).

La concentration de phycocyanine est positivement corrélée avec la concentration de chlorophylle extraite ainsi qu'avec le NTK. La concentration en chlorophylle mesurée en fluorimétrie est fortement corrélée avec la turbidité. Les MES, la conductivité et la concentration de NO₂ et NO₃ sont tous fortement corrélés ensemble.

11.5 Modèles prévisionnels pour la quantification des microcystines

L'objectif de cette analyse est d'élaborer un modèle de prévision de la concentration des microcystines avec les données pouvant être prises directement sur le site. À partir des données amassées au cours de l'étude, deux modèles visant la quantification des microcystines ont été créés. Le modèle A a été construit uniquement à partir des données sur la concentration de phycocyanine et le modèle B, avec les observations faites sur la concentration de phycocyanine et la saturation en oxygène. Les variables retenues pour l'élaboration du modèle sont celles ayant un impact statistiquement significatif sur la concentration en microcystines comme cela a été déterminé lors des analyses en ACP et des analyses de corrélation dans les sections 11.3 et 11.4 . Les paramètres qui ont été mesurés de façon sporadique (P, NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺, NTK et chlorophylle a) ont été exclus de l'analyse en raison du nombre limité des données recueillies.

Notons que lors de l'élaboration de ces modèles, le logarithme de la concentration de phycocyanine, ainsi que la saturation en oxygène représentaient les facteurs les plus importants. Cependant, le modèle bâti avec le logarithme de la concentration de phycocyanine uniquement avait un meilleur coefficient de corrélation. Cette situation est due au fait que,

contrairement au modèle B, les observations faites à la station AYL-1-24 et à la station GSF-1-23 ont pu être intégrées (voir la section 10.1 du présent document).

11.5.1 Modèle A

Quand est prise en compte la totalité des observations faites, le modèle A met en évidence la relation qui existe entre la concentration de phycocyanine et celle des microcystines. Le modèle est représenté par l'équation suivante.

Équation 1 : Modèle quantitatif A

$$\text{Concentration des microcystines} = 2,271 + 0,856(\log_{10} \text{de la concentration en phycocyanine})$$

La concentration en microcystines est exprimée en µg/L et la concentration en phycocyanine est exprimée en unité de fluorescence relative (RFU).

Le coefficient de corrélation entre le modèle et la concentration réelle des microcystines est $R = 0,570$ et le coefficient de détermination est $R^2 = 0,325$. L'effectif utilisé pour ce modèle est de $N=462$.

Les détails de ce modèle sont présentés dans le Tableau 43 et le Tableau 44 de l'annexe 11.

La Figure 15 présente la concentration en microcystines en fonction du logarithme de la concentration de phycocyanine.

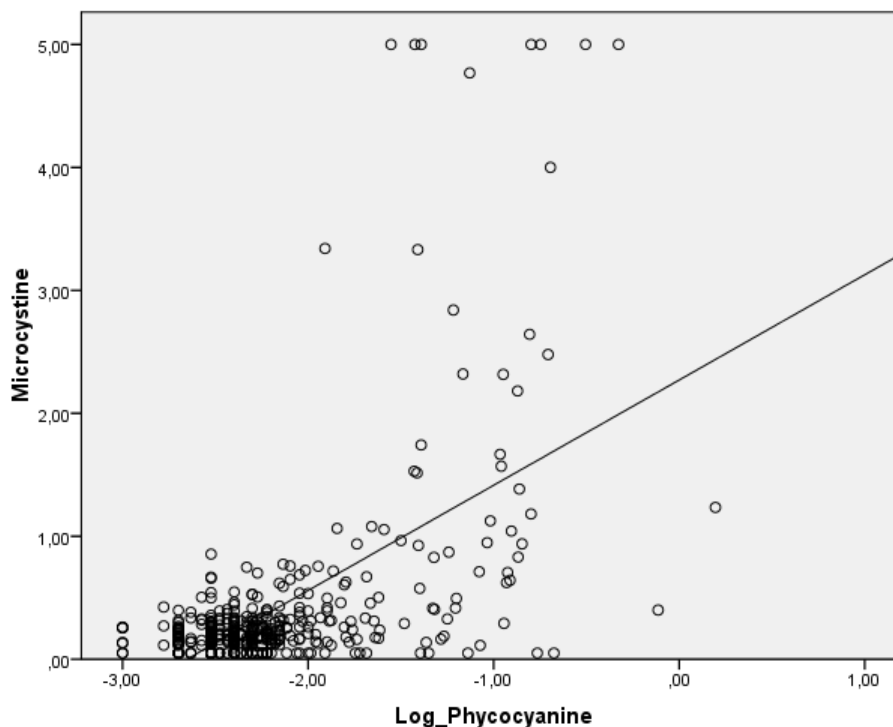


Figure 15 : Concentration en microcystines en fonction du logarithme de phycocyanine et droite représentant le modèle quantitatif A

La droite représentant le modèle quantitatif est construite à partir de l'équation présentée précédemment. Une analyse plus approfondie de la relation entre ces deux variables a permis de constater que des modèles basés sur des régressions non-linéaires de type cubique et quadratique permettaient d'obtenir un coefficient de corrélation plus grand que pour le modèle linéaire. Néanmoins, le modèle linéaire a été retenu puisque, pour les autres modèles, il y avait décroissance des valeurs de logPhycocyanine lorsque la concentration de microcystine était élevée, ce qui est difficilement explicable physiquement.

Il faut noter que le modèle A ne suit pas les règles d'homocédasticité. La figure 16 présente les valeurs résiduelles standardisées en fonction de la valeur de la variable explicative.

Résidus standardisés du modèle A en fonction de la variable explicative

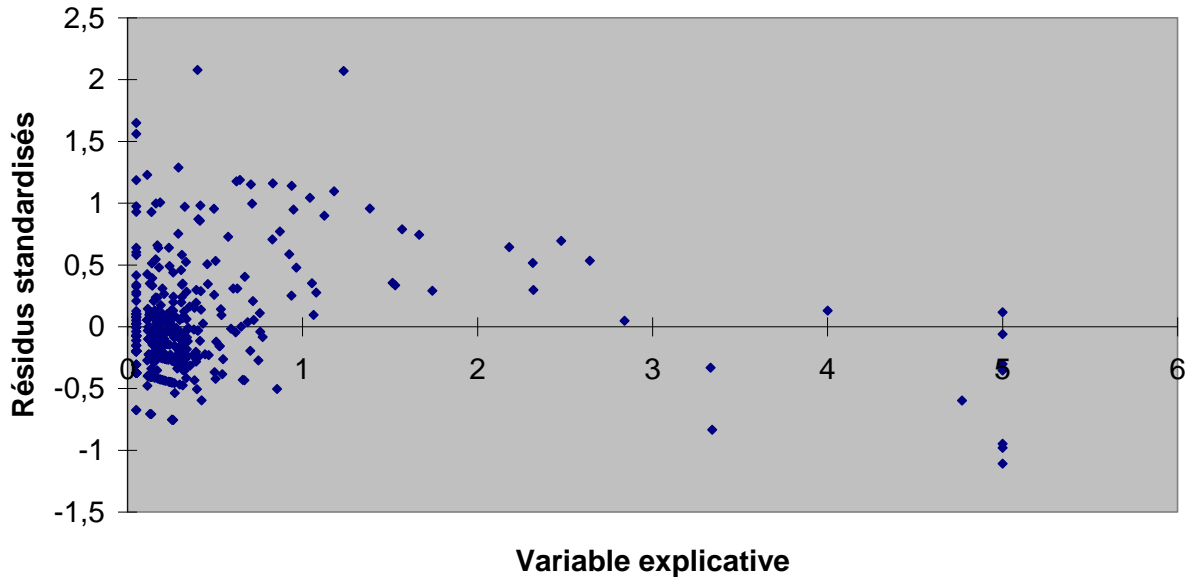


Figure 17: Valeurs résiduelles standardisées du modèle A en fonction de la valeur de la variable explicative

La présence d'un effet quadratique sur la figure précédente montre que le modèle A ne suit pas les règles d'homocédasticité puisque les valeurs résiduelles en fonction de la variable explicative ne sont pas uniformément distribuées autour de zéro (0). Sur l'axe des X, entre les valeurs 1 et 3, toutes les valeurs résiduelles se situent au-dessus de zéro, alors qu'entre les valeurs 9 à 11, elles se situent en grande majorité au-dessous de zéro (0). En général, le modèle sous-estime les concentrations de microcystines.

Les valeurs résiduelles représentent les différences entre les valeurs théoriques de concentration des microcystines (obtenus à partir du modèle A) et les concentrations réelles de microcystines. La Figure 18 présente les valeurs résiduelles non standardisées (i.e. des données non transformées) en fonction de la concentration en microcystines.

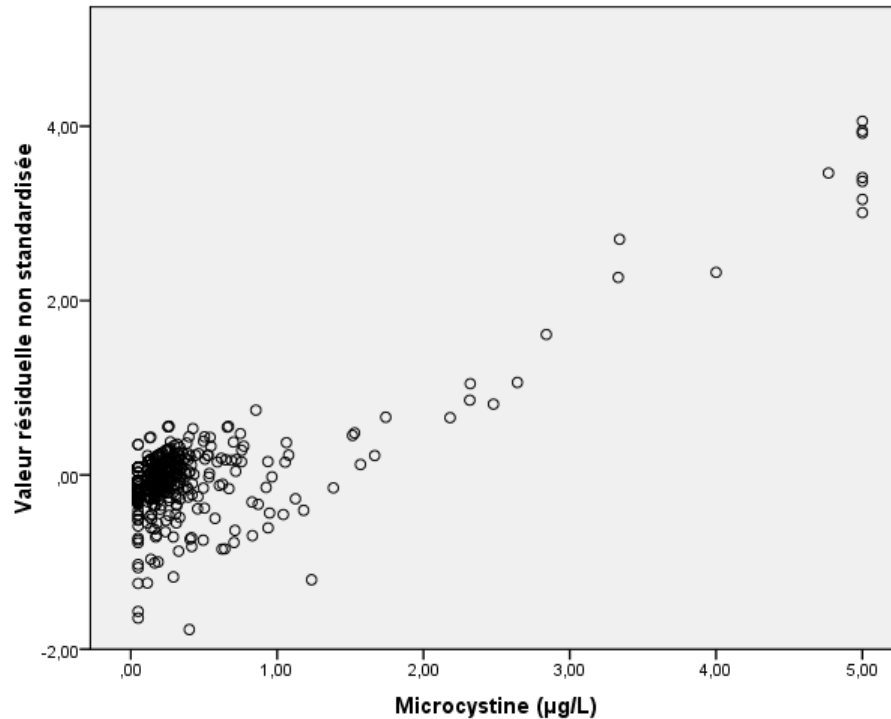


Figure 18 : Valeurs résiduelles non standardisées en fonction de la concentration en microcystines pour le modèle quantitatif A

Les valeurs résiduelles tendent à augmenter avec la concentration en microcystines. Dans le cas où les concentrations de microcystines sont faibles ou proches de 0, les valeurs résiduelles peuvent atteindre presque -2,00, signifiant qu'à quelques occasions le modèle peut surestimer la concentration de toxines. En ce qui a trait aux concentrations élevées de microcystines, les valeurs résiduelles peuvent atteindre 4,00, signifiant qu'une sous-évaluation importante est possible. Rappelons que la limite supérieure de quantification des trousseuses ELISA utilisées pour mesurer la concentration des microcystines est de 5 µg/L. Ceci implique que les échantillons dans lesquels la concentration de microcystines était de plus de 5 µg/L se sont vus attribuer une valeur de 5 µg/L. Cette limitation engendre nécessairement des erreurs lors de l'élaboration des modèles quantitatifs.

11.5.2 Modèle B

Le deuxième modèle met en évidence l'importance de la concentration de phycocyanine et de la saturation en oxygène. L'équation suivante décrit cette relation.

Équation 2 : Modèle quantitatif B

$$\text{Concentration des microcystines} = 1,491 + 0,747(\log_{10} \text{ de la concentration de phycocyanine}) + 0,005(\text{saturation en oxygène})$$

La concentration en microcystines est exprimée en µg/L, la concentration de phycocyanine en RFU et la saturation en oxygène en pourcentage (%).

Le coefficient de corrélation entre le modèle et la concentration réelle des microcystines est $R = 0,551$ et le coefficient de détermination, $R^2 = 0,303$. L'effectif utilisé ici est de $N=437$.

Il faut noter que ce modèle aussi ne suit pas les règles d'homocédasticité. Une analyse plus approfondie n'a pas permis de déterminer si une relation de type non-linéaire permettait d'obtenir un coefficient de corrélation plus grand. Les détails du modèle sont présentés dans le Tableau 45 et le Tableau 46 de l'Annexe 11.

La Figure 19 présente les valeurs résiduelles non standardisées en fonction de la concentration en microcystines.

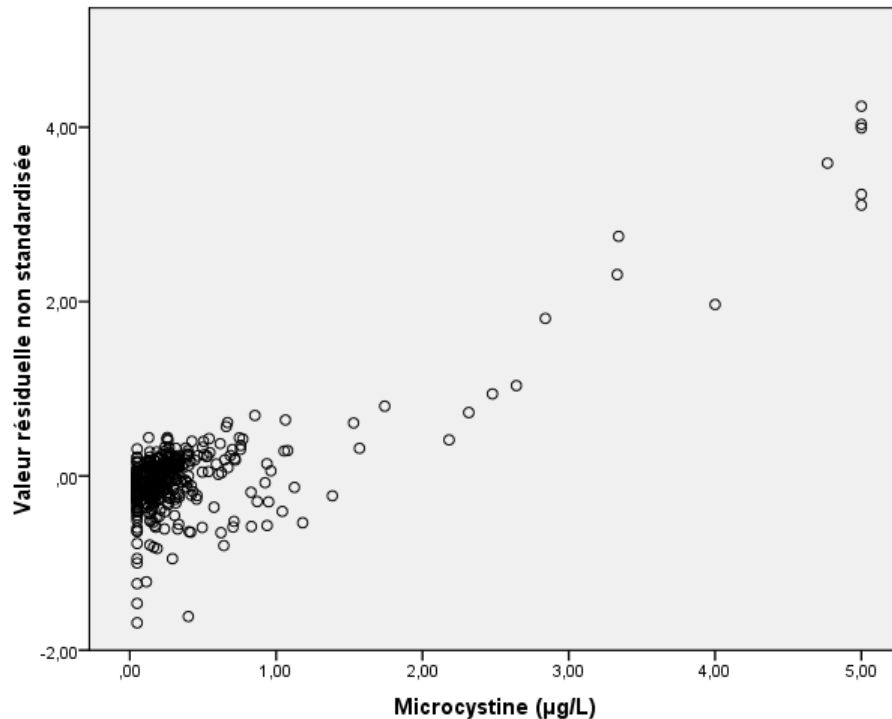


Figure 19 : Valeurs résiduelles non standardisées en fonction de la concentration en microcystines pour le modèle quantitatif B

Comme c'est le cas pour le modèle A, les valeurs résiduelles tendent à augmenter avec la concentration en microcystines. Lorsque les concentrations de microcystines sont de 0 à 0,5 µg/L, les valeurs résiduelles non standardisées peuvent atteindre des valeurs près de -2,00, signifiant qu'à quelques occasions le modèle peut surestimer la concentration des toxines. Quand les concentrations de microcystines sont élevées, les valeurs résiduelles peuvent atteindre 4,00, signifiant qu'une sous-évaluation importante est possible.

11.6 Modèle qualitatif

Afin de déterminer s'il y a un risque potentiel pour la santé humaine lié à la présence des microcystines dans les cours d'eau, un modèle qualitatif a été créé. Celui-ci se base sur les mesures de la concentration de phycocyanine. Il faut se rappeler que la concentration de phycocyanine a été identifiée lors des analyses précédentes comme le paramètre le plus influent sur la concentration des microcystines. Lors de l'élaboration des modèles qualitatifs, la concentration de phycocyanine s'est, une fois de plus, avérée le paramètre le plus indiqué.

L'objectif de ce modèle est de déterminer si, à partir d'un seuil de concentration de phycocyanine, il est possible d'évaluer le risque d'obtenir une concentration de microcystines potentiellement problématique pour la consommation. Afin de déterminer ce seuil, les deux paramètres (concentration des microcystines et logarithme de la concentration de phycocyanine) ont été mis en relation, une droite de tendance a été tracée et la concentration de phycocyanine correspondant à la concentration de microcystines jugée problématique a été déterminée.

À partir des données amassées, un seuil de 0,020 RFU a été établi. Ce seuil correspond à l'intercept de la concentration en microcystines de 1 µg/L lorsqu'une droite de tendance est tracée sur le graphique de la concentration en microcystines en fonction de la concentration de phycocyanine (Figure 20). La concentration des microcystines de 1µg/L correspond à la CMA recommandée par l'OMS (1998) pour l'eau potable.

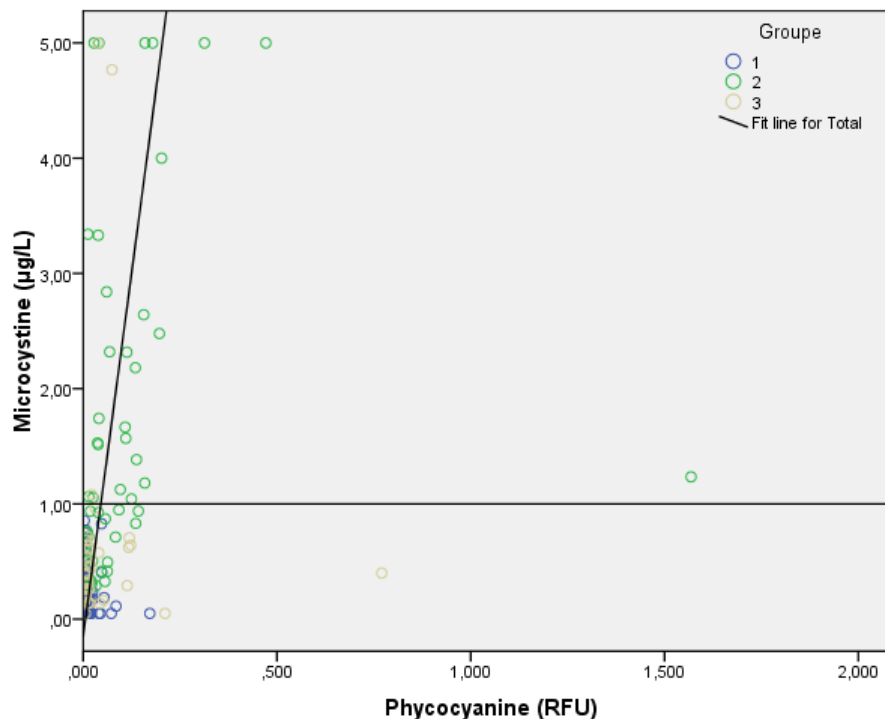


Figure 21 : Concentration des microcystines en fonction de la concentration de phycocyanine

Le Tableau 28 présente la fréquence des observations selon qu'elles sont supérieures ou inférieures aux seuils établis.

Tableau 28 : Fréquences des observations de la concentration de phycocyanine en fonction de la concentration des microcystines selon les seuils établis

Microcystine (µg/L)	Nombre d'observations dont la concentration de phycocyanine (RFU) se situe		
	Entre 0 et 0,02	> 0,02	Total
Entre 0 et 1	394	38	432
> 1	2	28	30
Total	396	66	462

Comme l'indique le Tableau 28, il y a eu 432 observations où la concentration en microcystines était inférieure à 1 µg/L et 30, où elle était supérieure à ce seuil. Il y a eu 396 observations où la concentration de phycocyanine était inférieure à 0,02 RFU et 66 où elle était supérieure à ce seuil.

Le Tableau 29 fait voir les fréquences en pourcentage du nombre total des observations de concentration de phycocyanine.

Tableau 29 : Fréquences relatives des observations de la concentration de phycocyanine en fonction de la concentration des microcystines selon les seuils établis

Microcystine (µg/L)	Phycocyanine (RFU)		
		Entre 0 et 0,02	> 0,02
	Entre 0 et 1	99,5%	57,6%
	> 1	0,05%	42,4%

Ce tableau démontre que lorsque la concentration de phycocyanine est inférieure à 0,02 RFU, dans 99,5 % des cas, la concentration des microcystines est inférieure à 1 µg/L alors qu'elle est supérieure dans 0,05 % des cas. Lorsque la concentration de phycocyanine est supérieure à 0,02 RFU, dans 42,4 % des cas, la concentration en microcystines est supérieure à 1 µg/L alors qu'elle est inférieure dans 57,6 % des cas.

12 Discussion

12.1 Caractérisation des milieux faiblement, moyennement et fortement contaminés par les cyanobactéries

Les trois groupes sont significativement différents ($\alpha=0,05$) pour leur concentration de microcystines, leur concentration de phycocyanine et leur turbidité. Pour ces trois paramètres, les valeurs observées tendent à être plus élevées pour les stations fortement contaminées par les cyanobactéries et plus basses pour les stations faiblement contaminées, les valeurs des stations moyennement contaminées se situant entre les deux autres groupes. Ainsi, ces trois paramètres représentent de bons indicateurs du niveau de contamination par les cyanobactéries et permettent de distinguer les milieux faiblement, moyennement et fortement contaminés.

Le rapport de la concentration phycocyanine sur celle de la chlorophylle mesurée en fluorimétrie (Pc/Chl) est significativement différent pour les stations faiblement contaminées par rapport aux deux autres groupes. Par contre, il n'est pas possible de distinguer les stations moyennement contaminées de celles fortement contaminées en se basant sur ce paramètre.

Ces résultats illustrent que les milieux faiblement contaminés ne sont pas dominés par les cyanobactéries contrairement aux milieux moyennement et fortement contaminés où les cyanobactéries dominent la communauté phytoplanctonique.

Pour les paramètres de la chlorophylle totale mesurée en fluorimétrie, de la transparence, de la saturation en oxygène, de l'oxygène dissous, du pH, des coliformes totaux, du phosphore, de la chlorophylle extraite et du NTK, il existe une différence significative entre les stations fortement contaminées et les deux autres groupes. Par contre, il n'est pas possible de distinguer les stations faiblement et moyennement contaminées selon ces paramètres.

Pour tous les autres paramètres, il n'existe pas de différences significatives entre les groupes.

Notons que les résultats obtenus avec l'analyse ANOVA sont en accord avec ceux obtenus par les coefficients de corrélation. En effet, les paramètres ayant de fortes corrélations avec la concentration de microcystines sont généralement les mêmes qui permettent de distinguer les stations faiblement, moyennement et fortement contaminées par les cyanobactéries.

12.2 ACP et corrélations

Un des objectifs des analyses d'ACP et des analyses de corrélations est de déterminer quelles variables sont les plus corrélées avec la concentration des microcystines. Il est également possible d'observer les variations des paramètres les uns par rapport aux autres. D'autre part, ces analyses permettent d'exclure certaines variables des analyses parce qu'elles sont trop corrélées ensemble. Ainsi, les paramètres très corrélés sont exclus afin de réduire le nombre de paramètres à analyser et d'éviter une certaine redondance dans les résultats. Par exemple, les paramètres de l'oxygène dissous, de la température de l'eau et des TDS ont été exclus à la suite de l'analyse anti-image effectuée lors de l'analyse ACP. Notons que les paramètres retenus pour cette analyse sont peu corrélés entre eux (Tableau 38 de l'annexe 9).

Les paramètres représentés dans la composante 1 de l'ACP (voir Tableau 25) sont également ceux qui sont le plus corrélés avec la concentration en microcystines. Comme il a été souligné précédemment, cette composante représente la présence du phytoplancton et des cyanobactéries. En effet, la concentration de phycocyanine représente l'abondance des cyanobactéries puisque ce pigment est présent chez celles-ci, comme le soutiennent Brient *et al.* (2008) et la concentration de chlorophylle représente l'abondance du phytoplancton

puisque ce pigment est présent chez la communauté phytoplanctonique en général (Brient *et al.*, 2004). La turbidité et la transparence font également partie de la composante 1 parce qu'ils sont fortement influencés par l'abondance des cyanobactéries et du phytoplancton (MDDEP, 2007 ; MDDEP, 2000 ; Mur *et al.*, 1999 ; Brient *et al.*, 2004).

En somme, la concentration de phycocyanine et de chlorophylle ainsi que la transparence et la turbidité de l'eau sont liées à la concentration en microcystines. Les paramètres principaux de la composante 1 sont donc des éléments à prendre en compte lors d'un suivi des cyanobactéries. On pourrait, par contre, supposer que comme la concentration de phycocyanine, la concentration de chlorophylle et la turbidité de l'eau sont très étroitement corrélées, la chlorophylle et la turbidité pourrait constituer un biais à la lecture de la concentration en phycocyanine par fluorimétrie. En effet, les mesures par fluorimétrie *in vivo* sont basées sur une lecture optique d'un échantillon, sans extraction ou traitement préalable de l'échantillon. La présence de matériaux pouvant influencer la diffusion de la lumière dans l'échantillon est donc susceptible de fausser les résultats des mesures de la concentration de phycocyanine. D'ailleurs, ces sources d'erreurs ont été précédemment identifiées (Prévost, 2009) .

Notons, que dans l'ACP, les vecteurs de la saturation en oxygène et du pH sont près de ceux des paramètres de la composante 1 (voir Figure 13). Cela peut signifier que ces paramètres sont influencés par la présence des cyanobactéries. En effet, la productivité primaire peut provoquer une sursaturation de l'oxygène à la surface de l'eau (Huot, 2009). À la station PSF-25-22, une lecture de la saturation en oxygène d'un peu moins de 200 % a été effectuée le 8 juillet 2008. Durant la première moitié de la période d'échantillonnage, la saturation en oxygène à cette station était systématiquement supérieure à 100 %. Or, à cette station, les concentrations de chlorophylle *a* et de phycocyanine étaient toujours très supérieures à la moyenne des autres stations.

Le pH peut être influencé par une multitude de facteurs environnementaux. À la station PSF-25-22 par exemple, le pH était très alcalin. Cette situation pourrait être expliquée en partie par la forte productivité primaire à cette station, l'abondance des cyanobactéries entraînant une augmentation du pH de l'eau (Lavoie *et al.*, 2007). Par contre, aux stations MAS-1-14 et MAS-2-13, le pH élevé ne peut être expliqué par la productivité primaire, relativement faible pour

ces stations. Les caractéristiques géologiques de la région pourraient expliquer le pH élevé à ces stations.

En plus de valider les observations faites en ACP, les corrélations entre les paramètres étudiés permettent de vérifier le lien qui existe entre ceux-ci. De plus, les paramètres mesurés sporadiquement au cours de l'étude n'ont pu être analysés en ACP, alors qu'ils le sont avec les corrélations. Ainsi le phosphore et le NTK sont fortement corrélés avec la concentration en microcystines. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Downing *et al.*, (2005). Le phosphore est généralement l'élément limitant la prolifération du phytoplancton et des cyanobactéries en milieu aquatique. À forte concentration en phosphore, on trouve donc généralement plus de phytoplancton et de cyanobactéries (MDDEP, 2000). Notons que les cyanobactéries possèdent une capacité importante de stockage du phosphore (Lavoie *et al.*, 2007). De plus, comme le phosphore a été mesuré dans les échantillons prélevés en zone littorale où ont également été mesurés les paramètres de la concentration de phycocyanine et des microcystines, il est fort probable que la majorité de l'élément nutritif était séquestré dans les cellules de cyanobactéries lorsque présentes. La corrélation entre le phosphore et la concentration en microcystines est de $R = 0,642$. Kotak *et al.* (2002) avaient calculé un coefficient de corrélation de 0,54 entre la concentration en microcystine-LR intracellulaire et la concentration du phosphore. Le coefficient de corrélation calculé entre le NTK et la concentration des microcystines est de $R = 0,757$. Une étude menée par Giani *et al.* (2005) a observé une relation de $R = 0,71$ entre l'azote total et la concentration en microcystines.

Giani *et al.* (2005) associent la forte corrélation entre la concentration des microcystines et l'azote total à l'importance de ce nutriment dans la production des toxines. Notons que les microcystines ainsi que certains pigments comme la phycocyanine contiennent des acides aminés eux-mêmes formés d'azote. Le NTK représentant la somme de la fraction organique de l'azote et de l'azote ammoniacal, un échantillon contenant de fortes concentrations de microcystines et de phycocyanine devrait être caractérisé par une grande concentration de NTK.

La concentration de phycocyanine et de chlorophylle *a* extraite varient positivement avec la concentration en microcystines. Cela signifie qu'à forte concentration en cyanobactéries (lors d'une prolifération excessive ou lorsqu'il y a présence d'écume), les cyanobactéries semblent libérer massivement des microcystines (Blais, 2002).

12.3 Modèles quantitatifs

L'analyse des résultats de cette analyse doit tenir compte que ni le modèle A ni le modèle B ne respecte les conditions statistiques nécessaires à l'utilisation correcte d'un modèle de régression linéaire. Ainsi, les résultats de cette analyse sont ici utilisés afin d'identifier les paramètres à tenir en compte lors du suivi de la concentration de microcystines plutôt qu'un modèle permettant de quantifier cette concentration.

Le modèle A permet de mettre en évidence le lien qui existe entre la concentration de phycocyanine et celle des microcystines. Comme la mesure des concentrations de phycocyanine vise à évaluer l'abondance des cyanobactéries, selon le modèle A, la concentration des microcystines dépend principalement de l'abondance des cyanobactéries. Cependant, l'abondance des cyanobactéries n'expliquerait que 32,5 % de la variance de la concentration des microcystines.

Le deuxième paramètre le plus significatif lors de l'élaboration des modèles était la saturation en oxygène (voir l'équation 2). Dans un lac où il y a une bonne oxygénation de l'eau à la surface, la saturation en oxygène devrait se situer autour de 100%. La sursaturation en oxygène (plus de 100%) peut survenir lorsqu'il y a une forte productivité primaire. L'oxygène étant un déchet métabolique du phytoplancton, il est possible d'établir un lien entre l'activité métabolique du phytoplancton et la sursaturation en oxygène (Huot, 2009). Ce résultat laisse supposer que la concentration des microcystines est fonction de l'abondance des cyanobactéries ainsi que de l'activité métabolique des producteurs primaires dont elles font partie, ces deux paramètres expliquant 30,3 % de la variance de la concentration des microcystines.

Le fait qu'aux stations GSF-1-23 et AYL-1-24, les données physicochimiques n'ont pas été obtenues, implique que les observations à ces stations n'ont pas pu être prises en compte dans l'élaboration du modèle B impliquant la saturation en oxygène. Notons que dans le cas de la station AYL-1-24, il s'agit d'une des stations fortement contaminées par les cyanobactéries. Les données de la station AYL-1-24 n'ont donc pas pu être incluses dans un modèle considérant la saturation en oxygène, mais elles sont incluses dans le modèle considérant uniquement la concentration de phycocyanine (modèle A). Cette situation pourrait expliquer la plus grande précision du modèle A ($R = 0,325$) par rapport au modèle B ($R =$

0,303). Il serait fort intéressant de vérifier un modèle se basant sur les deux paramètres sur plusieurs lacs contaminés par les cyanobactéries.

Notons que les trousse ELISA ne permettent pas de mesurer la concentration des microcystines au-delà de 5 µg/L (concentration de la solution standard la plus concentrée) à moins de faire des dilutions des échantillons, ce qui n'a pas été fait lors de l'étude. Cette réalité entraîne un biais important qui permet d'expliquer en partie l'imprécision des modèles. En effet, lorsqu'il était déterminé que la concentration d'un échantillon était plus élevée que 5 µg/L, la valeur de concentration de 5 µg/L lui était attribué (Thomas, 2007). Cependant cette imprécision peut également être expliquée en partie par le caractère imprévisible de la production des microcystines et la complexité du lien entre l'abondance des cyanobactéries et la concentration en microcystines (Brient *et al.*, 2004).

De plus, les lectures de la concentration de phycocyanine en fluorimétrie peuvent être biaisées notamment par la turbidité de l'eau et la présence de chlorophylle en quantité importante (Prévost, 2008), comme illustré par les fortes corrélations observées entre ces paramètres (Tableau 39). Aussi, la disposition des cellules de cyanobactéries peut influencer la lecture par fluorimétrie. En effet, les cellules des genres de cyanobactéries fréquemment trouvées dans nos lacs comme *Microcystis* ou *Anabaena* sont généralement arrangées en colonies (Wehr *et al.*, 2002). Deux effets peuvent survenir. Premièrement, les cellules se trouvant au centre de la colonie peuvent ne pas être stimulées par le faisceau lumineux d'excitation. Deuxièmement, le faisceau lumineux émis par une cellule après excitation peut être en partie absorbé ou altéré par les cellules voisines. Ces deux sources d'erreur sur les lectures fluorimétriques tendent à sous-évaluer l'abondance des cyanobactéries dans un échantillon (Huot, 2009).

Notons que lors de cette étude, les données de 25 stations d'échantillonnage ont été considérées ce qui représente une grande variété de milieux. La quantification de la concentration des microcystines en utilisant un modèle du même type devrait vraisemblablement être plus précis s'il est élaboré à partir des données amassées sur une seule station, vu la stabilité relative des caractéristiques du milieu. La présente étude a permis de mettre en évidence le lien existant entre la concentration des microcystines, celle de la phycocyanine et de la saturation en oxygène. Cette relation suppose que la production de microcystines dépendrait principalement de l'abondance des cyanobactéries et de leur activité métabolique. Il serait pertinent de vérifier cette relation en laboratoire.

Notons que Giani *et al.* (2005) ont développé un modèle quantitatif prévisionnel pour la concentration des microcystines basé sur la biomasse de deux genres de cyanobactéries (*Microcystis* et *Anabaena*). L'équation obtenue à partir de ce modèle permettait d'expliquer 95 % de la variabilité des concentrations de microcystines. Leurs résultats appuient le fait que la concentration des microcystines dépend principalement de l'abondance des cyanobactéries.

12.4 Modèle qualitatif

Le modèle qualitatif est certainement le plus intéressant quant à sa mise en application sur le terrain. En effet, il permet aux acteurs oeuvrant pour la protection des plans d'eau, de prendre des décisions éclairées sur la nécessité d'envoyer ou pas un échantillon pour des analyses plus poussées. Le fluorimètre permet d'effectuer un suivi plus rigoureux compte tenu de son faible coût à l'achat (environ 1500 \$) et de son coût d'opération nul, en excluant les frais du personnel qui échantillonne.

Le modèle qualitatif permet d'évaluer les risques d'obtenir une concentration des microcystines problématique de 1 µg/L correspondant au CMA recommandé par l'OMS pour l'eau potable. Les données amassées au cours de l'étude permettent de dire que lorsque la concentration de phycocyanine est en dessous de 0,02 RFU, les risques d'obtenir une concentration de microcystines supérieure au CMA sont de 0,5 %. Dans ce cas, la personne en charge peut éviter de procéder à une analyse plus poussée qui engendrerait des coûts importants. En revanche, lorsque la concentration de phycocyanine dépasse 0,02 RFU, le risque d'obtenir une concentration de 1 µg/L de microcystines ou plus est de 42,4 %. Dans ce cas, la personne en charge devrait procéder à des analyses de la concentration des microcystines soit par test ELISA, ou en l'envoyant au laboratoire du CEAEQ. Notons que le seuil de 0,02 RFU peut différer selon la calibration de l'appareil puisque le RFU est une unité relative. Un seuil différent peut être calculé selon la calibration et la station échantillonnée.

13 Conclusion et recommandations

L'objectif principal de la présente étude était d'améliorer la procédure de suivi des cyanobactéries pour, ultimement, offrir des outils de détection accessibles et parfaire les connaissances sur leur utilisation et sur l'interprétation des résultats obtenus.

Rappelons ici que la concentration des microcystines est le paramètre le plus important à mesurer lorsqu'il s'agit d'évaluer le risque sanitaire lié à la présence des cyanobactéries. Or, au Québec, les analyses de la concentration de microcystine sont généralement fort coûteuses. À elle seule, l'analyse d'un échantillon coûte quelque 280 \$ (Ellis, 2008). Qui plus est, elles ne peuvent s'effectuer que dans un laboratoire accrédité. Or, au Québec, un seul laboratoire l'est : le Centre en expertise et en analyse environnemental du Québec (CEAEQ).

Compte tenu du grand nombre de lacs sur le territoire du Québec, il est impensable d'effectuer une analyse hebdomadaire de la concentration des microcystines sur tous les lacs québécois. Notons également que dans la grande majorité des échantillons reçus au laboratoire du CEAEQ, leur analyse indique des concentrations de microcystines sous les limites de détection. Les frais d'analyse de ces échantillons représentent des dépenses inutiles pour le MDDEP à qui appartient le laboratoire (Sinotte, 2009). Autant les gestionnaires de l'eau que le MDDEP auraient avantage à recourir à des analyses *in situ* permettant de vérifier la pertinence d'envoyer ou non un échantillon pour des analyses plus poussées.

Dans un tel contexte, la mise au point d'un procédé simple, efficace, accessible et pouvant être appliqué directement sur le site est nécessaire.

La présente recherche fait ressortir la relation existant entre la concentration de phycocyanine et celle des microcystines, laquelle relation a été observée lors de toutes les analyses statistiques effectuées. En effet, les mesures de la concentration de phycocyanine à l'aide d'un fluorimètre ont permis de faire la distinction entre les stations étudiées, à savoir celles qui sont faiblement, moyennement et fortement contaminées par les cyanobactéries.

Ce rapport entre la concentration de phycocyanine et celle des microcystines a été mis en évidence à la suite de l'application de trois modèles de prédiction, lesquels ont été créés pour les besoins de la présente étude.

Les deux modèles quantitatifs n'expliquent qu'une faible proportion de la variabilité de la concentration de microcystines. Le modèle A (voir l'équation 1) et le modèle B (voir l'équation 2) expliquent respectivement 32,5 et 30,3 % de la variance de la concentration des microcystines. Ces modèles mettent en évidence les deux paramètres qui influencent le plus la concentration en microcystines. Cependant, leur valeur prédictive est faible et leur

application lors de la procédure générale de détection des cyanobactéries est peu recommandable.

En revanche, le modèle qualitatif, de loin le plus intéressant des trois, a permis d'identifier un seuil de 0,02 RFU, seuil au-dessous duquel 99,5 % des observations indiquaient une concentration négligeable de microcystines et au-dessus duquel 42,4 % des concentrations de microcystines étaient problématiques. Ce modèle permet donc d'évaluer s'il y a lieu d'envoyer les échantillons pour la quantification des microcystines à partir des mesures *in situ* de la concentration de phycocyanine mesurée à l'aide d'un fluorimètre.

Dans une optique de rendre accessible la détection des cyanobactéries au public - aux municipalités, aux organisations travaillant à la protection de l'eau et aux associations de riverains, le lien entre la concentration de phycocyanine et celle des microcystines joue donc un rôle de premier plan.

À cet égard, voyons que les mesures de la concentration de phycocyanine, elles, comportent deux avantages majeurs : elles nécessitent peu d'expertise de la part de la personne qui les fait et n'exige qu'un seul outil, le fluorimètre, d'ailleurs peu coûteux et facile d'utilisation. L'appareil utilisé lors de cette étude a été acheté au coût d'environ 1500 \$ et les accessoires au coût d'environ 150 \$. Elles peuvent donc très bien s'ajouter aux analyses courantes, la mesure de la concentration de la chlorophylle, celle de la turbidité de l'eau et la mesure de sa transparence, visant à vérifier la qualité d'un plan d'eau, et ce, à l'étape de l'inspection visuelle du site.

Les mesures de la concentration de phycocyanine par fluorimétrie pourraient facilement être intégrées au protocole de suivi des cyanobactéries proposé par le Réseau de surveillance volontaire des lacs. En plus de discriminer les échantillons qui ne nécessitent pas d'analyses des concentrations de microcystines, l'utilisation du fluorimètre permettrait d'obtenir des résultats quantitatifs sur l'abondance des cyanobactéries. Notons que le protocole de suivi, comme il est effectué présentement au Québec, propose uniquement un suivi visuel des cyanobactéries, suivi qui ne permet d'obtenir que des résultats qualitatifs. Avec ce type de résultats, dresser un portrait de l'évolution de l'abondance des cyanobactéries d'année en année est un exercice approximatif voire impertinent.

De surcroît, les observations faites à l'œil nu sur le site ne permettent pas de quantifier l'abondance des cyanobactéries et d'obtenir des résultats quantitatifs nécessaires à un suivi. Chevalier *et al.* (2001) notent que l'effet visuel d'une concentration de cellules de cyanobactéries de 20 000 cellules / mL, seuil proposé par l'OMS pour l'eau potable, dépend énormément de la coloration vraie et de la turbidité de l'eau. La majorité des personnes ne sont pas capables de détecter la présence des cyanobactéries à une telle concentration.

Dans le contexte actuel où les municipalités, les associations de riverains et les associations de protections de l'eau jouent un rôle crucial dans l'évaluation de la qualité de l'eau au Québec, l'utilisation d'outils comme la fluorimétrie constitue une solution de choix lorsqu'un suivi rigoureux est nécessaire. La possibilité d'uniformiser la procédure de détection et d'être en mesure de dresser un portrait global et de comparer la situation des lacs québécois en ce qui a trait aux cyanobactéries constituent des avantages indéniables de la fluorimétrie.

La simplicité d'utilisation, le faible coût de l'appareil ainsi que la pertinence des données fournies font du fluorimètre un outil adéquat pour effectuer le suivi des cyanobactéries et pour évaluer le danger lié à la présence potentielle de microcystines.

Conclusion générale

La recherche de méthodes simples, rapides et peu coûteuses a pour objectif de permettre à la population de s'impliquer dans la surveillance de la qualité de l'eau et d'obtenir des informations précoces sur les cyanobactéries et leurs toxines à moindre coût. Ainsi, il serait possible d'effectuer certaines analyses afin d'avoir une idée rapide du risque associé à l'utilisation de l'eau et d'envoyer seulement les échantillons qui contiennent ou qui sont susceptibles de contenir des toxines pour la confirmation des résultats par des laboratoires accrédités pour ce genre d'analyses (ex : le CEAEQ).

À la lumière des résultats obtenus lors de l'évaluation des méthodes de détection des cyanobactéries, la fluorimétrie semble la méthode la plus adéquate pour évaluer l'abondance de ces organismes. Il s'agit d'une méthode simple, rapide, peu coûteuse et sensible. La fluorimétrie pourrait être intégrée efficacement à une procédure précoce de détection, plus précisément dans l'étape de la *Mesure de l'abondance des cyanobactéries* (voir la Figure 5). Quant à la quantification de cyanotoxines, les tests immunoenzymatiques (ELISA) constituent la méthode la plus prometteuse. L'avantage principal de ces tests est qu'ils sont disponibles

sur le marché sous forme de trousse. Les analyses avec ce type de test sont simples, rapides et sensibles et pourraient être intégrées à l'étape de *Mesure de la quantité des cyanotoxines* (voir la Figure 5) lors de la procédure de détection précoce. Notons que, lorsque ces analyses indiquent la présence possible de cyanobactéries et/ou de cyanotoxines, les résultats doivent être validés au laboratoire du CEAEQ.

Après l'évaluation de quatre trousse commerciales ELISA, la trousse en microplaques de la compagnie Abraxis a été reconnue comme la plus performante. Les analyses avec cette trousse peuvent être effectuées en triplicata ce qui augmente la fiabilité des résultats. Les microplaques Abraxis étaient également les plus ergonomiques de par leur facilité d'utilisation. De plus, les réactifs fournis permettent d'obtenir une courbe d'étalonnage plus large et donc d'analyser une plus grande gamme de concentrations de façon plus précise. La sensibilité élevée et la fiabilité de la prise d'essai de ces plaques ont également joué en leur faveur. Le fait que la compagnie Abraxis fournisse des anticorps réagissant à un grand nombre de variantes de microcystines fait de son test en microplaques un outil de détection précoce de choix.

L'application de la procédure précoce de détection proposée aux chapitres 1 et 2 a permis d'amasser une grande quantité de données physicochimiques ainsi que des mesures de la concentration de phycocyanine et des microcystines. Les analyses statistiques ont fait ressortir la relation existant entre la concentration de phycocyanine et celle des microcystines, laquelle relation a été observée lors de toutes les analyses effectuées. Cette relation entre a été mis en évidence à la suite de l'application de trois modèles de prédiction. Les deux modèles quantitatifs montrent que la concentration en phycocyanine et la saturation en oxygène à la surface de l'eau sont les deux paramètres qui expliquent le plus la variabilité de la concentration des microcystines. À partir de ces résultats, il est possible d'émettre l'hypothèse que la concentration des microcystines est le résultat de l'abondance des cyanobactéries (associé à la concentration de phycocyanine) et de l'activité métabolique des producteurs primaires (associé à la saturation en oxygène). Cependant, le modèle qualitatif est de loin le plus intéressant pour son application dans la procédure de détection. Ce modèle montre qu'en dessous d'une concentration de phycocyanine de 0,02 RFU, 99,5 % des observations indiquaient une concentration négligeable de microcystines (moins de 1 µg/L d'équivalent de microcystine-LR) et qu'au-dessus de cette valeur seuil, 42,4 % des concentrations de microcystines étaient problématiques (plus de 1 µg/L d'équivalent de microcystine-LR).

L'application de ce modèle permettrait aux gestionnaires de l'eau d'éviter l'envoi d'échantillon ne contenant pas de microcystine au laboratoire du CEAEQ.

Les mesures de la concentration de phycocyanine par fluorimétrie pourraient facilement être intégrées au protocole de suivi des cyanobactéries proposé par le Réseau de surveillance volontaire des lacs (RSVL). En plus de discriminer les échantillons qui ne nécessitent pas d'analyses des concentrations de microcystines, l'utilisation du fluorimètre permettrait d'obtenir des résultats quantitatifs sur l'abondance des cyanobactéries, résultats qui permettrait de suivre l'évolution des cyanobactéries dans nos lacs et rivières.

Références

Agence spatiale canadienne ASC (2003). Télédétection hyper spectrale http://www.space.gc.ca/asc/fr/satellites/hyper_marine.asp. (site consulté le 1 mars 2007)

American Public Health Association APHA (2005). Standard methods for the examination of water & wastewater. 21st ed. 2005, Centennial ed. / prepared and published jointly by American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation ; joint editorial board, Andrew D. Eaton ... [et al.] ; managing editor, Mary Ann H. Franson. Washington, DC : American Public Health Association, c2005. ISBN : 0875530478

Blais, S. (2002). La problématique des cyanobactéries (algues bleu-vert) à la baie Missisquoi en 2001. *Agrosol*, vol. 13, n° 2, p. 103.

Blais, S. (2006). Guide d'identification des fleurs d'eau de cyanobactéries. Comment les distinguer des végétaux observés dans nos lacs et nos rivières. Direction du suivi de l'état de l'environnement, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Québec. 52 p.

Bodemer, U. (2004). Variability of phycobiliproteins in cyanobacteria detected by delayed fluorescence excitation spectroscopy and its relevance for determination of phytoplankton composition of natural water samples. *Journal of Plankton Research*, vol.26, p. 1147.

Bolduc, A. (2007), technicienne responsable des cyanobactéries à la Direction régionale Estrie du ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, communication personnelle.

Brient, L., Legeas, M., Leitao, M., Peigner, P., Goraguer, M.A., et Mansotte, F. (2004) Étude interrégionale Grand Ouest sur les cyanobactéries en eau douce, Caractérisation de sites à usage d'eau potable et de loisirs vis-à-vis de la prolifération de cyanobactéries, examen des causes de développement des algues et proposition d'un suivi sanitaire.

Brient, L., Lengronne, M., Bertrand, E., Rolland, D., Sipel, A., Steinmann, D., Baudin, I., Legeas, M., Le Rouzic, B. et Bormans, M. (2008). A phycocyanin probe as a tool for monitoring cyanobacteria in freshwater bodies. *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 10, n° 2, p. 248-255.

Cabana, H. (2009). Professeur adjoint Faculté de Génie, Génie civil, Université de Sherbrooke, communication personnelle.

Carmichael, W.W. et An, J. (1999). Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. *Natural toxins*, 1999, vol. 7, n°6, p.377.

Codd, G.A., Chorus, I. et Burch, M. (1999). Cyanobacteria in the environment, dans I. Chorus et J. Bartram (éd.), *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, London, New York, E & FN Spon.

Chevalier, P., Pilote R. et Leclerc, J.-M. (2001). Risques à la santé publique découlant de la présence de cyanobactéries (algues bleues) toxiques et de microcystines dans trois bassins versants du sud-ouest québécois tributaires du fleuve Saint-Laurent. Unité de recherche en

santé publique (Centre hospitalier de l'Université Laval) et Institut national de santé publique, 151p.

Chorus, I. et Mur, L. (1999). Cyanobacteria in the environment, dans I. Chorus et J. Bartram (éd.), Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management, London, New York, E & FN Spon.

De Blois, C. (2007). Chimiste de division chimie organique, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, communication personnelle.

Devic, E., Li, D., Dauta, A., Henriksen, P., Codd, G.A., Marty, J.L., et Fournier, D. (2002) Detection of Anatoxin-a(s) in Environmental Samples of Cyanobacteria by Using a Biosensor with Engineered Acetylcholinesterases, Applied and Environmental Microbiology, vol. 68, n°8, p. 4102.

Devidal, S. (2007). Solutions curatives pour la restauration des lacs présentant des signes d'eutrophisation.
http://www.rappel.qc.ca/IMG/pdf/OEDD_solutions_miracles.pdf (site consulté de 15 février 2007)

Dittmann, E. et Börner, T. (2005). Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. Toxicology and applied pharmacology, vol. 203, n°3, p. 192.

Dittmann, E. et Wiegand, C. (2006). Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs, Molecular Nutrition and Food Research, vol. 50, n°1, p.7.

Downing, J.A., Watson, S.B. and McCauley, E. (2001). Predicting Cyanobacteria dominance in lakes. Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, vol.58, n°10, p. 1905.

Downing, T.G., Sember, C.S., Geringer, M.M. et Leukes W. (2005). Medium N : P ratios and specific growth rate comodule microcystin and protein content in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 and *M-Aeruginosa* UV027, Microbial Ecology, vol. 49, no° 3, p. 468.

Ellis, D. (2008). Guide d'intervention pour les propriétaires, les exploitants ou les concepteurs de stations de production d'eau potable municipales aux prises avec une problématique de fleurs d'eau de cyanobactéries, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction des politiques de l'eau, Québec, ISBN 978-2-550-53297-2, 46 p.

Ellman, G. L., K. D. Courtney, K. D. Andres, and R. M. Featherstone. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, vol. 7, p. 88.

Falconer, I., Bartram, J., Chorus, I., Kuiper-Goodman, T., Utkilen, H., Burch M. et Codd, G.A. (1999). Cyanobacteria in the environment, dans I. Chorus et J. Bartram (éd.), Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management, London, New York, E & FN Spon.

Gagnon B., Marcoux G., Leduc R., Pouet M.-F., Thomas O. (2007) Emerging tools and sustainability of waterquality monitoring, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 26 (4), 308-314.

Giani, A., Bird, D.F., Prairie, Y.T., et Lawrence, J.F. (2005) Empirical study of cyanobacterial toxicity along a trophic gradient of lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 62, p. 2100.

Gregor, J., Maršálek, B. and Šípková, H. (2007). Detection and estimation of potentially toxic cyanobacteria in raw water at the drinking water treatment plant by in vivo fluorescence method. *Water Research*, vol. 41, n°1, p. 228.

Groupe scientifique sur l'eau, Unité Santé en Environnement, Direction Risques biologiques, environnementaux et occupationnels, Institut national de santé publique du Québec, (2005). Propositions de critères d'intervention et de seuils d'alertes pour les cyanobactéries <http://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/348-CriteresInterventionCyanobacteries.pdf> (site consulté le 10 mars 2007)

Harada, K., Kondo, F. et Lawton, L.(1999). Cyanobacteria in the Environment, dans I. Chorus et J. Bartram (éd.), *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, London, New York, E & FN Spon.

Hargreaves, J.A. (2003) Ecophysiology of Cyanobacteria: Implication for Off-Flavor Management in Pond Aquaculture. In *Off-Flavors in Aquaculture*, Orlando, Florida. Edited by A. M. Rimando, and K. K. Schrader. American Chemical Society, Washington, p. 107.

Hawkins, P.R., Novic, S., Cox, P., Neilan, B.A., Burns, B.P., Shaw, G., Wickramasinghe, W., Peerapornpisal, Y., Ruangyuttikarn, W., Itayama, T., Saitou, T., Mizuochi, M. and Inamori, Y. (2005). A review of analytical methods for assessing the public health risk from microcystin in the aquatic environment. *Aqua - Journal of Water Supply: Research and Technology*, vol 54, n°8, p. 509.

Henriksen, P., Carmichael, W.W., An, J. and Moestrup, O. (1997) Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from Danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. *Toxicon*, vol. 35, n°6, p. 901.

Hisbergues, M., Christiansen, G., Rouhiainen, L., Sivonen, K. et Börner, T. (2003). PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Archives of Microbiology*, vol. 180, n° 6, p. 402.

Huot, Yannick, Ph.D. Professeur Faculté des lettres et sciences humaines, Géomatique appliquée, communication personnelle

Izydorczyk, K., Tarczynska, M., Jurczak, T., Mrowczynski, J. and Zalewski, M. (2005). Measurement of phycocyanin fluorescence as an online early warning system for cyanobacteria in reservoir intake water. *Environmental toxicology*, vol 20, n°4, p. 425.

James, K.J., Furey, A., Sherlock, I.R., Stack, M.A., Twohig, M., Caudwell, F.B. et Skulberg, O.M. (1998). Sensitive determination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of chromatography.A*, vol. 798, n° 1-2, p. 147.

Janse, I., Kardinaal, W.E.A., Meima, M., Fastner, J., Visser, P.M., Zwart, G., 2004. Toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA

gene internal transcribed spacer diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, n°7, p. 3979.

Keleti, G. et Sylora, J. L. (1982). Production and Properties of Cyanobacterial Endotoxins, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 43, n°1, p. 104.

Kotak, B. G., Lam, A. K.-Y., Prepas, E. E. et Hrudey, S. E. (2000). Role of chemical and physical variables in regulating microcystin-LR concentration in phytoplankton of eutrophic lakes. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences*, vol. 57, p. 1584.

Kutser, T., Metsamaa, L., Strömbeck, N. et Vahtmäe, E. (2006). Monitoring cyanobacterial blooms by satellite remote sensing. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, vol 67, n°1-2, p. 303.

Lavoie, I., Laurion, I. et Vincent, W.F. (2007). Les fleurs d'eau de cyanobactéries, revue de littérature. INRS rapport n° 916, 120 p.

Lawton, L., Marsalek, B., Padisák, J. et Chorus, I.(1999). Cyanobacteria in the environment, dans I. Chorus et J. Bartram (éd.), *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, London, New York, E & FN Spon.

Lee, T., Tsuzuki, M., Takeuchi, T., Yokoyama, K., Karube, I. (1994). In vivo fluorometric method for early detection of cyanobacterial waterblooms. *Journal of Applied Phycology*, vol. 6, n°5–6, p.489.

Lehman, E.M. (2007) Seasonal occurrence and toxicity of *Microcystis* in impoundments of the Huron River, Michigan, USA. *Water Research*, vol. 41, n°4, p. 795.

Levine, S. N. et Schindler, D. W. (1999). Influence of nitrogen to phosphorus supply ratios and physicochemical conditions on cyanobacteria and phytoplankton species composition in the Experimental Lakes Area, Canada, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 56, n°3, p. 451.

Litaker, R.W. et Tester, P.A. (2002). Molecular methods for detecting and characterizing harmful phytoplankton. In *Manual of environmental microbiology* (2nd ed). ASM Press ed. C.J. Hurst, R.L. Crawford, G.R. Khudsen, M.J. McInerney and L.D. Stetzenbach, Washington, DC pp. 342-353.

Loftin, K. A., Meyer, M.T., Rubio, F., Kamp, L., Humphries, E. et Whereat, E. (2008) Comparison of two cell lysis procedures for recovery of microcystins in water samples from Silver Lake in Dover, Delaware with microcystin producing cyanobacterial accumulations: USGS Open-File Report 2008–1341, 9 p.

Lopez, C.B., Jewett, E.B., Dortch, Q., Walton, B.T., Hudnell, H.K. (2008). Scientific Assessment of Freshwater Harmful Algal Blooms. Interagency Working Group on Harmful Algal Blooms, Hypoxia, and Human Health of the Joint Subcommittee on Ocean Science and Technology. Washington, DC.

Mahmood, N.A. et Carmichael, W.W. (1987). Anatoxin-a(S), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NCR-525-17. *Toxicon*, vol. 25, n°11, p. 1221.

McElhiney, J. and Lawton, L.A. (2005) Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol 203, n°3, p. 219.

Merel, S., LeBot, B., Clément, M., Seux, R. et Thomas, O. (2009). Ms identification of microcystin-LR chlorination by-products. *Chemosphere*, vol. 74, n° 6, p. 832.

Mehto, P., Ankelo, M., Hinkkanen, A., Mikhailov, A., Eriksson, J.E., Spoof, L. et Meriluoto, J. (2001). "A time-resolved fluoroimmunoassay for the detection of microcystins, cyanobacterial peptide hepatotoxins". *Toxicol*, vol. 39, n° 6, p. 831-836.

Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs MDDEP (2000). *Portrait global de la qualité des eaux au Québec*
<http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/sys-image/global/global2.htm> (site consulté le 11 juin 2009)

Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs MDDEP (2002) Réseau de surveillance volontaire des lacs – Description sommaire
<http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/rsv-lacs/description.htm> (site consulté le 11 juin 2009)

Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs (MDDEP) et Conseil régional de l'environnement des Laurentides (CRE Laurentides) (2007). *Protocole de mesure de la transparence de l'eau*, mai 2007, 2^e édition mai 2009, Québec, MDDEP et CRE Laurentides, ISBN 978-2-550-5573-9 (version imprimée), 8 p.

Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs MDDEP (2008a). *Bilan des lacs et cours d'eau touchés par une fleur d'eau d'algues bleu-vert au Québec*.
http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/algues-bv/bilan/liste_comparative.asp (site consulté le 1 juillet 2009)

Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs MDDEP (2008b). *Guide d'échantillonnage à des fins d'analyses environnementales : Cahier 1 – Généralités*, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 58 p., 3 annexes,
http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/documents/publications/guides_ech.htm (site consulté le 11 mars 2008)

Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs MDDEP (2009). *Protocole de suivi visuel d'une fleur d'eau d'algues bleu-vert*.
<http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/rsv-lacs/alguesBV.pdf> (site consulté le 13 juin 2009)

Msagati, T.A.M., Siame, B.A. et Shushu, D.D. (2006) Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology*, vol. 78, n°4, p. 382.

Mur, L. R., Skulberg, O. M. et Utkilen, H. (1999). Cyanobacteria in the environment, dans I. Chorus et J. Bartram (éd.), *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, London, New York, E & FN Spon.

Oh, H.M. (2000). Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, p. 176.

Organisation mondiale de la santé OMS (1998). *Guidelines for drinking-water quality*, 2nd ed. Addendum to Vol. 2. Health criteria and other supporting information. Geneva

http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/cyanobactoxins.pdf (site consulté le 3 mars 2007)

Orr, P.T. et Jones, G.J. (1998). Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and Oceanography*, vol 43, n°8, p. 1604.

Ortea, P.M., Allis, O., Healy, B.M., Lehane, M., Ní Shuilleabháin, A., Furey, A. et James, K.J. (2004). Determination of toxic cyclic heptapeptides by liquid chromatography with detection using ultra-violet, protein phosphatase assay and tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, vol. 55, n°10, p. 1395.

Paerl, H.W., Fulton, R.S., Moisander, P.H. et Dyble, J. (2001). Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *The Scientific World*, vol. 1, p. 76.

Prévost, Michèle, B.Sc. (McGill), M.Sc.A., Ph.D. (Poly) Professeure titulaire, Département des génies civil, géologique et des mines, communication personnelle

Rantala, A., Rajaniemi-Wacklin, P., Lyra, C., Lepisto, L., Rintala, J., Mankiewicz-Boczek, J. et Sivonen, K. (2006) Detection of Microcystin-Producing Cyanobacteria in Finnish Lakes with Genus-Specific Microcystin Synthetase Gene E (*mcyE*) PCR and Associations with Environmental Factors. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, n°9, p. 6101.

Rivasseau, C., Racaud, P., Deguin, A. et Hennion, M.C. (1999). Development of a bioanalytical phosphatase inhibition test for the monitoring of microcystins in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta*, vol. 394, n°2-3, p. 243.

Robert, C. (2007) Les cyanobactéries leurs impacts sur les stations de production d'eau potable. *Vecteur environnement*, vol. 40, p. 16.

Robillot, C. et Hennion, M.C. (2001). Cyanobacteria toxin dosage methods. *Techniques Sciences Methodes. Genie Urbain-Genie Rural*, vol. 9, p. 52.

Sangolkar, L.N., Maske, S.S. et Chakrabarti, T. (2006). Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. *Water Research*, vol. 40, n°19, p. 3485.

Santé Canada (2008) Les algues bleues (cyanobactéries) et leurs toxines.
<http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/cyanobacter-fra.php> (site consulté le 4 juillet 2009)

Sasaki, D. et Mitchell, R.A. (2003). How to obtain reproducible quantitative ELISA results? <http://www.oxfordbiomed.com/artqelis.html> (site consulté le 13 avril 2006)

Schlüter L. et Møhlenberg (2003). Detecting presence of phytoplankton groups with non-specific pigment signatures. *Journal of Applied Phycology*, vol. 15, p. 465.

Schlüter, L., Lauridsen, T. L., Krogh, G. et Jørgensen T. (2006). Identification and quantification of phytoplankton groups in lakes using new pigment ratios – a comparison between pigment analysis by HPLC and microscopy. *Freshwater Biology*, vol. 51, p. 1474.

Sinotte, M. (2009). Direction des écosystèmes aquatiques au du Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, communication personnelle.

Sivonen, K., et Jones, G. (1999). Cyanobacterial toxins dans I. Chorus et J. Bartram (éd.), Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management, London, New York, E & FN Spon.

Svrcek, C. et Smith, D. W. (2004). Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. Journal of Environmental Engineering and Science, vol. 3, n°3, p.155.

Teste, V., Briand, J., Nicholson, B.C. et Puiseux-Dao, S. (2002). Comparison of changes in toxicity during growth of *Anabaena circinalis* (cyanobacteria) determined by mouse neuroblastoma bioassay and HPLC. Journal of Applied Phycology, vol. 14, n°5, p. 399.

Thomas, O. (2007) professeur et directeur du laboratoire d'étude et de recherche en environnement et santé (LERES) de l'École des hautes études en santé publique (EHESP) Rennes, France, communication personnelle.

Van Apeldoorn, M.E., Van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A. et Bakker, G.J.I. (2007). Toxins of cyanobacteria. Molecular Nutrition & Food Research, vol. 51, n°1, p. 7.

Vincent, R.K., Qin, X., McKay, R.M.L., Miner, J., Czajkowski, K., Savino, J. et Bridgeman, T. (2004). Phycocyanin detection from LANDSAT TM data for mapping cyanobacterial blooms in Lake Erie. Remote Sensing of Environment, vol. 89, n°3, p. 381.

Watanabe, M.F., Harada, K.I., Matsuura, K., Oishi, S., Watanabe, Y. et Suzuki, M. (1989). Heptapeptide toxins contained in natural samples of *Microcystis* species. Journal of Applied Phycology, vol. 1, n°2. 487.

Wehr, J., Thorp, J. et Sheath, R. (2002). Freshwater Algae of North America, Ecology and Classification, ISBN : 978-0-12-741550-5, Academic Press.

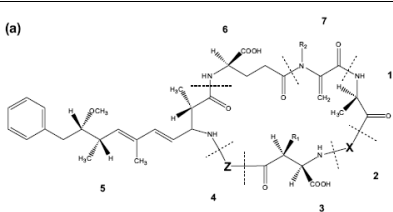
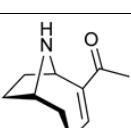
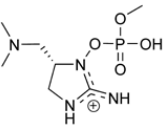
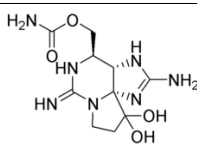
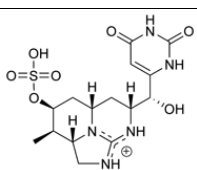
World Water Assessment Programme (2009) The United Nations World Water Development Report 3: Water in a Changing World. Paris: UNESCO, and London: Earthscan.

Yuan, M., Carmichael, W.W. and Hilborn, E.D. (2006) Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. Toxicon, vol. 48, n°6, p. 627.

Annexe 1: Toxines, caractéristiques et maxima d'absorbance UV

(Svrcek et Smith, 2004 ; Msagati et al., 2006)

Tableau 30 : Tableau récapitulatif des toxines et leur maxima en spectrophotométrie UV

Toxine	Type	Cyanobactéries : Genres associés	Formule	Spectre UV	Caractéristiques
Microcystine	Hépatotoxine Peptide cyclique	<i>Anabaena</i> * <i>Anabaenopsis</i> <i>Aphanocapsa</i> <i>Hapalosiphon</i> <i>Microcystis</i> * <i>Nostco</i> <i>Oscillatoria</i>	(a) 	-LR : Max à 238nm -variantes avec tyrosine : Max à 232nm -avec tryptophane : max à 223nm	-Micocystin-LR plus répandue et plus toxique -stable -résistant à hydrolyse par plusieurs enzymes -poids mol : 800-1100 -très soluble dans l'eau -peu volatile
Anatoxine-a	Neurotoxine Alcaloïde	<i>Anabaena</i> * <i>Aphanizomenon</i> * <i>Oscillatoria</i>		Max à 227nm	-poids mol : 165 -DL50: 200-500 -dégradation photochimique rapide
Anatoxine-a(s)	Neurotoxine Alcaloïde	<i>Anabaena</i> * <i>Oscillatoria</i>		???	-S pour salivation excessive -rare -instable
Saxitoxine	Neurotoxine Alcaloïde	<i>Anabaena</i> * <i>Aphanizomenon</i> * <i>Cylindrospermopsis</i> <i>Lyngbya</i>		Pas détectable UV	-autre nom : PSP paralytic shellfish poison -aussi produit par Dinoflagellés
Cylindrospermopsine	Cytotoxine alcaloïde	<i>Anabaena</i> * <i>Aphanizomenon</i> * <i>Cylindrospermopsis</i> <i>Umezakia</i>		Max à 262nm	-poids mol : 415 -stable à lumière décompose lentement à T entre 4-50C -Cytotoxique, hépatotoxique, neurotoxique, génotoxique
LPS	Endotoxine Lipopolysaccharide	Tous		???	-irritant cutané

* genres cyanobactériens d'eau douce d'intérêt au Canada

Annexe 2: Fournisseurs des produits commerciaux

Tableau 31 : Trousses commerciales et fournisseurs

Produit	Type de test	Fournisseur	Prix	Coordonnées
Microcystin ELISA kit	ELISA	Biosense	488 Euro/unité	www.biosense.com
Cylindrospermopsin ELISA kit	ELISA	Biosense	488 Euro/unité	www.biosense.com
Saxitoxin (PSP) ELISA kit	ELISA	Biosense	488 Euro/unité	www.biosense.com
QuantiPlate Kit for Microcystins - EP 022	ELISA	Envirologix	396 \$US/unité	www.envirologix.com
QualiTube Kit for Microcystins - ET 022	ELISA	Envirologix	145 \$US/unité	www.envirologix.com
QuantiTube Kit for Microcystins – ET 039	ELISA	Envirologix	200 \$US/unité	www.envirologix.com
Microcystins, ELISA Kits	ELISA	Abraxis	N/A	www.abraxiskits.com
Microcystins/Nodularins (ADDA), ELISA Kits	ELISA	Abraxis	N/A	www.abraxiskits.com

Tableau 32 : Sonde commerciale et fournisseur

Produit	Type de sonde	Fournisseur	Prix	Coordonnées
Sonde Micro-Flu	Mesure de la phycocyanine	AquaMS	Fixe : 6 900 € Portable : 8 400 €	www.aquams.com
Sonde Aquafluor	Mesure de la phycocyanine	Turner Design	N/A	www.turnerdesigns.com
Sonde YSI 6131	Mesure de la phycocyanine	YSI	N/A	www.ysi.com

Tableau 33 : Étalons de cyanotoxines et fournisseurs

Produit	Type	Fournisseur	Prix	Coordonnées
Microcystin-LA (<i>M. aeruginosa</i>)	Toxine purifiée	Sigma-aldrich	281.50 \$/100µg	www.sigmaaldrich.com
Microcystin-LR	Toxine purifiée	Sigma-aldrich	359.00\$/1ml conc. 10µg/ml	www.sigmaaldrich.com
Microcystin-LF-LR-LW-RR	Toxine purifiée	Calbiochem	N/A	www.calbiochem.com
Microcystin-LR-YR-RR	Toxine purifiée	Abraxis	N/A	www.abraxiskits.com

Annexe 3 : Protocoles de lyse cellulaire

fournies par Curtis Caulfield (Abraxis Inc.)

Microcystin Sample Extractions

Freeze and Thaw Method

Place 1mL of sample into a glass test tube and cap

Place test tube into a rack and place in a freezer (-20°C). Allow samples to freeze.

Remove the rack from the freezer and allow the samples to thaw (to speed up the thawing process, place into a warmer at 37°C or a warm water bath).

Repeat steps 2 and 3 an additional 2 times.

Prepare sample dilutions, if needed, and run by ELISA

Microwave Method

Obtain eppendorf tubes (1,5 to 2 mL microcentrifuge tubes – VWR cat#20170-355) for each sample. Carefully, punch a small hole in the center of each cap.

Place 0,5 mL of a sample into an eppendorf tube and cap. Mark the level of the sample on the outside of the tube

Place the tubes into a microwaveable rack that will hold the tubes in an upright position. Place the rack in the microwave (600 watt) on high for 7 minutes.

Remove and allow to cool.

Bring the samples back to volume with Diluent/Zero Standard. Prepare sample dilutions, if needed, and run by ELISA

Annexe 4 : Modes opératoires des quatres troussees testées

Mode opératoire des microplaques d'Abraxis

1. Add 50 μL of the standard solutions, control or samples into the wells of the test strips according to the working scheme given. We recommend using duplicates or triplicates.
2. Add 50 μL of the antibody solution to the individual wells successively using a multichannel pipette or a stepping pipette. Cover the wells with parafilm or tape and mix the contents by moving the strip holder in a rapid circular motion on the benchtop for 30 seconds. Be careful not to spill contents. Incubate for 90 minutes at room temperature.
3. After incubation, remove the covering and vigorously shake the contents of the wells into a sink. Wash the strips three times using the 1X washing buffer solution. Please use at least a volume of 250 μL of washing buffer for each well and each washing step. Remaining buffer in the wells should be removed by patting the plate dry on a stack of paper.
4. Add 100 μL of enzyme conjugate solution to the individual wells successively using a multichannel pipette or a stepping pipette. Cover the wells with parafilm or tape and mix the contents by moving the strip holder in a rapid circular motion on the benchtop for 30 seconds. Be careful not to spill contents. Incubate the strips for 30 min at room temperature.
5. After incubation, remove the covering and vigorously shake the contents of the wells into a sink. Wash the strips three times using the 1X washing buffer solution. Please use at least a volume of 250 μL of washing buffer for each well and each washing step. Remaining buffer in the wells should be removed by patting the plate dry on a stack of paper.
6. Add 100 μL of color solution to the wells using a multi- channel pipette or a stepping pipette. The strips are incubated for 20-30 minutes at room temperature. Protect the strips from sunlight.
7. Add 50 μL of stop solution to the wells in the same sequence as for the color solution using a multi- channel pipette or a stepping pipette.
8. Read the absorbance at 450 nm using a microplate ELISA photometer.

Mode opératoire des éprouvettes d'Abraxis

1. Bring all kit reagents and samples to be run to room temperature.
2. Prepare 1X wash solution by diluting the 100X wash concentrate with DI water. 1 mL concentrate per 100 mL DI water.
3. Remove the required number of antibody coated tubes from the re-sealable foil bag. Place tubes in rack and label with samples or calibrator level. Be sure to re-seal the bag with the desiccant to limit exposure of the tubes to moisture.
4. Add 500 μ L of Antibody Solution to each tube.
5. Pipet 500 μ L of calibrators, control and samples into the appropriate tubes. Be sure to use a clean pipet tip for each solution to avoid cross contamination.
6. Add 500 μ L of Enzyme Conjugate to each tube.
7. Swirl the tubes rapidly to mix the contents.
8. Incubate for 20 minutes.
9. After incubation, vigorously shake the contents of the tubes into a sink. Flood the tubes completely with wash solution, then shake to empty. Repeat this wash step four times for a total of five washes. Invert the rack on absorbent paper and tap out as much water as possible.
10. Add 500 μ L of Substrate to each tube.
11. Cover the tubes and incubate for 20 minutes.
12. Add 500 μ L of Stop Solution to each tube in the same order of addition as the Substrate.
13. Read the tubes with a spectrometer or tube reader at 450nm. If the reader has dual wavelength capability, read at 450nm minus 605 or 650nm.

Mode opératoire des microplaques d'Enviroligix

1. Rapidly add 125 μL of Microcystin Assay Diluent to each well that will be used, preferably with a repeating or multi-channel pipetter.
2. Immediately add 20 μL of Negative Control (NC), 20 μL of each Calibrator (C1-C3) and 20 μL of each sample (S1-S8) to their respective wells, as shown at left. (Follow this same order of addition for all reagents.) Do not add Microcystin-enzyme Conjugate in this step.
3. Thoroughly mix the contents of the wells by moving the strip holder in a rapid circular motion on the benchtop for a full 20-30 seconds. Be careful not to spill the contents!

NOTE: In order to minimize setup time it is recommended that a multi-channel pipette be used in steps 1, 2, 5, 8 and 10 when more than 3 strips are used.

4. Cover the wells with tape or Parafilm to prevent evaporation and incubate at ambient temperature for 30 minutes. If an orbital shaker is available shake at 200 rpm.
5. Add 100 μL of Microcystin-enzyme Conjugate to each well. Do not empty the well contents or wash the strips at this time.
6. Thoroughly mix the contents of the wells as in step 3. Cover the wells with tape or Parafilm and incubate at ambient temperature for 30 minutes. Use orbital shaker if available.
7. After incubation, carefully remove the covering and vigorously shake the contents of the wells into a sink or other suitable container. Flood the wells completely with Wash Solution, then shake to empty. Repeat this wash step four times. Slap the plate on a paper towel to remove as much Wash Solution as possible. Alternatively, use a microtiter plate washer with Wash Solution for the wash step.
8. Add 100 μL of Substrate to each well.
9. Thoroughly mix the contents of the wells, as in step 3. Cover the wells with new tape or Parafilm and incubate for 30 minutes at ambient temperature. Use orbital shaker if available.
Caution: Stop Solution is 1.0 N Hydrochloric acid. Handle carefully.
10. Add 100 μL of Stop Solution to each well and mix thoroughly. This will turn the well contents yellow.

NOTE: Read the plate within 30 minutes of the addition of Stop Solution. How to Interpret the Results

11. Set the wavelength of your microtiter plate reader to 450 nanometers (nm). (If it has dual wavelength capability, use 600, 630 or 650 nm as the reference wavelength.)

Mode opératoire des éprouvettes d'Envirologix

1. Place the required number of tubes in the rack and label them in duplicate for each calibrator and sample.
2. Attach a clean 2.5 mL syringe tip to the repeating pipetter and set the dispense dial to 3. Dispense 150 μ L Assay Diluent to all the test tubes.
3. Immediately add 75 μ L of the Negative Control, each of the three calibrators, and each sample to duplicate tubes, changing tips for each control/calibrator/sample. Do not add Microcystin-enzyme Conjugate in this step.
4. Thoroughly mix the contents of the tubes by moving the tube holder in a rapid circular motion on flat surface for a full 20-30 seconds.
5. Incubate tubes at ambient temperature for 15 minutes.
6. Attach a clean 12.5 mL syringe tip to the repeating pipetter and set the dispense dial to 1. Dispense 250 μ L Microcystin Enzyme-Conjugate to all the test tubes. Mix as described in step 4.
7. Incubate tubes at ambient temperature for 15 minutes.
8. After incubation, vigorously shake the contents of the tubes into a sink or other suitable container. Flood the tubes completely with cool tap water (distilled or de-ionized may be used if clean tap water is not available), then shake to empty. Repeat this wash step four times. Invert the tubes on a paper towel and tap to remove as much water as possible.
9. Attach a clean 12.5 mL syringe tip to the repeating pipetter and set the dispense dial to 2. Dispense 500 μ L Substrate to all the test tubes. Mix as described in step 4.
10. Incubate tubes at ambient temperature for 15 minutes.

NOTE: If blue color does not develop in the Negative Control tube, the assay is invalid and should be repeated.

Caution: Stop Solution is 1.0 N Hydrochloric acid. Handle carefully.

11. Attach a clean 12.5 mL syringe tip to the repeating pipetter and set the dispense dial to 2. Dispense 500 μ L Stop Solution to all the test tubes. Mix as described in step 4. This will turn the blue color in the tubes to yellow.

NOTE: Read the tubes within 30 minutes of the addition of Stop Solution.

12. Set the wavelength of your photometer to 450 nanometers (nm). If it has dual wavelength capability, use 600, 630 or 650 nm as the reference wavelength.
13. Blank the photometer against 1 mL water in a blank tube. Measure and record the optical density (OD) of each tube's contents.

Annexe 5 : Données brutes de la phase de comparaison des trousse

Tableau 34 : Concentrations de microcystine calculées par une régression non-linéaire à 4 paramètres

Lacs	MPLEnvirologix			MPLAbraxis			Éprouvettenvirologix			TubAbraxis		
	Concentration de MC (µg/L)	Incertitude (µg/L)	Incertitude (%)	Concentration de MC (µg/L)	Incertitude (µg/L)	Incertitude (%)	Concentration de MC (µg/L)	Incertitude (µg/L)	Incertitude (%)	Concentration de MC (µg/L)	Incertitude (µg/L)	Incertitude (%)
ARG-01	ND	ND	ND	0,15	0,01	4,23	0,21	0,01	4,39	0,12	0,00	2,31
BOI-01	ND	ND	ND	0,00	0,00	4,07	0,29	0,02	5,21	0,00	0,00	2,06
BPN-01	ND	ND	ND	0,00	0,00	6,05	0,00	0,00	3,74	0,56	0,12	22,09
BRO-01	ND	ND	ND	0,33	0,00	1,16	0,25	0,03	14,15	0,10	0,00	0,06
MAC-01	ND	ND	ND	0,00	0,00	6,42	0,00	0,00	0,97	0,00	0,00	1,32
MEM-01	ND	ND	ND	0,07	0,00	3,27	0,00	0,00	8,76	0,26	0,00	0,23
MNH-01	ND	ND	ND	0,06	0,00	4,45	0,13	0,01	5,60	0,00	0,00	3,48
PAR-01	ND	ND	ND	0,00	0,00	4,43	0,19	0,00	0,56	0,00	0,00	5,04
PSF-01	ND	ND	ND	10,28	0,94	9,12	>2,5	ND!	11,58	1,16	0,63	54,18
WAT-01	ND	ND	ND	2,44	0,19	7,68	>2,5	ND!	12,99	2,58	0,06	2,29
ARG-02	0,08	0,00	2,51	0,08	0,00	2,70	0,00	0,00	13,29	0,27	0,01	3,31
BOI-02	0,00	0,00	3,89	0,09	0,00	1,86	0,00	0,00	10,11	0,18	0,00	1,21
BPN-02	0,15	0,00	2,07	0,00	0,00	5,69	0,00	0,00	8,88	0,27	0,02	6,32
BRO-02	0,00	0,00	2,84	0,06	0,00	1,41	0,00	0,00	6,91	0,29	0,00	1,72
MAC-02	0,08	0,00	2,02	0,08	0,00	4,02	0,00	0,00	10,45	0,20	0,00	1,05
MEM-02	0,02	0,00	1,69	0,12	0,00	3,99	0,00	0,00	4,11	0,34	0,01	1,57
MNH-02	0,06	0,00	4,13	0,09	0,00	4,67	0,00	0,00	5,44	0,25	0,00	1,09
PAR-02	0,00	0,00	2,15	0,02	0,00	2,18	0,00	0,00	9,78	0,32	0,00	1,57
PSF-02	>2,5	ND!	7,11	>5	ND!	13,82	>2,5	ND!	2,73	>5	ND!	22,07
WAT-02	2,00	0,28	14,17	>5	ND!	4,58	>2,5	ND!	4,31	>5	ND!	10,83
ARG-03	0,20	0,00	1,81	0,18	0,01	7,39	0,00	0,00	1,16	ND	ND	ND
BOI-03	0,20	0,00	1,72	0,10	0,00	2,22	0,04	0,00	0,18	ND	ND	ND
BPN-03	0,20	0,02	9,58	0,06	0,00	6,20	0,00	0,00	0,53	ND	ND	ND
BRO-03	0,14	0,01	3,50	0,05	0,00	2,60	0,03	0,00	0,21	ND	ND	ND
MAC-03	0,10	0,00	4,80	0,01	0,00	3,04	0,00	0,00	1,84	ND	ND	ND
MEM-03	0,19	0,00	2,40	0,06	0,00	4,23	0,01	0,00	0,31	ND	ND	ND
MNH-03	0,22	0,01	2,66	0,10	0,01	6,61	0,04	0,00	0,11	ND	ND	ND
PAR-03	ND	ND	ND	ND	ND!	0,50	ND	ND	ND	ND	ND	ND

PSF-03	>2,5	ND!	7,04	>5	ND!	4,88	>2,5	ND!	8,05	ND	ND	ND
WAT-03	>2,5	ND!	0,64	>5	ND!	10,66	>2,5	ND!	3,36	ND	ND	ND
ARG-04	0,18	0,01	6,39	0,28	0,02	5,87	0,27	0,01	3,76	ND	ND	ND
BOI-04	0,08	0,00	6,26	0,04	0,00	4,92	0,08	0,00	2,17	ND	ND	ND
BPN-04	0,00	0,00	2,58	0,03	0,00	2,56	0,05	0,00	1,20	ND	ND	ND
BRO-04	0,00	0,00	2,46	0,05	0,00	1,08	0,10	0,00	0,23	ND	ND	ND
MAC-04	0,02	0,00	4,20	<LD	ND!	0,90	0,11	0,00	0,30	ND	ND	ND
MEM-04	0,00	0,00	3,47	0,05	0,00	1,66	0,18	0,00	1,99	ND	ND	ND
MNH-04	0,06	0,00	2,01	0,04	0,00	4,60	0,00	0,00	1,90	ND	ND	ND
PAR-04	0,09	0,00	3,34	0,04	0,00	3,44	0,00	0,00	0,09	ND	ND	ND
PSF-04	8,09	0,05	0,64	19,96	1,23	6,18	9,58	0,01	0,10	ND	ND	ND
WAT-04	4,43	0,06	1,28	13,17	2,03	15,43	5,51	0,00	0,09	ND	ND	ND
ARG-05	0,17	0,01	7,53	0,08	0,00	2,75	0,16	0,00	0,74	0,18	0,00	0,76
BOI-05	0,20	0,01	3,17	0,15	0,01	5,91	0,45	0,01	1,74	0,22	0,01	3,24
BPN-05	0,0	0,00	3,36	0,01	0,00	8,13	0,10	0,00	1,55	0,19	0,00	0,73
BRM-05	0,0	0,00	5,64	0,01	0,00	4,76	0,15	0,01	3,32	0,20	0,00	0,44
BRO-05	0,0	0,00	3,53	0,04	0,00	3,91	0,25	0,00	0,68	0,24	0,01	4,59
MAC-05	0,18	0,01	4,78	0,0	0,00	3,26	0,18	0,00	2,14	0,23	0,00	0,75
MEM-05	0,0	0,00	3,86	0,0	0,00	0,28	0,09	0,00	1,11	0,25	0,00	1,16
PAR-05	0,17	0,00	1,27	0,0	0,00	4,35	0,0	0,00	1,58	0,30	0,00	0,00
PSF-05	1,63	0,11	6,58	1,54	0,05	3,16	0,84	0,01	1,65	3,60	0,05	1,46
WAT-05	6,68	0,07	1,03	6,48	0,37	5,72	4,85	0,05	1,07	8,48	1,99	23,44

Annexe 6 : Date d'échantillonnage et analyses complémentaires effectuées lors de la phase de modélisation

Date d'échantillonnage	Analyses complémentaires
03-juin-08	P, NO ₂ , NO ₂ , NH ₄ , NTK, Chlorophylle <i>a</i>
10-juin-08	P, NO ₂ , NO ₂ , NH ₄ , NTK, Chlorophylle <i>a</i>
17-juin-08	P, NO ₂ , NO ₂ , NH ₄ , NTK, Chlorophylle <i>a</i>
24-juin-08	P, NO ₂ , NO ₂ , NH ₄ , NTK, Chlorophylle <i>a</i>
01-juil-08	Chlorophylle <i>a</i>
08-juil-08	Chlorophylle <i>a</i>
15-juil-08	Chlorophylle <i>a</i>
22-juil-08	Chlorophylle <i>a</i>
29-juil-08	Chlorophylle <i>a</i>
05-août-08	aucune
12-août-08	aucune
19-août-08	aucune
26-août-08	Chlorophylle <i>a</i>
02-sept-08	Chlorophylle <i>a</i>
09-sept-08	aucune
16-sept-08	aucune
23-sept-08	aucune
30-sept-08	aucune
07-oct-08	aucune
14-oct-08	aucune

Annexe 7 : Copie de la feuille Excel utilisée pour le calcul des concentrations de microcystines avec la regression non-linéaire à quatre paramètres

4-parameter logistic fitting with Excel Solver for Microcystin ELISA

Ver.20060924

Operation

- 1) Please add "solver" from Addin soft to tool bar.
(If you do not know how to add this Addin soft, please refer the help of Excel soft.)
- 2) Please input the New Standrd OD data (averaged) here

MC (ppb)	OD (averaged)	B/B0(%)
0	2,856	100
0,15	2,649	92,8
0,4	2,176	76,2
1	1,974	69,1
2	1,700	59,5
5	1,523	53,3

- 3) Please confirm B/B0(%) values were changed according to the OD-data input.

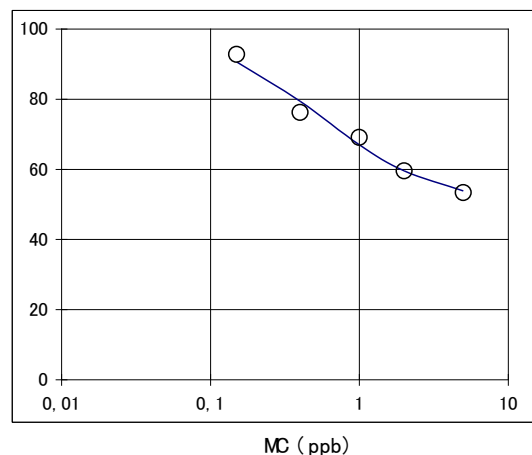
MC (ppb)	B/B0(%)	Predicted values	Residual Squares
0	100,0	100,549	3,013E-01
0,15	92,8	90,597	4,644E+00
0,4	76,2	79,383	1,019E+01
1	69,1	66,965	4,636E+00
2	59,5	59,571	2,200E-03
5	53,3	53,846	2,697E-01
Sum of residual squares			2,005E+01

- 4) Please select "Solver" from the pull down menu of tool
- 5) Please confirm Solver parameter (usually, you do not need to change)
Target Cell Sum of residual squares (\$F\$24)
Optimize Minimize
Cell changed \$D\$35:\$D\$38
- 6) Please click "Go" or "Solve"
- 7) Please confirm if the graph line is on the plot and Click "OK".
- 8) Please confirm calculated 4-parameter results are reasonable (automatically changed).

A	100,5488801
B	1,096523197
C	0,543758002
D	49,74571346

Initial
(Max.)
(Slope)
(IC₅₀)
(Min.)

$$Y=(A-D)/(1+(X/C)^B)+D$$



- 9) Please input the averaged OD of unknown sample here
- 10) The calculated ELISA mean values (ug/L) are given here (automatically)

No.	OD-ave	B/B0(%)	MC (ppb)
1		0,0	#NOMBRE!
2		0,0	#NOMBRE!
3		0,0	#NOMBRE!
4		0,0	#NOMBRE!
5		0,0	#NOMBRE!
6		0,0	#NOMBRE!

Annexe 8 : Détails de l'analyse ANOVA

Tableau 35 : Statistiques descriptives de l'ANOVA

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Microcystine	1	370	0,19	0,14	0,01	0,18	0,20	0,05	0,85
	2	52	1,66	1,50	0,21	1,24	2,07	0,29	5,00
	3	40	0,63	1,02	0,16	0,30	0,95	0,05	5,00
	Total	462	0,39	0,75	0,04	0,32	0,46	0,05	5,00
Phycocyanine	1	370	0,006	0,012	0,001	0,005	0,007	0,001	0,172
	2	52	0,108	0,224	0,031	0,046	0,170	0,003	1,568
	3	40	0,051	0,125	0,020	0,011	0,091	0,003	0,770
	Total	462	0,022	0,090	0,004	0,013	0,030	0,001	1,568
Chlorophylle	1	370	4,897	3,263	0,170	4,564	5,231	0,607	42,150
	2	52	14,665	9,630	1,335	11,984	17,346	1,774	46,167
	3	40	6,934	5,361	0,848	5,220	8,649	2,366	35,253
	Total	462	6,173	5,541	0,258	5,666	6,680	0,607	46,167
PC/Chl	1	370	0,156	0,342	0,018	0,121	0,191	0,033	5,460
	2	52	0,584	0,677	0,094	0,395	0,773	0,055	4,500
	3	40	0,485	0,550	0,087	0,309	0,661	0,089	2,185
	Total	462	0,233	0,441	0,021	0,193	0,273	0,033	5,460
Transparence	1	358	1,13	0,20	0,01	1,11	1,15	0,09	1,20
	2	39	0,59	0,37	0,06	0,47	0,71	0,14	1,20
	3	40	1,02	0,32	0,05	0,92	1,12	0,10	1,20
	Total	437	1,07	0,28	0,01	1,04	1,10	0,09	1,20
Température	1	361	20,5	3,5	0,2	20,1	20,8	10,7	28,3
	2	41	20,8	3,7	0,6	19,6	22,0	11,0	28,3
	3	40	20,3	3,4	0,5	19,2	21,3	10,5	25,2
	Total	442	20,5	3,5	0,2	20,1	20,8	10,5	28,3
Saturation en oxygène	1	357	97,4	14,4	0,8	95,9	98,9	54,7	148,4
	2	40	108,3	29,8	4,7	98,8	117,8	57,1	197,5
	3	40	93,6	14,0	2,2	89,2	98,1	63,9	139,4
	Total	437	98,1	16,7	0,8	96,5	99,7	54,7	197,5
Oxygène dissous	1	357	8,82	1,43	0,08	8,67	8,97	4,80	14,93
	2	40	9,71	2,43	0,38	8,93	10,48	5,05	16,27
	3	40	8,51	1,46	0,23	8,05	8,98	5,61	12,43
	Total	437	8,87	1,57	0,07	8,72	9,02	4,80	16,27
pH	1	357	7,79	0,43	0,02	7,75	7,83	6,49	8,97
	2	41	8,48	0,85	0,13	8,21	8,74	6,94	9,86
	3	40	7,63	0,42	0,07	7,50	7,77	7,04	9,24
	Total	438	7,84	0,52	0,03	7,79	7,89	6,49	9,86
TDS	1	357	0,0922	0,0348	0,0018	0,0885	0,0958	0,0380	0,1880
	2	41	0,1013	0,0119	0,0019	0,0976	0,1051	0,0550	0,1260
	3	40	0,0895	0,0079	0,0012	0,0870	0,0920	0,0780	0,1060
	Total	438	0,0928	0,0318	0,0015	0,0898	0,0958	0,0380	0,1880
Conductivité	1	357	129	48	3	124	134	53	254
	2	41	143	19	3	137	149	77	190
	3	40	125	11	2	122	128	106	157
	Total	438	130	44	2	126	134	53	254
Coliformes totaux	1	366	342	596	31	281	403	2	2424
	2	52	657	870	121	415	899	2	2424
	3	40	482	707	112	256	708	2	2424
	Total	458	390	649	30	330	450	2	2424
E.coli	1	366	37	154	8	22	53	2	2424
	2	52	63	125	17	29	98	2	654
	3	40	65	216	34	-4	134	2	1038
	Total	458	43	157	7	28	57	2	2424
Turbidité	1	295	8,13	4,58	0,27	7,60	8,65	1,00	43,33
	2	43	35,84	24,53	3,74	28,29	43,39	7,33	112,67
	3	32	14,05	12,23	2,16	9,64	18,46	6,33	66,67
	Total	370	11,86	13,28	0,69	10,50	13,22	1,00	112,67
Phosphore	1	75	0,022	0,014	0,002	0,019	0,025	0,009	0,108
	2	9	0,098	0,084	0,028	0,033	0,162	0,021	0,273
	3	8	0,033	0,011	0,004	0,024	0,043	0,022	0,048
	Total	92	0,030	0,036	0,004	0,023	0,038	0,009	0,273
Chlorophylle SM	1	185	2,34	2,34	0,17	2,00	2,68	0,43	28,20
	2	24	36,21	38,07	7,77	20,13	52,29	0,64	140,00
	3	19	10,04	28,91	6,63	-3,90	23,97	0,94	129,00
	Total	228	6,55	18,06	1,20	4,19	8,91	0,43	140,00
NH4	1	75	0,08	0,12	0,01	0,05	0,11	0,03	0,83
	2	9	0,13	0,13	0,04	0,03	0,23	0,03	0,42
	3	8	0,06	0,06	0,02	0,01	0,11	0,03	0,16
	Total	92	0,08	0,12	0,01	0,06	0,11	0,03	0,83
NTK	1	75	0,17	0,17	0,02	0,13	0,21	0,05	0,84
	2	9	1,04	0,90	0,30	0,34	1,73	0,05	2,35
	3	8	0,18	0,13	0,04	0,08	0,29	0,05	0,40
	Total	92	0,25	0,40	0,04	0,17	0,34	0,05	2,35
COT	1	75	6,38	2,63	0,30	5,78	6,99	2,90	17,50
	2	9	8,63	3,37	1,12	6,04	11,22	4,60	15,90
	3	8	6,71	1,26	0,44	5,66	7,76	4,80	8,77
	Total	92	6,63	2,69	0,28	6,08	7,19	2,90	17,50

Groupe 1 : milieux faiblement contaminés; groupe 2 : milieux fortement contaminés; groupe 3 : milieux moyennement contaminés

Tableau 36 : Résultats de l'ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Microcystine	Between Groups	100,791	2	50,395	143,138	0,000
	Within Groups	161,603	459	0,352		
	Total	262,394	461			
Phycocyanine	Between Groups	0,510	2	0,255	36,458	0,000
	Within Groups	3,212	459	0,007		
	Total	3,723	461			
Chlorophylle	Between Groups	4375,423	2	2187,711	102,678	0,000
	Within Groups	9779,657	459	21,306		
	Total	14155,079	461			
PC/Chl	Between Groups	11,131	2	5,566	32,580	0,000
	Within Groups	78,410	459	0,171		
	Total	89,541	461			
Transparence	Between Groups	10,365	2	5,182	94,011	0,000
	Within Groups	23,925	434	0,055		
	Total	34,290	436			
Température	Between Groups	5,613	2	2,806	0,227	0,797
	Within Groups	5437,569	439	12,386		
	Total	5443,181	441			
Saturation en oxygène	Between Groups	5129,392	2	2564,696	9,608	0,000
	Within Groups	115845,876	434	266,926		
	Total	120975,268	436			
Oxygène dissous	Between Groups	34,162	2	17,081	7,148	0,001
	Within Groups	1037,086	434	2,390		
	Total	1071,248	436			
pH	Between Groups	19,187	2	9,594	41,496	0,000
	Within Groups	100,569	435	0,231		
	Total	119,757	437			
TDS	Between Groups	0,004	2	0,002	1,772	0,171
	Within Groups	0,439	435	0,001		
	Total	0,442	437			
Conductivité	Between Groups	8164,354	2	4082,177	2,108	0,123
	Within Groups	842501,165	435	1936,784		
	Total	850665,518	437			
Coliformes totaux	Between Groups	4889881,808	2	2444940,904	5,921	0,003
	Within Groups	187878473,775	455	412919,723		
	Total	192768355,584	457			
E.coli	Between Groups	51836,117	2	25918,058	1,047	0,352
	Within Groups	11265126,144	455	24758,519		
	Total	11316962,260	457			
Turbidité	Between Groups	28981,666	2	14490,833	147,412	0,000
	Within Groups	36076,768	367	98,302		
	Total	65058,434	369			
Phosphore	Between Groups	0,046	2	0,023	28,327	0,000
	Within Groups	0,072	89	0,001		
	Total	0,118	91			
Chlorophylle SM	Between Groups	24619,804	2	12309,902	56,074	0,000
	Within Groups	49394,376	225	219,531		
	Total	74014,180	227			
NH4	Between Groups	0,025	2	0,012	0,921	0,402
	Within Groups	1,185	89	0,013		
	Total	1,209	91			
NTK	Between Groups	6,093	2	3,047	31,166	0,000
	Within Groups	8,700	89	0,098		
	Total	14,794	91			
COT	Between Groups	40,513	2	20,257	2,928	0,059
	Within Groups	615,675	89	6,918		
	Total	656,188	91			

Annexe 9 : Détails de l'analyse en composantes principales

Tableau 37 : Variance totale expliquée par les composantes de l'ACP

Total Variance Explained									
Component	Initial Eigenvalues			Extraction Sums of Squared Loadings			Rotation Sums of Squared Loadings		
	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %
1	3,748	37,484	37,484	3,748	37,484	37,484	3,240	32,403	32,403
2	1,654	16,540	54,024	1,654	16,540	54,024	1,738	17,380	49,782
3	1,198	11,981	66,006	1,198	11,981	66,006	1,622	16,224	66,006
4	,791	7,907	73,913						
5	,729	7,289	81,202						
6	,572	5,718	86,920						
7	,434	4,341	91,261						
8	,372	3,717	94,977						
9	,340	3,400	98,378						
10	,162	1,622	100,000						

Extraction Method: Principal Component Analysis.

Tableau 38 : Matrice du test anti-image de l'ACP

Anti-image Matrices											
		Microcystine	Phycocyanine	Chlorophylle	Transparence	Saturation en oxygène	pH	Conductivité	Coliformes totaux	E.coli	Turbidité
Anti-image Covariance	Microcystine	,785	,001	-,112	,047	-,088	-,074	,020	,028	,043	,007
	Phycocyanine	,001	,484	-,130	-,008	-,071	-,085	,062	,032	,004	-,104
	Chlorophylle	-,112	-,130	,468	,049	,012	-,026	,020	,005	,057	-,080
	Transparence	,047	-,008	,049	,298	,045	,005	,031	,009	,098	,172
	Saturation en oxygène	-,088	-,071	,012	,045	,741	-,201	,034	,061	-,023	,042
	pH	-,074	-,085	-,026	,005	-,201	,499	-,294	,008	,041	-,032
	Conductivité	,020	,062	,020	,031	,034	-,294	,729	,025	-,042	,033
	Coliformes totaux	,028	,032	,005	,009	,061	,008	,025	,773	-,281	-,051
	E.coli	,043	,004	,057	,098	-,023	,041	-,042	-,281	,730	-,010
	Turbidité	,007	-,104	-,080	,172	-,042	-,032	,033	-,051	-,010	,252
Anti-image Correlation	Microcystine	,893 ^a	,002	-,185	,098	-,116	-,118	,027	,036	,057	,017
	Phycocyanine	,002	,869 ^a	-,273	-,021	-,119	-,174	,104	,053	,007	-,298
	Chlorophylle	-,185	-,273	,888 ^a	,130	,020	-,054	,035	,008	,098	-,232
	Transparence	,098	-,021	,130	,792 ^a	,095	,014	,066	,018	,211	,627
	Saturation en oxygène	-,116	-,119	,020	,095	,780 ^a	-,330	,047	,080	-,031	,097
	pH	-,118	-,174	-,054	,014	-,330	,741 ^a	-,488	,013	,069	-,090
	Conductivité	,027	,104	,035	,066	,047	-,488	,524 ^a	,034	-,058	,077
	Coliformes totaux	,036	,053	,008	,018	,080	,013	,034	,864 ^a	-,374	-,115
	E.coli	,057	,007	,098	,211	-,031	,069	-,058	-,374	,660 ^a	-,023
	Turbidité	,017	-,298	-,232	,627	-,097	-,090	,077	-,115	-,023	,772 ^a

a. Measures of Sampling Adequacy(MSA)

Annexe 10 : Tableaux des corrélations

Tableau 39 : Corrélations de Pearson entre les paramètres

		Microcystine	Phycocyanine	Chlorophylle	PC/Chl	Transparence	Température	Saturation en oxygène	Oxygène dissous	pH	TDS	Conductivité	Coliformes totaux	E.coli	Turbidité	Phosphore	Chlorophylle SM	NH4	NTK	COT
Microcystine	Pearson Correlation	1,000	,333	,434	,319	-.337	,098	,227	,166	,372	,057	,083	,060	-.003	,410	,642	,608	,130	,757	,402
	Sig. (2-tailed)		,000	,000	,000	,000	,040	,000	,001	,000	,237	,084	,201	,951	,000	,000	,000	,219	,000	,000
	N	462	462	462	462	437	442	437	437	438	438	438	455	455	370	92	227	92	92	92
Phycocyanine	Pearson Correlation	,333	1,000	,554	,677	-.526	,035	,244	,209	,453	,044	,056	,197	,035	,697	,544	,886	,229	,748	,395
	Sig. (2-tailed)	,000		,000	,000	,000	,464	,000	,000	,000	,363	,246	,000	,463	,000	,000	,000	,028	,000	,000
	N	462	462	462	462	437	442	437	437	438	438	438	455	455	370	92	227	92	92	92
Chlorophylle	Pearson Correlation	,434	,554	1,000	,293	-.571	,076	,193	,144	,407	,065	,085	,145	,058	,708	,386	,566	,229	,485	,169
	Sig. (2-tailed)	,000	,000		,000	,000	,111	,000	,003	,000	,177	,076	,002	,214	,000	,000	,000	,028	,000	,108
	N	462	462	462	462	437	442	437	437	438	438	438	455	455	370	92	227	92	92	92
PC/Chl	Pearson Correlation	,319	,677	,293	1,000	-.298	-.135	,186	,232	,304	,048	,022	,139	,047	,483	,556	,831	,129	,709	,400
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000		,000	,005	,000	,000	,000	,315	,652	,003	,314	,000	,000	,000	,221	,000	,000
	N	462	462	462	462	437	442	437	437	438	438	438	455	455	370	92	227	92	92	92
Transparence	Pearson Correlation	-.337	-.526	-.571	-.298	1,000	-.061	-.217	-.174	-.343	-.086	-.095	-.271	-.275	-.816	-.494	-.600	-.304	-.516	-.489
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000		,205	,000	,000	,073	,048	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,004	,000	,000
	N	437	437	437	437	437	437	436	436	436	436	436	436	436	348	89	219	89	89	89
Température	Pearson Correlation	,098	,035	,076	-.135	-.061	1,000	,064	-.350	,115	-.109	,115	,092	-.062	,055	,093	,114	-.051	-.033	,347
	Sig. (2-tailed)	,040	,464	,111	,005	,205		,181	,000	,000	,023	,016	,054	,195	,307	,382	,092	,634	,757	,001
	N	442	442	442	442	437	442	437	437	438	438	438	441	441	352	90	221	90	90	90
Saturation en oxygène	Pearson Correlation	,227	,244	,193	,186	-.217	,064	1,000	,909	,452	,169	,177	-.080	-.018	,206	-.272	,454	,042	-.110	-.079
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,181		,000	,000	,000	,097	,710	,000	,010	,000	,693	,304	,461	
	N	437	437	437	437	436	437	437	437	437	437	437	436	436	348	89	218	89	89	89
Oxygène dissous	Pearson Correlation	,166	,209	,144	,232	-.174	-.350	,909	1,000	,321	,211	,125	-.113	,010	,165	-.275	,389	,057	-.071	-.231
	Sig. (2-tailed)	,001	,000	,003	,000	,000	,000	,000		,000	,009	,019	,833	,002	,009	,000	,594	,510	,029	
	N	437	437	437	437	436	437	437	437	437	437	437	436	436	348	89	218	89	89	89
pH	Pearson Correlation	,372	,453	,407	,304	-.343	,237	,452	,321	1,000	,433	,499	-.001	-.014	,410	,181	,562	,103	,288	,031
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000		,000	,000	,979	,764	,000	,088	,000	,333	,006	,773
	N	438	438	438	438	436	438	437	437	438	438	438	437	437	348	90	219	90	90	90
TDS	Pearson Correlation	,057	,044	,065	-.048	-.086	-.109	,169	,211	,433	1,000	,968	-.057	-.004	,048	,021	,065	,212	-.008	-.212
	Sig. (2-tailed)	,237	,363	,177	,315	,073	,023	,000	,000	,000		,000	,236	,935	,375	,847	,337	,045	,943	,045
	N	438	438	438	438	436	438	437	437	438	438	438	437	437	348	90	219	90	90	90
Conductivité	Pearson Correlation	,083	,056	,085	,022	-.095	,115	,177	,125	,499	,968	1,000	-.035	-.027	,063	,046	,093	,203	-.008	-.139
	Sig. (2-tailed)	,084	,246	,076	,652	,048	,016	,000	,009	,000	,000		,471	,578	,244	,667	,170	,055	,938	,192
	N	438	438	438	438	436	438	437	437	438	438	438	437	437	348	90	219	90	90	90
Coliformes totaux	Pearson Correlation	,060	,197	,145	,139	-.271	,092	-.080	-.113	-.001	-.057	-.035	1,000	,394	,314	,117	,181	,059	,213	,385
	Sig. (2-tailed)	,201	,000	,002	,003	,000	,054	,097	,019	,979	,236	,471		,000	,000	,271	,006	,582	,043	,000
	N	455	455	455	455	436	441	436	436	437	437	437	458	458	365	90	224	90	90	90
E.coli	Pearson Correlation	-.003	,035	,058	,047	-.275	-.062	-.018	,010	-.014	-.004	-.027	,394	1,000	,243	,010	,161	,017	,101	,200
	Sig. (2-tailed)	,951	,463	,214	,314	,000	,195	,710	,833	,764	,935	,578	,000		,000	,928	,016	,874	,343	,058
	N	455	455	455	455	436	441	436	436	437	437	437	458	458	365	90	224	90	90	90
Turbidité	Pearson Correlation	,410	,697	,708	,483	-.816	,055	,206	,165	,410	,048	,063	,314	,243	1,000	,792	,000	,792	,000	,000
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,307	,000	,002	,000	,375	,244	,000	,000		,000	,000	,000	,000	,000
	N	370	370	370	370	348	352	348	348	348	348	348	365	365	370	135	135	135	135	135
Phosphore	Pearson Correlation	,642	,544	,386	,556	-.494	,093	-.272	-.275	,181	,021	,046	,117	,010	,000	1,000	,492	,205	,860	,309
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,382	,010	,009	,088	,847	,667	,271	,928			,000	,050	,000	,003
	N	92	92	92	92	89	90	89	89	90	90	90	90	90	92	92	92	92	92	92
Chlorophylle SM	Pearson Correlation	,608	,886	,566	,831	-.600	,114	,454	,389	,562	,065	,093	,181	,161	,792	,492	1,000	,113	,683	,418
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,092	,000	,000	,000	,337	,170	,006	,016	,000	,000		,283	,000	,000
	N	227	227	227	227	218	221	218	218	219	219	219	224	224	135	92	228	92	92	92
NH4	Pearson Correlation	,130	,229	,229	,129	-.304	-.051	,042	,057	,103	,212	,203	,059	,017	,000	,205	,113	1,000	,220	,208
	Sig. (2-tailed)	,219	,028	,028	,221	,004	,634	,693	,594	,333	,045	,055	,582	,874		,050	,283		,035	,047
	N	92	92	92	92	89	90	89	89	90	90	90	90	90	92	92	92	92	92	92
NTK	Pearson Correlation	,757	,748	,485	,709	-.516	-.033	-.110	-.071	,288	-.008	-.008	,213	,101	,000	,860	,683	,220	1,000	,408
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,757	,304	,510	,006	,943	,938	,043	,343		,000	,000	,035	,000	,000
	N	92	92	92	92	89	90	89	89	90	90	90	90	90	92	92	92	92	92	92
COT	Pearson Correlation	,402	,395	,169	,400	-.489	,347	-.079	-.231	,031	-.212	-.139	,385	,200	,000	,309	,418	,208	,408	1,000
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,108	,000	,000	,001	,461	,029	,773	,045	,192	,000	,058		,003	,000	,047	,000	,000
	N	92	92	92	92	89	90	89	89	90	90	90	90	90	92	92	92	92	92	92

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).
 * . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).
 a. Cannot be computed because at least one of the variables is constant.

Tableau 40 : Corrélations non-paramétrique de Spearman entre les paramètres

		Microcystine	Phycocyanine	Chlorophylle	PC/Chl	Transparence	Température	Saturation en oxygène	Oxygène dissous	pH	TDS	Conductivité	Coliformes totaux	E.coli	Turbidité	Phosphore	Chlorophylle SM	NH4	NTK	COT
Microcystine	Correlation Coefficient	1,000	,397**	,284**	,347**	-,275**	,249**	,049	-,051	,168**	,171**	,226**	,074	,162**	,202**	,339**	,353**	,292**	,269**	,260**
	Sig. (2-tailed)		,000	,000	,000	,000	,000	,305	,288	,000	,000	,000	,114	,001	,000	,001	,000	,005	,010	,012
	N	462	462	462	462	437	442	437	437	438	438	438	438	455	455	370	92	227	92	92
Phycocyanine	Correlation Coefficient	,397**	1,000	,576**	,681**	-,404**	-,031	-,015	,006	,247**	,293**	,270**	,132**	,078	,390**	,561**	,797**	,135	,343**	,266**
	Sig. (2-tailed)	,000		,000	,000	,000	,519	,748	,901	,000	,000	,000	,005	,098	,000	,000	,000	,201	,001	,010
	N	462	462	462	462	437	442	437	437	438	438	438	455	455	370	92	227	92	92	92
Chlorophylle	Correlation Coefficient	,284**	,576**	1,000	-,082	-,487**	,132**	-,006	-,065	,119	,058	,087	,183**	,191**	,548**	,403**	,689**	,165	,320**	,185**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000		,077	,000	,006	,900	,173	,013	,226	,069	,000	,000	,000	,000	,000	,116	,002	,077
	N	462	462	462	462	437	442	437	437	438	438	438	455	455	370	92	227	92	92	92
PC/Chl	Correlation Coefficient	,347**	,681**	-,082	1,000	-,198**	-,137**	,048	,129**	,232**	,320**	,271**	,046	-,023	,149**	,262**	,329**	-,010	-,111	,151**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,077		,000	,004	,321	,007	,000	,000	,000	,325	,625	,004	,012	,000	,924	,290	,151
	N	462	462	462	462	437	442	437	437	438	438	438	455	455	370	92	227	92	92	92
Transparence	Correlation Coefficient	-,275**	-,404**	-,487**	-,198**	1,000	-,049	-,053	-,037	-,124**	-,134**	-,130**	-,305**	-,378**	-,625**	-,538**	-,447**	-,347**	-,284**	-,370**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000		,306	,269	,437	,010	,005	,006	,000	,000	,000	,000	,000	,001	,007	,000
	N	437	437	437	437	437	437	436	436	436	436	436	436	436	348	89	218	89	89	89
Température	Correlation Coefficient	,249**	-,031	,132**	-,137**	-,049	1,000	,024	-,389**	,213**	-,099	,145**	,161**	,057	,074	,127	,123	,027	-,143	,403**
	Sig. (2-tailed)	,000	,519	,006	,004	,306		,622	,000	,000	,039	,002	,001	,230	,167	,231	,068	,803	,178	,000
	N	442	442	442	442	437	442	437	437	438	438	438	441	441	352	90	227	90	90	90
Saturation en oxygène	Correlation Coefficient	,049	-,015	-,006	,048	-,053	,024	1,000	,885**	,335**	,146**	,141**	-,088	,009	-,016	-,316**	,031	-,082	-,348**	-,214**
	Sig. (2-tailed)	,305	,748	,900	,321	,269	,622		,000	,000	,002	,003	,066	,856	,763	,003	,652	,447	,001	,044
	N	437	437	437	437	436	437	437	437	437	437	437	436	436	348	89	218	89	89	89
Oxygène dissous	Correlation Coefficient	-,051	,006	-,065	,129**	-,037	-,389**	,885**	1,000	,210**	,181**	,066	-,174**	-,031	-,025	-,334**	,001	-,094	-,212	-,415**
	Sig. (2-tailed)	,288	,901	,173	,007	,437	,000	,000		,000	,000	,168	,000	,517	,638	,001	,990	,383	,046	,000
	N	437	437	437	437	436	437	437	437	437	437	437	436	436	348	89	218	89	89	89
pH	Correlation Coefficient	,168**	,247**	,119	,232**	-,124**	,213**	,335**	,210**	1,000	,497**	,541**	-,135**	-,136**	-,123	-,190	,087	-,081	-,099	-,262**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,013	,000	,010	,000	,000	,000		,000	,000	,005	,004	,022	,073	,202	,450	,351	,012
	N	438	438	438	438	436	438	437	437	438	438	438	437	437	348	90	219	90	90	90
TDS	Correlation Coefficient	,171**	,293**	,058	,320**	-,134**	-,099	,146**	,181**	,497**	1,000	,954**	-,111**	-,071	-,056	,057	,072	,077	-,079	-,267**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,226	,000	,005	,039	,002	,000	,000		,000	,020	,140	,301	,594	,290	,471	,460	,011
	N	438	438	438	438	436	438	437	437	438	438	438	437	437	348	90	219	90	90	90
Conductivité	Correlation Coefficient	,226**	,270**	,087	,271**	-,130**	-,145**	,141**	,066	,541**	,954**	1,000	-,058	-,052	-,042	,072	,085	,080	-,106	-,155**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,069	,000	,006	,002	,003	,168	,000	,000		,230	,475	,432	,499	,211	,453	,319	,145
	N	438	438	438	438	436	438	437	437	438	438	438	437	437	348	90	219	90	90	90
Coliformes totaux	Correlation Coefficient	,074	,132**	,183**	,046	-,305**	,161**	-,088	-,174**	-,135**	-,111	-,058	1,000	,590**	,294**	,246	,106	,125	,241**	,402**
	Sig. (2-tailed)	,114	,005	,000	,325	,000	,001	,066	,000	,005	,020	,230		,000	,000	,019	,113	,240	,022	,000
	N	455	455	455	455	436	441	436	436	437	437	437	458	458	365	90	224	90	90	90
E.coli	Correlation Coefficient	,162**	,078	,191**	-,023	-,378**	,057	,009	-,031	-,136**	-,071	-,052	,590**	1,000	,282**	,439**	,148	,129	,261**	,134**
	Sig. (2-tailed)	,001	,098	,000	,625	,000	,230	,856	,517	,004	,140	,275	,000		,000	,000	,027	,227	,013	,209
	N	455	455	455	455	436	441	436	436	437	437	437	458	458	365	90	224	90	90	90
Turbidité	Correlation Coefficient	,202**	,390**	,548**	,149**	-,625**	,074	-,016	-,025	-,123**	-,056	-,042	,294**	,282**	1,000		,516**			
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,004	,000	,167	,763	,638	,022	,301	,432	,000	,000			,000			
	N	370	370	370	370	348	352	348	348	348	348	348	365	365	370		135			
Phosphore	Correlation Coefficient	,339**	,561**	,403**	,262**	-,538**	,127	-,316**	-,334**	-,190	,057	,072	,246	,439**		1,000	,435**	,238**	,342**	,266**
	Sig. (2-tailed)	,001	,000	,000	,012	,000	,231	,003	,001	,073	,594	,499	,019	,000			,000	,023	,001	,010
	N	92	92	92	92	89	90	89	89	90	90	90	90	90	90	92	92	92	92	92
Chlorophylle SM	Correlation Coefficient	,353**	,797**	,689**	,329**	-,447**	,123	,031	,001	,087	,072	,085	,106	,148	,516**	,435**	1,000	,113	,234**	,155**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,068	,652	,990	,202	,290	,211	,113	,027	,000	,000		,285	,025	,141
	N	227	227	227	227	218	221	218	218	219	219	219	224	224	135	92	228	92	92	92
NH4	Correlation Coefficient	,292**	,135	,165	-,010	-,347**	,027	-,082	-,094	-,081	,077	,080	,125	,129		,238**	,113	1,000	,138	,339**
	Sig. (2-tailed)	,005	,201	,116	,924	,001	,803	,447	,383	,450	,471	,453	,240	,227		,023	,285		,188	,001
	N	92	92	92	92	89	90	89	89	90	90	90	90	90	90	92	92	92	92	92
NTK	Correlation Coefficient	,269**	,343**	,320**	,111	-,284**	-,143	-,348**	-,212	-,099	-,079	-,106	,241	,261		,342**	,234	,138	1,000	,345**
	Sig. (2-tailed)	,010	,001	,002	,290	,007	,178	,001	,046	,351	,460	,319	,022	,013		,001	,025	,188		,001
	N	92	92	92	92	89	90	89	89	90	90	90	90	90	90	92	92	92	92	92
COT	Correlation Coefficient	,260**	,266**	,185**	,151	-,370**	,403**	-,214**	-,415**	-,262**	-,267**	-,155	,402**	,134		,266**	,155	,339**	,345**	1,000
	Sig. (2-tailed)	,012	,010	,077	,151	,000	,000	,044	,000	,012	,011	,145	,000	,209		,010	,141	,001	,001	
	N	92	92	92	92	89	90	89	89	90	90	90	90	90	90	92	92	92	92	92

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Tableau 41 : Corrélations de Pearson entre la concentration en microcystines et le logarithme en base 10 des paramètres

		Microcystine	Log Phycocyanine	Log Chlorophylle	Log PCChl	Log Transparence	Log Temperature	Log SatOxygene	Log Oxygene Dissous	Log pH	Log TDS	Log Conductivite	Log Coliformes Totaux	Log E.coli	Log Turbidite	Log Phosphore	Log Chlorophylle extraite	Log NH4	Log NTK	Log COT
Microcystine	Pearson Correlation	1,000	,570	,393	,451	-,317	,095	,180	,132	,355	,104	,127	,061	,051	,374	,592	,682	,172	,551	,357
	Sig. (2-tailed)		,000	,000	,000	,000	,046	,000	,006	,000	,030	,008	,192	,280	,000	,000	,000	,102	,000	,000
	N	462	462	462	462	437	442	437	437	438	438	438	455	455	370	92	227	92	92	92
Log Phycocyanine	Pearson Correlation	,570	1,000	,641	,826	-,588	-,020	,153	,153	,447	,199	,195	,148	,126	,616	,704	,930	,220	,553	,353
	Sig. (2-tailed)	,000		,000	,000	,000	,680	,001	,001	,000	,000	,000	,002	,007	,000	,000	,000	,035	,000	,001
	N	462	462	462	462	437	442	437	437	438	438	438	455	455	370	92	227	92	92	92
Log Chlorophylle	Pearson Correlation	,393	,641	1,000	,096	-,494	,173	,050	-,024	,306	,054	,094	,157	,186	,613	,454	,698	,207	,385	,223
	Sig. (2-tailed)	,000	,000		,039	,000	,000	,620	,000	,000	,050	,001	,000	,000	,000	,000	,000	,048	,000	,033
	N	462	462	462	462	437	442	437	437	438	438	438	455	455	370	92	227	92	92	92
Log PCChl	Pearson Correlation	,451	,826	,096	1,000	-,376	-,153	,159	,212	,344	,214	,179	,076	,026	,352	,547	,753	,115	,405	,278
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,039		,000	,001	,000	,000	,000	,000	,000	,104	,574	,000	,000	,000	,277	,000	,007
	N	462	462	462	462	437	442	437	437	438	438	438	455	455	370	92	227	92	92	92
Log Transparence	Pearson Correlation	-,317	-,588	-,494	-,376	1,000	-,038	-,181	-,152	-,356	-,121	-,129	-,287	-,432	-,746	-,548	-,618	-,290	-,352	-,402
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000		,431	,000	,001	,000	,012	,007	,000	,000	,000	,000	,000	,006	,001	,000
	N	437	437	437	437	437	437	436	436	436	436	436	436	436	348	89	218	89	89	89
Log Temperature	Pearson Correlation	,095	-,020	,173	-,153	-,038	1,000	,035	-,367	,234	-,089	,138	,180	,043	,069	,118	,114	-,015	-,083	,427
	Sig. (2-tailed)	,046	,680	,000	,001	,431		,468	,000	,000	,063	,004	,000	,370	,197	,270	,091	,888	,435	,000
	N	442	442	442	442	437	442	437	437	438	438	438	441	441	352	90	221	90	90	90
Log Saturation Oxygene	Pearson Correlation	,180	,153	,050	,159	-,181	,035	1,000	,915	,412	,173	,180	-,111	,002	,105	-,314	,313	-,089	-,266	-,134
	Sig. (2-tailed)	,000	,001	,299	,001	,000	,468		,000	,000	,000	,021	,966	,050	,003	,000	,406	,012	,211	,211
	N	437	437	437	437	436	437	437	437	437	437	437	436	436	348	89	218	89	89	89
Log Oxygene Dissous	Pearson Correlation	,132	,153	-,024	,212	-,152	-,367	,915	1,000	,285	,198	,113	-,178	-,016	,069	-,329	,254	-,087	-,191	-,298
	Sig. (2-tailed)	,006	,001	,620	,000	,001	,000	,000		,000	,000	,018	,000	,735	,199	,002	,000	,415	,072	,005
	N	437	437	437	437	436	437	437	437	437	437	437	436	436	348	89	218	89	89	89
Log pH	Pearson Correlation	,355	,447	,306	,344	-,356	,234	,412	,285	1,000	,467	,525	-,098	-,055	,167	,114	,480	,021	,119	-,046
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000		,000	,000	,041	,252	,002	,284	,000	,841	,264	,669
	N	438	438	438	438	436	438	437	437	438	438	438	437	437	348	90	219	90	90	90
Log TDS	Pearson Correlation	,104	,199	,054	,214	-,121	-,089	,173	,198	,467	1,000	,972	-,125	-,048	-,036	,042	,079	,103	-,039	-,234
	Sig. (2-tailed)	,030	,000	,263	,000	,012	,063	,000	,000	,000		,000	,009	,313	,508	,695	,245	,332	,718	,027
	N	438	438	438	438	436	438	437	437	438	438	438	437	437	348	90	219	90	90	90
Log Conductivite	Pearson Correlation	,127	,195	,094	,179	-,129	,138	,180	,113	,525	,972	1,000	-,082	-,041	-,021	,070	,101	,099	-,056	-,143
	Sig. (2-tailed)	,008	,000	,050	,000	,007	,004	,000	,018	,000	,000		,086	,396	,697	,511	,135	,351	,597	,180
	N	438	438	438	438	436	438	437	437	438	438	438	437	437	348	90	219	90	90	90
Log Coliformes Totaux	Pearson Correlation	,061	,148	,157	,076	-,287	,180	-,111	-,178	-,098	-,125	-,082	1,000	,600	,318	,249	,108	,125	,243	,401
	Sig. (2-tailed)	,192	,002	,001	,104	,000	,000	,021	,000	,041	,009	,086		,000	,000	,018	,108	,240	,021	,000
	N	455	455	455	455	436	441	436	436	437	437	437	458	458	365	90	224	90	90	90
Log E.coli	Pearson Correlation	,051	,126	,186	,026	-,432	,043	,002	-,016	-,055	-,048	-,041	,600	1,000	,355	,306	,184	,116	,251	,176
	Sig. (2-tailed)	,280	,007	,000	,574	,000	,370	,966	,735	,252	,313	,396	,000		,000	,003	,006	,277	,017	,097
	N	455	455	455	455	436	441	436	436	437	437	437	458	458	365	90	224	90	90	90
Log Turbidite	Pearson Correlation	,374	,616	,613	,352	-,746	-,069	-,105	,069	,167	-,036	-,021	,318	,355	1,000	,620	,702	,296	,551	,343
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,197	,050	,199	,002	,508	,697	,000	,000		,000	,000	,004	,000	,001
	N	370	370	370	370	348	352	348	348	348	348	348	365	365	370	92	228	92	92	92
Log Phosphore	Pearson Correlation	,592	,704	,454	,547	-,548	,118	-,314	-,329	,114	,042	,070	,249	,306	1,000	,620	,296	,551	,343	,343
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,270	,003	,002	,284	,695	,511	,018	,003		,000	,000	,096	,000	,001
	N	92	92	92	92	89	90	89	89	90	90	90	90	90	92	92	92	92	92	92
Log ChlorophylleS M	Pearson Correlation	,682	,930	,698	,753	-,618	,114	,313	-,254	,480	,079	,101	,108	,184	,702	,620	1,000	,168	,501	,291
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,091	,000	,000	,000	,245	,135	,108	,006	,000	,000		,109	,000	,005
	N	227	227	227	227	218	221	218	218	219	219	219	224	224	135	92	92	92	92	92
Log NH4	Pearson Correlation	,172	,220	,207	,115	-,290	-,015	-,089	-,087	,021	,103	,099	,125	,116	1,000	,296	,168	1,000	,174	,317
	Sig. (2-tailed)	,102	,035	,048	,277	,006	,888	,406	,415	,841	,332	,351	,240	,277		,004	,109	,096	,002	,002
	N	92	92	92	92	89	90	89	89	90	90	90	90	90	92	92	92	92	92	92
Log NTK	Pearson Correlation	,551	,553	,385	,405	-,352	-,083	-,266	-,191	,119	-,039	-,056	,243	,251	1,000	,501	,501	,174	1,000	,387
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,001	,435	,012	,072	,264	,718	,597	,021	,017		,000	,000	,096	,000	,000
	N	92	92	92	92	89	90	89	89	90	90	90	90	90	92	92	92	92	92	92
Log COT	Pearson Correlation	,357	,353	,223	,278	-,402	,427	-,134	-,298	-,046	-,234	-,143	,401	,176	1,000	,343	,291	,317	,387	1,000
	Sig. (2-tailed)	,000	,001	,033	,007	,000	,000	,211	,005	,669	,027	,180	,000	,097		,001	,005	,002	,000	,000
	N	92	92	92	92	89	90	89	89	90	90	90	90	90	92	92	92	92	92	92

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

a . Cannot be computed because at least one of the variables is constant.

Tableau 42 : Corrélations de Pearson entre le logarithme en base 10 de la concentration des microcystines et les autres paramètres

		Log Microcystine	Phycocyanine	Chlorophylle	PC/Chl	Transparence	Température	Saturation en oxygène	Oxygène dissous	pH	TDS	Conductivité	Coliformes totaux	E.coli	Turbidité	Phosphore	Chlorophylle SM	NH4	NTK	COT
Log Microcystine	Pearson Correlation	1,000	,294	,399	,244	-,362	,239	,155	,044	,329	,099	,155	,084	-,010	,421	,497	,531	,195	,516	,287
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,001	,361	,000	,039	,001	,075	,824	,000	,000	,062	,000	,000	,006
	N	462	462	462	462	437	442	437	437	438	438	438	455	455	370	92	227	92	92	92
Phycocyanine	Pearson Correlation	,294	1,000	,554	,677	-,526	,035	,244	,209	,453	,044	,056	,197	,035	,697	,544	,886	,229	,748	,395
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,464	,000	,000	,000	,363	,246	,000	,463	,000	,000	,000	,028	,000	,000
	N	462	462	462	462	437	442	437	437	438	438	438	455	455	370	92	227	92	92	92
Chlorophylle	Pearson Correlation	,399	,554	1,000	,293	-,571	,076	,193	,144	,407	,065	,085	,145	,058	,708	,386	,566	,229	,485	,169
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,111	,000	,003	,000	,177	,076	,002	,214	,000	,000	,000	,028	,000	,108
	N	462	462	462	462	437	442	437	437	438	438	438	455	455	370	92	227	92	92	92
PC/Chl	Pearson Correlation	,244	,677	,293	1,000	-,298	-,135	,186	,232	,304	,048	,022	,139	,047	,483	,556	,831	,129	,709	,400
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,005	,000	,000	,000	,315	,652	,003	,314	,000	,000	,000	,221	,000	,000
	N	462	462	462	462	437	442	437	437	438	438	438	455	455	370	92	227	92	92	92
Transparence	Pearson Correlation	-,362	-,526	-,571	-,298	1,000	-,061	-,217	-,174	-,343	-,086	-,095	-,271	-,275	-,816	-,494	-,600	-,304	-,516	-,489
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,205	,000	,000	,000	,048	,000	,048	,000	,000	,000	,000	,004	,000	,000
	N	437	437	437	437	437	437	436	436	436	436	436	436	436	348	89	218	89	89	89
Température	Pearson Correlation	,239	,035	,076	-,135	-,061	1,000	,064	-,350	,237	-,109	,115	,092	-,062	,055	,093	,114	-,051	-,033	,347
	Sig. (2-tailed)	,000	,464	,111	,005	,205	,000	,181	,000	,000	,023	,016	,054	,195	,307	,382	,092	,634	,757	,001
	N	442	442	442	442	437	442	437	437	438	438	438	441	441	352	90	221	90	90	90
Saturation en oxygène	Pearson Correlation	,155	,244	,193	,186	-,217	,064	1,000	,909	,452	,169	,177	-,080	-,018	,206	-,272	,454	,042	-,110	-,079
	Sig. (2-tailed)	,001	,000	,000	,000	,000	,181	,000	,000	,000	,000	,000	,097	,710	,000	,010	,000	,693	,304	,461
	N	437	437	437	437	436	437	437	437	437	437	437	436	436	348	89	218	89	89	89
Oxygène dissous	Pearson Correlation	,044	,209	,144	,232	-,174	-,350	,909	1,000	,321	,211	,125	-,113	,010	,165	-,275	,389	,057	-,071	-,231
	Sig. (2-tailed)	,361	,000	,003	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,009	,019	,833	,002	,009	,000	,594	,510	,029
	N	437	437	437	437	436	437	437	437	437	437	437	436	436	348	89	218	89	89	89
pH	Pearson Correlation	,329	,453	,407	,304	-,343	,237	,452	,321	1,000	,433	,499	-,001	-,014	,410	,181	,562	,103	,288	,031
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,979	,764	,000	,088	,000	,333	,006	,773
	N	438	438	438	438	436	438	437	437	438	438	438	437	437	348	90	219	90	90	90
TDS	Pearson Correlation	,099	,044	,065	,048	-,086	-,109	,169	,211	,433	1,000	,968	-,057	-,004	,048	,021	,065	,212	-,008	-,212
	Sig. (2-tailed)	,039	,363	,177	,315	,073	,023	,000	,000	,000	,000	,000	,236	,935	,375	,847	,337	,045	,943	,045
	N	438	438	438	438	436	438	437	437	438	438	438	437	437	348	90	219	90	90	90
Conductivité	Pearson Correlation	,155	,056	,085	,022	-,095	,115	,177	,125	,499	,968	1,000	-,035	-,027	,063	,046	,093	,203	-,008	-,139
	Sig. (2-tailed)	,001	,246	,076	,652	,048	,016	,000	,009	,000	,000	,000	,471	,578	,244	,667	,170	,055	,938	,192
	N	438	438	438	438	436	438	437	437	438	438	438	437	437	348	90	219	90	90	90
Coliformes totaux	Pearson Correlation	,084	,197	,145	,139	-,271	,092	-,080	-,113	-,001	-,057	-,035	1,000	,394	,314	,117	,181	,059	,213	,385
	Sig. (2-tailed)	,075	,000	,002	,003	,000	,054	,097	,019	,979	,236	,471	,000	,000	,000	,271	,006	,582	,043	,000
	N	455	455	455	455	436	441	436	436	437	437	437	458	458	365	90	224	90	90	90
E.coli	Pearson Correlation	-,010	,035	,058	,047	-,275	-,062	-,018	,010	-,014	-,004	-,027	,394	1,000	,243	,010	,161	,017	,101	,200
	Sig. (2-tailed)	,824	,463	,214	,314	,000	,195	,710	,833	,764	,935	,578	,000	,000	,928	,016	,874	,343	,058	,058
	N	455	455	455	455	436	441	436	436	437	437	437	458	458	365	90	224	90	90	90
Turbidité	Pearson Correlation	,421	,697	,708	,483	-,816	,055	,206	,165	,410	,048	,063	,314	-,243	1,000	,792	,792	,117	,181	,200
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,307	,000	,002	,000	,375	,244	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
	N	370	370	370	370	348	352	348	348	348	348	348	365	365	370	135	135	92	92	92
Phosphore	Pearson Correlation	,497	,544	,386	,556	-,494	,093	-,272	-,275	,181	,021	,046	,117	,010	1,000	,492	,492	,205	,860	,309
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,382	,010	,009	,088	,847	,667	,271	,928	,000	,000	,000	,050	,000	,003
	N	92	92	92	92	89	90	89	89	90	90	90	90	90	92	92	92	92	92	92
Chlorophylle SM	Pearson Correlation	,531	,886	,566	,831	-,600	,114	,454	,389	,562	,065	,093	,181	,161	,792	,492	1,000	,113	,683	,418
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,092	,000	,000	,000	,337	,170	,006	,016	,000	,000	,000	,283	,000	,000
	N	227	227	227	227	218	221	218	218	219	219	219	224	224	135	92	228	92	92	92
NH4	Pearson Correlation	,195	,229	,229	,129	-,304	-,051	,042	,057	,103	,212	,203	,059	,017	1,000	,205	,113	1,000	,220	,208
	Sig. (2-tailed)	,062	,028	,028	,221	,004	,634	,693	,594	,333	,045	,055	,582	,874	,000	,050	,283	,000	,035	,047
	N	92	92	92	92	89	90	89	89	90	90	90	90	90	92	92	92	92	92	92
NTK	Pearson Correlation	,516	,748	,485	,709	-,516	-,033	-,110	-,071	,288	-,008	-,008	,213	,101	1,000	,860	,683	,220	1,000	,408
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,757	,304	,510	,006	,943	,938	,043	,343	,000	,000	,000	,035	,000	,000
	N	92	92	92	92	89	90	89	89	90	90	90	90	90	92	92	92	92	92	92
COT	Pearson Correlation	,287	,395	,169	,400	-,489	,347	-,079	-,231	,031	-,212	-,139	,385	,200	1,000	,309	,418	,208	,408	1,000
	Sig. (2-tailed)	,006	,000	,108	,000	,000	,001	,461	,029	,773	,045	,192	,000	,058	,000	,003	,000	,047	,000	,000
	N	92	92	92	92	89	90	89	89	90	90	90	90	90	92	92	92	92	92	92

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

a. Cannot be computed because at least one of the variables is constant.

Annexe 11 : Détails des modèles de régression linéaire multiple

Modèle A

Tableau 43 : Sommaire du modèle quantitatif A

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,570 ^a	,325	,324	,62034

a. Predictors: (Constant), Log_Phycocyanine

b. Dependent Variable: Microcystine

Tableau 44 : Coefficients du modèle quantitatif A

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	2,271	,129		17,553	,000
	Log_Phycocyanine	,856	,057	,570	14,895	,000

a. Dependent Variable: Microcystine

Modèle B

Tableau 45 : Sommaire du modèle quantitatif B

Model Summary^c

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,536 ^a	,287	,286	,58840
2	,551 ^b	,303	,300	,58246

a. Predictors: (Constant), Log_Phycocyanine

b. Predictors: (Constant), Log_Phycocyanine, Saturation en oxygène

c. Dependent Variable: Microcystine

Tableau 46 : Coefficients du modèle quantitatif B

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	95% Confidence Interval for B	
		B	Std. Error	Beta			Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	2,098	,134		15,691	,000	1,835	2,360
	Log_Phycocyanine	,783	,059	,536	13,239	,000	,667	,899
2	(Constant)	1,491	,234		6,377	,000	1,031	1,950
	Log_Phycocyanine	,747	,060	,511	12,520	,000	,629	,864
	Saturation en oxygène	,005	,002	,129	3,149	,002	,002	,009

a. Dependent Variable: Microcystine