



Applicabilité des kits ELISA dans le cadre de la surveillance des eaux souterraines et eaux superficielles

Rapport final

BRGM/RP 58259-FR
mars 2010

Applicabilité des kits ELISA dans le cadre de la surveillance des eaux souterraines et eaux superficielles

Rapport final

BRGM/RP 58259-FR
mars 2010

Étude réalisée dans le cadre des projets
de Service public du BRGM 2009

A. Togola

Vérificateur :

Nom : JP GHESTEM

Date : 15/03/10

Signature :

Approbateur :

Nom : G HERVOUET

Date : 16/03/10

Signature :

En l'absence de signature, notamment pour les rapports diffusés en version numérique, l'original signé est disponible aux Archives du BRGM.

Le système de management de la qualité du BRGM est certifié AFAQ ISO 9001:2000.

Mots clés : ELISA ; analyse ; pesticides ; immuno-enzymatique ; surveillance ; eau

En bibliographie, ce rapport sera cité de la façon suivante : Togola A., (2009) – Applicabilité des kits ELISA dans le cadre de la surveillance des eaux souterraines et eaux superficielles, Rapport BRGM/RP-58259FR, 27 pages, 11 illustrations,

Synthèse

Le test ELISA (acronyme d'*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) est un test immunologique destiné à détecter et/ou doser une molécule dans un échantillon liquide. Ces kits faciles d'utilisation et utilisables sur le terrain permettent l'analyse de nombreuses substances (toxines, protéines, molécules organiques...) dont certaines substances des listes réglementaires de la directive Cadre sur l'Eau.

Si jusqu'ici ces kits étaient plus utilisés dans les domaines de la biologie et de la biochimie, les limites de quantification actuellement accessibles deviennent compatibles avec certains niveaux de qualité environnementaux.

Ainsi, ces outils pourraient dans l'avenir avoir une place dans certains programmes de surveillance. Ce rapport, rédigé dans le cadre du programme de travail d'AQUAREF 2009, s'attache à faire l'état de l'art de l'utilisation de ces outils, leurs avantages et inconvénients ainsi que sur leur utilisation possible dans les programmes de monitoring, et les développements et études encore nécessaires. Les possibilités offertes en termes de types de molécules, type de matrice analysables sont présentées. Le BRGM propose également quelques essais en laboratoire orientés vers les interférences potentielles (matière organique, effets multi résidus, faux positifs) montrant l'applicabilité des ces outils pour différents types d'eaux souterraines et d'eaux de surface. En effet, des essais ont été réalisés sur échantillons naturels afin de montrer l'impact de la teneur en matière en suspension et des propriétés physico-chimiques des eaux analysées sur la validité des mesures. Il apparaît que les mesures par tests ELISA sont relativement robustes, hormis l'impact de la teneur en matière en suspension qui nécessite la filtration préalable des échantillons.

Deux exemples d'applications sont ensuite développés, montrant les apports de l'utilisation de ces kits en terme de nombres d'échantillons analysés (intérêts en terme de cout et de temps d'analyse) et donc d'informations acquises. Le premier exemple montre une application à grande échelle spatiale (150 échantillons analysés en 1 semaine sur un bassin versant) et le deuxième une utilisation à pas de temps court (évolution temporelle des caractéristiques d'un site).

Sommaire

1. Introduction	7
2. Technique ELISA	9
2.1. PRINCIPE	9
2.1.1. Réaction immuno-enzymatique	9
2.1.2. Principe du dosage	10
2.1.3. Types de kits disponibles	10
2.2. PRESENTATIONS DES KITS	11
2.3. TYPES DE SUBSTANCES ANALYSABLES	12
3. Essais sur la validité des kits	15
3.1. EFFETS DE LA PRESENCE DE MATIERES EN SUSPENSION	15
3.2. VARIABILITE SELON LES TYPES D'EAU.....	16
3.3. MESURES A LA LIMITE DE QUANTIFICATION	16
4. Exemples d'application des kits ELISA	19
4.1. APPLICABILITE A LA CARACTERISATION D'UN MILIEU	19
4.1.1. Contexte et objectifs des mesures	19
4.1.2. Résultats de la campagne	19
4.1.3. Conclusions	22
4.2. APPLICABILITE AU SUIVI TEMPOREL D'UNE ZONE D'INTERET	22
4.2.1. Contexte et objectifs des mesures	22
4.2.2. Conclusions	24
4.3. ESTIMATION DU COUT DE L'UTILISATION DES KITS ELISA	24
5. CONCLUSIONS	27

Liste des illustrations

Illustration 1 : Schéma présentant les 3 principes utilisés pour la technique ELISA.....	10
Illustration 2 : Présentation des deux systèmes de kits ELISA communément employés (à gauche format microplaque, à droite format en tube).	11
Illustration 3 : Exemples de kits distribués commercialement. Les NQE (définitives ou en proposition, http://www.ineris.fr/substances/fr/page/9) sont données à titre indicatif à fin de comparaison.	13
Illustration 4 : Comparaison des mesures effectuées avec et sans filtration.	15
Illustration 5 : Effet de différentes matrices sur la mesure	16
Illustration 6 : test de la réponse des kit ELISA à la limite de quantification (Atrazine)	17
Illustration 7 : test de la réponse du kit ELISA à la limite de quantification (Acétochlor)	17
Illustration 8 : Résultats obtenus par les mesures ELISA (atrazine et métolachlor), Bassin versant de l'Ariège	20
Illustration 9 : Résultats obtenus entre kits ELISA et analyses classiques	21
Illustration 10 : Chronique de la contamination en atrazine, suivi par tests ELISA.....	23
Illustration 11 : Chronique de la contamination en isoproturon, suivi par tests ELISA.....	24

1. Introduction

L'analyse des substances polluantes dans les eaux est un sujet toujours en évolution. La liste des substances à suivre évolue, le nombre de substances augmente, et avec, le coût et la complexité des mesures. Les méthodes d'analyses classiques sont majoritairement utilisées mais des outils alternatifs tendent à se développer depuis quelques années (capteurs *in situ*, échantillonneurs passifs, système de mesures rapides) et les analyses classiques peuvent dans certains cas être complétées voire remplacées par des méthodes présentant des atouts complémentaires : plus rapides, moins coûteuse, permettant parfois l'acquisition d'information plus pertinentes. L'introduction de ces nouveaux outils, dont les kits ELISA, peut donc dans certains cas être envisagés, afin d'obtenir des informations plus précises dans le cadre des programmes de surveillance, de la détermination de sources de pollutions... Il est dans un premier temps nécessaire de tester ces outils afin d'évaluer leurs performances et leurs limites.

Le test ELISA (acronyme d'*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) est un test immunologique destiné à détecter et/ou doser une molécule dans un échantillon liquide. Ces kits faciles d'utilisation et utilisables sur le terrain permettent l'analyse de nombreuses substances (toxines, protéines, molécules organiques...) dont certaines substances des listes réglementaires de la directive Cadre sur l'Eau. Ces outils ont actuellement la réputation d'être souvent moins robustes, moins sensibles ou moins précis que les analyses classiques. Le rapport fait l'état des lieux des connaissances actuelles et présentent certains essais afin de montrer l'applicabilité, mais aussi les limites de ces tests.

2. Technique ELISA

2.1. PRINCIPE

2.1.1. Réaction immuno-enzymatique

Le principe de la technique ELISA repose sur une reconnaissance immuno-enzymatique.

Le dosage se fait via une réaction catalysée par une enzyme qui libère un composant coloré mesurable par spectroscopie. Il s'agit d'une technique biochimique, utilisée principalement en immunologie, afin de détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon. La technique utilise un ou deux anticorps ; l'un est spécifique de l'antigène et l'autre réagit aux complexes immuns (antigène – anticorps) et est couplé à une enzyme. C'est un test simple, facile d'emploi et peu coûteux, mais limité par la disponibilité en anticorps spécifiques.

Le principe de reconnaissance immuno-enzymatique est déclinée de différentes manières (Illustration 1) :

ELISA indirect : l'enzyme amplifie les signaux des complexes immuns ; cette technique, très sensible peut entraîner un grand nombre de faux positifs (il est donc nécessaire d'effectuer un grand nombre de mesures complémentaires de contrôle en parallèle des échantillons à doser),

ELISA en sandwich : permet de détecter un échantillon d'antigène dans un sérum ou tout autre échantillon ; très utilisé dans la recherche,

ELISA par compétition : s'effectue par compétition de liaison. Plus la concentration initiale de l'antigène est haute, moins il restera d'enzyme pour émettre le signal et plus le signal sera faible. C'est la technique la plus couramment utilisées pour les dosages de substances chimique en application environnementale.

En absence de pesticides dans la solution à doser, tous les anticorps (portant le substrat chromogène) sont combinés à l'association « molécule pesticides/enzyme ». La coloration est donc maximale (absorbance maximale). En présence de pesticide dans la solution à doser, les anticorps chromogènes se fixent, soit sur le pesticide présent dans l'échantillon, soit sur le complexe « molécule pesticides/enzyme" qui sont alors en compétition. Seuls les anticorps fixés au complexe restent dans le tube lors de l'opération de rinçage. En cas de prédominance forte de pesticide dans l'échantillon, il n'y aura pas d'anticorps chromogène fixé au complexe ; les anticorps non complexés étant éliminés, l'absorbance sera quasi nulle (absence de coloration). On établit donc à l'aide de solutions de référence une courbe de calibration reliant absorbance et concentration en pesticide dans l'échantillon.

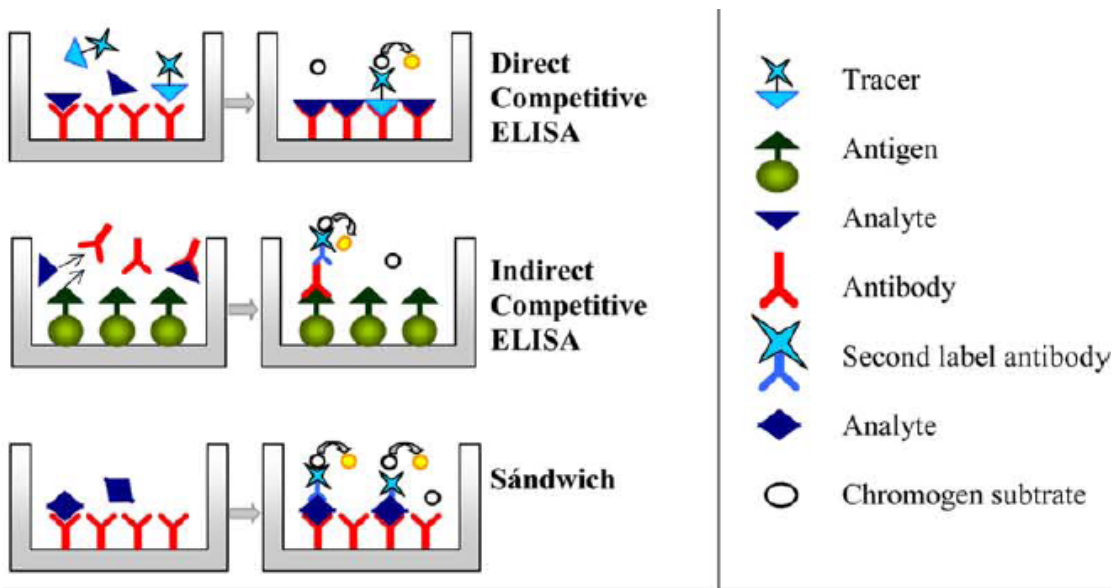


Illustration 1 : Schéma présentant les 3 principes utilisés pour la technique ELISA

2.1.2. Principe du dosage

Le principe de la mesure repose sur la reconnaissance structurale de la molécule cible. A ce titre les kits ELISA sont plus ou moins sélectifs selon la spécificité du site de reconnaissance greffé : certains kits très élaborés vont permettre de sélectionner des composés de structure très proche (exemple kits atrazine qui réagit essentiellement pour l'atrazine et ses métabolites) d'autres sont beaucoup plus globaux (kit « perturbateurs endocriniens », kit HAP...).

Les kits utilisés sont susceptibles de détecter d'autres composés ayant une structure chimique proche du composé initialement recherché, ce qui fait que le résultat donne une valeur finale qui comprend la teneur en ces composés présents. C'est ce que l'on appelle la réactivité croisée. Un certain nombre de substances sont ainsi testées, généralement de structure proche de la molécule cible, afin d'évaluer leur impact sur la mesure. La réponse du composé au kit est évaluée en fonction de la concentration entraînant 50 % inhibition d'absorbance.

2.1.3. Types de kits disponibles

L'utilisation des kits ELISA requiert la détection des molécules d'intérêt dans un échantillon liquide. Les applications biologiques se sont développées sur des échantillons type plasma, urine... Les applications environnementales, d'abord axées sur des échantillons d'eau plus ou moins complexes (eaux de surface, eaux souterraines, effluents de station d'épuration), s'élargissent actuellement vers des

échantillons solides (sols, boues, sédiments...) préalablement extraits avec un solvant organique (méthanol...) qui n'absorbe pas à la longueur d'onde utilisée pour la mesure.

2.2. PRESENTATIONS DES KITS

Les systèmes de mesure ELISA sont commercialement disponibles sous deux principaux formats.

L'utilisation de kit microplaques permet d'automatiser plus facilement la mesure d'un grand nombre d'échantillons, l'utilisation de pipettes multicanaux étant adaptée à cette configuration. Ces systèmes, comportant 96 puits, permettent, si on considère les mesures nécessaires pour l'obtention de la gamme de calibration, du blanc de référence et des points de contrôle et le fait que les échantillons soit traités au minimum en duplicatas, la mesure d'environ 40 échantillons de manière quasi simultanée. Le complexe molécule pesticides/enzyme est, dans cette configuration, greffé sur le fond des puits. Moins de 10 minutes de préparation sont nécessaires pour traiter l'ensemble de la microplaque.

D'un autre côté, les volumes d'échantillon (50 μ L) et de réactifs utilisés pour ces mesures est assez faible, augmentant l'incertitude sur la mesure. La configuration du système entraîne une plus grande variabilité dans les résultats : si une goutte de réactif ou d'échantillon reste sur les parois, on aura une réaction imparfaite et donc une valeur erronée.

Les kits présentés en tube permettent une meilleure répétabilité des résultats. Dans ce cas, le complexe molécule pesticides/enzyme est greffé sur des particules magnétiques mise en suspension dans les tubes, donc plus facilement en contact avec l'échantillon et les réactifs. Les volumes d'échantillon et de réactifs plus élevés augmentent la répétabilité de la mesure. Néanmoins le traitement tube par tube des échantillons allonge le temps de manipulation (environ 30 minutes de préparation pour 30 échantillons)

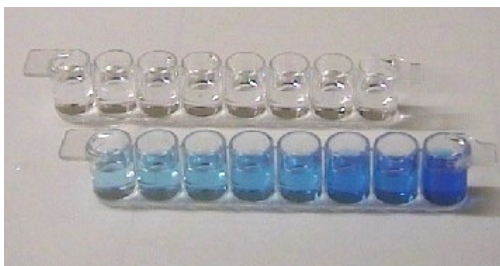


Illustration 2 : Présentation des deux systèmes de kits ELISA communément employés (à gauche format microplaque, à droite format en tube).

2.3. TYPES DE SUBSTANCES ANALYSABLES

Le développement des kits ELISA est actuellement en plein essor. Il faut cependant distinguer deux types d'approches : les kits développés en Recherche et Développement dans le cadre de projets de recherche sur des thématiques très précises avec des applications « prospectives » et ceux commercialisés par divers sociétés comme ABRAXIS, ECOLOGIENA, BIOSENSE ...

Les premiers vont souvent correspondre à des outils « maison », ne respectant pas forcément les formats classiques, permettant parfois d'obtenir des résultats pertinents, mais dans le contexte de l'étude pour laquelle ils ont été produits.

Si l'on considère les types commerciaux, ils sont désormais nombreux, et variables selon le type d'applications envisagées : types de matrices analysables, limite de détection, gamme d'application...mais aussi type de mesures : les kits seront plus ou moins spécifiques, ce qui peut être un avantage ou un inconvénient en fonction des objectifs de la mesure. Soit on s'intéresse à la présence d'une molécule, soit à la présence d'une famille de composés (HAP, PCBs..) sans besoin de discriminer précisément quelles sont la ou les molécules présentes. Pour le dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques par exemple, la mesure est souvent exprimée en équivalents (phénanthrène, Benzo[a]pyrène...) par rapport à la structure chimique ciblée.

Le tableau suivant (Illustration 3) donne une liste non exhaustive du type de kits actuellement disponibles. Il présente différents types de kits tant au niveau des molécules ou familles de molécules ciblées, du type de matrice analysable que de la gamme de concentrations validées par le constructeur.

Les gammes de calibrations peuvent elles aussi être très variables et importante à considérer selon le type de kits et les différentes applications envisagées (eaux souterraines, effluents, sols pollués...).

Les limites de quantification, qui étaient jusqu'ici un des obstacles majeurs à l'utilisation des mesures ELISA s'abaissent progressivement au fur et à mesure, ceci étant plus lié à l'augmentation de la demande qu'à l'existence de réels verrous technologiques. L'exemple de l'atrazine montre cet évolution : jusqu'à il y a quelques années, la limite de quantification des kits « polluants organiques » était de 0.1 µ/L, soit le seuil de potabilité. Actuellement, des kits sont actuellement disponibles à des seuils beaucoup plus bas pour quelques molécules, dont l'atrazine. En ce qui concerne les autres pesticides, ces seuils sont actuellement de l'ordre de 0.1 à 0.050 µg/l mais des nouveaux kits sont commercialisés tous les mois, étendant la gamme de produits analysés et abaissant les limites de détection. Ces avancées permettent désormais d'envisager l'utilisation de ces kits pour des applications environnementales plus larges : programme de surveillance réglementaires, localisation de sources de pollutions...

Certains kits, comme par exemple la majorité des kits pour le dosage des PCBs fonctionnent en semi-quantitatif : une valeur seuil est annoncée, correspondant à la

limite de détection du kit, sans aucune autre information sur la teneur en composé que l'atteinte ou non de ce niveau seuil.

D'autres systèmes sont plus généralistes et peu précis sur la ou les molécules dosées. L'exemple des kits « œstrogènes » semble le plus flagrant. Selon les modèles, il est possible de doser soit réellement un des œstrogènes (oestradiol, œstrone, éthynil-œstradiol), soit des analogues structuraux des œstrogènes. Pour ces kits plus « globaux », tous les analogues structurels de l'œstradiol, (avec plus ou moins de sélectivité) peuvent répondre positivement : les oestrogènes, mais aussi les alkylphénols, les xéno-œstrogènes, certains phtalates, HAPs ou autres substances de structure proches. Selon l'information souhaitée, ce type de kits globaux peut être informatif, par exemple si l'on veut évaluer la toxicité (effet perturbateur endocrinien) d'un échantillon ou s'il l'on connaît déjà le polluant recherché mais que l'on souhaite investiguer sa présence (de manière spatiale ou temporelle).

Il est néanmoins nécessaire de clairement identifier l'adéquation entre l'information attendue et le niveau de sélectivité du kit à choisir.

Illustration 3 : Exemples de kits distribués commercialement. Les NQE (définitives ou en proposition, <http://www.ineris.fr/substances/fr/page/9>) sont données à titre indicatif à fin de comparaison.

Paramètres	Méthode	Matrice	Gamme de calibration	NQE
Acétochlor et autres acetanilides	Particules magnétiques	Eau, sol	0,10 à 2,5 µg/L	0.3 µg/L (alachlor)
Alachlor	Particules magnétiques	Sol, Eau	0,05 à 5,0 µg/L	0.3 µg/L (alachlor)
Aldicarb	Particules magnétiques	Eau	0,25 à 100 µg/L	
Alkylphénols ethoxylés	Microplaques	eau, effluent	20 à 1000 µg/L	0.3 µg/L (alkylphenols)
Alkylphenols	Microplaques	eau et effluent	5 à 500 µg/L	
Alkylphénols Ethoxylates	Particules magnétiques	Eau	20 à 1000 µg/L	
	Microplaques	Eau	20 à 1000 µg/L	
Atrazine et triazines	Particules magnétiques	sol, Eau	0,04 à 5,0 µg/L	0.6 µg/L (atrazine)
	Microplaques	Eau	0,02 à 1,5 µg/L	
	Microplaques	Eau, sédiment, sol,	0,03 à 3 µg/L	
Composés benzéniques Mesure total BTEX	Particules magnétiques	Eau sol	0,9 à 30 mg/L (sol) 0,02 à 3,0 mg/L (eau)	0.01 à 0.07 mg/L
Bisphenol A	Particules Microplaques	Effluent	5 à 500 µg/L	
	Particules magnétiques	Eau	0,05 à 10,0 µg/L	
Carbendazim/Benomyl	Particules magnétiques	Eau	0,10 à 5,0 µg/L	
Carbaryl	Particules magnétiques	Eau	0,25 à 5,00 µg/L	
Carbofuran	Particules magnétiques	Eau	0,25 à 5,00 µg/L	
Chlorpyrifos	Particules magnétiques	Eau	0,22 à 3,0 µg/L	0.03 µg/L
DDT/DDE/DDD	Particules magnétiques	Eau sol	1,25 à 75,0 µg/L	
Diuron et phénylurée	Particules magnétiques	Eau sol	0,03 à 3,0 µg/L	0.2 µg/L
2,4-D	Particules magnétiques	Eau sol	0,7 à 50 µg/L 0,15 à 7,5 mg/L (sol)	0.3 µg/L

Estrogenes totaux	Particules / Microplaques	Eau	0,1 à 3,0 µg/L	
Glyphosate	Microplaques	Eau sol	1,0 à 25,0 µg/L	
Isoproturon	Particules/ Microplaques	Eau	0,05 à 0,5 µg/L	0.3 µg/L
LAS surfactant alkylés	Particules magnétiques	Eaux , Effluent	20 à 1000 µg/L	
Méthomyl	Particules magnétiques	eau	0,45 à 15,0 µg/L	
Métalochlor	Particules magnétiques	Eau sol	0,05 à 5,0 µg/L	0.3 µg/L (alachlor)
PCB	Particules magnétiques	Sol	seuils 20, 50, 100, 500mg/L	
		Eau sol	Sol: 2-2000 mg/L Eau: 10 µg/L -2000 mg/L	
		Eau sol	0,5 à 10 mg/L (sol) 0,5 à 10 µg/L (eau)	
HAPs	Particules magnétiques	Eau sol	HAP totaux sol : 1 à 1000mg/L	0.02 à 2.4 µg/L
		Eau sol Equiv, phénanthrène	0,2 à 5,0mg/L (sol) 0,93 à 66,5 µg/L (eau)	
		Eau sol Equiv, benzo[a]pyrène	10 à 500 µg/L (sol) 0,04 à 10,0 µg/L (eau)	
Pentachlorophénol	Particules magnétiques	Eau sol	0,5 à mg/L 50mg/L (sol) 5 à 500 µg/L (eau)	0.4 µg/L
		Eau	0,1 à 10,0 mg/L (sol) 0,06 à 10 µg/L (eau)	

3. Essais sur la validité des kits

Les kits sont désormais utilisés en routine pour certaines applications par des laboratoires d'analyses de routine, notamment en ce qui concerne les pesticides.

Quelques expérimentations en laboratoire ont été menées afin de tester l'influence de certains facteurs sur la validité de ce type de mesure. Tous les kits commercialisés comportent un certain niveau de validation, concernant les réactions croisées (spécificité du kit), limites de détection, gamme de linéarité...qui sont généralement fournis automatiquement par le fabricant. Un exemple de documentation est présenté en Annexe 1.

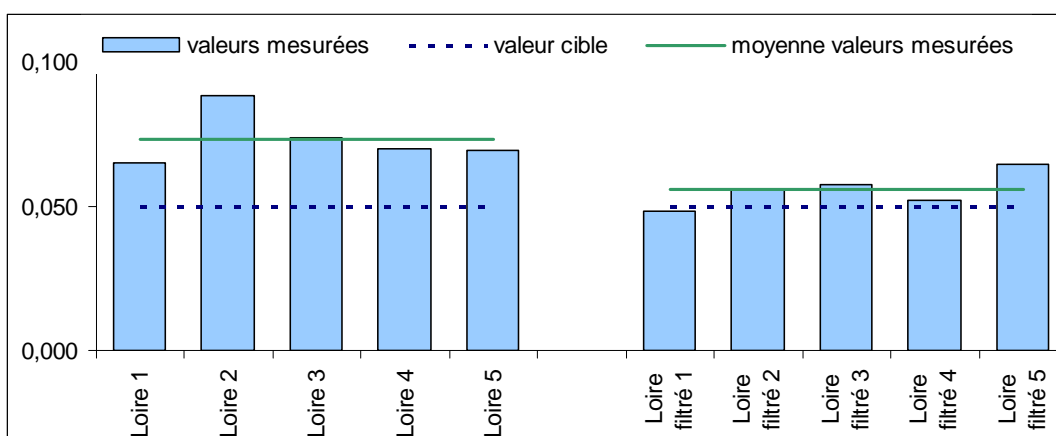
3.1. EFFETS DE LA PRESENCE DE MATIERES EN SUSPENSION

La présence de matière en suspension dans les échantillons peut affecter la lecture de densité optique et donc la quantification de la teneur en substances dans l'échantillon.

Selon le type de kit (microplaque ou tube) ce résultat sera plus ou moins impacté. L'expérimentation suivante a été effectuée sur des échantillons naturels de la Loire, en utilisant le kit de dosage de l'atrazine « haute sensibilité » (LQ : 0,020 µg/L).

Les échantillons préalablement analysés pour évaluer la teneur en atrazine ont ensuite été supplémentés à 0,050 µg/L. Cinq échantillons ont été directement dopés, les cinq autres ont préalablement été filtrés (0,70 µm). Les résultats sont présentés dans l'illustration 4. On peut ainsi noter qu'en l'absence de filtration, les valeurs mesurées sont surestimées. En effet, la mesure de la teneur en analytes est faite par rapport à la valeur d'absorbance de la solution. Plus celle-ci est colorée, plus la présence de polluant est faible. Or la présence de particules, qui interfèrent avec la transmission de la lumière va artificiellement diminuer l'absorbance et donc entraîner une surestimation des concentrations.

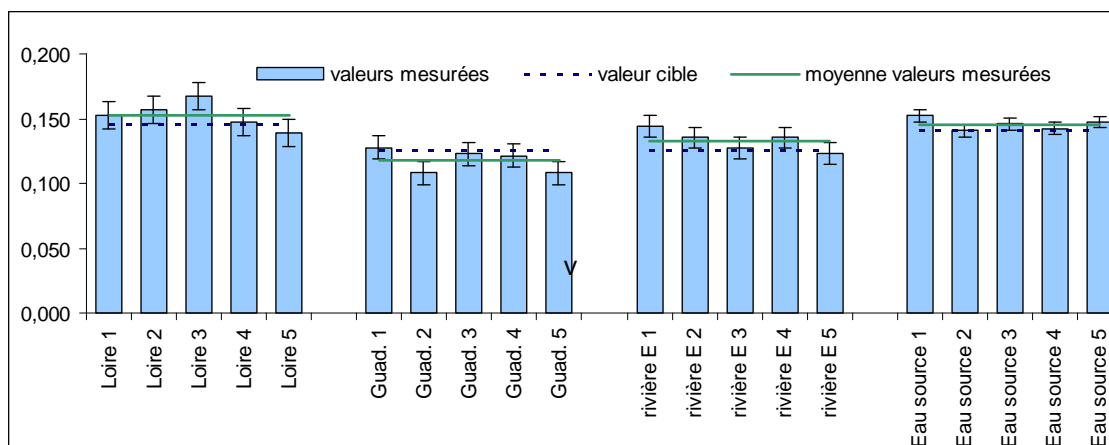
Illustration 4 : Comparaison des mesures effectuées avec et sans filtration.



3.2. VARIABILITE SELON LES TYPES D'EAU

Pour cette expérimentation, différents types d'eau préalablement filtrés, ont été supplémentés en atrazine et analysés au cours de la même série de mesure (même kit, même jour de mesure...). Les différents échantillons, préalablement filtrés, possèdent des caractéristiques physicochimiques variables en termes de teneur en matière organique notamment (entre 0 et 10mg/L selon les échantillons). On peut noter (Illustration 5) qu'il n'y a pas d'effet matrice clairement mis en évidence, la principale différence apparaît dans la variabilité entre les mesures ; Pour l'échantillon d'eau de source (eau embouteillée) la variabilité est de 3% contre 6 à 8% pour les autres types d'eau (max Guadeloupe 8% ; rivière 6%, Loire 7%). Les échantillons filtrés ont été analysés par LCMSMS en parallèle de ces expérimentations. La valeur cible correspond à la somme du dopage et de la concentration initiale dans l'échantillon. Les valeurs cibles diffèrent donc quelque peu en fonction de la présence ou non d'analytes dans les échantillons avant dopage.

Illustration 5 : Effet de différentes matrices sur la mesure

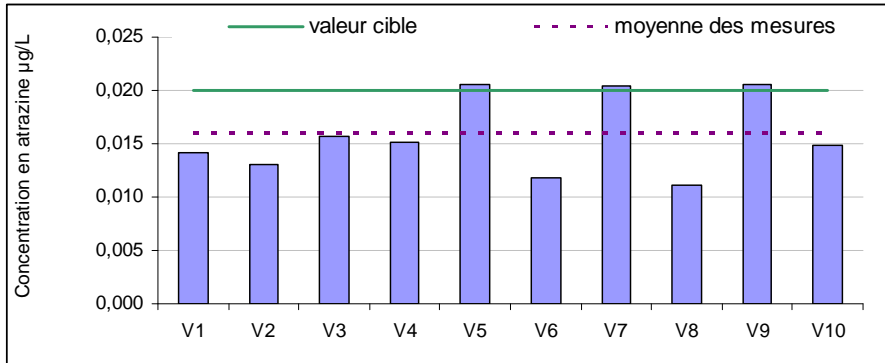


3.3. MESURES A LA LIMITE DE QUANTIFICATION

Des essais ont été mis en œuvre pour tester la validité du kit au niveau de la limite de quantification annoncé par le fournisseur.

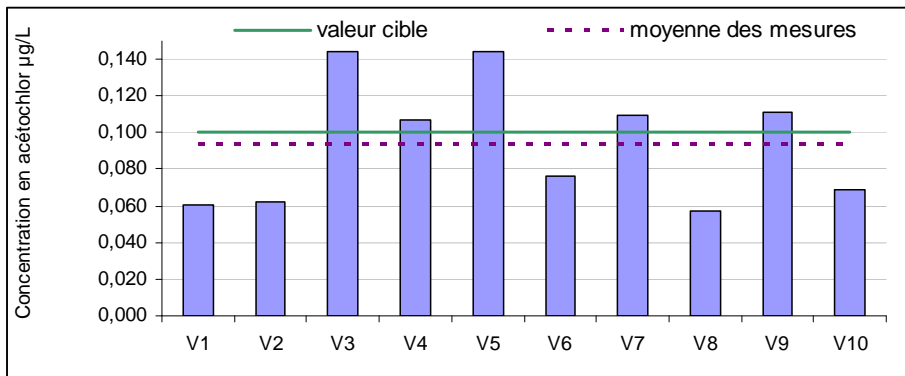
Dix répliquats d'échantillon d'eau naturelle ont été dopés à la limite annoncée par le fournisseur (0,020 µg/L pour le kit atrazine et 0,1µg/L pour le kit acetochlor testés pour cet essai). Les résultats sont présentés dans l'illustration 6 et l'illustration 7.

Illustration 6 : test de la réponse des kit ELISA à la limite de quantification (Atrazine)



On peut noter sur cet exemple qu’à la limite de quantification, on a plutôt une tendance à la sous-estimation (valeur moyenne mesurée de 0,016 µg/L) avec une variabilité de l’ordre de 21% sur les 10 mesures effectuées. Il n’y a aucun réplicat présentant une réelle surestimation de la valeur cible (0,21 µg/L pour les deux valeurs les plus élevées).

Illustration 7 : test de la réponse du kit ELISA à la limite de quantification (Acétochlor)



Le kit acétochlor présente une plus forte variabilité : si la valeur moyenne (0,94 µg/L) présente un faible écart par rapport à la valeur cible (0,1 µg/L) la variabilité entre les 10 réplicats est de l’ordre de 34 %, avec deux réplicats présentant une surestimation de la valeur cible (0,145 µg/L dans les deux cas). Il est à noter que la nouvelle norme française NF T90 210 (« Protocole d’évaluation initiale des performances d’une méthode dans un laboratoire ») définit la LQ à la plus petite concentration pouvant être déterminée avec une exactitude définie de 60 %. Les résultats obtenus sur ces kits sont donc globalement en concordance avec ces exigences

4. Exemples d'application des kits ELISA

Des mesures de surveillance peuvent être réalisées avec différents objectifs :

- la détection d'un évènement temporel: des dosages peuvent être effectués pour détecter des pics de concentration (pollutions, etc.) liés à un évènement climatique susceptible d'entraîner des flux, par exemple des orages, des pluies
- la caractérisation d'un nouveau système ou la détection de nouvelles substances (bilan d'un bassin versant, détermination de sources....)

Les exemples suivants illustrent ces deux aspects aux travers de deux cas d'études montrant les apports obtenus grâce à l'utilisation de la mesure rapide par kit ELISA.

4.1. APPLICABILITE A LA CARACTERISATION D'UN MILIEU

4.1.1. Contexte et objectifs des mesures

L'exemple suivant porte sur une étude qui s'est déroulée en 2009 en Région Midi Pyrénées (projet TRANSPOLAR, Région, FEDER, BRGM) afin d'étudier la présence de phytosanitaires employés (antérieurement ou actuellement) pour la culture du maïs. Les deux composés ciblés étaient l'atrazine et le métolachlor.

La principale difficulté était d'établir dans un premier temps un diagnostic général de la zone d'intérêt, afin de déterminer les zones d'intérêts à suivre de manière plus spécifique. La zone d'intérêt, de nature très diverse en termes de types de sols et d'hydrogéologie est couverte par un important réseau piézométrique (plus de 150 piézomètres).

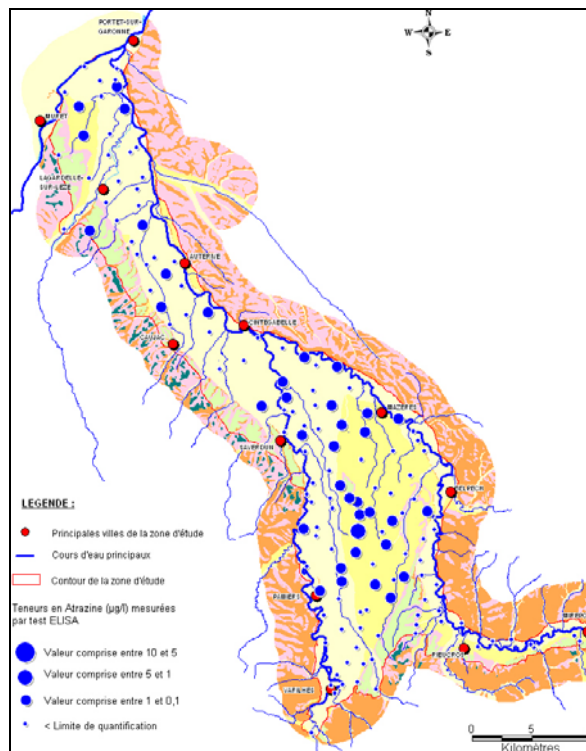
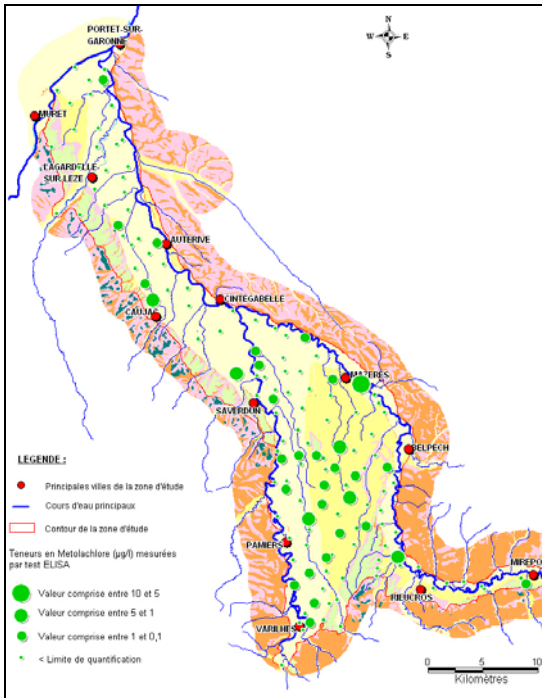
Dans le cas d'une étude prospective, utilisant les méthodologies de dosage classique, une première sélection aurait du être effectuée. Dans le cadre de ce projet, l'initiative à donc été prise de tester l'usage des mesures par kits ELISA, avec contrôle aléatoire de 20 % des mesures par analyse classique. Dans cette optique, 150 sites d'eaux souterraines ont été échantillonnés : les analyses ELISA ont été effectuées sur les 150 échantillons et 30 échantillons choisis aléatoirement ont été analysés par les techniques classiques (extraction en phase solide, analyse par UPLC/MS/MS)

4.1.2. Résultats de la campagne

Les résultats de la campagne sont présentés dans la figure suivante (Illustration 8). Les informations apportées par ces mesures permettent de localiser les zones de fortes pressions, des zones moins impactées par l'un ou l'autre des composés ciblés, des zones préservées... Au moment de cette campagne, les kits disponibles pour les composés d'intérêt permettaient d'atteindre une limite de quantification de 0,1 µg/L, valeur suffisante pour cette première approche permettant la « découverte » d'un site.

Actuellement, pour l'atrazine, un nouveau kit est disponible permettant d'atteindre le seuil de 0,020 µg/L.

Illustration 8 : Résultats obtenus par les mesures ELISA (atrazine et métolachlor), Bassin versant de l'Ariège



Le tableau suivant (Illustration 9) présente les résultats obtenus sur les 25 échantillons dosés selon les deux méthodes (ELISA et mesure classique). Compte tenu de la réactivité croisée, les résultats ELISA sont exprimés en équivalent atrazine. En effet, le phénomène de réactivité croisée, liée à l'homologie structurale entre certaines molécules de la même famille entraîne une mesure prenant en compte la présence d'autres molécule que l'atrazine elle-même. Sans prendre en compte la présence de ces autres molécules, on conclue dans la majorité des cas à une surestimation de la concentration en atrazine. Afin d'effectuer une comparaison plausible, les différentes triazines ont été mesurées dans les échantillons. En fonction de la réactivité croisée (donnée par le fabricant), leurs concentrations respectives sont pondérées (1 pour l'atrazine, 0,22 pour la DEA, 0,15 pour la simazine et 0 pour la DIA qui n'interfère pas dans la réponse du test) et sommées pour obtenir la valeur « Somme réactivité triazines » correspond à la valeur théorique attendue. Ces résultats sont présentés dans l'illustration 9.

Illustration 9 : Résultats obtenus entre kits ELISA et analyses classiques

Ech.	Equivalent Atrazine ELISA	somme réactivité triazines µg/L	Atrazine (µg/L)	DEA (µg/L)	DIA (µg/L)	Simazine (µg/L)
1	0,78	0,592	0,453	0,549	0,289	0,120
2	0,21	0,099	0,047	0,213	0,079	0,032
3	<0,1	0,038	0,025	0,057	<0,02	<0,02
4	<0,1	0,016	<0,02	0,051	0,034	0,033
5	<0,1	0,176	0,09	0,362	0,109	0,043
6	0,1	0,025	0,025	<0,02	<0,02	<0,02
7	<0,1	0,130	0,045	0,366	0,092	0,028
8	<0,1	0,032	<0,02	0,144	<0,02	<0,02
9	<0,1	0,093	0,029	0,289	0,035	<0,02
10	0,23	0,140	0,056	0,382	0,036	<0,02
11	<0,1	0,099	0,026	0,33	0,087	<0,02
12	<0,1	0,009	<0,02	0,043	0,039	<0,02
13	0,22	-	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
14	<0,1	-	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
15	<0,1	-	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
16	<0,1	0,094	0,046	0,216	<0,02	<0,02
17	0,16	0,006	<0,02	0,025	0,041	<0,02
18	<0,1	0,103	0,045	0,234	0,061	0,045
19	<0,1	-	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
20	0,17	0,204	0,096	0,466	0,113	0,037
21	0,10	0,086	0,053	0,125	<0,02	0,034
22	<0,1	-	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
23	0,13	0,098	0,073	0,114	<0,02	<0,02
24	0,37	0,351	0,245	0,453	0,065	0,045
25	<0,1	0,059	0,045	0,025	0,055	0,054

On s'aperçoit en comparant ces deux valeurs que de manière générale la valeur « équivalent atrazine » donnée par le kit reste supérieure à la valeur théorique. Les molécules considérées pour l'analyse classique sont celles testées par le fabricant. Il est donc possible que d'autres molécules puissent entraîner une réaction croisée (autres triazines, autres métabolites de l'atrazine comme la DEDIA...). Par ce biais il apparaît uniquement deux résultats identifiables comme « faux positifs » (identifiés en jaune dans le tableau) pour lesquels les molécules ayant réagi avec le réactif du kit ne font pas partie de la liste analysée.

Sur cette même problématique, trois résultats mettent en évidence des « faux négatifs » : le kit détermine une concentration inférieure à la limite de détection alors que des composés sont présents dans l'échantillon. Dans les 3 exemples, c'est la concentration en DEA qui s'avère élevée. Il est donc possible que le facteur de réaction croisée affecté à la DEA soit sous-évalué, mais aucune investigation supplémentaire n'a été menée, ces expérimentations étant conduite dans l'objectif d'une photographie indicative de la zone d'étude.

Il est quand même intéressant de noter que ces faux négatifs ne concernent pas la mesure en atrazine.

De manière générale on note une sous-estimation des valeurs réelles, encore plus flagrante si l'on néglige les autres produits pouvant impacter la réponse du kit. Le critère de « réactivité croisée », correspondant donc à la sélectivité du type de kit est un point important à considérer lors de la sélection du kit à employer.

4.1.3. Conclusions

Sur les 150 points échantillonnés et analysés avec les ELISA, 16 ont ainsi pu être sélectionnés de manière totalement éclairée sans négliger des zones qui aurait pu être considérées à priori comme préservée.

L'intérêt de l'utilisation des kits est la rapidité de traitement de l'échantillon, ce qui permet le suivi d'un grand nombre de sites mesurés lors d'une même analyse et le faible cout des kits. Certes les mesures ainsi obtenues n'ont pas la précision et la sensibilité des analyses classiques (type extraction liquide/solide couplé à l'analyse par GCMS ou LCMS) mais peuvent permettre une première caractérisation d'une zone potentielle d'étude, afin de déterminer la zone source, le panache de pollution, la zone impactée...

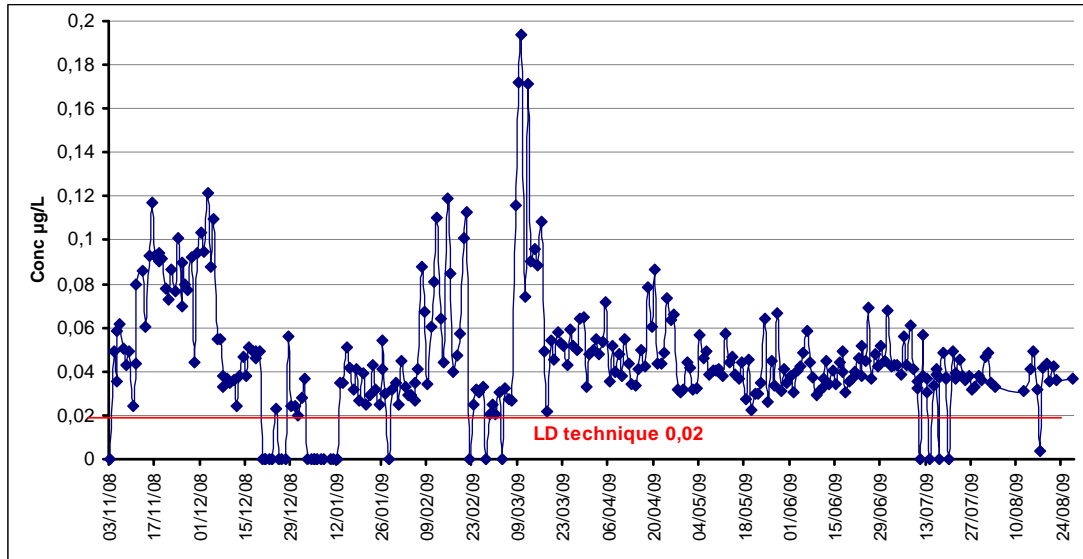
4.2. APPLICABILITE AU SUIVI TEMPOREL D'UNE ZONE D'INTERET

4.2.1. Contexte et objectifs des mesures

Un deuxième exemple d'application est le suivi à pas de temps court d'un site d'intérêt. L'exemple présenté ici, encore en cours d'acquisition est le suivi de deux pesticides

(atrazine et isoproturon) sur un site en Région orléanaise, afin d'obtenir des chroniques de contamination, ensuite corrélable aux données hydrologique acquises simultanément.

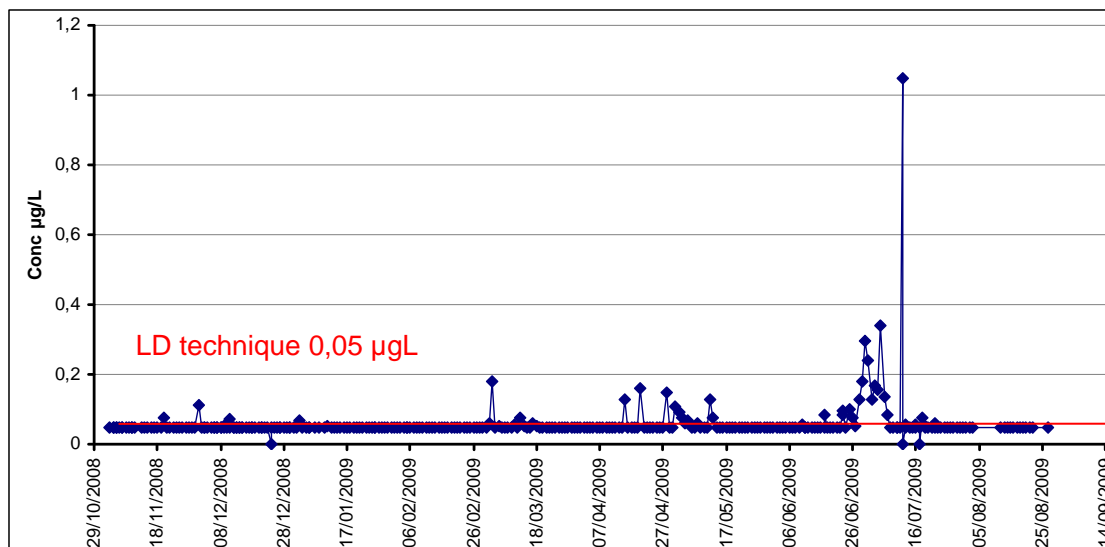
Illustration 10 : Chronique de la contamination en atrazine, suivi par tests ELISA



La chronique obtenue pour l'atrazine (ou plutôt l'atrazine et autres triazines) permet d'évaluer le cas échéant une variabilité sur un pas de temps très fin, ce qui autorise de prendre en compte des phénomènes très rapides (effets de crue, épandage des pesticides..) afin de mieux appréhender les perturbations éco-systémiques.

Si l'on regarde les résultats obtenus pour l'isoproturon (illustration 11), avec un seuil de détection beaucoup plus haut (50 ng/L contre 20 ng/L pour le kit atrazine), on note l'importance de ce critère pour une application environnementale pertinente : au vu des relatives basses concentrations mesurées sur ce site, il aurait été plus intéressant de posséder un kit ELISA plus sensible. Seuls quelques périodes et /ou évènements localisés ont dans ces condition put être mis en évidence. Néanmoins, l'évènement de juin 2009, visible sur 12 jours (crue) n'aurait sans doute pas pu être mis en évidence par une mesure classique mensuelle. Même dans ces conditions assez limitantes, l'intérêt d'acquérir ce type d'information reste important.

Illustration 11 : Chronique de la contamination en isoproturon, suivi par tests ELISA



4.2.2. Conclusions

Sur ce genre d'applications, l'utilisation des kits ELISA permet de traiter rapidement un grand nombre d'information, afin de mettre en évidence, des tendances, des évènements, non compatibles avec les outils classiques en termes de moyens humains et financiers.

L'utilisation de telles chroniques, bien qu'imprécise, peut permettre de mieux dimensionner un suivi, de caractériser un site d'intérêt afin de déterminer les périodes d'échantillonnage d'intérêt ou dans certains cas le mode de fonctionnement d'un système hydrologique.

4.3. ESTIMATION DU COUT DE L'UTILISATION DES KITS ELISA

L'utilisation des kits ELISA peut présenter un avantage financier certain, seulement dans la mesure où le nombre de molécules à suivre est limité : les kits étant spécifiques d'une molécule ou d'une famille de molécules, le suivi de plusieurs substances entraîne rapidement une augmentation de cout qui rend les analyses classiques tout à fait concurrentielles !

Lors de l'étude du Bassin versant de l'Ariège, les échantillons ELISA ont pu être analysés sur 5 jours (prélèvements et expéditions des échantillons compris), dont environ 20h d'analyses à proprement parler. Le cout de cette campagne est estimé, en terme de consommables, à environ 1 800 euros par type de kit, soit aux alentours de

5000 euros en considérant les deux kits et le temps passé. En considérant un cout moyen de 100 euros par échantillon en analyse classique par un laboratoire de routine, la même étude aurait couté aux alentours de 15 000 euros, avec par contre un nombre de molécules suivies plus importants. Cela reste, selon les objectifs de l'investigation, une approche envisageable et intéressante, pour un nombre de molécule cible limité : en augmentant le nombre de molécules d'intérêt, on augmente le cout de la campagne, en termes de consommable mais aussi de temps passé dans les laboratoires, ce qui n'est généralement pas le cas par une analyse classique.

Le gain financier dans l'usage de ces kits repose essentiellement sur le fait qu'une multitude d'échantillons peuvent être traités simultanément, avec un cout unitaire de d'environ 10 à 15 euros par échantillon. Ce gain n'est effectif que si les échantillons sont analysés en même temps.

Ainsi dans leur format actuel (présentation en microplaques, nécessité d'effectuer des gammes de calibration et des points en duplicatas...) il n'est pas évident d'utiliser ces kits pour une application hebdomadaire, dans un objectif de suivi d'un site particulier.

5. CONCLUSIONS

Les kits ELISA, bien que développés depuis des années voient s'élargir leur champs d'usage par les applications environnementales. Leur applicabilité à des campagnes de suivis sur sites, dans un objectif de caractérisation d'un milieu hétérogène, de compréhension la variabilité temporelle de la qualité d'une masse d'eau, a été éprouvée. La pertinence des résultats obtenus est avérée, seule persiste la question des matières en suspension : s'il n'est pas clairement établi dans les protocoles fournis par les fabricants la nécessité de filtrer les échantillons (est seulement indiqué « la possibilité » de filtrer pour des échantillons « très chargés en matière en suspension), les essais faits au laboratoire ont montré la nécessité de cette étape pour une meilleure fiabilité des résultats. Pour les mesures effectuées dans des eaux, l'information obtenue concerne donc uniquement la fraction dissoute.

Le principal intérêt de l'utilisation des kits est la rapidité de traitement de l'échantillon, (ce qui permet le suivi d'un grand nombre de sites mesurés lors d'une même séquence d'analyse) et le faible cout des kits. En effet les systèmes actuels permettent d'analyser entre 40 (format tube) et 96 (format microplaque) points au cours d'une même séquence. En prenant en compte la gamme et les points de contrôle, entre 30 et 40 échantillons peuvent être analysés simultanément, en environ 4h pour un coût d'environ 500 euros. Même en considérant l'analyse en duplicats de chaque échantillon, les gains en termes de temps et de coût sont très importants. Certes les mesures ainsi obtenues n'ont pas la précision et la sensibilité des analyses classiques (type extraction liquide/solide couplé à l'analyse par GCMS ou LCMS) mais peuvent permettre une première caractérisation d'une zone potentielle d'étude, afin de déterminer la zone source, le panache de pollution, la zone impactée...

Le gain financier dans l'usage de ces kits repose essentiellement sur le fait qu'une multitude d'échantillons peuvent être traités simultanément, avec un cout unitaire de d'environ 10 à 15 euros par échantillon et par kit. Ce gain n'est effectif que si les échantillons sont analysés en même temps. Les kits ELISA sont ainsi applicables sur des campagnes, d'investigation, de contrôle d'un grand nombre de sites échantillonnés dans un court laps de temps, mais totalement sans fondement (d'un point de vue financier) pour des suivis hebdomadaires ou mensuels.

Le principe de fonctionnement de ces kits ELISA repose sur une analogie de structure entre les molécules, ce qui peut présenter un inconvénient si l'on souhaite connaitre la concentration en une seule molécule bien spécifique, mais aussi un avantage si l'on souhaite une mesure plus globale (indice PCB, HAP, perturbateur endocriniens...)

En fonction des applications envisagées, il est donc nécessaire de préciser les besoins à mettre en œuvre afin de vérifier l'applicabilité de ces outils en termes de sélectivité et de sensibilité notamment.



**Centre scientifique et technique
Service MMA**

3, avenue Claude-Guillemin
BP 36009 – 45060 Orléans Cedex 2 – France – Tél. : 02 38 64 34 34