

**Etude globale sur les cyanobactéries  
dans la rivière Erdre**

**Travaux de recherche en laboratoire**

*Rapport final  
Janvier 2004*

*LOT 2 Etude du développement des cyanobactéries  
LOT 3 Etude des toxines émanant des cyanobactéries*

Projet initié par l'**EDEN**



Coordination **SETUDE Ingénieur Conseil**

## Sommaire

<b>Résumé / Summary</b>	3
<b>Introduction</b>	5
<b>Synthèse</b>	6
<b>Lot 2 : Etude du développement des cyanobactéries</b>	17
<b>I. Facteurs limitant le développement des cyanobactéries dans l'Erdre</b>	18
I.1. Isolation et caractérisation des souches de <i>Planktothrix agardhii</i> de l'Erdre	
I.2. Impact du phosphore et de l'azote sur la croissance de <i>Planktothrix</i>	
I.3. Influence de l'éclairement	
<b>II. Impact de la vitesse d'écoulement sur la croissance de <i>Planktothrix agardhii</i></b>	26
II.1. Expériences de laboratoire par agitation continue en appareil de jar-test	
II.2. Simulations d'écoulement en rivière artificielle	
<b>III. Rôle des vases dans la prolifération des cyanobactéries</b>	37
III.1. Influence du recyclage interne des nutriments	
III.2. Influence d'une remise en suspension des cyanobactéries	
<b>IV. Impact éventuel des produits phytosanitaires sur les cyanobactéries</b>	56
<b>Lot 3 : Etude des toxines émanant des cyanobactéries</b>	58
<b>I. Facteurs limitant la libération de toxines par les cyanobactéries dans l'Erdre</b>	59
I.1. Caractérisation des toxines des souches de <i>Planktothrix agardhii</i> de l'Erdre	
I.2. Impact du phosphore et de l'azote sur la croissance de <i>Planktothrix</i>	
I.3. Influence de l'éclairement	
<b>II. Impact de la vitesse d'écoulement sur le relargage de microcystine par <i>Planktothrix agardhii</i></b>	74
II.1. Expériences de laboratoire par agitation continue en appareil de jar-test	
II.2. Simulations d'écoulement en rivière artificielle	
<b>III. Analyse du rejet potentiel de microcystine provenant des sédiments de la rivière</b>	88
III.1. Caractérisation des sédiments de l'Erdre	
III.2. Analyse des concentrations de microcystine dans les sédiments de l'Erdre	
III.3. Tests sur l'adsorption, la dégradation et le relargage de microcystine	
<b>IV. Contexte scientifique actuel sur les cyanotoxines et les risques associés</b>	92
<b>Références bibliographiques</b>	95

## RESUME

La prolifération de cyanobactéries et le risque sanitaire potentiel dû au rejet des toxines associées ont mené le syndicat mixte EDEN à lancer une étude globale sur les cyanobactéries dans l'Erdre. Au sein du consortium chargé du projet, le Centre de Compétence des Eaux de Berlin (KWB) a réalisé en coopération avec l'Agence Fédérale de l'Environnement (UBA) des travaux de recherche en laboratoire sur l'espèce *Planktothrix agardhii*, prédominante dans l'Erdre, et la microcystine (toxine associée). L'objectif a été de déterminer l'influence des facteurs-clés tels que les nutriments (azote, phosphore), la lumière, l'écoulement et les sédiments sur la croissance et la compétition des cyanobactéries ainsi que le rejet de microcystine par la population de *Planktothrix* de l'Erdre.

Les résultats des cultures en laboratoire ont montré que des conditions limitées en nutriments provoquent une diminution de la biomasse de cyanobactéries, et peuvent favoriser la prédominance de certains génotypes ayant des besoins réduits parmi la population de *Planktothrix*. Dans l'état actuel des connaissances scientifiques, on ne peut toutefois déceler des différences de compétition entre *Planktothrix* toxiques et non-toxiques. La limitation en nutriments a favorisé le rejet de microcystine par les cellules, mais grâce à la diminution globale de la biomasse de cyanobactéries, la quantité globale de toxine rejetée se trouve diminuée. Ceci est applicable à un milieu très pauvre en nutriments (moins de 50 µg/L de phosphore total). Dans l'Erdre, tant que les apports externes en nutriments restent aussi importants qu'à l'heure actuelle, la lumière constitue le facteur limitant. Le recyclage interne de nutriments en provenance des sédiments est par ailleurs globalement négligeable face aux apports exogènes.

Des expériences de culture dans un système de rivière artificielle ont montré que la vitesse d'écoulement n'a pas d'impact significatif sur la croissance de *Planktothrix* et le relargage de microcystine. Seule une courte phase transitoire d'effets négatifs a été observée.

La capacité de survie de *Planktothrix agardhii* dans les sédiments de l'Erdre en période hivernale a été prouvée par la présence d'une population importante lors de l'analyse de sédiments par fluorescence. Cet inoculum pourrait suffire à initier le développement de *Planktothrix* lors de la prochaine période de croissance algale.

Cependant, les fortes capacités d'adsorption des sédiments de l'Erdre analysés permettent d'écarter le risque potentiel de relargage de microcystine en provenance des vases.

Ces travaux, innovants à l'échelle mondiale pour l'espèce *Planktothrix agardhii*, s'inscrivent dans la démarche de compréhension globale initiée par l'EDEN dans le but de préserver les valeurs environnementales, sanitaires et touristiques de l'Erdre.

## SUMMARY

Cyanobacteria proliferation and the potential health risk related with the release of the associated toxins have lead the local association EDEN to initiate a comprehensive study on cyanobacteria in the river Erdre. Within the consortium in charge of the project, the Berlin Centre of Competence for Water (KWB) realised lab-scale research in cooperation with the German Federal Environmental Agency (UBA), on the species *Planktothrix agardhii* which predominates in the river Erdre, and the associated toxin microcystin. The objective was to determine the influence of key factors such as nutrients (nitrogen, phosphorus), light, flow velocity and sediments on cyanobacteria growth and competition as well as microcystin release from the *Planktothrix* population in the river Erdre.

Results from the lab-scale cultures proved that nutrient-limited conditions lead to a decrease of cyanobacteria biomass and may favour some genotypes with reduced needs among the *Planktothrix* population. Given the current state of scientific knowledge, no differences in competition between toxic and non-toxic *Planktothrix* strains can be established. Nutrient limitation favours microcystin release from cells, however the global decrease of cyanobacteria biomass induces a decrease of the total quantity of released toxin. These results can be applied in a water body where nutrients concentrations are very low (below 50 µg/L for total phosphorus). In the river Erdre, as long as external nutrients inputs remain considerable, light is the limiting factor. Internal nutrient recycling from the sediments is globally negligible in comparison with external inputs.

Culture experiments in a flow simulation flume proved that flow velocity had substantial impact neither on *Planktothrix* growth nor on microcystin release. Only a short transition phase with negative effects was observed.

Overwintering of *Planktothrix* in Erdre-sediments could be proved by the detection of a substantial population using fluorescence analysis. This inoculum should be large enough for initiation of *Planktothrix* development in the next vegetation period.

However, the high adsorption capacities of the analysed sediments from the river Erdre allow to put aside a potential risk of microcystin release from sludge.

While providing innovative results on the species *Planktothrix agardhii*, this project contributes to the comprehensive study initiated by the EDEN association in order to preserve the values associated with environment, health and tourism in the river Erdre.

## Introduction

Les cyanobactéries représentent un danger potentiel dû aux toxines qu'elles peuvent relarguer. L'impact de la prolifération de cyanobactéries sur l'environnement, sur la santé humaine et sur l'économie des sites touristiques est un problème majeur. En 2001, la prolifération massive de cyanobactéries dans l'Erdre (Loire-Atlantique, France) a déclenché le lancement d'une étude globale pour comprendre et limiter ce phénomène, à l'initiative du syndicat local EDEN (Entente pour le Développement de l'Erdre Navigable), menée par un groupement d'études<sup>1</sup>, coordonné par SETUDE Ingénieur Conseil.

Le Centre de Compétence des Eaux de Berlin (KompetenzZentrum Wasser Berlin, KWB) prend part à l'étude en coopération avec les spécialistes de l'Agence Fédérale de l'Environnement à Berlin (UmweltBundesAmt, UBA), sur les points suivants :

- étude de la croissance des cyanobactéries (lot 2 du projet EDEN)
- étude des toxines liées aux cyanobactéries dans l'Erdre (lot 3 du projet EDEN)

Les travaux de l'UBA, dirigés par le Dr Ingrid CHORUS, en collaboration avec le Dr Jutta FASTNER et le Dr Karina PREUSSEL, dans le cadre de ces deux lots, sont axés sur les thèmes suivants :

- Facteurs limitants pour la croissance de *Planktothrix agardhii* et son contenu en microcystine : impact des nutriments (N, P) et de la lumière
- Impact de la vitesse d'écoulement et des forces de cisaillement sur la croissance de *Planktothrix agardhii* et son contenu en microcystine (expériences en rivière artificielle)
- Evaluation du rôle des sédiments dans la croissance des cyanobactéries et analyse du rejet potentiel de microcystine par les sédiments de l'Erdre

Les expériences ont été menées à l'UBA sur l'ensemble de l'année 2003. L'objectif de ce rapport scientifique détaillé est de présenter l'ensemble des résultats des travaux de recherche en laboratoire, pour le lot 2 puis pour le lot 3.

---

<sup>1</sup> BCEOM, Eco-Environnement Ingénierie, BI-EAU, ANJOU RECHERCHE, KWB et SETUDE

# *Synthèse*

---

**Etude sur les cyanobactéries dans l'Erdre**  
Travaux de recherche en laboratoire – LOTS 2 et 3  
Rapport final KWB / UBA, Janvier 2004

## Introduction

---

Pour chacun des 3 aspects de l'étude de l'UBA sur le problème de la présence de *Planktothrix* dans l'Erdre, nous présentons dans cette synthèse (i) le contexte scientifique actuel (pour les non-spécialistes), (ii) les questions ouvertes à résoudre sur la situation de l'Erdre, (iii) l'approche de recherche scientifique choisie pour chaque cas dans le cadre de l'étude, (iv) les résultats scientifiques principaux, (v) leurs implications pour la compréhension et la gestion de la population de *Planktothrix agardhii* de l'Erdre et (vi) les recommandations. Pour la bibliographie correspondante et le détail des données obtenues lors de l'étude, les lecteurs sont priés de se reporter au contenu du rapport scientifique.

La contribution de l'UBA à l'étude sur l'Erdre a porté sur les aspects suivants :

- I.a Impact des concentrations en nutriments (phosphore et azote) sur la croissance et la biomasse de *Planktothrix agardhii*.
- I.b Impact des concentrations en nutriments (phosphore et azote) sur les concentrations en microcystine intracellulaire et extracellulaire.
- II Impact du stress physique (forces de cisaillement créées par la vitesse d'écoulement) sur le rejet de microcystine par les cellules dans le milieu aquatique environnant.
- III.a Rôle des vases dans la prolifération des cyanobactéries
- III.b Concentrations en microcystine dans les sédiments et leur impact sur les concentrations dans l'eau

### **I.a Impact des concentrations en nutriments (phosphore et azote) sur la croissance et la biomasse de *Planktothrix agardhii*.**

---

Contexte scientifique : La quantité totale de cyanobactéries et/ou cellules algales suspendues présentes dans un litre d'eau (c.à.d. biomasse) dépend de la disponibilité de la ressource. Ces relations sont bien connues et s'appliquent de la même façon aux cyanobactéries et aux algues, c.à.d. au phytoplancton. Dans le but d'estimer la quantité de phytoplancton, il est nécessaire de disposer d'une mesure de la biomasse (le nombre de cellules ou de filaments est inadéquat, puisque la taille des cellules et la longueur des filaments sont très variables). Deux unités de mesure couramment utilisées sont le biovolume (volume de cellule en  $\text{mm}^3$  par litre d'eau) et la concentration en chlorophylle-a (puisque la concentration de ce pigment facilement analysable est en étroite corrélation avec le biovolume).

La relation entre disponibilité de la ressource et biomasse du phytoplancton est caractérisée au mieux par la « capacité de charge » pour la biomasse du phytoplancton : en général, 1  $\mu\text{g}$  de phosphore (P) et 10  $\mu\text{g}$  d'azote (N) peuvent subvenir aux besoins de la biomasse pour un biovolume d'environ 0,5  $\text{mm}^3/\text{L}$  ou une concentration en chlorophylle-a de 1  $\mu\text{g}/\text{L}$ . Dans les régions européennes non arides, le phosphore est habituellement le nutriment limitant. Pour utiliser l'exemple précédent, ceci signifie qu'une augmentation de l'azote jusqu'à par

exemple 50 µg/L ne provoquerait pas d'augmentation de la biomasse du phytoplancton, à moins que les concentrations en phosphore ne soient augmentées proportionnellement.

La capacité de charge de la biomasse de phytoplancton est déterminée par la concentration totale du nutriment limitant, c.à.d. pas uniquement la fraction dissoute dans l'eau. Ceci est dû au fait que la majeure partie des nutriments est habituellement déjà liée à des particules organiques suspendues, souvent du phytoplancton, mais aussi en diverses proportions à des bactéries, du zooplancton et des détritiques organiques. Quand ceux-ci se dégradent et relarguent des nutriments dissous, le phytoplancton va assimiler ces nutriments dissous très rapidement. Ceci mène souvent à un recyclage rapide du phosphore entre le phytoplancton, le zooplancton, les bactéries et les détritiques, et leurs phases de croissance et déclin peuvent être observées même lorsque les concentrations en nutriments dissous ne sont pas détectables.

La plupart des espèces de phytoplancton, et en particulier les cyanobactéries, peuvent accumuler des réserves de phosphore pour réaliser jusqu'à 4 divisions cellulaires. Ceci signifie qu'une cellule peut se diviser en 16 nouvelles cellules sans avoir besoin d'assimiler de P dissous supplémentaire. La croissance de la population n'est donc pas nécessairement dépendante de la concentration en phosphore dissous dans l'eau : même si ceci est en dessous des limites de détection, si les réserves de la cellule sont complètes, une augmentation consécutive de la biomasse est possible. Cependant, les taux de division cellulaire dépendent de la quantité de phosphore et d'azote disponible dans les cellules – ils sont plus lents si les réserves sont faibles.

Les espèces de phytoplancton ont des taux de croissance différents pour des intensités lumineuses données, selon leur capacité à assimiler et stocker les nutriments. La dominance des espèces est déterminée par le résultat de la compétition pour la (les) ressource(s) limitante(s).

Si l'on considère les espèces de cyanobactéries productrices de microcystine, les progrès scientifiques récents ont montré que dans beaucoup de populations observées sur site, les génotypes avec les gènes pour la production de microcystine co-existent avec les génotypes ne disposant pas de ce gène. L'avantage de la production de microcystine en termes de compétition (c.à.d. la « raison » pour laquelle les cellules produisent ces peptides) n'est pas encore connu. Jusqu'ici, les chercheurs ont identifié des variations dans les taux de croissance entre les souches, mais aucune de ces études précédentes n'a déterminé que de telles variations sont liées au fait qu'une souche contienne ou non des microcystines. La plupart de ces travaux de recherche ont été réalisés sur des souches de *Microcystis* ; des études comparant les taux de croissance d'un certain nombre de souches de *Planktothrix* sous différentes conditions de limitation font défaut.

Ainsi, le contexte général peut être résumé de la façon suivante :

1. Le contrôle des quantités de biomasse du phytoplancton – et donc en conséquence les quantités de la biomasse de cyanobactéries et les concentrations de cyanotoxines – par contrôle de la « capacité de charge » est bien compris. Des modèles sont disponibles pour déterminer les concentrations à cibler et pour évaluer l'importance relative des différentes sources provoquant la charge de nutriments.



2. Le contrôle de la dominance des espèces est moins bien compris : l'étude de l'écologie du phytoplancton a permis de développer des modèles décrivant la niche écologique de certaines espèces, mais les facteurs déterminant l'issue de la compétition entre les espèces sont complexes et beaucoup moins prévisibles du point de vue de la gestion des espèces.
3. Le contrôle de la dominance d'une souche ou d'un génotype pour une espèce donnée est très peu compris : un nombre très restreint de projets de recherche récents a étudié les différences entre taux de croissance de souches de *Microcystis* avec et sans microcystine sous différentes conditions de limitation, mais les variations n'ont pu être reliées à la production de microcystine. Des informations similaires sur la variation du taux de croissance ne sont pas disponibles pour des génotypes de *Planktothrix*.

La question pour l'étude sur l'Erdre était donc de savoir si la limitation en nutriments mène à des différences dans les taux de croissance entre génotypes de *Planktothrix agardhii* producteurs ou non de microcystine, si de telles différences peuvent mener à la dominance de l'un de ces génotypes et ainsi expliquer les quantités de microcystine trouvés dans l'Erdre ou même avoir des implications en termes de mesures de gestion de l'Erdre.

Travaux de recherche : Divers génotypes ont été isolés de la population de *Planktothrix agardhii* de l'Erdre en prélevant des filaments uniques mis en culture pour en obtenir des souches monoclonales de laboratoire. Une approche en culture batch sous conditions strictement contrôlées (définition claire du facteur limitant pour le taux maximal de croissance et provoquant l'état stationnaire) a été utilisée pour comparer les taux de croissance de différentes souches sous des conditions limitées en (i) phosphore et (ii) azote. Le contenu en microcystine et en autres oligopeptides de ces souches a été caractérisé par analyse HPLC-PDA (High Performance Liquid Chromatography - Photodiode Array : chromatographie liquide haute pression avec détection à barrettes de diode) et MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight - Mass Spectrometry : ionisation/désorption par laser à l'aide d'une matrice, avec analyseur de temps de vol, couplée à une spectrométrie de masse).

Les 8 souches isolées de la population de *Planktothrix* de l'Erdre ne contenaient pas de microcystines, mais un ensemble de divers autres oligopeptides. Ceci semble être dû à un « caprice de la nature » (probablement rare), c.à.d. un glissement vers les génotypes non producteurs de microcystine au sein de cette population, qui a apparemment débuté pendant les mois d'hiver 2002/03 et a duré jusque vers la fin de l'été 2003 (alors que les génotypes producteurs de microcystines sont réapparus à la fin de l'été 2003). Cependant, ces souches ont été utiles pour comparer la gamme de différences entre les taux de croissance avec limitation en nutriments. Comme le profil d'oligopeptides ont montré que certaines souches isolées étaient très similaires (sinon identiques), 4 souches ont été choisies pour les expériences.

Principaux résultats :

- Les taux de croissance maximaux (sous conditions saturées en nutriments) étaient très similaires. Aucun avantage en termes de compétition n'est à attendre des souches en absence d'une limitation en nutriments.

- La limitation en nutriments a eu des effets plus tôt pour certaines souches que pour d'autres (voir Tableau 2 dans le rapport scientifique). En conditions de limitation en nutriments, ceci pourrait représenter un avantage compétitif pour certaines souches.

Implications pour la compréhension et la gestion de la population de *Planktothrix* de l'Erdre :

- Comme les taux de croissance de toutes les souches étaient très proches sous des conditions non limitées, aucun avantage compétitif des souches non productrices de microcystine n'est à attendre sous des conditions d'apports excessifs en nutriments (comme ceci est le cas dans l'Erdre la majorité de la saison).
- Si les nutriments deviennent limitants, les résultats montrent que ceci pourrait favoriser la dominance de certains génotypes de *Planktothrix agardhii* par rapport à d'autres. Cependant, lors cette étude courte, seules des souches de l'Erdre non productrices de microcystine ont pu être incluses. Ainsi, pour *Planktothrix* il n'a pas encore été démontré si la caractéristique de produire des microcystines peut affecter les taux de croissance ou non en cas de limitation des nutriments. Pour *Microcystis*, les résultats publiés montrent que la variabilité de la croissance lors d'une limitation de la ressource n'est pas liée à la production de microcystine.

Cependant, cette question a une importance limitée pour les solutions de gestion envisageables, car l'identification sans ambiguïtés d'une limitation en nutriments sur le terrain est complexe, puisque cela requiert la détermination des quotas intracellulaires de nutriments (la diminution des nutriments dissous n'est pas un indicateur suffisant ; voir la discussion plus haut).

- Les informations sur la variation des taux de croissance des génotypes de *Planktothrix agardhii* obtenues par cette étude sur l'Erdre confirment et précisent le scénario global connu à partir d'expériences limnologiques et de l'écologie du phytoplancton. L'incertitude des prédictions augmente avec le niveau de différenciation : alors que la quantité de biomasse en relation avec la capacité de charge peut être assez bien prévue, la prédétermination des espèces dominantes est plus incertaine, et la prédiction de la dominance de génotypes (c.à.d. « souches ») pour une espèce donnée n'est pas (encore) possible. C'est pourquoi l'utilisation d'une limitation en nutriments pour influencer les taux de croissance des souches productrices de microcystine en faveur des souches non productrices de microcystine n'est pas une solution réaliste pour la gestion de ce problème.

Recommandations :

La réduction effective de la biomasse de *Planktothrix agardhii* dans la rivière Erdre (et ailleurs) est uniquement possible en choisissant de :

- (i) **réduire la capacité de charge** de la biomasse du phytoplancton en général par réduction des concentrations en phosphore total dans l'eau de la rivière Erdre en dessous de 30-50 µg/L

ou

- (ii) influencer la compétition entre les cyanobactéries et le reste du phytoplancton par le **contrôle des conditions physiques** en vue de les rendre moins favorables pour les cyanobactéries et plus profitable aux algues planctoniques moins

nocives. Gérer (c.à.d. augmenter) la vitesse d'écoulement de l'Erdre pourrait être une option, puisque les cyanobactéries dominent rarement dans les rivières à écoulement rapide. Une alternance entre des taux d'écoulement forts et faibles à des intervalles de 2-3 semaines pourraient également être une option (qui nécessite moins d'eau), puisque ceci modifie les conditions d'écoulement avant que la communauté de phytoplancton ne s'y adapte et que les cyanobactéries deviennent dominantes.

## **I.b Impact des concentrations en nutriments (phosphore et azote) sur les concentrations en microcystine intracellulaire et extracellulaire.**

---

Contexte scientifique : les hypothèses de travail antérieures, supposant que la production des toxines était une « réponse au stress » des cellules de cyanobactéries, ont été clairement écartées. La production de microcystine dépend du fait que les cellules contiennent ou non l'information génétique correspondante. Cependant, les facteurs environnementaux sont supposés avoir une influence sur la production et le rejet de microcystine, et les travaux de biologie moléculaire l'ont montré.

Des expériences de laboratoire pour déterminer si une limitation en lumière ou en nutriments affecte le contenu cellulaire en microcystine ainsi que leur rejet doivent être réalisées dans des conditions strictement contrôlées (c.à.d. dans des systèmes de culture continue). A ce jour, les résultats d'expériences conçues de façon appropriée sont disponibles pour la limitation en lumière, en P et en N pour *Microcystis aeruginosa* et pour la limitation en lumière de *Planktothrix* (voir l'étude bibliographique dans le rapport scientifique complet). Les résultats montrent que ces conditions peuvent changer le contenu cellulaire d'un facteur 2-3, au plus 4. Cependant, des généralisations n'étaient pas envisageables avant cette étude sur l'Erdre, puisque aucune expérience n'avait été réalisée par un protocole expérimental adapté pour déterminer l'impact de la limitation en N et P sur le contenu en microcystine de *Planktothrix agardhii*.

La question pour l'étude sur l'Erdre était donc de déterminer si la concentration en microcystine dans les cellules de *Planktothrix agardhii* et le rejet de microcystine dans le milieu répond à une limitation en nutriments d'une façon similaire à celle montrée pour *Microcystis aeruginosa*, c.à.d. seulement d'un facteur 2-4, ou si des différences plus prononcées (potentiellement intéressantes en termes de gestion du problème) apparaissent.

Travaux de recherche : Des expériences en culture continue ont été réalisées avec une souche de *Planktothrix agardhii* productrice de microcystine. En utilisant des chemostats, la vitesse d'écoulement du milieu était utilisée pour déterminer le taux de croissance, qui à son tour détermine l'état de limitation en nutriments des cellules, c.à.d. les quotas cellulaires en nutriments. Les cultures ont été récoltées après qu'un état stationnaire soit atteint pour la vitesse d'écoulement choisie, pour détermination des concentrations en microcystine intracellulaire et extracellulaire, de même que le biovolume. A partir des concentrations en microcystine intracellulaire et du biovolume par litre, le contenu en microcystine des cellules a pu être calculé. A la base, il était prévu d'utiliser une souche isolée de l'Erdre, mais ceci n'a pas été possible sur la durée de l'étude sur l'Erdre (voir plus haut), une souche collectée

d'une autre culture a été utilisée : CYA 126/8. Quatre différents taux d'écoulement du milieu et les niveaux de limitation en nutriments correspondants ont été testés.

Principaux résultats :

- La limitation en phosphore n'affecte pas le contenu en microcystine des cellules de *Planktothrix agardhii* pour la souche étudiée, même à une croissance fortement limitée à 10% du quota cellulaire maximum. Cela affecte les concentrations en microcystine extracellulaire beaucoup plus que les concentrations de microcystine intracellulaire : en cas de limitation en phosphore, la concentration de microcystine extracellulaire a augmenté de 300% par rapport à un cas de croissance illimitée. Le taux maximal de microcystine extracellulaire de 63 % (par rapport à la quantité totale de microcystine) a été obtenu pour la plus forte limitation en phosphore (10% du taux de croissance maximal).
- La limitation en azote affecte le contenu en microcystine des cellules de *Planktothrix agardhii* au plus d'un facteur de 0.86 entre croissance illimitée et croissance à 10 % du quota cellulaire maximum. Ceci affecte les concentrations en microcystine extracellulaire remarquablement : en cas de forte limitation des cultures, la quantité maximum de microcystine extracellulaire est devenue jusqu'à 22 fois plus élevée qu'en cas de croissance illimitée. Le taux maximal de microcystine extracellulaire (par rapport à la quantité totale de microcystine) de 78% a été obtenu pour 10% du quota cellulaire.
- Les difficultés initiales pour trouver une souche de culture qui ne forme pas de flocs (ce qui perturbe fortement la méthode de culture continue) ont mis en avant la cause du manque de résultats sur *Planktothrix agardhii* dans les publications scientifiques avant cette étude sur l'Erdre.

Implications pour la compréhension et la gestion de la population de *Planktothrix* de l'Erdre :

- La limitation en nutriments n'affecte pas de façon significative le contenu en microcystine des cellules. Une action sur la limitation en nutriments n'aura donc pas d'impact par ce mécanisme.
- Les concentrations en microcystine dissoute pourraient être plus importantes en cas de forte limitation en nutriments, ce qui se produit rarement dans l'Erdre, ou dans les situations rares et transitoires d'une lyse soudaine lors des blooms.
- Les concentrations en microcystine totale pourraient augmenter d'un facteur 2 à 4 en cas de limitation des nutriments.
- Il est important de noter que l'augmentation potentielle de la microcystine totale par biovolume (d'un facteur 3 environ) lors d'une limitation sévère en nutriments doit être considérée en lien avec la baisse significative et simultanée de la biomasse de cyanobactéries (d'un facteur 10 ou plus). Le résultat net d'une limitation en nutriments serait donc une baisse significative des concentrations en microcystine.

Recommandations : Comme pour I.a.

## **II. Impact du stress physique (forces de cisaillement créées par la vitesse d'écoulement) sur le rejet de microcystine par les cellules dans le milieu aquatique environnant.**

---

Contexte scientifique : L'impact du stress de cisaillement sur la stabilité des cellules de cyanobactéries et des filaments est très peu connu ; ce domaine de recherche est actuellement tout juste en train d'émerger. Des observations ponctuelles ont suggéré que *Planktothrix agardhii* est assez sensible à la rupture des cellules, qui pourrait potentiellement causer un rejet significatif de microcystine. L'impact d'un tel stress physique sur la croissance de la population était également complètement inconnu avant l'étude sur l'Erdre.

La question pour l'étude sur l'Erdre était donc d'évaluer l'importance du stress physique induit par le régime d'écoulement et ses changements soudains sur la rupture des cellules, la lyse et le relargage de microcystine de même que sur la croissance.

Travaux de recherche : Une culture en masse de la souche productrice de microcystine a été soumise à une perturbation physique conséquente dans deux systèmes expérimentaux différents :

1. A échelle de laboratoire, dans des appareils de test de floculation (utilisés sous forme d'expériences en culture batch) à quatre différents gradients de cisaillement (« G », augmenté toutes les 24 heures), variant de conditions très calmes, c.à.d. permettant presque une sédimentation des filaments, jusqu'à une agitation vigoureuse, c.à.d. causant dans la culture d'importants tourbillons et de la mousse (gradient de vitesse G variant de  $110 \text{ s}^{-1}$  à  $730 \text{ s}^{-1}$ ).
2. A échelle semi-réelle dans le système expérimental de l'UBA simulant une rivière dans un canal en boucle contenant  $4,3 \text{ m}^3$  de culture, agité à 4 vitesses d'écoulement successives (une par semaine), variant également de très faible, c.à.d. permettant presque la sédimentation des filaments, à assez forte, c.à.d. provoquant des courants prononcés et visibles (vitesse moyenne d'écoulement variant de 0,16 à 0,39 m/s).

Les cultures en appareils de floculation ont été échantillonnées quotidiennement pour analyse des concentrations en microcystine intra- et extracellulaire et pour détermination de la longueur des filaments. La croissance des cultures a été suivie par lecture de la turbidité.

La croissance de la culture dans le système de rivière artificielle a été suivi par une mesure continue de la turbidité et un échantillonnage régulier pour analyse des concentrations en microcystine intra- et extracellulaire.

### Principaux résultats :

- L'ensemble des résultats des tests en appareil de floculation et en rivière artificielle montrent une phase courte et transitoire d'effets négatifs sur les filaments, résultant dans le rejet de microcystine et la rupture des filaments quand le stress dû à la turbulence augmente. Cependant, l'adaptation à la nouvelle situation est très rapide et a peu d'impact sur la croissance de la population et son contenu en microcystine.
- Le changement de conditions vers un cisaillement prononcé provoque l'augmentation des concentrations de microcystine extracellulaire, mais cet effet ne se produit qu'à un niveau très faible : même pour des quantités de biovolume très fortes de  $280 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ , les

concentrations en microcystine extracellulaire n'ont atteint que 6,6 µg/L (maximum 3,2 % de la microcystine totale). Dans les expériences en canal, l'augmentation de la vitesse d'écoulement a mené à des pics momentanés de 3 µg/L.

- *Planktothrix agardhii* s'est développé sans problème pour chacun des 4 niveaux testés dans le système de rivière artificielle. Contrairement à ce qui était attendu, la croissance a montré une réponse positive à une agitation vigoureuse dans l'appareil de test de floculation.

#### Implications pour la compréhension et la gestion de la population de *Planktothrix* de l'Erdre :

- Des problèmes de rejet de microcystine dû aux forces de cisaillement provoquées par les digues sur l'Erdre sont très improbables.
- Un écoulement rapide ne provoque pas d'effet destructeur sur la population de *Planktothrix* dans l'Erdre. Cependant, cela peut favoriser encore plus la croissance de ses compétiteurs, tels que les diatomées, qui sont la population typiquement dominante dans les rivières à écoulement rapide.

Recommandations : Les conclusions de cette partie de l'étude confortent la solution de régimes d'écoulement alternés décrits dans le point I.a : aucun effet destructeur tel que déclin, lyse des cellules et rejet de toxine n'est à prévoir en cas d'écoulement rapide et de forte turbulence. Au contraire, les effets bénéfiques obtenus en créant des conditions de compétition entre les espèces - plus rapidement que les espèces ne peuvent développer des avantages de compétition ou même « remporter la compétition » - sont bien connus et pourraient être utilisés avec succès. De plus, évacuer *Planktothrix* du système par intervalles de plusieurs semaines (c.à.d. quand les concentrations de microcystine à risque sont atteintes) peut être une autre option à considérer dans ce contexte.

### **III.a Rôle des vases dans la prolifération des cyanobactéries**

---

Contexte scientifique : Les sédiments peuvent avoir deux types d'impact sur la prolifération de cyanobactéries : le recyclage interne de nutriments favorisant la croissance de cyanobactéries, et le stockage et la remise en suspension de cellules de cyanobactéries.

La question pour l'étude sur l'Erdre était d'évaluer le rôle des sédiments dans la prolifération des cyanobactéries, par ces deux types d'impacts.

Travaux de recherche Une recherche bibliographique détaillée a synthétisé les mécanismes à prendre en compte et la méthodologie pour évaluer l'importance du recyclage interne, avant de considérer le cas de l'Erdre. Une synthèse sur les mécanismes de remise en suspension des cyanobactéries a également été réalisée. La présence de cyanobactéries dans les sédiments de l'Erdre en hiver a été analysée.

#### Principaux résultats :

- Les mécanismes de relargage des nutriments (resuspension, diffusion, bioturbation) sont bien connus des scientifiques, l'évaluation de leur importance nécessite des études détaillées pour tenir compte de la spécificité de chaque site, avant de réaliser le bilan des flux en nutriments dans le milieu. Il faut alors tenir compte d'une part du stock de nutriments présents, et d'autre part des capacités de relargage.

- La concentration moyenne en phosphore total dans les vases de l'Erdre est de l'ordre de 1,1 gP/kg sec. Le stock de phosphore présent dans les vases de l'Erdre ne représente pas une source majeure de nutriments. L'indice trophique estimé pour la concentration en phosphore total des vases de l'Erdre laisse prévoir un état mésotrophe, donc non eutrophe.
- La remise en suspension de cellules de cyanobactéries après stockage dans les sédiments lors de la saison hivernale est bien connue pour les espèces telles que *Microcystis* et *Anabaena*. Jusqu'alors aucune étude n'existait à ce sujet sur *Planktothrix agardhii*. Les analyses de sédiments de l'Erdre en janvier montrent qu'une population considérable de *Planktothrix* y survit lors de la période hivernale, pouvant fournir un inoculum pour la croissance des cyanobactéries au printemps.

Implications pour la compréhension et la gestion de la population de *Planktothrix* de l'Erdre :

- Le stock de phosphore présent dans les vases de l'Erdre n'est donc pas un facteur principal de la prolifération des cyanobactéries.
- Il est néanmoins possible que des poches de relargage soient présentes, dont l'évaluation demanderait des études précises sur site.
- La priorité doit porter sur les apports externes, facteur prépondérant par rapport aux apports internes.

Recommandations : Limiter avant tout les apports externes.

### **III.b Concentrations en microcystine dans les sédiments et leur impact sur les concentrations dans l'eau**

---

Contexte scientifique : les cellules de cyanobactéries contenant de la microcystine peuvent s'accumuler sur les sédiments de la rivière et rejeter de la microcystine lorsqu'elles sont dégradées. La microcystine dissoute est adsorbée par certains types de sédiments (c.à.d. ceux contenant une fraction suffisamment importante d'argile ou de matière organique) mais pas par d'autres (sédiments sablonneux). Les microcystines sont biodégradées, mais les publications scientifiques montrent des taux très variables et des temps de délai pour différents types de milieux. Dans les systèmes aquatiques avec une forte densité de cyanobactéries, les sédiments peuvent donc représenter une source potentielle de microcystine.

La question pour l'étude sur l'Erdre était de déterminer si la resuspension des sédiments peut devenir une source significative de concentrations en microcystine. Un aspect spécifique était le rejet de microcystine par les sédiments dragués et stockés près de la rivière, où l'eau qui en percole pourrait ramener les microcystines dans la rivière.

Travaux de recherche : Le contenu en microcystine des échantillons de sédiments prélevés dans l'Erdre à trois occasions (décembre 2002, mai 2003 et septembre/octobre 2003) a été analysé (à la fois par analyse ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - et par HPLC-PDA) et les sédiments ont été caractérisés par analyse de la taille des grains. De plus, pour tester leur capacité d'adsorption et de désorption de microcystine, les sédiments ont été inoculés avec une quantité connue de microcystine dans des expériences batch de 7

jours à 0, 3, 10 et 50 µg/L de microcystine LR, et les concentrations en microcystine dans les surnageants ont été déterminés quotidiennement.

Principaux résultats :

- Les concentrations en microcystine n'étaient jamais au dessus de la limite de détection (dans aucun des échantillons de sédiment de l'Erdre)
- Alors que la microcystine n'était pas dégradée dans l'échantillon témoin, aucune microcystine n'a été détectée dans les surnageants testés. Ceci signifie que la microcystine ajoutée aux sédiments a été immédiatement adsorbée, du fait de la fine taille des grains et leur forte teneur en matière organique.

Implications pour la compréhension et la gestion de la population de Planktothrix de l'Erdre :

- Les résultats impliquent que grâce à la fine taille des grains et leur haute teneur en matière organique, les sédiments de l'Erdre adsorbent très bien la microcystine. Le fait qu'aucune microcystine n'ait désorbé mène à l'hypothèse qu'elle a été probablement très rapidement dégradée pendant qu'elle était adsorbée ou en train de se désorber lentement. Compte-tenu des expositions antérieures aux microcystines, il est possible que des bactéries capables de dégrader la microcystine soient présentes dans les sédiments de l'Erdre.

Recommandations :

- Les sédiments dragués peuvent être stockés près de l'Erdre sans risquer de relarguer des microcystines dans l'eau par lessivage.
- Le relargage de microcystine par les sédiments n'est pas à considérer comme une source significative de microcystine dans l'eau de l'Erdre.



## *Lot 2*

---

# *Etude du développement des cyanobactéries*

**Etude sur les cyanobactéries dans l'Erdre**  
Travaux de recherche en laboratoire – LOT 2

Rapport final KWB / UBA, Janvier 2004

## I. Facteurs limitant le développement des cyanobactéries dans l'Erdre

### I.1. Isolation et caractérisation des souches de *Planktothrix agardhii* de l'Erdre

#### I.1.1. Protocole expérimental

##### Isolation de souches de *Planktothrix agardhii* à partir de la population de l'Erdre

Sept souches de *Planktothrix agardhii* (PaE 01- PaE 07) ont été isolées à partir de l'échantillon prélevé dans l'Erdre le 17 avril 2003. Cet échantillon a été incubé dans un milieu non dilué (1 :1) à 20°C et 20  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Après deux semaines, des trichomes simples de *Planktothrix agardhii* ont été sélectionnés à l'aide d'une pipette Pasteur à partir de cette eau de l'Erdre pré-traitée, rincés plusieurs fois avec un milieu stérile et transférés en tubes de cultures pré-stockés avec 0,5 mL de milieu de culture. La culture a été poursuivie en répétant ce protocole jusqu'à l'obtention de cultures contenant des souches pures. A partir de 50 trichomes, 7 souches ont ainsi pu être isolées.

Toutes les souches de *Planktothrix agardhii*, y compris la souche E01 fournie par Luc Brient (Université Rennes I) ont été ensuite cultivées en cultures batch de 250 mL pour obtenir une quantité suffisante de cellules pour analyse des microcystines et analyse MALDI-TOF.

L'analyse HPLC n'a détecté aucune microcystine dans ces sept souches. Au cours de l'été 2003 il est devenu évident que ce résultat provient probablement d'un glissement dans la composition de la population de *Planktothrix* de l'Erdre vers des génotypes qui ne produisent pas de microcystine, puisque les échantillons prélevés de mai à septembre 2003 contenaient *Planktothrix*, mais pas de microcystine.

Trois des souches se sont développées avec une distribution homogène en cultures en suspension, quatre souches ont eu tendance à former de plus gros agrégats (fluffs) et n'ont donc pas pu convenir à des expériences de croissance. Les souches PaE 02, PaE 05 et PaE 06, ayant poussé en filaments individualisés, elles ont été utilisées pour des expériences en culture batch, afin de tester l'influence du manque en azote ou phosphore sur les taux de croissance et la concentration en métabolites peptidiques supplémentaires. De plus, la souche E01, fournie par Luc Brient, également incluse dans le test, ne contenait pas non plus de microcystine (seul un pic très faible a été détecté par HPLC - initialement suspecté de représenter une microcystine, il n'a pas été confirmé en tant que tel par les expériences approfondies.)

#### Profils MALDI-TOF

La spectrométrie de masse par MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight) donne la masse moléculaire des peptides contenus dans les échantillons et permet d'obtenir des indications sur les variantes de microcystine présentes.

Méthode : Quelques milligrammes de cellules des souches lyophilisées de *Planktothrix agardhii* ont été extraites avec 20  $\mu\text{L}$  d'un mélange acetonitrile/éthanol/eau (1 :1 :1) avec 0,03% d'acide trifluoroacétique. 1  $\mu\text{L}$  de l'extrait a été préparé directement sur une plaque d'acier sans étain et 1  $\mu\text{L}$  de matrice a été ajouté immédiatement (composée de 10 mg/mL d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque dans un mélange eau/acétonitrile (1 :1) avec 0,03% d'acide trifluoroacétique).

Le spectre de masse des ions positifs a été enregistré pour chaque souche à l'aide d'un spectromètre de masse MALDI-TOF (Voyager DE-PRO, PerSeptive BioSystems,

Framingham, MA) équipé d'un réflectron comme cela a été décrit dans des publications (Erhard *et al.* 1997, Fastner *et al.* 1999). Pour la désorption des composés, un rayon laser à azote ( $\lambda=337$  nm) a été envoyé sur la plaque. Le courant d'accélération a été fixé à 20 kV. Toutes les mesures ont été faites en mode d'extraction retardée, permettant de déterminer les valeurs des masses monoisotopiques ( $m/z$  : ratio masse/charge). Des produits de dégradation de la chlorophylle a, la phaeophytine a et phaeophorbide a, avec des ratio de masses  $m/z$  de 871,57 et 593,27 Da, ont été utilisés pour calibration interne. Une masse minimum de 500 Da a amélioré la mesure en sélectionnant les ions les plus importants.

Après détermination des masses monoisotopiques, des mesures de « Post Source Decay » (PSD), permettant de détecter les fragments d'ions, ont été effectués directement à partir de la même colonie sur la plaque. Les ions précurseurs ont été sélectionnés avec un sélecteur temporel d'ions ayant une gamme de masse de 10 unités de masse. Les courants utilisés dans le réflectron ont été réduits progressivement pour enregistrer 12 séquences de segments spectraux.

### ***1.1.2. Résultats : spectre MALDI-TOF des souches isolées***

Le spectre MALDI-TOF-MS des souches PaE 01- 07 a donné des profils de métabolites similaires pour les souches PaE 01- 06, qui sont montrés dans la figure 1. Pour ces souches, l'anabaenopeptine G ( $m/z=909,5$ ) est le pic le plus important.

D'autres métabolites ont également pu être détectés, mais pas pour toutes les souches. Les profils sont très proches entre les souches PaE 02, 05 et 06 (qui sont par ailleurs les souches n'ayant pas formé d'aggrégats), de même qu'entre PaE 01 et PaE 03. Il doit cependant être mentionné que l'anabaenopeptine G pourrait masquer d'autres métabolites. C'est pourquoi, on ne peut pas exclure que PaE 01-06 produisent les mêmes composés.

A l'opposé, la souche PaE 07 diffère distinctement des autres souches isolées. La souche est caractérisée par un profil de peptides incluant diverses microviridines et anabaenopeptines B ( $m/z=837,5$ ) en tant que métabolite principal. Ceci montre une similarité avec la souche E01 fournie par Luc Brient (voir Fig. 1). Il est remarquable que 2 laboratoires différents aient apparemment isolé des souches avec le même profil de peptides (et donc des génotypes identiques ou proches) à partir de différents échantillons de l'Erdre pris à différents moments. Ceci indique que PaE 07 et E01 représentent l'un des génotypes (ou souches) dominants dans la rivière Erdre. La figure 1 montre également le profil de peptides de souches de laboratoire, parmi lesquelles la souche CYA 126/8 a été utilisée pour les travaux en culture continue (détaillés dans la suite).

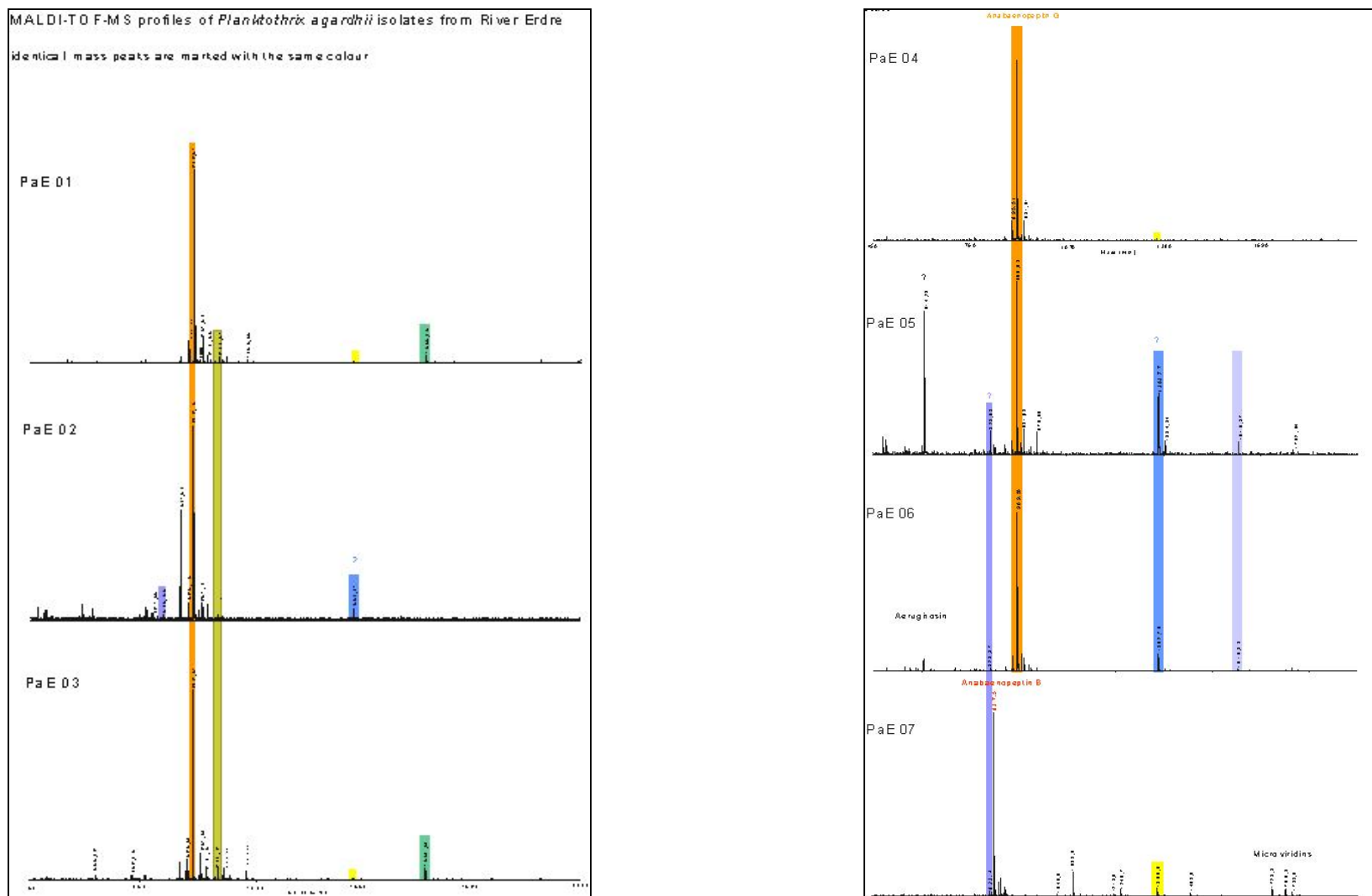
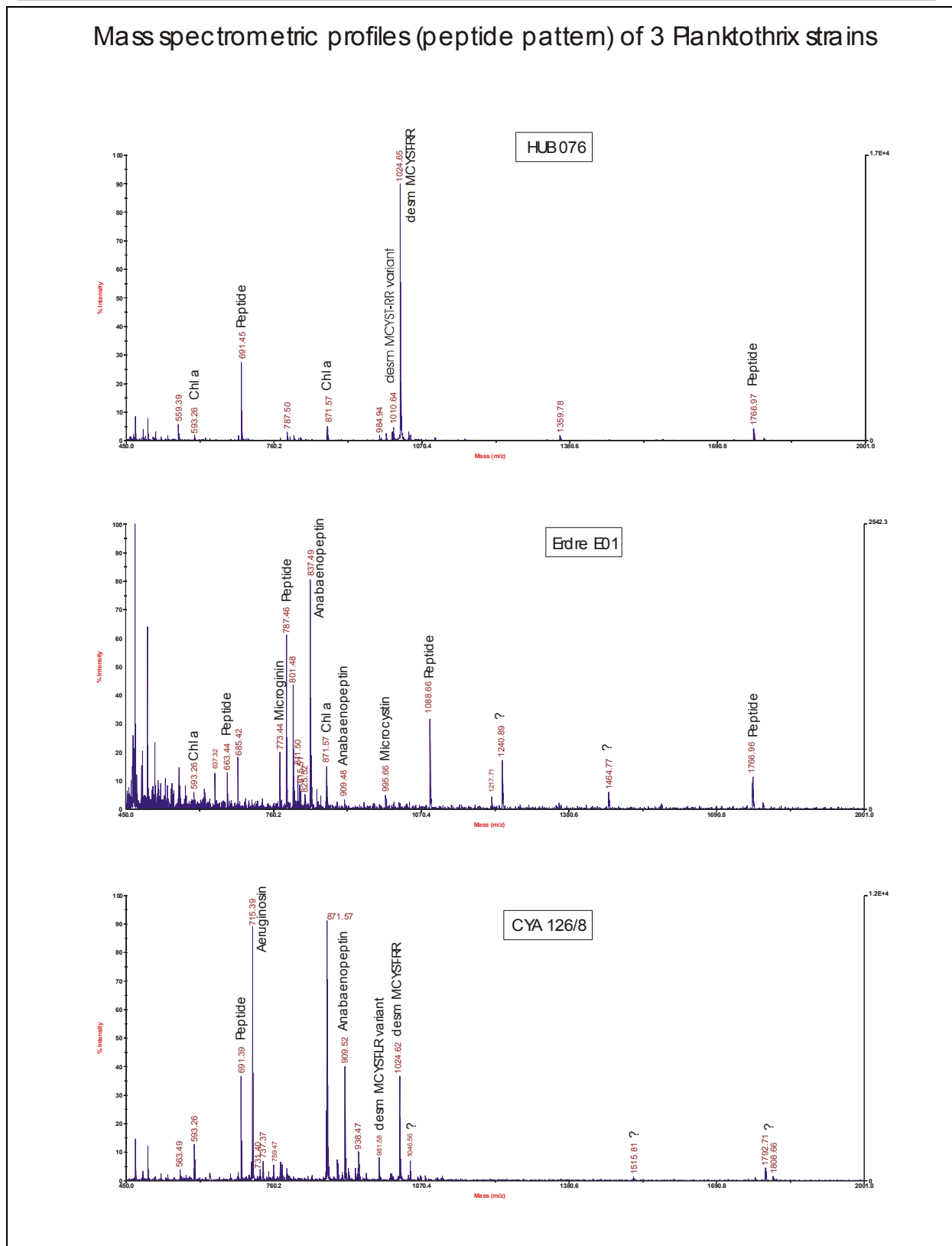


Figure 1a:  
 Profils MALDI-TOF de 7 souches de *Planktothrix agardhii* isolées de l'Erdre en avril 2003 (les pics de masse identique ont la même couleur)



**Figure 1b :**  
 Profils MALDI-TOF de la souche de *Planktothrix agardhii* E01 isolée de l'Erdre par Luc Brient, et de 2 souches de culture de collection – HUB 076 isolée dans la région de Berlin et CYA 126/8 fournie par NIVA, Oslo

## I.2. Impact du phosphore et de l'azote sur la croissance des souches de *Planktothrix* isolées de l'Erdre

Les nutriments (azote et phosphore) sont nécessaires à la croissance des cyanobactéries. De fortes concentrations de nutriments favorisent le développement des algues. Cependant, le métabolisme des cyanobactéries requiert à la fois de l'azote et du phosphore. Une limitation de l'un de ces nutriments peut avoir un impact sur la croissance cellulaire des cyanobactéries.

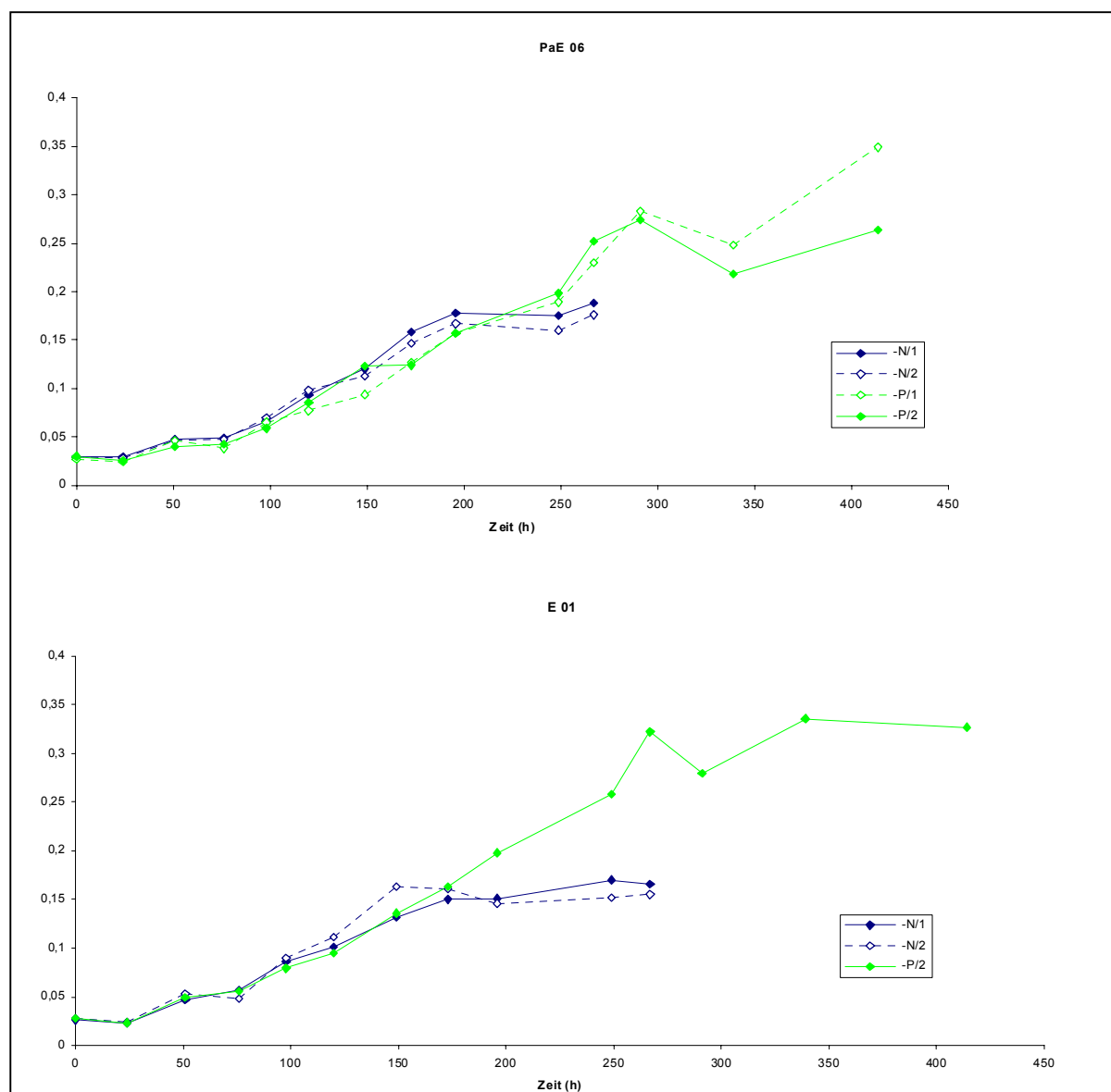
**Objectif :** Détermination des différences entre taux de croissance et de l'impact d'une limitation en nutriments sur la croissance à partir d'expériences en cultures batch sur des souches de l'Erdre.

**Approche :** Bien que les souches de *Planktothrix* isolées de l'Erdre (voir partie I.1) ne produisent pas de microcystines, elles ont pu être utilisées pour un screening en culture batch, en vue d'évaluer les différences de croissance en réponse à la limitation en nutriments entre 4 souches de *Planktothrix* de l'Erdre. Cette détermination permet de montrer si les taux de croissance répondent de façon suffisamment différenciée à la limitation en nutriments pour pouvoir éventuellement mettre en évidence une dominance d'un génotype au sein de la population de *Planktothrix*. Cette évaluation peut prendre en compte les souches productrices de microcystine en comparant les résultats des expériences en cultures continues à ceux des souches productrices de microcystine isolées à partir d'autres milieux aquatiques.

**Protocole :** Les cultures batch des quatre souches de l'Erdre ont été obtenues sur deux différents milieux – l'un sans phosphore et l'autre sans azote. Avec une telle approche, les cultures croissent à leur taux maximal de croissance (à une intensité lumineuse choisie) jusqu'à ce que le nutriment limitant respectif vienne à manquer dans les réserves intracellulaires. L'épuisement des réserves cellulaires limite ensuite la croissance, ou même l'arrête, c.à.d. que les cultures passent dans une phase stationnaire. Dans la phase de croissance exponentielle, les cultures ne sont pas limitées en nutriments. Ainsi, bien que des différences entre souches soient possibles, les taux de croissance exponentiels devraient être les mêmes pour une même souche, que ce taux de croissance soit déterminé dans le milieu limité en N ou dans celui limité en P.

Toutes les souches ont été obtenues par dilution d'une pré-culture saturée en nutriments avec une solution sans azote ou sans phosphore, de façon parallèle. Des Erlenmeyer de 500 mL ont été remplis de milieu de culture privé de N ou de P, respectivement, et un inoculum de souches de *Planktothrix agardhii* a été ajouté. Toutes les expériences ont été commencées avec des concentrations en biomasse identiques (mesurées par la densité optique, DO). Les cultures en flacons Erlenmeyer ont été agitées en continu à 20°C et éclairées à 34-37,5  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  dans un cycle d'éclairage/obscurité de 16h/8h. La densité optique à 750 nm a été mesurée quotidiennement. Des échantillons ont été prélevés pendant 3 jours au même moment lors de la phase de croissance exponentielle et 3 jours lors de la phase stationnaire, pour quantification du biovolume.

**Résultats :** La croissance des souches est illustrée ici par les exemples des souches PaE 06 et E01 (Figure 2).



**Figure 2 : Courbes de croissance des cultures batch avec deux souches différentes de *Planktothrix agardhii* de l'Erdre, en milieu limité en azote (-N) ou en phosphore (-P) (mesuré par augmentation de la densité optique, DO à 750 nm).**

Les résultats montrent comme attendu que les taux de croissance des différentes variantes dans la phase de croissance exponentielle reflètent la croissance maximale en conditions saturées. Lorsque les cellules se divisent, elles utilisent et mobilisent leurs réserves de phosphore lors des expériences de limitation en phosphore. De façon similaire, dans les expériences limitées en azote, elles mobilisent les réserves d'azote, bien que dans une moindre mesure comparé au cas du phosphore. Ceci permet une croissance continue pendant un certain temps même sans phosphore ou azote dissous dans le milieu. La diminution du taux de croissance commence lorsque les concentrations intracellulaires en nutriments deviennent limitantes.

Le tableau 1 montre les taux de croissance lors de la phase exponentielle. Pour PaE 02 –P et E01 –P seul l'un des deux essais parallèles a pu être inclus suite à la contamination du second essai parallèle. Les taux de croissance maximaux des 4 souches de l'Erdre sont

remarquablement identiques dans les conditions choisies pour l'expérience. Seule E01 a montré un taux de croissance nettement plus fort dans le milieu limité en azote. Bien qu'en théorie une différence aussi prononcée ( $\Delta\mu \approx 0.1 \text{ d}^{-1}$ ) puisse mener à la dominance de cette souche dans une situation prolongée de compétition, ce résultat doit être confirmé par répétition de l'expérience, puisque ce taux plus élevé n'a été observé que dans l'un des 2 milieux privés d'azote (voir fig. 2).

**Tableau 1 : Taux de croissance  $\mu$  ( $\text{d}^{-1}$ ) lors des phases de croissance exponentielle des cultures batch**

	PaE 02		PaE 05		PaE 06		E01	
	-N	-P	-N	-P	-N	-P	-N	-P
$\mu$ ( $\text{d}^{-1}$ )	0,26	0,24	0,26	0,27	0,26	0,25	0,35	0,27
Variance	0,11	0,11	0,15	0,14	0,12	0,14	0,19	0,17

En considérant la durée de la croissance exponentielle, les quatre souches ont montré des différences dans la sensibilité aux conditions limitées en nutriments. Par exemple, E01 était limitée en azote après seulement 150 heures (à titre de comparaison, après 200 heures pour PaE 06), mais n'a été limitée en phosphore qu'après 340 h de croissance exponentielle (PaE 06 après 290 heures) (Tab. 2, Fig 2). De telles différences peuvent indiquer différentes stratégies de stockage et/ou de mobilisation des nutriments selon les génotypes, ce qui résulte probablement dans la capacité à compenser les conditions limitées en nutriments pour des périodes plus ou moins longues. Ainsi, la souche PaE 05 semble mieux équipée pour résister à une limitation en phosphore durable que les autres souches.

**Tableau 2 : Temps de culture (heures) jusqu'au début de la limitation en nutriments**

	PaE 02	PaE 05	PaE 06	E01
-N	265	200	200	150
-P	265	>415	290	340



### I.3. Influence de l'éclairement

Pour déterminer les réactions physiologiques des cellules aux conditions environnementales, telles que les changements dans les taux de croissance ou la production et le contenu en métabolites, des cultures continues sont préférables aux cultures batch car l'état de limitation peut être clairement défini : bien que dans les cultures batch bien conçues il soit possible de déterminer qualitativement le facteur limitant, il n'est pas possible de quantifier le degré de limitation. Ceci est possible avec des cultures continues, où le milieu de culture est constamment remplacé pour maintenir les cellules dans un état stationnaire défini. Deux approches différentes sont possibles : le principe du turbidostat, dans lequel une mesure en ligne de la turbidité contrôle le débit de milieu nutritif de la culture pour maintenir la turbidité (et donc la densité cellulaire) constante, et le principe du chemostat, dans lequel le flux de milieu de culture est permanent et égal au taux de croissance de la culture – une fois que celle-ci a atteint son état stationnaire.

La méthode du turbidostat est appropriée pour étudier l'impact d'une limitation de l'éclairement, alors que la méthode par chemostat est nécessaire pour évaluer la limitation en nutriments. Ceci est dû au fait que le taux d'écoulement détermine le taux de croissance, qui à son tour détermine le statut de limitation en nutriments des cellules (« quota cellulaire », c.à.d. le contenu en nutriments des cellules).

Des études antérieures de l'Agence Fédérale de l'Environnement (Böttcher et al. 2001) avec *Planktothrix agardhii* (HUB 076) à l'aide de turbidostats ont clairement mis en évidence le rôle de l'intensité lumineuse pour la croissance, à l'aide de cultures continues de trois souches de *Planktothrix*. La gamme d'intensité lumineuse testée était de 2.5 à 73  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Pour ces éclaircements, les taux de croissance de toutes les souches ont augmenté de façon exponentielle d'environ 0,02  $\text{d}^{-1}$  jusqu'à 0,52  $\text{d}^{-1}$ . L'une des souches était caractérisée par un taux de croissance légèrement plus fort lors d'un éclaircissement plus intense. Cependant, aucun lien entre la croissance et la capacité des souches de *Planktothrix* à produire des microcystines n'a été établi.

## II. Impact de la vitesse d'écoulement sur la croissance de *Planktothrix agardhii*

La réaction de *Planktothrix agardhii* à un stress physique est très peu connue, en particulier en ce qui concerne la croissance, la rupture des cellules, la lyse et le relargage de microcystine. Des observations ponctuelles faites lors de la manipulation de *Planktothrix* en laboratoire ont suggéré que ces espèces sont plutôt sensibles au stress physique (tel que le cisaillement) et y répondent par une rupture des cellules.

Pour maîtriser la population de *Planktothrix agardhii* de l'Erdre, l'importance du stress physique induit par la vitesse d'écoulement et ses changements soudains a fait l'objet d'une évaluation par des expériences utilisant le système de rivière artificielle de l'UBA ainsi qu'une culture en masse de *Planktothrix agardhii* HUB 076. Les expériences prévues dans le programme de travail ont débuté comme prévu en août 2003. Ces tests ont été définis comme un système de culture batch pour évaluer l'impact de la vitesse d'écoulement sur l'adaptation de la population et la croissance de *Planktothrix* pendant la phase de croissance exponentielle, de même que les concentrations intracellulaires et extracellulaires de microcystine à diverses vitesses d'écoulement.

Nous avons complété ce programme expérimental par un test supplémentaire à échelle de laboratoire, en utilisant des appareils de floculation (jar-tests utilisés traditionnellement pour étudier la floculation lors du traitement des eaux potables). Les avantages de cette approche supplémentaire sont de permettre (i) l'étude d'une gamme de vitesses et de forces de cisaillement plus large et (ii) la réalisation d'expériences par une seconde approche indépendante.

### II.1. Expériences de laboratoire par agitation continue en appareil de jar-test

**Approche et méthode** : Quatre expériences ont été lancées avec diverses vitesses de rotation des agitateurs, dans des béciers de 2 L équipés d'un stator pour augmenter les turbulences et donc les forces de cisaillement (appareil de « jar-test » pour tester la floculation). Le gradient moyen de cisaillement  $G$  peut être déduit de la fréquence de rotation  $r$  et la géométrie du montage expérimental à l'aide de l'équation :

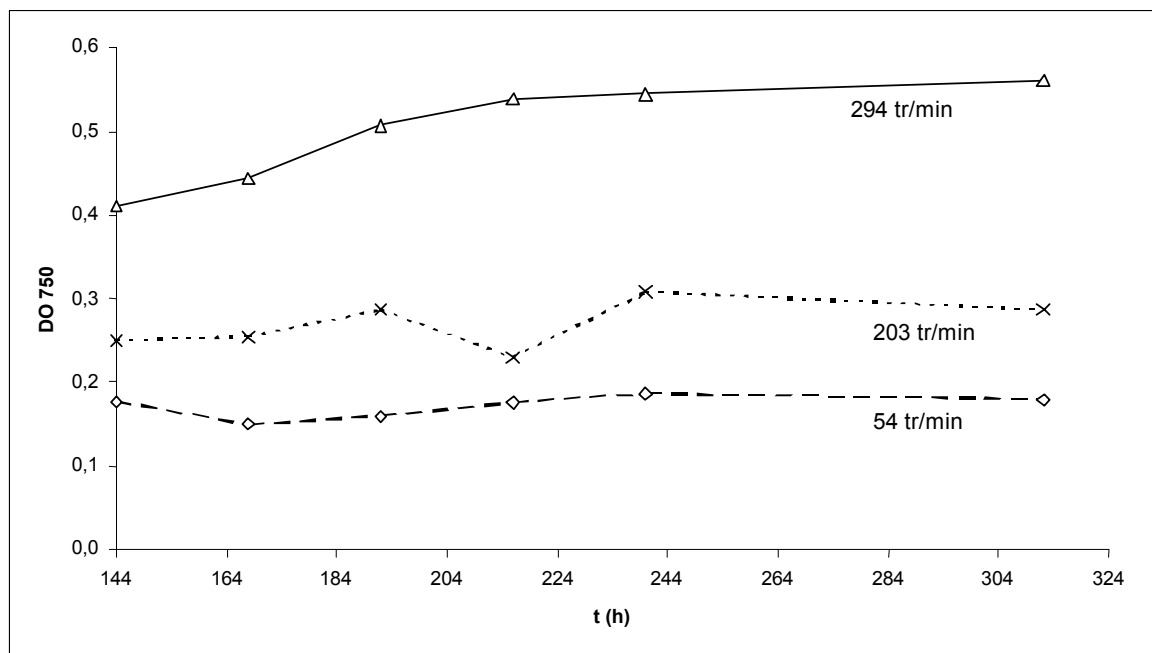
$$\lg G = 1,47 \lg r - 0,768 \quad \text{c.à.d.} \quad G = 0,171 r^{1,47}$$

(voir la feuille de travail DVGW – W218 : Coagulation et floculation pour le traitement des eaux ; Partie 2 Méthodes de test).

La souche testée ici était HUB 076. Les cultures ont été menées avec un milieu de culture HUB (désignation UBA) à  $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  et  $20^\circ\text{C}$ . L'une de ces expériences a dû être stoppée prématurément suite à une panne du moteur de l'agitateur.

Après qu'aucune différence substantielle n'ait été détectée entre ces tests, la vitesse rotationnelle a été augmentée dans chaque appareil, avec une vitesse plus grande toutes les 24 heures. A chaque augmentation, des échantillons ont été prélevés pour analyse de la microcystine intra- et extracellulaire, détermination de la distribution de longueur des filaments et de la courbe de croissance. Après la dernière accélération les cultures se sont développées pendant 8 jours supplémentaires à vitesse rotationnelle maximale.

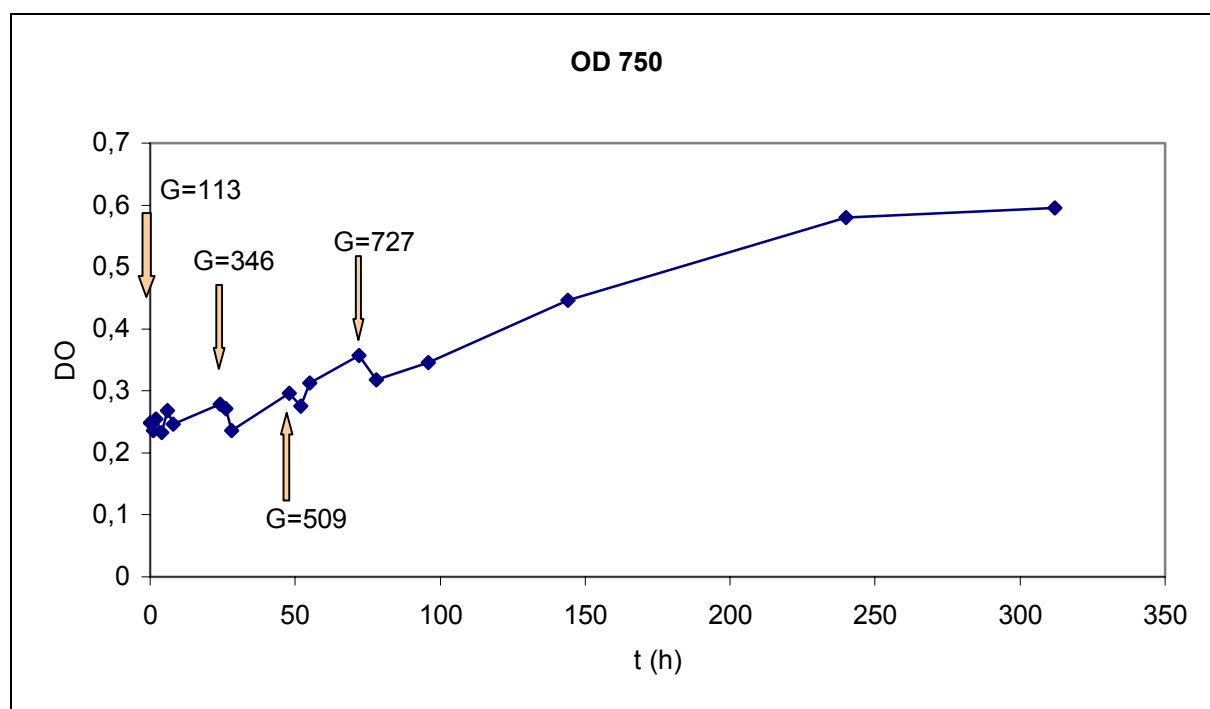
**Résultats :** de façon surprenante, la culture agitée avec la plus haute fréquence (294 tours/min à partir de l'heure 96) s'est développée beaucoup mieux que les autres tests (Fig 3). Ceci est très probablement dû à un effet substantiel (et positif) de l'ajout supplémentaire de CO<sub>2</sub> dans les cultures, dû à l'agitation intensive. De plus, les conséquences supposées négatives de l'agitation, telles que la rupture des filaments, ne semblent jouer qu'un rôle mineur, compensé rapidement par la croissance.



**Figure 3 : Croissance – mesurée par la variation de la densité optique (DO à 750 nm) des cultures – de 3 tests parallèles d'agitation, démarrants à diverses vitesses rotationnelles (à 294, 203 et 54 tr/min) avec *Planktothrix agardhii* HUB 076.**

Remarque : toutes les cultures ont débuté à t=0 avec des concentrations de biovolume similaires.

Pour une observation des effets autres que ceux sur la croissance provoqués par le stress mécanique dans ces expériences, le test démarré avec la plus forte vitesse rotationnelle a été étudié en détail. La figure 4 montre les variations de la densité optique lors du test, en fonction du temps et en relation avec les accélérations de l'agitation rotationnelle, c.à.d. le gradient de cisaillement induit par l'agitation. La densité optique montre une nette diminution en réponse à chaque augmentation du gradient de cisaillement, comme réaction initiale. Cependant, après un temps relativement court (env. 4h) les cellules semblent s'être adaptées aux nouvelles conditions et se développent à nouveau, comme l'indique l'augmentation des valeurs de DO.



**Figure 4 : Densité optique de la culture agitée avec la plus forte vitesse, c.à.d. sous fort gradient de cisaillement.**

Les flèches indiquent les instants où l'agitation a été accélérée.

Toutes ces observations correspondent avec les résultats de mesure de la croissance (Fig. 3), suggérant une période d'adaptation à croissance réduite, lors de laquelle les filaments soumis à un stress mécanique se rompent probablement davantage.

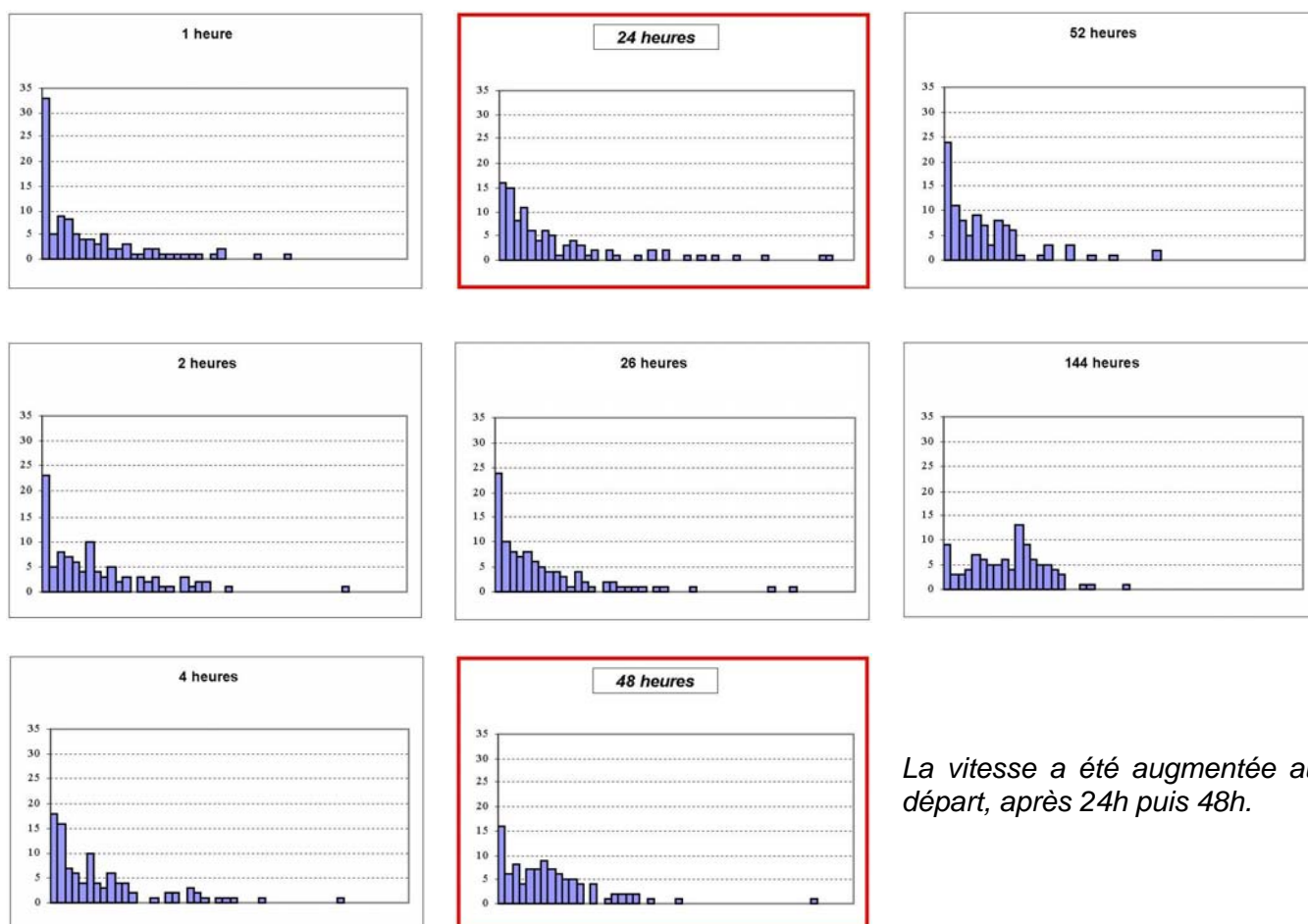
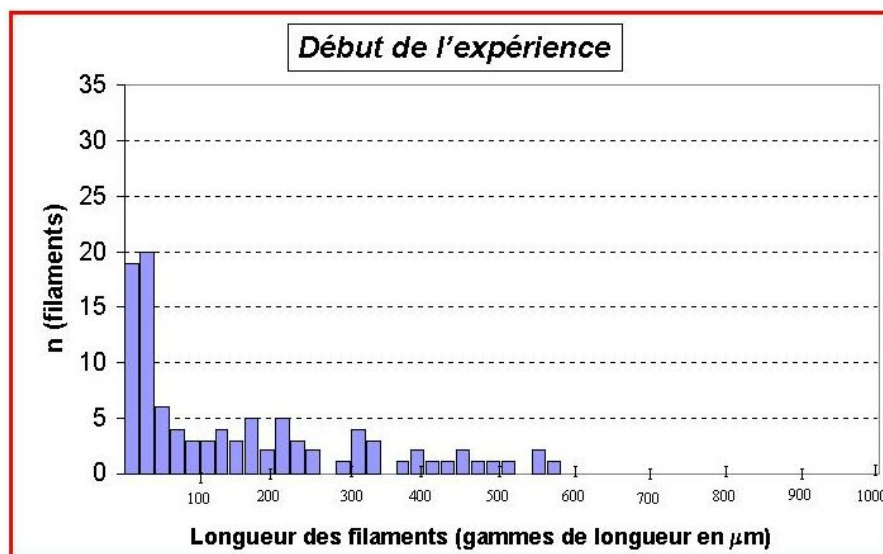
Une autre réponse potentielle à une turbulence accrue et aux forces de cisaillement est la rupture des filaments, qui résulterait dans une plus grande proportion de filaments courts. Ainsi, la distribution de la longueur des filaments a été étudiée. Les résultats sont donnés dans la figure 5 (voir page suivante).

Les échantillons prélevés 1 à 2 heures après chaque accélération de l'agitateur montrent un taux plus élevé de filaments courts (<20  $\mu\text{m}$ ). Ceci confirme l'hypothèse de travail selon laquelle les forces de cisaillement ont un impact sur la stabilité des filaments. Cependant, cet impact n'a été que de courte durée et n'a eu qu'une faible influence sur la population de la culture : après 4 jours d'agitation intensive à un gradient de cisaillement de  $727 \text{ s}^{-1}$  la culture a montré une nette diminution du nombre de filaments courts et une augmentation simultanée du nombre de filaments > 180  $\mu\text{m}$ .

La vitesse rotationnelle de l'agitateur a été augmentée après échantillonnage des prélèvements encadrés ici en rouge.

On observe un changement rapide des longueurs de filaments après augmentation de la vitesse d'agitation, avec une augmentation nette de la quantité de filaments courts (0-20  $\mu\text{m}$ ).

Une élongation des filaments se produit après une phase d'adaptation, marquée par une réduction du quota de filaments courts et une augmentation du nombre de filaments plus longs dans les 24h jusqu'à l'accélération suivante.



La vitesse a été augmentée au départ, après 24h puis 48h.

**Figure 5 : Distribution de longueur des filaments de *Planktothrix* lors des expériences en appareil de floculation (nombre de filaments répartis par classes de longueur en  $\mu\text{m}$ )**

**Conclusion :** les résultats obtenus indiquent une phase courte et temporaire d'effets négatifs sur les filaments, se traduisant par une certaine rupture des filaments lorsque la turbulence est accrue. Cependant, l'adaptation à cette nouvelle situation est très rapide, en moins de 4 jours, et a peu d'impact sur la population de *Planktothrix*.

## II.2. Simulations d'écoulement en rivière artificielle

**Approche :** La réalisation de cultures batch de souches *Planktothrix agardhii* HUB 076 productrices de microcystine et non-axéniques (=cultures contenant également d'autres bactéries, mais pas d'autres cyanobactéries ou algues), à grande échelle et à diverses vitesses d'écoulements dans le système de rivière artificielle de l'UBA, permet de déterminer la croissance et les concentrations intra- et extracellulaires de microcystine qui en résultent.

Les expériences en canal ont débuté par 2 semaines d'adaptation de la culture (après une phase de stagnation) à un écoulement très faible, avec une densité de culture d'environ 50 µg/L de microcystine totale. Des tests précédents avec HUB 076 indiquent que ceci correspond à une quantité de 100 à 450 µg/L de chlorophylle-a, soit la densité de population dans des situations d'eutrophie importante voire légèrement au dessus de celles-ci. De plus, on peut s'attendre à des taux de microcystine extracellulaire de l'ordre de 0,1 à 0,3 µg/L pour cette densité cellulaire. Les expériences en canal ont été menées en mode semi-continu en rapport avec la densité cellulaire : si la turbidité (et donc potentiellement le signal fluorescent) indique une hausse de densité de plus de 20%, la culture est diluée. Les concentrations de nutriments étaient en excès pour éviter une limitation, et l'éclairement était faible (de l'ordre de 5-10 µE/m<sup>2</sup> s) de façon à simuler les conditions d'eutrophie et de forte turbidité et éviter la compétition avec d'autres algues. L'intensité de l'écoulement a été augmentée progressivement, pour laisser à la population dans le canal le temps de s'adapter avant une nouvelle hausse. Les vitesses d'écoulement n'ont pas été pré-déterminées, elles ont été augmentées jusqu'au point de rupture des cellules ou jusqu'à ce qu'aucune croissance ne soit détectée pendant 2 semaines.

### **Protocole expérimental - Description du système de rivière artificielle**

Le système consiste d'une boucle couverte de plastique transparent, avec les dimensions suivantes :

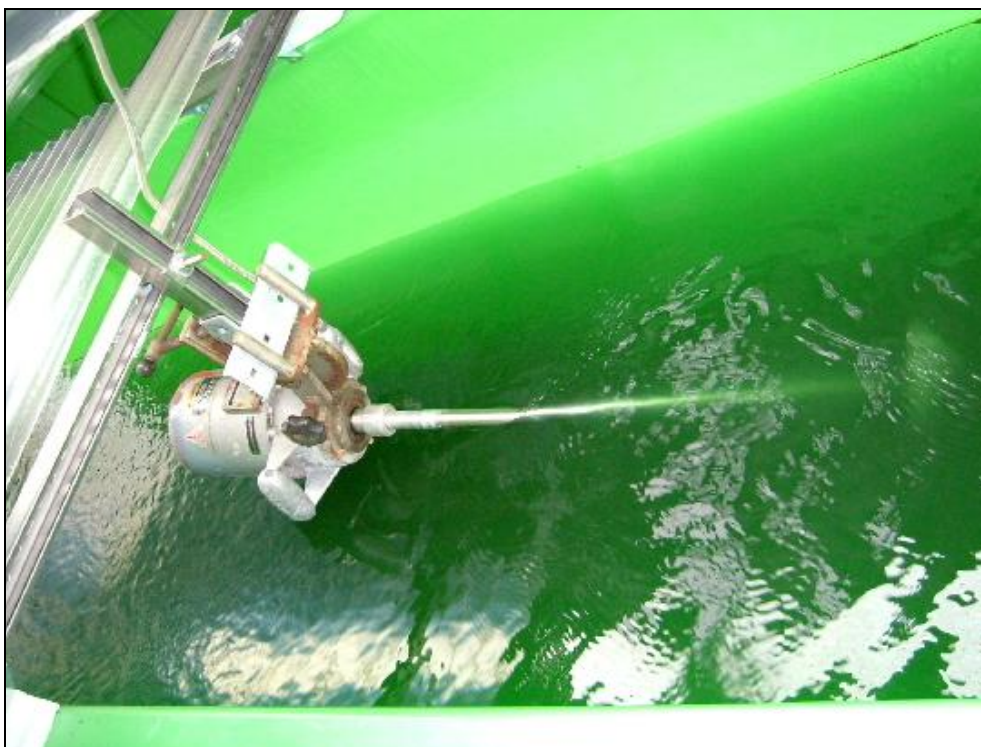
- Diamètre du canal : 1 m
- Hauteur d'eau : 29 cm au niveau de l'agitateur
- Longueur de la boucle : 21 m

Le volume a été maintenu constant à 4,4 m<sup>3</sup>. L'écoulement était provoqué par un agitateur qui peut être régulé sur une gamme de 0 à 20 Hz (Figure 7) et cause des turbulences déjà considérables à 15 Hz (Figure 8).

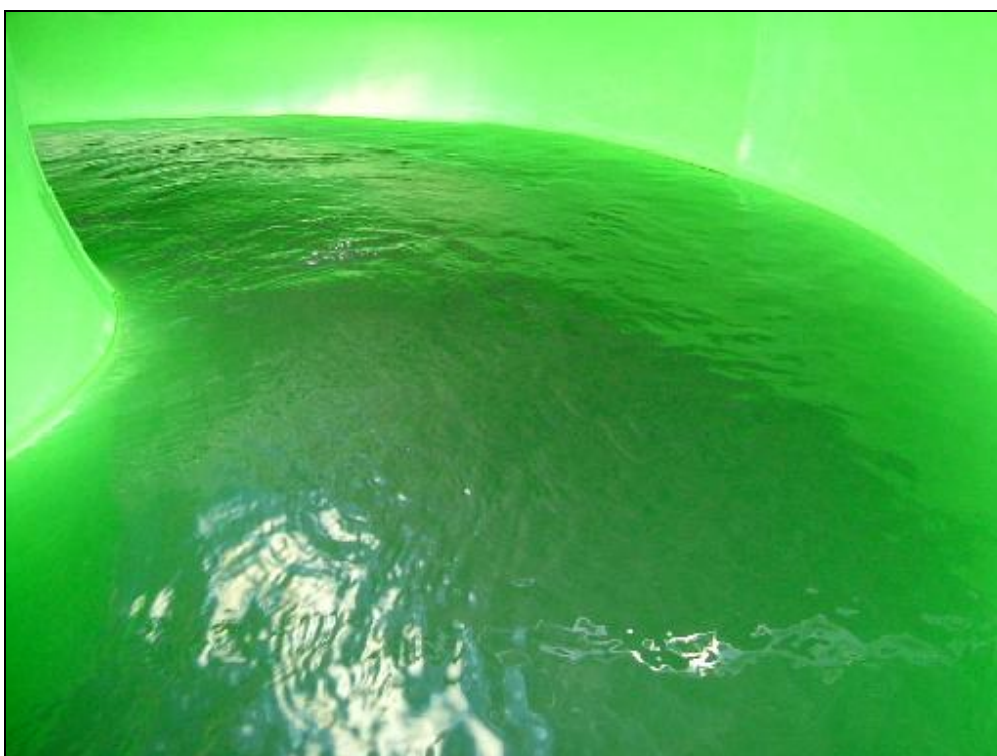




Figure 6 : Système de rivière artificielle de l'UBA préparé pour les expériences sur *Planktothrix* de l'Erdre



**Figure 7 : Agitateur dans la rivière artificielle**



**Figure 8 : Ecoulement à 15 Hz (turbulence visible)**

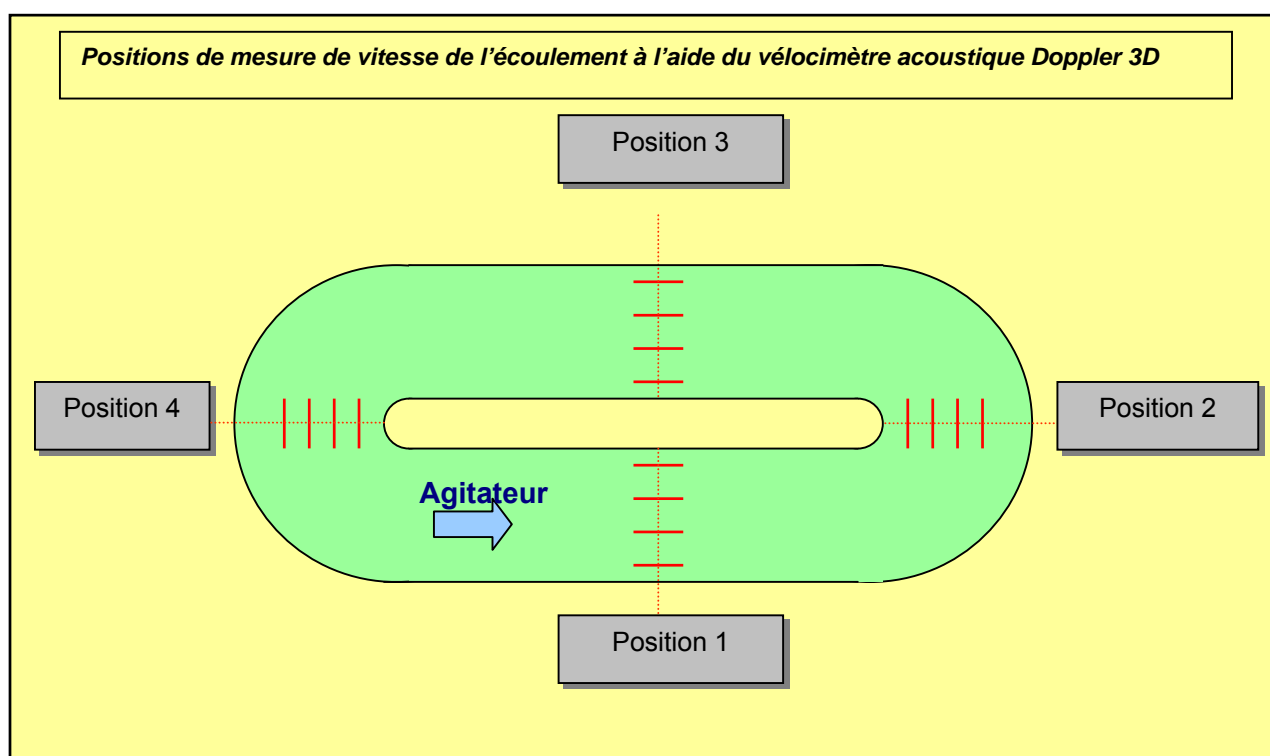
La température était maintenue à  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . La culture était éclairée à  $35 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  avec un rythme éclaircissement/obscurité de 16/8 h avec des lampes OSRAM Biolux, qui fournissent une lumière comparable à la lumière du jour naturelle. Le milieu utilisé était un milieu HUB.



Les expériences étaient menées à quatre vitesses d'écoulement différentes en ajustant la fréquence de rotation de l'agitateur respectivement à 10, 15, 20 et 7,5 Hz ; chaque fréquence a été opérée pendant 144 h (1 semaine). Un essai au début du mois d'août à 2,5 Hz a montré que l'écoulement induit à cette faible fréquence n'était pas suffisant pour maintenir les filaments en suspension – ils se sont déposés au fond et ont dépéri.

### Mesure des vitesses d'écoulement

Pour les 4 vitesses rotationnelles testées, les vitesses d'écoulement ont été mesurées avec un vélocimètre acoustique Doppler 3D (ADV) à quatre positions dans le chenal, comme ceci est indiqué dans la figure 9, avec des points de mesures répartis régulièrement sur la section transversale et la profondeur, comme ceci est indiqué sur la grille de la figure 10.



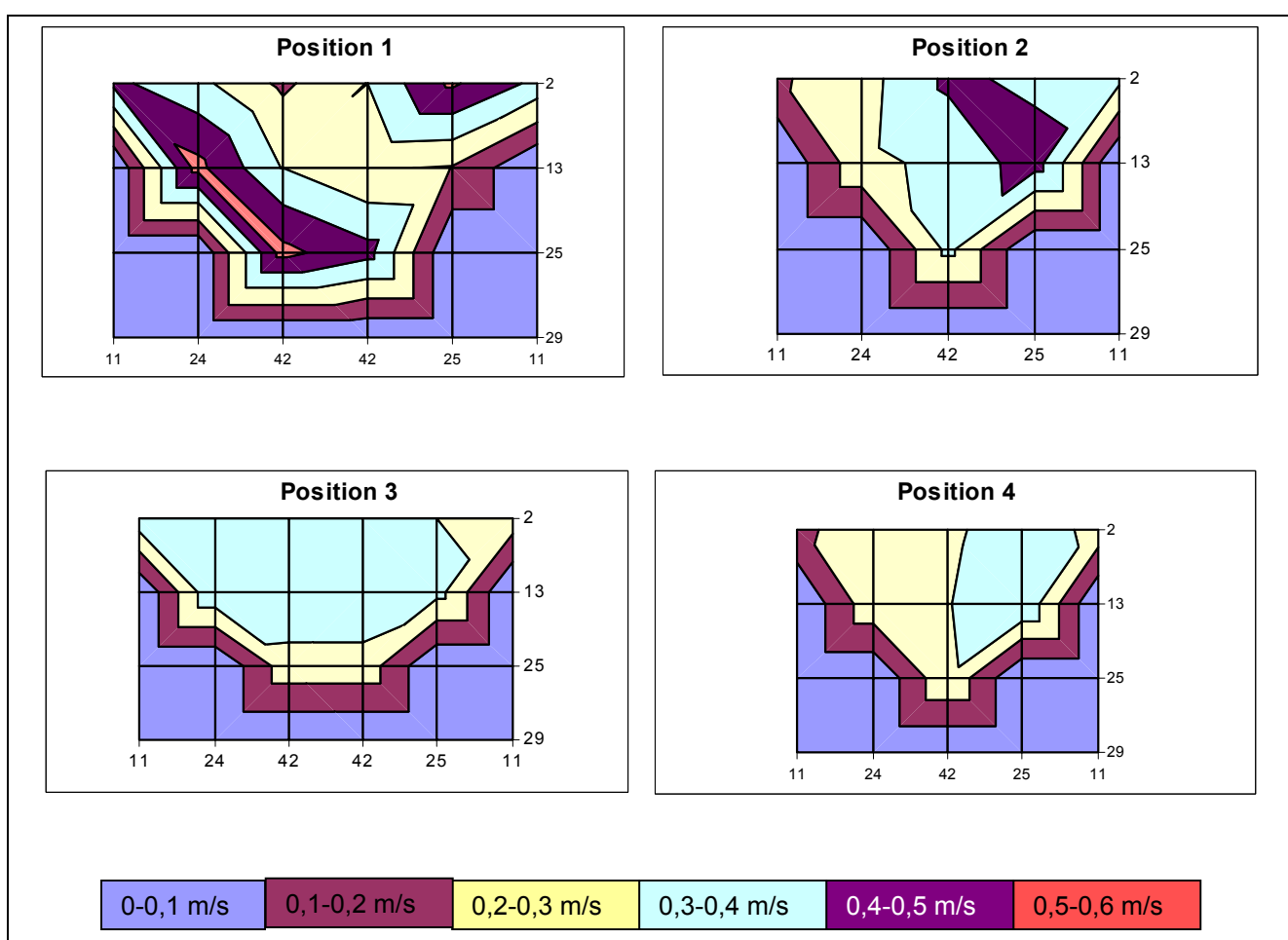
Positions horizontales des points de mesure (Distance par rapport aux bords du chenal)						
	Par rapport au bord extérieur			Par rapport au bord intérieur		
<b>Position 1</b>	11 cm gauche	25 cm gauche	42 cm gauche	42 cm droite	25 cm droite	11 cm droite
<b>Position 2</b>	11 cm gauche	25 cm gauche	42 cm gauche	<b>Pas de mesure</b>	25 cm droite	11 cm droite
<b>Position 3</b>	11 cm gauche	25 cm gauche	42 cm gauche	42 cm droite	25 cm droite	11 cm droite
<b>Position 4</b>	11 cm gauche	25 cm gauche	42 cm gauche	<b>Pas de mesure</b>	25 cm droite	11 cm droite

Positions verticales des points de mesure (profondeur sous à la surface de l'eau)			
<b>Position 1</b>	2 cm	13 cm	25 cm
<b>Position 2</b>	2 cm	13 cm	25 cm
<b>Position 3</b>	2 cm	13 cm	25 cm
<b>Position 4</b>	2 cm	13 cm	25 cm

Figure 9 : Positions de mesure des vitesses d'écoulement dans le chenal

Le principe de fonctionnement de l'appareil de mesure de l'écoulement utilisé (type PVM-PD) est basé sur le principe de la mesure de la pulsation doppler. Un cristal piezo-électrique envoie et reçoit à courts intervalles des séries d'impulsions d'ultra-sons d'une fréquence connue dans le fluide dont on veut mesurer l'écoulement. Le décalage de fréquence provoqué par l'effet Doppler sur le signal renvoyé fournit une mesure de la vitesse d'écoulement au point de mesure se trouvant directement devant l'appareil (référence : notice d'utilisation PVM-PD NIVUS, 2001).

La distribution des vitesses d'écoulement est montrée dans la figure 10. Selon la position du vélocimètre, une augmentation jusqu'à 0,6 m/s est possible à la vitesse d'agitation maximale de 20 tours/min. Cela montre également une répartition très hétérogène de l'écoulement sur la section transversale, en particulier à la position 1 juste après l'agitateur et les courbes, alors que l'écoulement est plutôt uniforme à la position 3. Une modélisation hydrodynamique pour obtenir une mesure intégrale de l'écoulement aurait donc été inadaptée au projet.



**Figure 10 : Répartition horizontale de la vitesse d'écoulement dans le chenal, mesurée à une fréquence d'agitation rotationnelle de 20 Hz et une profondeur d'eau de 29 cm.**

Remarque : Cette figure déforme le contour semi-circulaire du chenal en un rectangle.

Le tableau 3 (page suivante) donne la vitesse d'écoulement moyenne à la position 3 à 42 cm de distance du bord extérieur du chenal, en tant que valeur moyenne sur 2, 13 et 25 cm de profondeur (profondeur totale : 29 cm).

**Tableau 3 : Vitesse d'écoulement moyenne déterminée à la position 3**

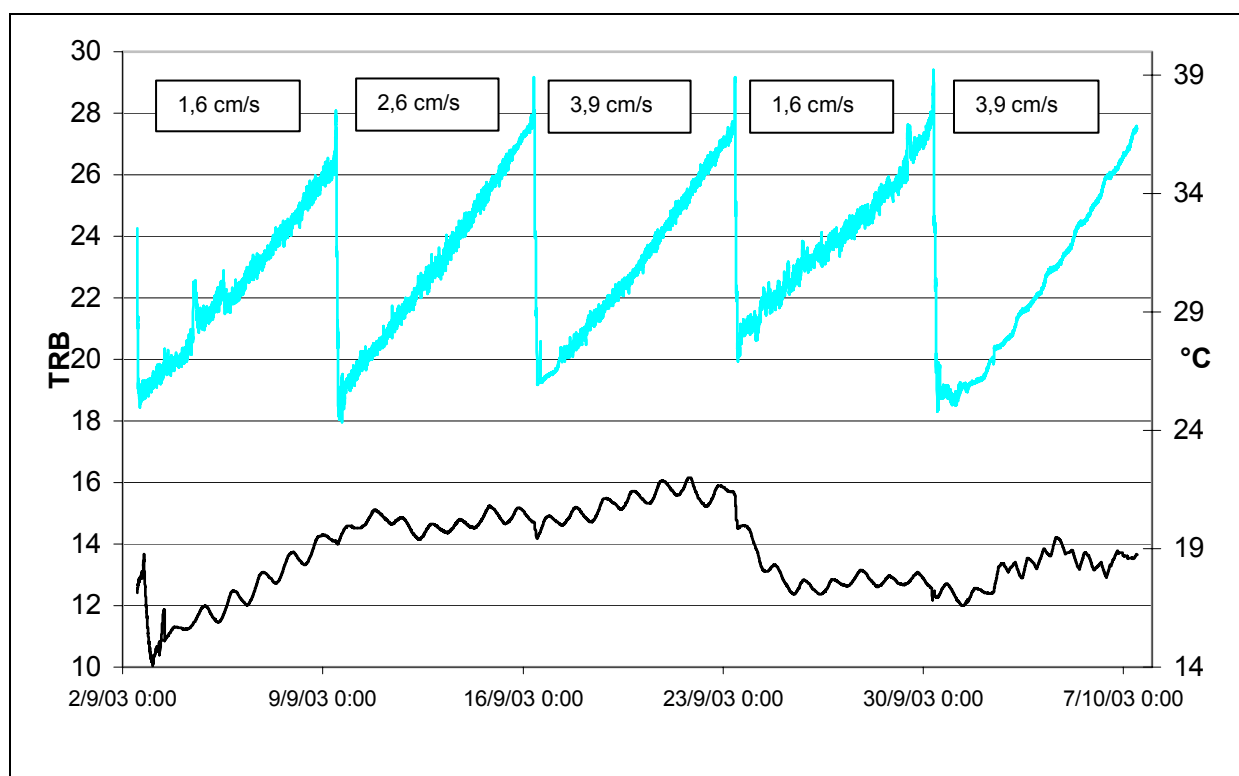
10 Hz	1,57 ± 0,02 cm/s
15 Hz	2,57 ± 0,08 cm/s
20 Hz	3,86 ± 0,03 cm/s

Chaque expérience a débutée avec la même densité de filaments, déterminée en diluant la culture à une valeur de turbidité de 32-35 FNU. La température, le pH et la turbidité ont été enregistrés en continu pendant l'expérience (à l'aide d'une sonde Dr Lange Solitarx t-line). Des échantillons ont été prélevés à 0, 1, 3, 48, 72 et 144h pour mesurer les paramètres suivants :

- Conductivité
- Concentration de microcystine intracellulaire
- Concentration de microcystine extracellulaire
- Concentration de chlorophylle
- Détermination microscopique de la longueur des filaments et du biovolume (fixation de l'échantillon avec une solution de Lugol) et évaluation de l'état des filaments

**Résultats sur la croissance de *Planktothrix* :**

Les taux de croissance des cultures ont été très stables, comme le montre l'augmentation continue de la turbidité lors de expériences (figure 11). De plus, ces taux étaient similaires pour les quatre vitesses d'écoulement, certains taux légèrement plus faibles pouvant s'expliquer par une chute de la température à 15 –18 °C dans la culture. L'examen microscopique de l'état des filaments n'a pas montré d'impact immédiat et évident de la vitesse d'écoulement ou de ses changements.



**Figure 11 : Augmentation de turbidité et suivi de la température au cours du temps lors de 5 expériences (d'une semaine chacune) réalisées à diverses vitesses d'écoulement ; les taux d'écoulement sont indiqués dans les encadrés.**

Les cultures ont été diluées à la densité initiale (32-35 FNU) à chaque changement de la vitesse de rotation (marqué par une baisse soudaine de la turbidité).

Le dernier test consistant à augmenter soudainement la vitesse d'écoulement de la valeur la plus faible de 1,6 cm/s à la plus forte de 3,9 cm/s n'a pas montré d'effet sensiblement différent des autres (voir figure 11), à part une phase d'adaptation légèrement plus longue.

### III. Rôle des vases dans la prolifération des cyanobactéries

Les principaux facteurs externes entraînant la croissance des cyanobactéries ont été identifiés par de nombreuses études au niveau mondial. Les plus importants sont les nutriments (azote, phosphore), la lumière (fort/faible éclaircissement), l'agitation (lacs et rivières turbulents/stratifiés), la température (stratification thermique), la consommation par des prédateurs, et les sédiments (recyclage interne des nutriments). On peut résumer ces facteurs par le schéma suivant :

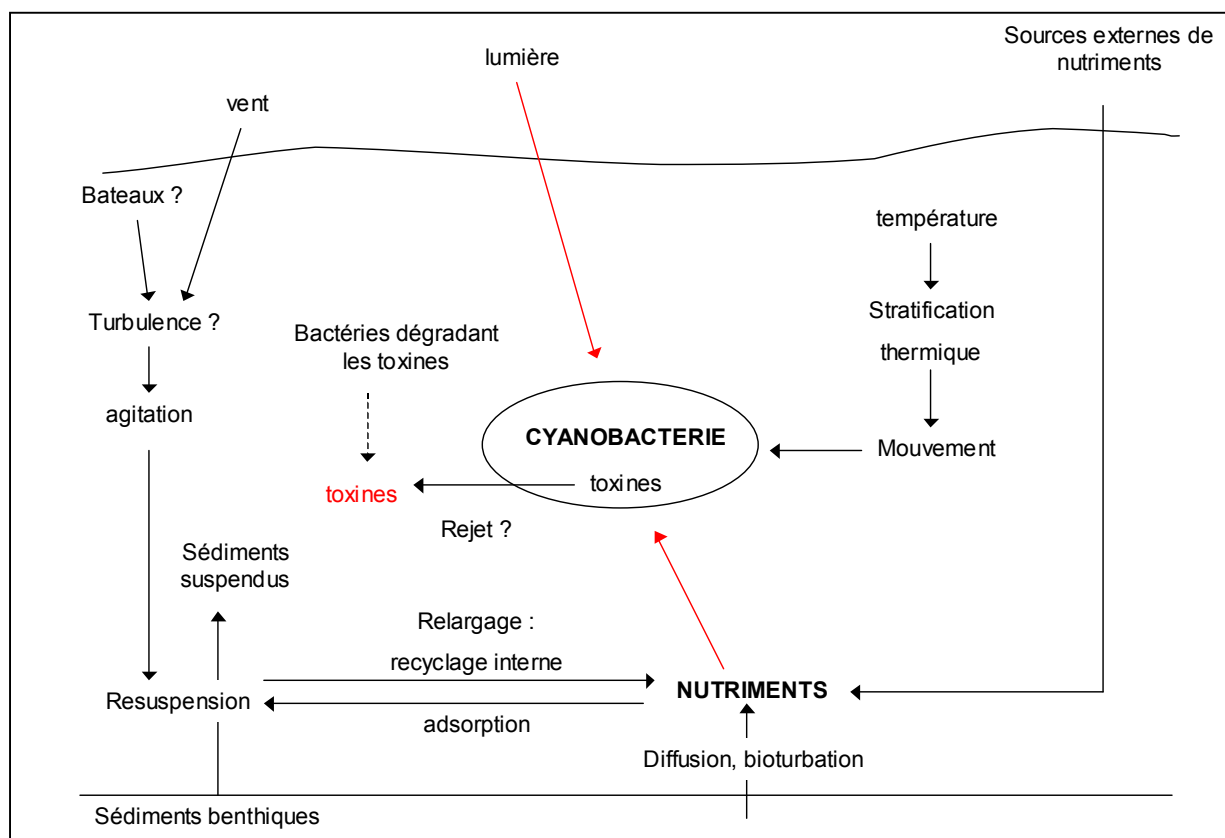


Figure 12 : Principaux facteurs favorisant la croissance de cyanobactéries

Les sédiments peuvent avoir deux types d'impacts sur les blooms de cyanobactéries et la croissance algale :

- un impact indirect dû au **recyclage interne de nutriments en provenance des sédiments**, favorisant une croissance accrue des cyanobactéries. De nombreux articles et études sont disponibles sur ce sujet.
- un impact direct sur la **remise en suspension de cyanobactéries et de leurs toxines** dans la colonne d'eau. Des études et des articles existent sur la resuspension de certaines espèces de cyanobactéries telles que *Microcystis* et *Anabaena*, mais aucune référence n'existe sur *Planktothrix*.

### III.1. Influence du recyclage interne des nutriments

#### 1. Formes de nutriments

##### Phosphore

Différentes formes de phosphore co-existent [20]:

Phosphore			
dissous		particulaire	
organique	inorganique $\text{PO}_4^{3-}$ (orthophosphates)	organique	inorganique
		Dans le plancton ou les détritux	Lié au fer, aluminium, calcium et métaux argileux

Le plus important est de pouvoir identifier le phosphore « biodisponible », le phosphore susceptible d'être relargué des sédiments. Il est constitué du phosphore dissous dans l'eau interstitielle (c'est à dire entre les particules de sédiment), du phosphore adsorbé sur les particules qui peut désorber dans des conditions spécifiques, et du phosphore particulaire, c'est à dire inclus dans des cellules vivantes ou non entièrement dégradées. Le phosphore dissous dans l'eau interstitielle peut se diffuser graduellement dans la couche d'eau au-dessus des sédiments. C'est un processus lent, contrôlé par les gradients de concentration et donc par le taux d'échange avec l'eau située au-dessus des sédiments. Le phosphore adsorbé sur les particules peut être échangeable (par sorption/désorption), dépendant fortement des conditions chimiques telles que redox ou pH [15]. De plus, le phosphore particulaire organique est relargué sous forme de détritux de matière organique (cellules, débris cellulaires).

Des techniques de spéciation permettent de déterminer les différents types de phosphore. Une étude française a analysé les différentes fractions de phosphore dans une retenue hydroélectrique, et le phosphore remobilisable a été identifié comme étant le phosphore organique, plus le phosphore inorganique adsorbé sur les oxydes et hydroxydes de fer et d'aluminium. Le phosphore non remobilisable a été identifié comme étant constitué des orthophosphates du calcium de phosphate (insoluble) [16]. Un mécanisme très important pour le rejet et l'adsorption de phosphore dissous sur les particules de sédiment est la formation de phosphate de fer. Dans des conditions oxydantes, celui-ci est peu soluble dans l'eau et précipite. Cependant, dans des conditions anoxiques comme celles qui se produisent fréquemment dans les sédiments riches en matière organique, il devient beaucoup plus soluble. Dans beaucoup de milieux aquatiques, ce mécanisme provoque des scénarios saisonniers très prononcés, avec l'adsorption d'une grande partie du phosphore lors de conditions de bonne oxygénation et d'agitation (de la fin de l'automne au printemps), et mène à de forts pics de rejet quand les conditions deviennent anoxiques, d'habitude en fin d'été. Les sédiments de rivière avec des traces d'oxygène dans la couche d'eau au-dessus peuvent également être sujet à ce mécanisme, si l'eau devient stagnante et que l'oxygène

contenu dans la fine couche d'eau au-dessus des sédiments est rapidement consommé par les processus de dégradation.

### Azote

L'azote est sous forme de nitrate  $\text{NO}_3^-$ , d'ammonium  $\text{NH}_4^+$  et d'azote organique.

Bien que le phosphore soit souvent considéré comme le facteur principal pour la croissance des cyanobactéries, l'azote est également nécessaire au métabolisme des bactéries.

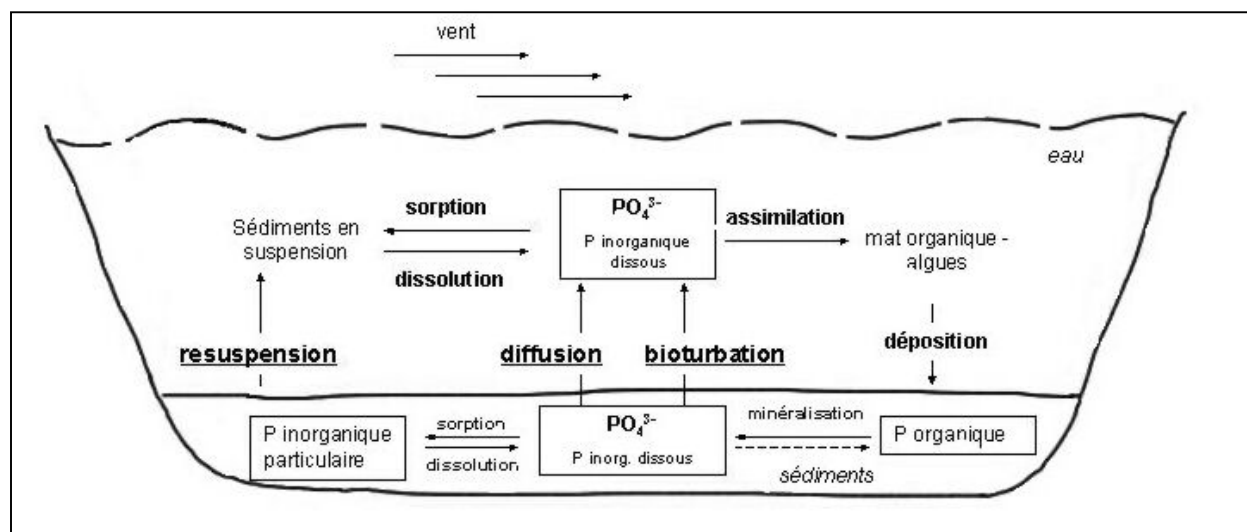
## **2. Mécanismes de recyclage**

Le rôle des nutriments stockés dans les vases dépend du taux de relargage en provenance des sédiments, venant enrichir le milieu en nutriments et favorisant ainsi la croissance des cyanobactéries.

Le relargage de nutriments en provenance des sédiments est en lien avec les principaux phénomènes suivants :

- Mécanismes physiques : **resuspension**
- Mécanismes chimiques : **diffusion**
- Mécanismes biologiques : **bioturbation**

Les phénomènes à l'origine du recyclage de phosphore en provenance des sédiments sont présentés dans le schéma ci-dessous :



**Figure 13 : Principaux processus de recyclage interne du phosphore (d'après [21])**

Le phosphore peut être dissous dans l'eau interstitielle entre les grains de sédiments, ou contenu dans les particules organiques (cellules et débris cellulaires), ou encore adsorbé sur des particules organiques ou inorganiques de sédiment. Le phosphore se lie aux sédiments par divers mécanismes : assimilation de  $\text{PO}_4$  par les organismes biologiques dans les sédiments anoxiques (la matière organique ainsi formée est ensuite minéralisée à nouveau), sorption avec le fer (fer III) et précipitation sous forme de minéraux.

Ces mécanismes sont influencés par un certain nombre de facteurs physiques, chimiques et biologiques, que nous proposons de résumer ci-dessous.

Le rôle important du relargage de nutriments en provenance des sédiments lors des problèmes d'eutrophisation est largement reconnu [5] et fait l'objet de nombreuses études par la communauté scientifique internationale.

#### **a) La resuspension des sédiments**

La resuspension des sédiments est un phénomène de transport physique, dû aux turbulences provoquées par le vent, et les bateaux éventuellement, mais ce dernier point n'est pas très documenté [12] [20] [27].

Les sédiments remis en suspension peuvent agir comme un puits ou une source de phosphore, tout dépend de la concentration d'équilibre en phosphore.

Si la concentration en phosphore dans l'eau est inférieure à la concentration d'équilibre, le phosphore des sédiments en suspension va être dissous. Si au contraire la concentration en phosphore dans l'eau est supérieure à la concentration d'équilibre, les sédiments en suspension vont agir comme un puits (sorption du phosphore sur les sédiments).

Les principaux facteurs affectant l'échange de phosphore durant la resuspension sont les suivants [12] [20]

- concentration de matières en suspension : une forte concentration de solides en suspension favorise les réactions d'adsorption.
- force ionique : une faible force ionique augmente le relargage de phosphore
- conditions redox
- pH
- concentrations en nitrate : si une concentration importante en nitrate est disponible dans l'eau interstitielle, cela maintient des conditions suffisamment oxydantes pour prévenir un rejet de phosphore dû aux conditions redox.
- température : par l'impact général de la température sur ces mécanismes - c'est à dire sur les processus de diffusion, biodégradation et bioturbation, minéralisation, qui consomment de l'oxygène et ont donc un impact sur les conditions redox.
- taux d'écoulement : plus l'écoulement est rapide, plus le gradient de concentration entre l'eau interstitielle et les couches du dessus augmentent, favorisant le rejet de nutriments. Cependant, à l'opposé, un écoulement plus important transporte également les nutriments rejetés, permettant ainsi « d'exporter » un contenu excessif en nutriments.

L'agitation des sédiments peut mener à un relargage plus important de nutriments et donc un développement accru des cyanobactéries. Des expériences menées à l'Université Technique du Brandebourg de Cottbus ont mis en évidence l'apport supplémentaire de nutriments dans la colonne d'eau dû à la resuspension des sédiments [26]. Ceci est détaillé dans la suite au paragraphe 3a.



## **b) La diffusion des nutriments**

La diffusion est le phénomène de transport chimique provoqué par un gradient de concentrations en phosphore à l'interface sédiments/eau [21]. Ce mécanisme concerne le phosphore inorganique dissous dans l'eau interstitielle entre les particules de sédiments : les orthophosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ).

De fortes concentrations en phosphore inorganique dissous, à l'origine d'un plus fort gradient de concentration, sont liées aux facteurs suivants :

- la charge externe en phosphore et la déposition de phosphore organique, venant enrichir le stock dans les sédiments.
- les concentrations en minéraux tels que fer et calcium, influençant la dissolution ou la sorption du phosphore inorganique.
- les caractéristiques oxydo-réductrices du milieu, qui favorisent la solubilité du phosphore en milieu anoxique (peu d'oxygène), ou la sorption sur les minéraux de fer ou calcium en milieu oxique.

### Influence des conditions anoxiques

Les conditions en oxygène à l'interface eau/sédiment sont particulièrement importantes, puisque le relargage ponctuel de phosphore inorganique dissous se produit en particulier lors de conditions anoxiques à l'interface eau/sédiment [23]. Avec un faible potentiel redox et une faible concentration en oxygène à l'interface eau/sédiment, le relargage de nutriments en provenance des sédiments est favorisé [16] [23].

Ceci est à prendre en compte pour la gestion de tels problèmes : l'apport de nutriments depuis les sédiments est minimisé si les conditions d'oxygénation à l'interface eau/sédiment sont suffisantes. Un écoulement important dans la rivière permet de transférer de l'oxygène aux sédiments du lit de la rivière ou du fond du lac.

## **c) L'activité biologique**

### Bioturbation

La bioturbation est un facteur biologique de relargage de phosphore, dû à l'activité des organismes aquatiques vivant dans les sédiments, qui peuvent déplacer des composés entre les différentes couches de sédiment [28].

### Macrophytes submergés

La présence de macrophytes submergés peut également avoir un impact car une forte densité diminue la resuspension, et le rejet d'oxygène en provenance des racines augmente l'adsorption sur les composés du fer [20]. De plus, les macrophytes assimilent également le phosphate, venant ainsi en compétition avec le phytoplancton si le phosphore devient limitant. Ainsi, si au printemps les macrophytes submergés s'établissent rapidement en une large population, ils peuvent assimiler une quantité suffisamment importante de nutriments pour limiter la quantité de phytoplancton, qui utilise alors la fraction restante de nutriments dissous. Cependant, si la croissance du phytoplancton est plus rapide, cela peut mener à une turbidité significative, en inhibant la croissance des macrophytes dû à la limitation de l'éclairement. Le phytoplancton – souvent des cyanobactéries – va alors devenir dominant.

Cette alternance entre dominance du phytoplancton ou des macrophytes est dénommée par le terme « conditions bistables » **[6] [9] [10]**.

### d) Synthèse

L'action de ces facteurs physiques, chimiques et biologiques sur les mécanismes d'échange du phosphore est résumée dans le tableau 4.

<b>Facteurs physiques</b>		<b>Mécanisme concerné</b>
Ecoulement hydraulique	Turbulences (vent, bateaux)	Resuspension de P particulaire Diffusion (augmente gradient de concentration)
	Temps de séjour de l'eau	Export de P
Température	De fortes températures favorisent l'ensemble des mécanismes.	Diffusion de P dissous Minéralisation de P organique Activité bactérienne
Lumière	Affecte la croissance	Activité bactérienne
Caractéristiques vases	Densité, épaisseur des couches de sédiments, vitesse de chute	Diffusion de P dissous Sorptions/Dissolution
<b>Facteurs chimiques</b>		<b>Mécanisme concerné</b>
Formes de P (eau, sédiment)	P inorganique dissous	Transport et assimilation du stock de P biodisponible (dissous ou susceptible d'être relargué par les sédiments, favorisant la croissance algale)
	P inorganique particulaire	
	P organique dissous	
	P organique particulaire	
Concentration en P	Influence échanges à l'interface eau/sédiment	Diffusion (gradient de concentration) Sorptions/dissolution
Conditions redox	Conditions oxydantes favorisent sorption	Sorptions/ dissolution de P inorganique (avec Fe, Al, Ca)
Concentration en oxygène	Anoxie (peu d'oxygène) provoque forte dissolution de P	
Concentrations en nitrate	Présence de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> favorise sorption	
pH	Influence réactions d'échange	
<b>Facteurs biologiques</b>		<b>Mécanisme concerné</b>
Organismes aquatiques dans les sédiments	Déplacent les couches de sédiments	Transport et assimilation du stock de P dans les sédiments
Macrophytes submergés	Rejet d'O <sub>2</sub>	Dissolution de P inorganique
	Assimilation de P	Diminue P dissous disponible pour cyanobactéries
Biomasse	Déposition de P organique	Transport de P dans les sédiments

**Tableau 4 : Rôle des facteurs physiques, chimiques et biologiques sur la dynamique du phosphore dans un système aquatique (synthèse)**

### **3. Méthodologie pour estimer l'importance du recyclage interne**

#### **a) Resuspension**

La resuspension des sédiments peut être un facteur important. Il convient donc d'estimer la désorption du phosphore lors de la remise en suspension de particules de sédiment dans la colonne d'eau, en mesurant les isothermes de sorption du phosphore (HUPFER). Des explications complémentaires en termes de méthodologie sont disponibles dans la bibliographie (voir réf [7] [13] [14] [24] [25] [26]).

#### Expériences en compartiment sur la resuspension des sédiments (Dr. C. WIEDNER)

La resuspension des sédiments par agitation artificielle et l'impact sur le relargage de nutriments ainsi que la croissance de *Planktothrix agardhii* ont été testés à l'aide d'expériences dans des compartiments (enclosures) dans un lac par le Dr Claudia WIEDNER, lors de sa thèse à l'Université Technique du Brandebourg de Cottbus [26].

#### **Contexte**

Au cours de cette étude, la dynamique du phytoplancton a été observée dans 3 lacs de faible profondeur, dans la région du Brandebourg, en Allemagne. L'un des objectifs était d'étudier en particulier les effets de la resuspension des sédiments sur les cyanobactéries grâce à des expériences en compartiments (« enclosures »). Les espèces présentes étaient *Planktothrix agardhii* et *Limnothrix*. Les hypothèses suivantes ont été faites :

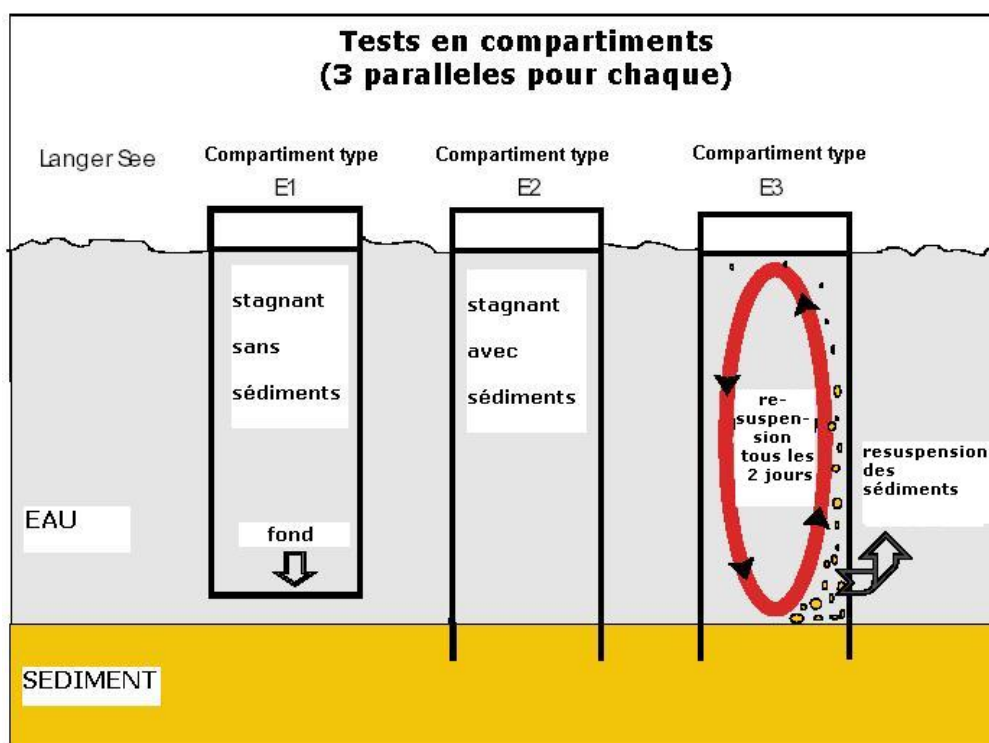
1. En cas de mélange régulier de l'eau menant à une resuspension des sédiments, une charge de nutriments plus importante est provoquée que lors d'une stagnation prolongée de la colonne d'eau, et la croissance de *Planktothrix agardhii* est favorisée par rapport à *Limnothrix*.
2. Lors d'une stagnation prolongée de la colonne d'eau, la quantité de nutriments relarguée en provenance des sédiments est plus faible qu'en cas de turbulences prononcées, et la croissance de *Limnothrix* est favorisée par rapport à *Planktothrix agardhii*.

#### **Protocole expérimental**

Les expériences sur la resuspension des sédiments ont été réalisées dans le Langer See en août-septembre 1997. Il s'agissait de comparer 4 situations (avec chacune 3 expériences en parallèle pour comparaison) :

1. **Compartiment d'eau stagnante sans sédiment** : la colonne d'eau est restée stagnante tout le temps de l'expérience. Il n'y avait aucun contact entre la colonne d'eau et les sédiments.
2. **Compartiment d'eau stagnante avec sédiment** : la colonne d'eau est restée stagnante tout le temps de l'expérience. Il y avait contact entre la colonne d'eau et les sédiments.
3. **Compartiment d'eau avec sédiment remis en suspension** : l'eau et les sédiments étaient mélangés artificiellement tous les 2 jours à l'aide d'un disque de Secchi jusqu'à homogénéisation de la colonne d'eau avec les sédiments. Ce dernier cas simulait le cas de la resuspension des sédiments.
4. **Eau du Langer See** : des échantillons étaient prélevés autour des compartiments.

La figure 14 présente ces diverses situations.



**Figure 14 : Tests de resuspension des sédiments dans le Langer See [26]**

Des échantillons étaient prélevés tous les 2 jours pour obtenir le profil vertical de la température, des concentrations et saturation en oxygène, du pH, de l'éclairement et de la chlorophylle a. Dans chaque compartiment, un échantillon composite (avec prélèvements à diverses hauteurs) était réalisé tous les 4 jours. Sur cet échantillon étaient analysés les concentrations en azote et phosphore total et azote et phosphore inorganiques dissous, la concentration en chlorophylle a, la composition du phytoplancton et son biovolume, ainsi que la concentration en microcystine. De telles expériences représentent donc un investissement considérable, en temps et en coûts d'opération.

### Résultats

La resuspension des sédiments a clairement provoqué des pics de concentration en azote et phosphore dissous et totaux. En conséquence, les quantités plus importantes observées pour *Planktothrix agardhii* suite à ces pics de nutriments montrent que la croissance de *Planktothrix agardhii* a été favorisée par le relargage de nutriments dans les compartiments avec resuspension, au détriment de *Limnothrix*. A l'inverse, les expériences en eau stagnante ont permis d'observer que le relargage de nutriments provenant des sédiments était plus faible que dans les compartiments agités, ce qui a favorisé la croissance de *Limnothrix* au lieu de *Planktothrix agardhii*. Les hypothèses formulées ont donc été validées par ces expériences.

Ces expériences ont par ailleurs permis de faire d'autres observations : le facteur limitant pour la croissance de *Planktothrix agardhii* dans la cas de cette étude s'est révélé être l'azote. Il a également été montré que le contenu de microcystine de *Planktothrix agardhii* augmente en cas de forte concentration en azote total et une faible intensité d'éclairage.

## ***b) Diffusion***

### ▪ **Détermination du flux de diffusion**

Le **flux de diffusion du phosphore** en provenance des sédiments est modélisé par l'équation suivante (1ère loi de Fick) :

$$J = D \frac{\partial [P]}{\partial z}$$

avec

- J flux de diffusion du phosphore (mgP/m<sup>2</sup>.j)  
D coefficient de diffusivité moléculaire de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (m/j)  
 $\frac{\partial [P]}{\partial z}$  gradient vertical de concentration en phosphore (mgP/m<sup>3</sup>.m)

L'équation simplifiée peut s'écrire

$$J = D \frac{[P]_{\text{sed}} - [P]_{\text{eau}}}{z}$$

- [P]<sub>sed</sub> : concentration en PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> dans l'eau interstitielle entre les particules de sédiment (mgP/m<sup>3</sup>)  
[P]<sub>eau</sub> concentration en PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> dans l'eau du lac/ de la rivière (mgP/m<sup>3</sup>)  
z hauteur de l'interface eau/sédiment à travers laquelle diffuse P (m)

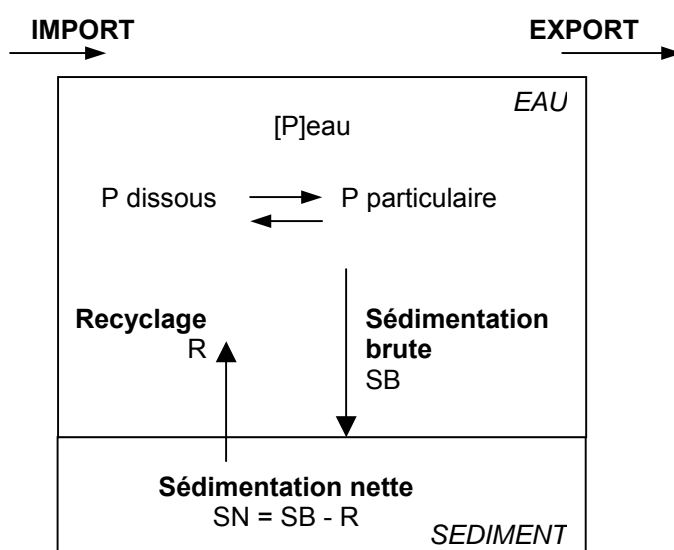
Les concentrations de phosphore dues à la diffusion ne dépendent pas que de la concentration en phosphore dans les sédiments. HUPFER [8] a montré qu'il n'y a pas de corrélation directe entre concentration dans les sédiments et concentrations dans la colonne d'eau, tout dépend des conditions du milieu. En d'autres termes, il ne suffit pas de connaître le stock de phosphore dans les sédiments, il faut également déterminer les taux de relargage.

La détermination des gradients de concentration entre sédiment et eau peut cependant se révéler imprécise du fait de la grande hétérogénéité spatiale dans un fleuve (il est également important de tenir compte de la dynamique temporelle de ces mécanismes). Il faut également considérer les autres processus de transport, qui peuvent être très importants.

## ***c) Bilan des flux de phosphore et durée d'épuisement du stock***

La quasi totalité des études connues portent sur des lacs, et non des rivières. Dans le cas de rivières, pour établir le bilan des flux de nutriments, il convient de prendre en compte non seulement les flux entrants, les flux de sédimentation et de relargage, mais également les flux sortants.

Pour connaître la durée d'épuisement du stock de phosphore, il faut prendre en compte la capacité de relargage des sédiments, à savoir la différence entre flux de diffusion et la sédimentation de la matière organique. Les processus à prendre en compte pour faire le bilan en phosphore d'un système aquatique peuvent être résumés par la figure suivante :



**Figure 15 : Bilan en phosphore d'un système aquatique (source : HUPFER [8]).**

Pour évaluer le rôle des sédiments, il est alors essentiel de mettre en relation le stock de phosphore et les flux nets de relargage. Il arrive en effet que le rôle des sédiments soit sur-évalué, si l'on compare le flux de nutriments provenant des sédiments avec la charge extérieure sans prendre en compte la sédimentation du phosphore (HUPFER, communication particulière).

#### **d) Importance du recyclage interne**

Le recyclage interne peut être une source importante de nutriments, en particulier de phosphore. Cependant, lorsque des mesures curatives sont à prendre, son rôle a souvent été mal évalué : ce phénomène n'est pas le plus important tant que la charge externe en nutriments est suffisamment forte pour maintenir des concentrations en phosphore assez élevées et donc maintenir une quantité considérable de phytoplancton (algues et cyanobactéries) dans le milieu aquatique. Des résultats d'étude [6] ont montré que des concentrations en phosphore bien en dessous de  $50 \mu\text{g/L}$  de P total sont nécessaires pour réduire de façon significative la biomasse de phytoplancton et la dominance des cyanobactéries. Des changements dans la concentration en P total dans la gamme de 100 à quelques centaines de  $\mu\text{g/L}$  ne montrent qu'un faible impact sur la biomasse de phytoplancton et les blooms de cyanobactéries, puisque dans de tels systèmes le phosphore n'est pas le facteur qui limite leur croissance. C'est en effet plutôt la lumière, lorsque la turbidité due à la forte quantité de phytoplancton a atteint son maximum.

La condition préliminaire cruciale pour contrôler les cyanobactéries est donc une réduction significative de l'apport externe en nutriments dans l'écosystème aquatique, puisque c'est la source initiale de nutriments dans le lac ou la rivière. Dans de nombreux cas, en particulier dans les milieux avec un faible temps de séjour, aucune mesure ne sera nécessaire pour combattre ce recyclage interne, puisque un débit important de grandes quantités d'eau à faibles concentrations en phosphore va capter le phosphore des sédiments et le transporter hors du système. Après plusieurs années d'un tel « rinçage » du milieu aquatique, un nouvel

équilibre eau-sédiment pour l'adsorption et la désorption du phosphore va s'établir de lui-même, avec un rejet de P venant des sédiments beaucoup plus faible, ou même des sédiments fonctionnant comme un piège pour le phosphore.

Toutes les études connues s'accordent pour dire que l'étape préliminaire indispensable est la réduction des apports externes avant l'étude et la mise en place de mesures contre le recyclage interne (voir par exemple les références [3], [15], [20], [21]).

Pour des cours d'eau, il n'existe aucun cas connu des spécialistes (HUPFER, CHORUS, communications particulières) où des mesures internes visent en priorité à réduire les apports internes de nutriments. Pour les rivières, avec un temps de séjour de l'eau plutôt court, les apports extérieurs (import et export) de nutriments sont le facteur-clé. Les fleuves s'adaptent la plupart du temps très rapidement à une charge externe réduite.

Dans certains milieux aquatiques, le recyclage interne est un problème qui peut persister longtemps, en particulier si la vitesse d'écoulement est faible, si une forte quantité de phosphore sensible aux conditions redox est liée aux sédiments, et si les conditions chimiques des sédiments favorisent le relargage.

De nombreuses techniques ont été développées pour faire face à ce recyclage interne de nutriments en provenance des sédiments, faisant appel à des méthodes physiques ou chimiques [20]. Ces techniques peuvent se révéler assez coûteuses et ne sont pas toujours efficaces [15].

Pour prévoir des interventions curatives efficaces, la condition préliminaire est d'estimer la charge externe par rapport à la charge interne. Deux conditions doivent être réunies avant d'entreprendre des mesures contre le recyclage interne :

1. La charge externe doit être suffisamment faible pour permettre aux concentrations dans le milieu aquatique de baisser jusqu'à des niveaux auxquels ils limitent la quantité de phytoplancton. Cela correspond en général à 50 µg/L de P total, ou moins. Si l'azote est limitant et est considéré comme moyen éventuel de contrôle (ce qui est rarement le cas), les niveaux à atteindre correspondants sont de 350 µg/L ou moins. Seuls les milieux aquatiques peu profonds avec une biomasse de phytoplancton très forte (comme dans la Veluvemeer aux Pays-Bas, qui a montré des concentrations en chlorophylle-a de 200 µg/L avant restauration) sont susceptibles de donner une réaction positive à de hauts niveaux de phosphore total, c.à.d. déjà en dessous de 150 µg/L.
2. Si la charge externe peut être suffisamment réduite, des analyses du recyclage interne sont justifiées pour estimer leur impact sur les concentrations totales en phosphore dans le milieu aquatique. De telles analyses ciblent principalement le phosphore lié aux sédiments, ainsi que des expériences pour évaluer les taux de rejet potentiel.

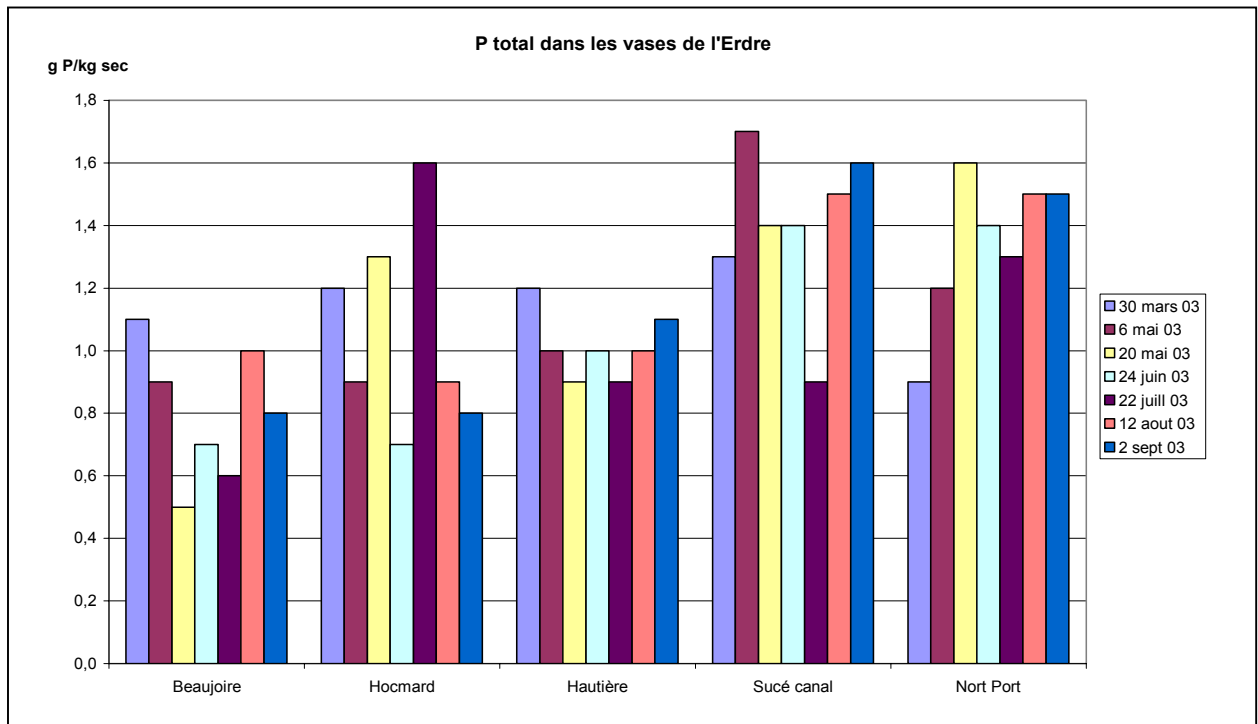
Sans de telles connaissances de bases sur les spécificités du site, des efforts pour réduire le recyclage interne ne peuvent être fructueux.



#### 4. Le cas de l'Erdre : évaluation du stock de phosphore dans les vases

##### ▪ Concentrations en phosphore

Les campagnes d'analyse réalisées par ANJOU-RECHERCHE en 2003 ont fourni les résultats suivants pour les concentrations en phosphore total dans les vases :



**Figure 16 : Concentrations en phosphore total des vases de l'Erdre en 2003**

La concentration moyenne en P total dans les vases sèches est de 1,1 gP/kg sec.

##### ▪ Calcul de l'indice trophique correspondant

Il est possible d'évaluer l'état trophique d'un plan d'eau à partir des concentrations en phosphore des sédiments. Les travaux du CEMAGREF [1] donnent la méthode de calcul suivante pour l'indice trophique d'un plan d'eau à partir de la concentration en P total dans la phase solide des sédiments :

$$I = 74,51 + 37,38 \log [C_{P_{tot}}]$$

avec  $[C_{P_{tot}}]$  exprimée en % : 1 gP/kg sec = 0,10 %

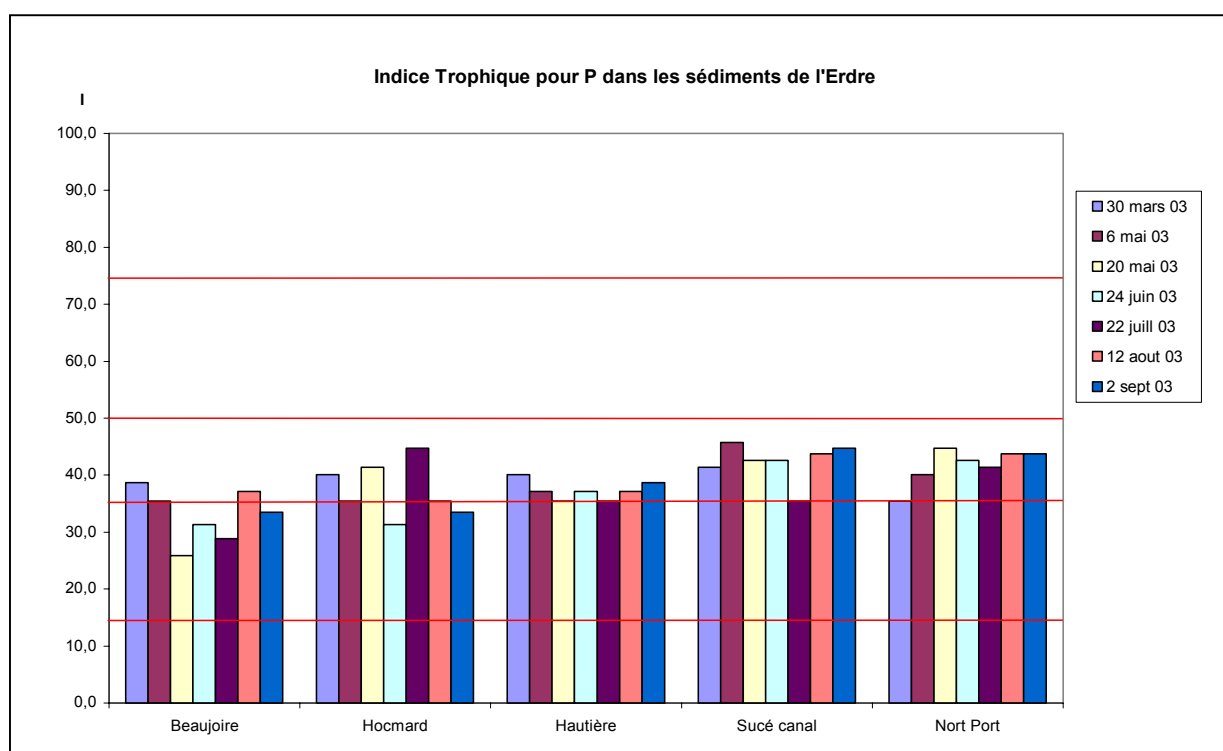
La grille d'évaluation est la suivante :

Indice I	< 15	15-35	35-50	50-75	> 75
Etat du plan d'eau	Ultra-oligotrophe	Oligotrophe	Mésotrophe	Eutrophe	Hyper-eutrophe

Dans le cas de l'Erdre, on obtient les indices suivants :

Indice	Beaujoire	Hocmard	Hautière	Sucé canal	Nort Port
30 mars 03	38,7	40,1	40,1	41,4	35,4
6 mai 03	35,4	35,4	37,1	45,7	40,1
20 mai 03	25,9	41,4	35,4	42,6	44,8
24 juin 03	31,3	31,3	37,1	42,6	42,6
22 juill 03	28,8	44,8	35,4	35,4	41,4
12 aout 03	37,1	35,4	37,1	43,7	43,7
2 sept 03	33,5	33,5	38,7	44,8	43,7
Moy	38,3				

**Tableau 5 : Indice trophique de l'Erdre (à partir de la concentration en P des vases)**



**Figure 17 : Indice trophique de l'Erdre (à partir de la concentration en P des vases)**

Pour les concentrations en phosphore total analysées dans les vases de l'Erdre, on obtient donc un état **mésotrophe**, avec un indice de valeur moyenne 38,3. Le stock en phosphore des vases n'est donc pas un facteur prépondérant de recyclage interne, et donc de croissance accrue du phytoplancton.

Il ne faut cependant pas exclure la présence possible de poches de relargage sur certains sites, par resuspension, diffusion ou bioturbation. L'importance de ce recyclage local dépend des caractéristiques du site, qui doivent être déterminées précisément pour une évaluation fiable. On peut notamment citer une étude précédente sur l'Erdre par CAVALCANTE en 1995 [3] portant sur Sucé-sur-Erdre et la plaine de Mazerolles.

Le phénomène de recyclage interne à partir des vases de l'Erdre est donc globalement beaucoup moins important que les apports externes (détaillés dans le lot 1 de l'étude). C'est donc sur ces apports exogènes que doivent porter les actions en priorité.

## **5. Actions éventuelles sur le recyclage interne**

### **1) Etape préliminaire indispensable : limiter les apports externes sur le bassin versant.**

Pour limiter la croissance du phytoplancton, la concentration en nutriments doit atteindre des niveaux très faibles. Pour le phosphore, la valeur limite recommandée pour la concentration en phosphore total dans l'eau est au maximum de **50 µg P/L**.

Les actions visant à limiter ces apports exogènes sur le bassin versant de l'Erdre sont discutées en détail dans le cadre du Lot 1 de l'étude.

### **2) Une fois les apports externes réduits : étudier en détail le recyclage interne dans l'Erdre.**

Une fois les apports externes réduits, il est possible que sur certains sites des phénomènes de recyclage interne apparaissent. Avant d'envisager des actions contre le recyclage interne, une étape indispensable est d'étudier en détail le phénomène sur site. Cette étude préliminaire nécessite des investissements en temps et en coût relativement importants, mais se révèle intéressante sur le long terme.

Les deux paramètres à déterminer pour la quantification du recyclage interne de nutriments sont : 1) le stock de nutriments dans les sédiments et 2) le potentiel de remobilisation par les divers phénomènes de relargage (diffusion, resuspension, bioturbation) dépendant fortement des conditions locales.

Les objectifs sont de déterminer en particulier avec précision :

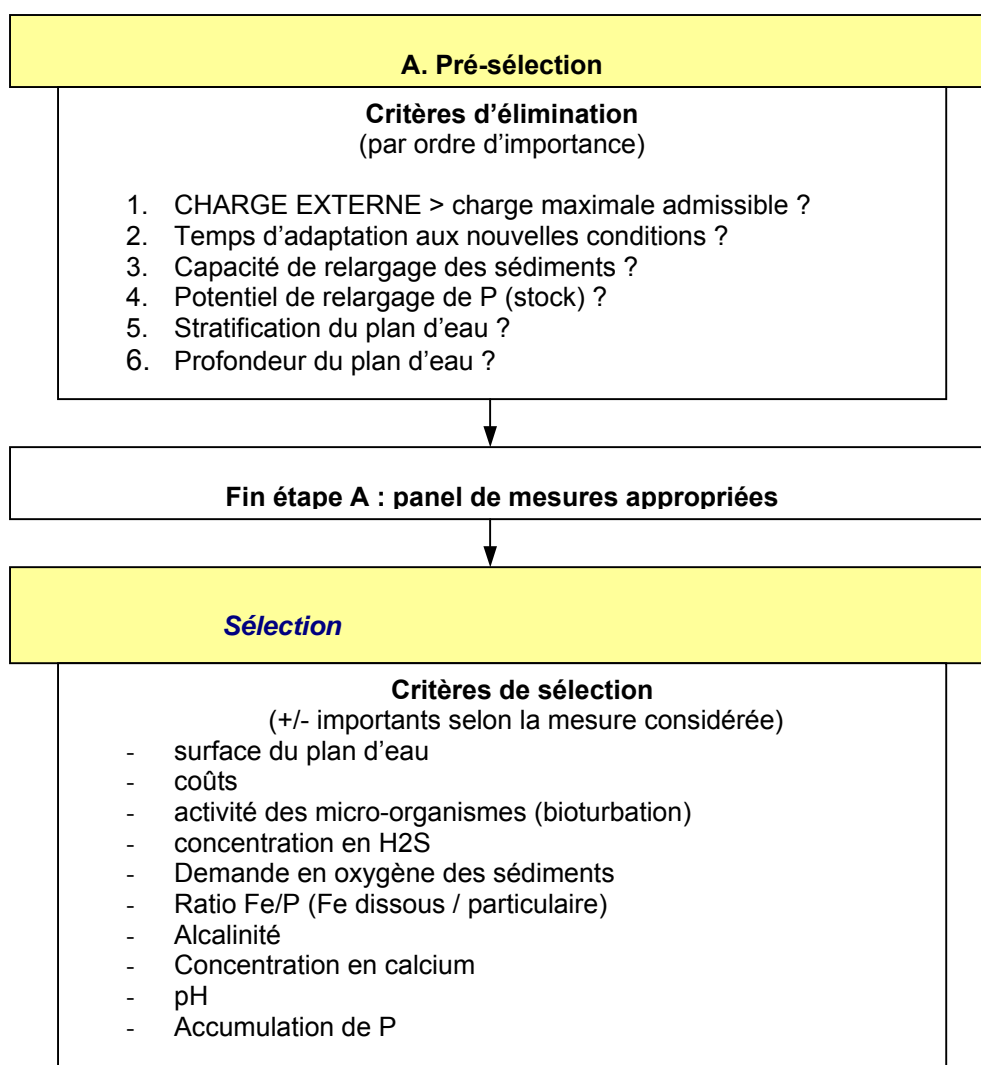
- Les gradients de concentrations dans les sédiments (diffusion)
- La spéciation des formes de phosphore pour quantifier le phosphore biodisponible
- Les isothermes de désorption sur les sédiments resuspendus

### **3) Mise en place de mesures contre le relargage**

Une fois le phénomène connu et identifié, des mesures de réduction du relargage interne peuvent être envisagées ([3], [8], [15], [18], [20]), dont nous pouvons citer les principales à titre d'information :

- précipitation avec des sels d'aluminium ou de fer
- traitement à la chaux
- dragage des sédiments
- aération artificielle
- contrôle du régime d'écoulement hydraulique

Le choix des mesures doit être adapté aux caractéristiques du site. SCHAUSER *et al* [18] ont proposé un système d'aide à la décision permettant de pré-sélectionner un panel de mesures (en excluant les mesures inadaptées), puis de choisir la mesure la plus appropriée en fonction des caractéristiques du site. Cette approche peut être résumée par le schéma suivant (Figure 18).



**Figure 18 : Sélection de mesures contre le relargage interne de phosphore (d'après [18])**

En l'absence de la réduction préliminaire des apports externes, les mesures curatives entreprises pour réduire le recyclage interne n'auront qu'un effet mitigé et à court terme. Certaines études ont même montré que la mise en place de mesures contre le recyclage interne sans action préalable sur les apports externes pouvait exacerber l'état d'eutrophisation du milieu [21]. Un exemple par rapport à la resuspension des sédiments : les sédiments resuspendus ont pour intérêt de réduire l'intensité lumineuse dans la colonne d'eau, pouvant limiter la croissance du phytoplancton. Si ces sédiments sont traités et enlevés du milieu, alors que les apports externes ne sont pas réduits, la croissance des algues bénéficiera de conditions encore plus favorables. Il est donc capital de réduire avant tout les apports externes.

### **III.2. Influence d'une remise en suspension des cyanobactéries contenues dans les sédiments**

L'impact de la resuspension des sédiments sur le relargage de cyanobactéries dans la colonne d'eau a été expérimenté surtout dans le cadre d'études sur les espèces telles que *Microcystis* et *Anabaena*. L'impact sur *Planktothrix agardhii* ne semble pas avoir fait l'objet de recherches à ce jour. Quelques indications peuvent cependant être données.

#### **Relargage de cyanobactéries**

Le mélange des sédiments avec l'eau n'a pas le même impact sur toutes les espèces de cyanobactéries, selon leurs facultés de mouvement dans la masse d'eau. Les déplacements à court terme ont été étudiés de façon intensive pour le taxon formant colonie *Microcystis aeruginosa* et dans une certaine mesure pour l'espèce *Anabaena*, filamenteuse et formant colonie. *Microcystis* a un avantage de compétition dans des milieux stratifiés, où le mouvement permet aux colonies de flotter à la surface lorsqu'elles nécessitent de la lumière pour une activité photosynthétique intense, alors qu'après avoir assimilé une quantité suffisante d'hydrates de carbone elles peuvent descendre dans des couches plus profondes où les concentrations en nutriments sont plus fortes. Ceci n'est cependant pas applicable pour toutes les espèces filamenteuses. *Planktothrix agardhii* met en oeuvre un mécanisme différent : ses vacuoles de gaz lui servent à contrecarrer la décantation, mais pas dans un scénario de mouvement au cours de la journée. Une étude néerlandaise donne une vitesse moyenne de flotation de 0,8 cm/h pour les espèces de *Planktothrix* (filamenteux), alors qu'elle était de 11,2 cm/h pour *Microcystis* (espèce formant colonie) [5]. *Planktothrix agardhii* ne forme jamais de mousse en surface, mais est distribué de façon plutôt homogène entre les couches supérieures turbulentes, et peut donc prédominer sur *Microcystis* en particulier dans des systèmes peu profonds et bien agités dans lesquels des déplacements contrôlés ne sont pas possibles.

#### Expériences en laboratoire

Des expériences envisageables en laboratoire pourraient être l'étude de la remise en resuspension de cyanobactéries. Cela consisterait à laisser sédimenter des vases de l'Erdre contenant *Planktothrix*, pendant plusieurs mois et à basse température, avant de procéder à une resuspension et évaluer les quantités de *Planktothrix* ainsi relarguées. Toutefois, ce type d'expérience n'est réalisable qu'en période hivernale, car les caractéristiques de sédimentation en période estivale ne s'y prêtent pas (les vases décantent plus en hiver). Ces expériences n'ont donc pas pu être réalisées dans le cadre du projet sur les cyanobactéries dans l'Erdre.

#### **Survie des cyanobactéries dans les sédiments lors de la période hivernale**

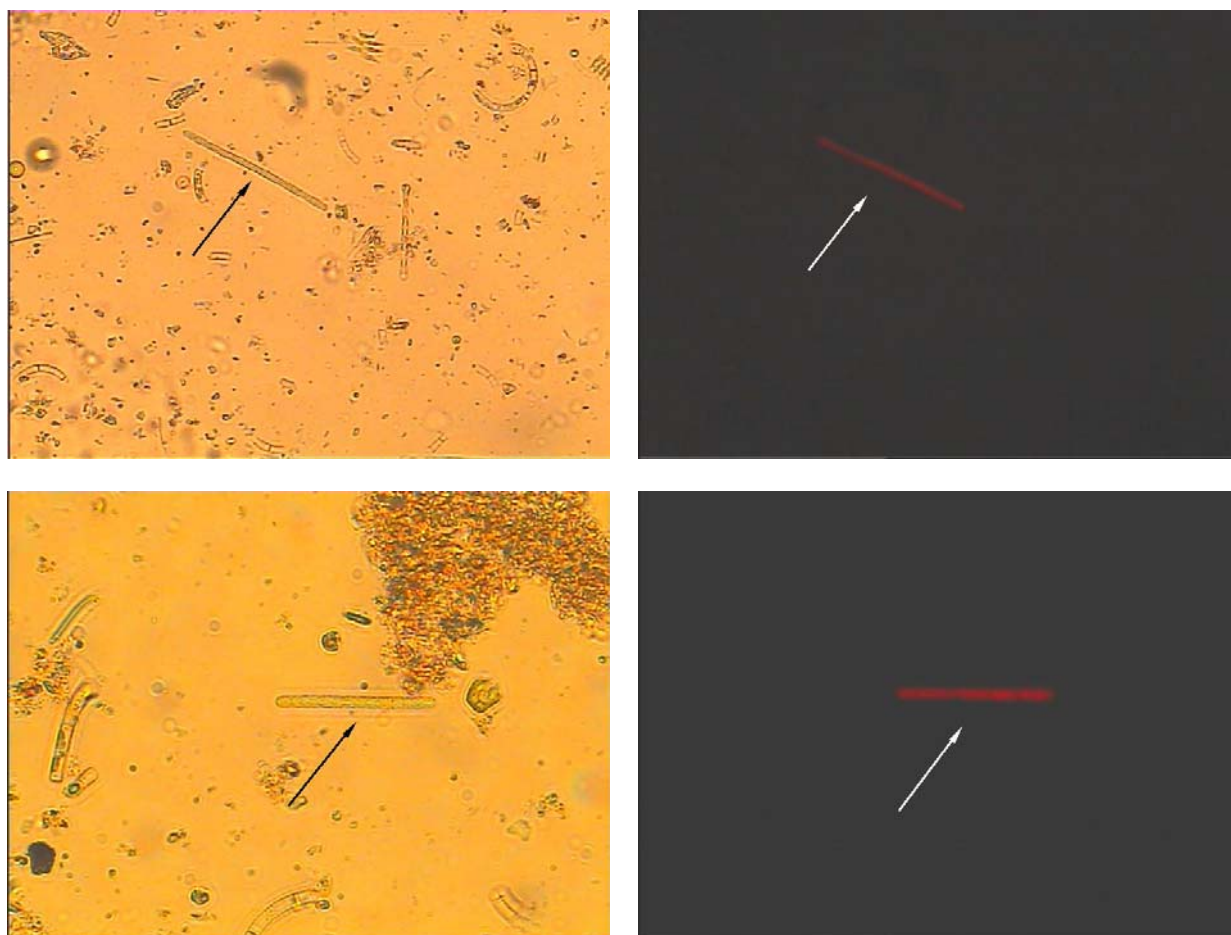
Le recrutement des cyanobactéries au printemps, après avoir survécu tout l'hiver dans les sédiments, est reconnu pour les espèces de cyanobactéries telles que *Microcystis*, qui forment colonie [20], [28]. Cependant, dans les travaux précédant cette étude, il n'existe pas de données sur le comportement de *Planktothrix* et leur capacité de survie dans les sédiments pendant l'hiver ainsi que leur recrutement l'été suivant. Une grande quantité des filaments à la surface des sédiments impliquerait également la contamination des sédiments par les microcystines, à moins que les cellules ne meurent et ne lysent rapidement et que la microcystine rejetée soit biodégradée rapidement par des microorganismes.

### Analyse de la présence de cyanobactéries dans les sédiments de l'Erdre en hiver

Des échantillons de sédiments ont été prélevés sur les sites de La Jonelière (rive gauche) et Port Breton le 13.01.04. Au laboratoire, des sous-échantillons ont été remis en suspension avec soin dans de l'eau distillée et centrifugés brièvement pour assurer la sédimentation des particules minérales. Le surnageant a été centrifugé à nouveau pour concentrer le phytoplancton présent. Les échantillons purifiés d'algues ont été observés avec un microscope inverse (ZEISS, Axiovert 100) qui est équipé de caméras digitales et d'une unité de fluorescence (HBO 50) pour détection de l'autofluorescence du phytoplancton.

Grâce au fait que seules les cellules vivantes avec un appareil photosynthétique intact montrent une autofluorescence de leur chlorophylle, cette méthode permet de faire la distinction entre cellules vivantes et mortes.

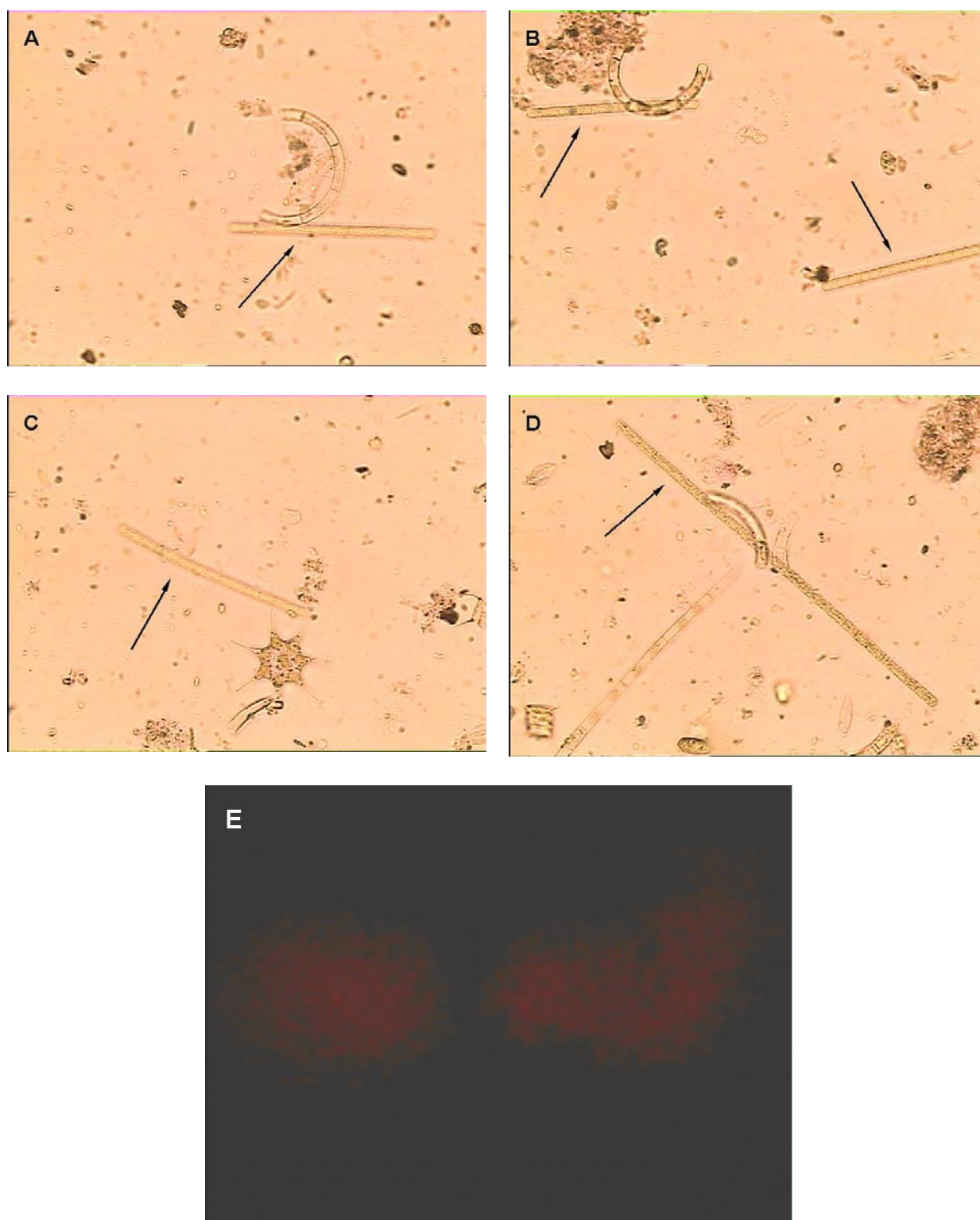
Dans les sédiments de la Jonelière, une grande quantité de filaments de *Planktothrix* intacts a été trouvée. Des exemples en sont donnés dans la figure 19.



**Figure 19 : Filaments de *Planktothrix* observés dans des sédiments de l'Erdre en janvier 2004.** Images microscopiques (x 400) en mode inversé (à gauche) et autofluorescence des mêmes filaments (à droite).

De plus, des colonies de *Microcystis* ont pu être détectées. Les capacités de survie de cette espèce dans les sédiments pendant la période hivernale ont été décrites par d'autres auteurs [2].





**Figure 20 : Autres exemples d'échantillons de sédiments contenant des cyanobactéries en hiver : *Planktothrix* (A-D) et *Microcystis* (E).**

Dans l'ensemble il est devenu évident que *Planktothrix* survit lors de la période hivernale dans les sédiments de l'Erdre. Un nombre considérable de filaments intacts a été détecté dans un sous-échantillon de volume très réduit ( $< 1 \text{ cm}^3$ ). Un inoculum avec cette concentration de cellules devrait être largement suffisant pour initier le développement de *Planktothrix* lors de la prochaine période de croissance algale.

## **IV. Impact éventuel des pesticides et produits phytosanitaires sur les cyanobactéries**

Afin de prendre en compte un éventuel impact des pesticides ou produits phytosanitaires sur le développement des cyanobactéries, une brève étude bibliographique a amené aux constatations suivantes.

### ***Les pesticides***

Les produits phytosanitaires ou pesticides sont des substances chimiques utilisées pour protéger les cultures, assainir les locaux et le matériel pour l'élevage des animaux et agir sur la croissance des végétaux et le sol. On distingue notamment les herbicides, les fongicides et les insecticides, selon les espèces nuisibles à contrôler. Les herbicides les plus courants, notamment dans les régions de pratique agricole comme la Bretagne, sont l'atrazine, la simazine, le lindane ou encore l'isoproturon.

### ***Evaluation de l'impact des pesticides sur les milieux aquatiques***

Evaluer la présence et l'impact des pesticides pose divers problèmes méthodologiques. Il existe en effet une grande variété de produits (450 à 500 molécules différentes). Par ailleurs, la pollution est le plus souvent diffuse et chronique (issue des traitements agricoles et urbains), donc difficile à identifier et quantifier. L'analyse des pesticides fait appel à des méthodes spécifiques et très coûteuses. De plus, d'autres substances (autres contaminants chimiques, matière organique et minérale...) interviennent en même temps dans le milieu.

La mise en évidence des effets liés uniquement aux produits phytosanitaires pour une zone précise est donc très complexe.

### ***Impact sur la flore aquatique et conséquences sur les cyanobactéries***

Relativement peu d'études existent sur les éventuels effets d'altération sur le phytoplancton. L'impact sur la flore aquatique peut être ambivalent [MONOD]. Les pesticides peuvent d'une part provoquer la disparition des prédateurs, comme le montre une étude concernant l'action du lindane sur les consommateurs de phytoplancton (insectes, gammarés...) [MITCHELL]. La prolifération du phytoplancton est alors favorisée indirectement.

Cependant, la présence de produits phytosanitaires peut affecter directement le phytoplancton et les macrophytes, comme cela a été montré pour l'atrazine par exemple [LAMPERT]. Les espèces moins sensibles habituellement en compétition avec ces organismes peuvent alors bénéficier de conditions favorables à leur croissance, comme ce pourrait être le cas pour les cyanobactéries. Cependant, la présence de pesticides en fortes concentrations peut avoir un effet algicide, y compris sur les cyanobactéries : tout dépend des concentrations de ces produits dans le milieu. Des chercheurs ont même montré que certaines espèces de cyanobactéries se développent mieux en présence d'une faible concentration en herbicide, notamment le lindane et son effet sur l'espèce *Anabaena* [BUENO][KURITZ].

Peu d'études sont recensées sur les seuils d'impact des produits phytosanitaires sur les cyanobactéries. On peut néanmoins citer la banque de données de l'EPA (Environmental Protection Agency, Agence de Protection de l'Environnement, US) qui regroupe les données existantes sur l'action de diverses substances chimiques sur les cyanobactéries [ECOTOX].



Enfin, même si l'action des pesticides peut éventuellement contribuer à réduire la population de cyanobactéries, il existe un risque de lyse des cellules mortes et de libération des toxines. Ce problème survient lors de tout traitement chimique des cyanobactéries, comme l'utilisation de sulfate de cuivre qui fait partie des techniques courantes pour réduire la biomasse à court terme en l'attente de solutions durables.

### **Conclusion**

Du fait de la diversité des produits phytosanitaires, de la complexité et du coût de leurs mesures, l'impact de ces substances chimiques sur la flore aquatique et en particulier les cyanobactéries est difficile à évaluer. L'effet éventuel (inhibition ou stimulation) des pesticides sur le développement des cyanobactéries est encore mal connu dans le contexte scientifique actuel. Il n'était donc pas pertinent d'aborder en détail cette problématique complexe dans le cadre de cette étude sur l'Erdre.

*Lot 3*

---

*Etude des toxines  
émanant des cyanobactéries*

**Etude sur les cyanobactéries dans l'Erdre**  
Travaux de recherche en laboratoire – LOT 3

Rapport final KWB / UBA, Janvier 2004

## I. Facteurs limitant la libération de toxines par les cyanobactéries dans l'Erdre

### I.1. Isolation et caractérisation des toxines des souches de *Planktothrix agardhii* de l'Erdre

#### I.1.1. Protocole expérimental

##### Isolation de souches de *Planktothrix agardhii* à partir de la population de l'Erdre

Sept souches de *Planktothrix agardhii* (PaE 01- PaE 07) ont été isolées à partir de l'échantillon prélevé dans l'Erdre le 17 avril 2003. Cet échantillon a été incubé dans un milieu non dilué (1 :1) à 20°C et 20  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Après deux semaines, des trichomes simples de *Planktothrix agardhii* ont été sélectionnés à l'aide d'une pipette Pasteur à partir de cette eau de l'Erdre pré-traitée, rincés plusieurs fois avec un milieu stérile et transférés en tubes de cultures pré-stockés avec 0,5 mL de milieu de culture. La culture a été poursuivie en répétant ce protocole jusqu'à l'obtention de cultures contenant des souches pures. A partir de 50 trichomes, il a pu être isolé 7 souches.

Toutes les souches de *Planktothrix agardhii* (y compris la souche E01 fournie par Luc Brient) ont été ensuite cultivées en cultures batch de 250 mL pour obtenir une quantité suffisante de cellules pour analyse des microcystines et analyse MALDI-TOF.

L'analyse HPLC n'a détecté aucune microcystine dans ces sept souches. Au cours de l'été 2003 il est devenu évident que la cause de ceci est probablement un glissement dans la composition de la population de *Planktothrix* de l'Erdre vers des génotypes qui ne produisent pas de microcystine, puisque les échantillons prélevés de mai à septembre 2003 contenaient *Planktothrix*, mais pas de microcystine.

Trois des souches se sont développées avec une distribution homogène en cultures en suspension, quatre souches ont eu tendance à former de plus gros agrégats (fluffs) et n'ont donc pas pu convenir à des expériences de croissance. Les souches PaE 02, PaE 05 et PaE 06, ayant poussé en filaments individualisés, elles ont été utilisées pour des expériences en culture batch, afin de tester l'influence du manque en azote ou phosphore sur les taux de croissance et la concentration en métabolites peptidiques supplémentaires. De plus, la souche E01, fournie par Luc Brient, également incluse dans le test, ne contenait pas non plus de microcystine (seul un pic très faible a été détecté par HPLC - initialement suspecté de représenter une microcystine, il n'a pas été confirmé en tant que tel par les expériences approfondies.)

#### Profils MALDI-TOF

La spectrométrie de masse par MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight) donne la masse moléculaire des peptides contenus dans les échantillons et permet d'obtenir des indications sur les variantes de microcystine présentes.

Méthode : Quelques milligrammes de cellules des souches lyophilisées de *Planktothrix agardhii* ont été extraites avec 20  $\mu\text{L}$  d'un mélange acetonitrile/éthanol/eau (1 :1 :1) avec 0,03% d'acide trifluoroacétique. 1  $\mu\text{L}$  de l'extrait a été préparé directement sur une plaque d'acier sans étain et 1  $\mu\text{L}$  de matrice a été ajouté immédiatement (composée de 10 mg/mL d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque dans un mélange eau/acétonitrile (1 :1) avec 0,03% d'acide trifluoroacétique).

Le spectre de masse des ions positifs a été enregistré pour chaque souche à l'aide d'un spectromètre de masse MALDI-TOF (Voyager DE-PRO, PerSeptive BioSystems, Framingham, MA) équipé d'un réflectron comme cela a été décrit dans des publications (Erhard *et al.* 1997, Fastner *et al.* 1999). Pour la désorption des composés, un rayon laser à azote ( $\lambda=337$  nm) a été envoyé sur la plaque. Le courant d'accélération a été fixé à 20 kV. Toutes les mesures ont été faites en mode d'extraction retardée, permettant de déterminer les valeurs des masses monoisotopiques ( $m/z$  : ratio masse/charge). Des produits de dégradation de la chlorophylle a, la phaeophytine a et phaeophorbide a, avec des ratio de masses  $m/z$  de 871,57 et 593,27 Da, ont été utilisés pour calibration interne. Une masse minimum de 500 Da a amélioré la mesure en sélectionnant les ions les plus importants.

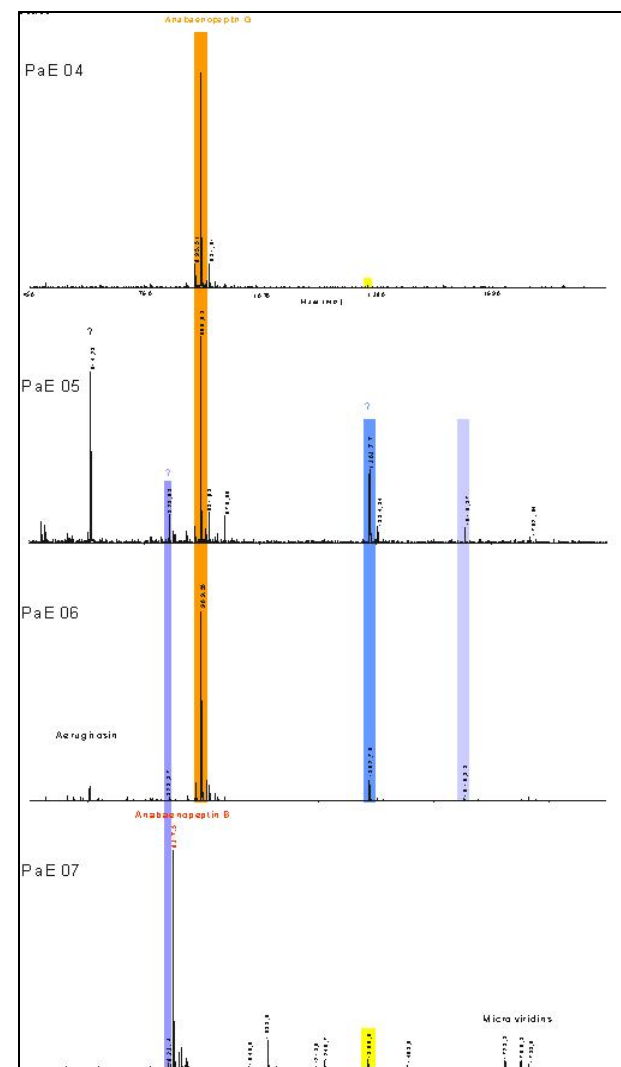
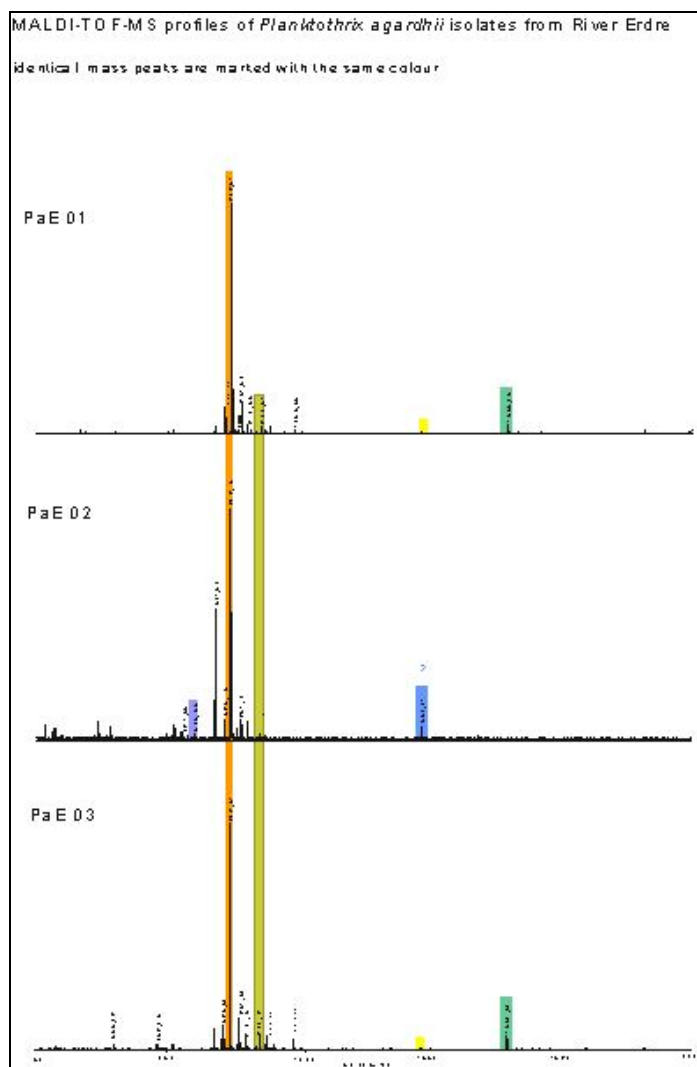
Après détermination des masses monoisotopiques, des mesures de « Post Source Decay » (PSD), permettant de détecter les fragments d'ions, ont été effectués directement à partir de la même colonie sur la plaque. Les ions précurseurs ont été sélectionnés avec un sélecteur temporel d'ions ayant une gamme de masse de 10 unités de masse. Les courants utilisés dans le réflectron ont été réduits progressivement pour enregistrer 12 séquences de segments spectraux.

### ***1.1.2. Résultats : profils MALDI-TOF des métabolites pour les souches isolées***

Le spectre MALDI-TOF-MS des souches PaE 01- 07 ont donné des profils de métabolites similaires pour les souches PaE 01- 06, qui sont montrés dans la figure 21. Pour ces souches, l'anabaenopeptine G ( $m/z=909,5$ ) est le pic le plus important.

D'autres métabolites ont également pu être détectés, mais pas pour toutes les souches. Les profils sont très proches entre les souches PaE 02, 05 et 06 (qui sont par ailleurs les souches n'ayant pas formé d'aggrégats), de même qu'entre PaE 01 et PaE 03. Il doit cependant être mentionné que l'anabaenopeptine G pourrait masquer d'autres métabolites. C'est pourquoi, on ne peut pas exclure que PaE 01-06 produisent les mêmes composés.

A l'opposé, la souche PaE 07 diffère distinctement des autres souches isolées. La souche est caractérisée par un profil de peptides incluant diverses microviridines et anabaenopeptines B ( $m/z=837,5$ ) en tant que métabolite principal.



**Figure 21a:**  
**Profils MALDI-TOF des 7 souches de *Planktothrix agardhii* isolées de l'Erdre**  
 (les pics de masse identiques ont la même couleur)

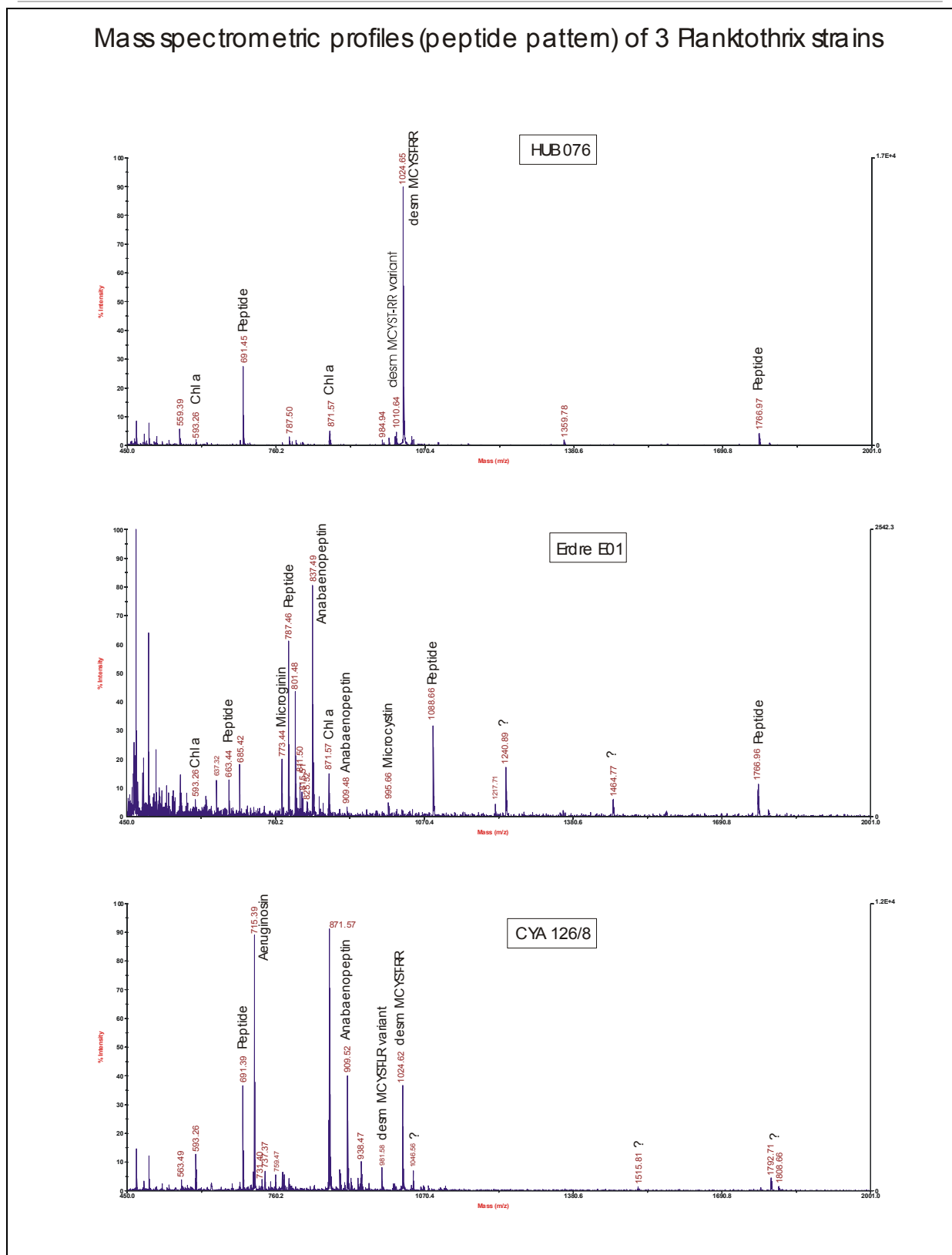


Figure 21b :

Profils MALDI-TOF de la souche de *Planktothrix agardhii* E01 isolée de l'Erdre par Luc Brient, et de 2 souches de culture de collection – HUB 076 isolée dans la région de Berlin et CYA 126/8 fournie par NIVA, Oslo

## **I.2. Impact du phosphore et de l'azote sur le contenu en microcystine cellulaire**

### **I.2.1. Objectifs**

L'impact des nutriments et de la lumière sur la croissance de cyanobactéries telles que *Microcystis aeruginosa* et *Planktothrix agardhii*, ainsi que la production et le relargage de microcystine par ces espèces, a déjà fait l'objet d'études au niveau mondial. A partir des résultats publiés et de leurs propres travaux, les spécialistes de l'UBA ont formulé l'hypothèse de travail suivante :

- Le ratio production de microcystine / croissance cellulaire, et donc le contenu cellulaire de microcystine dans *Planktothrix agardhii*, ne varie probablement pas d'un facteur supérieur à 2-3 en cas de limitation par N et P.
- La concentration en microcystine extracellulaire n'excède probablement pas 5% de la concentration totale en microcystine (intracellulaire + extracellulaire) sous des conditions variables de concentrations de N et P, lors d'expériences de culture de *Planktothrix agardhii*.

L'objectif était de vérifier la validité de ces hypothèses. Le plan de travail a été le suivant :

- Une étude bibliographique détaillée en premier lieu
- Puis des expériences ont été menées à l'UBA pour confirmer les hypothèses :
  - Expériences en cultures continues
  - Expériences batch

### **I.2.2. Contexte scientifique et synthèse bibliographique**

De nombreuses études sont disponibles concernant l'effet des nutriments sur la production de microcystines. Cependant, la majorité d'entre elles font appel à des approches expérimentales inadaptées, ne donnant que peu d'indications sur les liens de cause à effet.

L'un des problèmes est la diversité des unités de référence utilisées pour les concentrations en microcystine. De nombreux auteurs expriment les résultats en microcystine par unité de poids sec [ $\text{mg g}^{-1}$ ]. Cependant, le poids sec moléculaire est un paramètre de référence variable, car il est hautement influencé par divers hydrates de carbone et/ou composés nutritionnels de réserve sous différentes conditions environnementales. Ainsi, LONG (2001a) a montré les changements de poids sec d'un facteur 2,4 sous divers apports en azote. UTKILEN & GJØLME (1992, 1995), BICKEL (2000) et OH (2000) ont utilisé les protéines comme base de référence pour le contenu en microcystine. Il est toutefois difficile de relier des composés peptidiques (microcystines) à des structures similaires (protéines) dont la biosynthèse dépend des mêmes éléments de base (acides aminés). La quantification des contenus en toxines par unité de volume de culture (LEHTIMÄKI 1994) n'est pas non plus adaptée pour des études comparatives, en l'absence de données sur la densité de la cellule ou la biomasse cellulaire, c'est à dire si le volume biologique n'est pas connu.

Un autre facteur source de confusion dans les résultats disponibles vient du fait que la plupart des études précédentes ont été réalisées dans des cultures batch (et non en culture continue). Dans ce cas, plusieurs facteurs sont modifiés en même temps, ce qui pose problème : quand la culture devient plus dense, la concentration en nutriments dissous diminue, mais l'éclairement moyen disponible par cellule également. Seules les données

obtenues lors des phases de croissance exponentielles et stationnaires dans les cultures batch peuvent être caractérisées par un état de croissance défini (ORR & JONES 1998, LONG 2001) : la phase exponentielle représente la phase de croissance illimitée (ou uniquement limitée par l'éclairement, si l'expérience est faite sous faible éclairage), et la phase stationnaire correspond à une très forte limitation. Si une augmentation de l'éclairage ne provoque pas de reprise de la croissance, on peut supposer que les cultures sont alors limitées en nutriments. Toutefois, de tels contrôles de qualité ne sont habituellement pas réalisés. C'est pourquoi on ne peut conclure clairement si les nutriments sont le facteur limitant, ou si les cultures avaient déjà été limitées auparavant par l'éclairement.

A l'opposé, les méthodes de culture continues (turbidostat, chemostat) ou semi-continues ont permis de définir clairement des phase d'état stationnaire pouvant être reliés à un taux de croissance. Ceci a été appliqué de façon appropriée par OH et al. 2000, HESSE and KOHL 2001, LONG et al. 2001.

La synthèse de tous les résultats disponibles dans la bibliographie (y compris ceux dont l'approche expérimentale est discutable) montre que la quantité de microcystine varie d'un facteur 2 à 3 sous l'influence des nutriments. Dans la plupart des cas, un apport plus important d'azote a entraîné de plus fortes quantités de microcystines, pour le phosphore aucune conclusion particulière ne s'est détachée.

Cependant, à l'exception de SIVONEN 1990, aucun résultat d'expériences n'a été publié sur l'effet de la limitation en nutriments sur l'espèce *Planktothrix*. Toutefois, les expériences réalisées dans le cas cité ont été faites de façon inappropriée avec de fortes concentrations en nutriments et avec des cultures batch dont l'utilisation a été critiquée plus haut. Bien qu'on puisse supposer que les mécanismes de régulation sont similaires, ceci reste à prouver. Ainsi, à partir des connaissances disponibles, nous pouvons établir l'hypothèse de travail selon laquelle la quantité de nutriments n'affecte pas la concentration en microcystine issue de la population de *Planktothrix agardhii* dans la rivière Erdre d'un facteur supérieur à 2 ou 3. Ceci reste à vérifier par les expériences réalisées dans le cadre de ce projet.



## Tableau 6 : Influence de la concentration en azote sur la teneur en microcystine

Remarque : Dans les tableaux 6 et 7, pour les cultures en chemostat (OH 2000, HESSE 2001, LONG 2001), la gamme de concentrations en nutriments appliquée n'est pas donnée, car la limitation est provoquée par des taux de croissance prédéterminés.

Gamme (N)	Méthode	Unité de biomasse à laquelle la MCYST a été rapportée	Cyanobactérie	Degré d'impact sur MCYST	Commentaires	Référence
0.1-2 mM	Cultures batch	toxicité LD50	<i>Microcystis aeruginosa</i> M228	Toxicité augmente avec N	Pas de corrélation entre apport en N et LD50	Watanabe & Oishi 1985
0, 0.9 mM	Cultures batch	toxicité LD50	<i>Microcystis aeruginosa</i> 7813	Baisse considérable de la toxicité si réduction de N		Codd & Poon 1988
0.3-6 mM	Cultures batch	MCYST par poids sec [ $\mu\text{g mg}^{-1}$ ]	<i>Planktothrix agardhii</i> 97, CYA 128	Au + fort N : 97: 2.2 fois + de MCYST 128: 2 fois + de MCYST	Corrélation positive entre conc. en N, croissance et MCYST	Sivonen 1990
0.35-5.8 mM	Cultures continues	MCYST: par poids sec [ $\mu\text{g mg}^{-1}$ ] par protéine [ $\mu\text{g mg}^{-1}$ ]	<i>Microcystis aeruginosa</i> CYA 228/1	3 fois + de MCYST par poids sec à haute concentration en N.	Corrélation positive entre conc. en N et MCYST Pas de changement de MCYST par protéine.	Utkilen & Gjølme 1995
0-3.6 mM	Cultures batch	MCYST par poids sec [ $\text{mg g}^{-1}$ ]	<i>Anabaena</i> 90, 202A1	90: pas d'effet de N sur MCYST 202A1: env.. 50% moins de MCYST au + fort N	Comparaison de cultures en phase exponentielle de croissance.	Rapala et al. 1997
0.2, 2 mM	Cultures batch	MCYST par poids sec [ $\mu\text{g mg}^{-1}$ ]	<i>Microcystis viridis</i>	env. 27% moins de MCYST à concentration réd. de N.		Song et al. 1998
11.8 $\mu\text{M}$ - 1.18mM	Cultures batch	MCYST: quota par cellule [ $\text{fmol cell}^{-1}$ ]	<i>Microcystis aeruginosa</i> MASH-01	3 fois + de MCYST sous conditions illimitées (phase log)	Effet significatif de N sur quota cellulaire de MCYST (corrélation positive) Culture MCYST [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ] augmente avec apport en N + fort	Orr & Jones 1998

Gamme (N)	Méthode	Unité de biomasse à laquelle la MCYST a été rapportée	Cyanobactérie	Degré d'impact sur MCYST	Commentaires	Référence
6,5-650 $\mu\text{M}$	Cultures batch	MCYST par poids sec [ $\mu\text{g mg}^{-1}$ ]	<i>Microcystis aeruginosa</i> UTEX 2388	env. 30% + de MCYST à conc. moy. de N. (104 $\mu\text{M}$ )	Pas de différences de croissance entre cultures jusqu'à échantillonnage (récolte)	Lee et al. 2000
	Chemostat limité en N	MCYST: quota cellulaire [ $\text{fmol cell}^{-1}$ ] par poids sec [ $\mu\text{g mg}^{-1}$ ]	<i>Microcystis aeruginosa</i> MASH-01A19	À saturation en N ( $\mu_{\text{max}}$ ): Quota cellulaire facteur 2.58 MCYST/poids sec facteur 5.48	réduction de croissance jusqu'à 0.1 $\mu_{\text{max}}$	Long et al. 2001a
	chemostat semi-continu	MCYST par biovolume [ $\mu\text{g mm}^{-3}$ ]	<i>Microcystis aeruginosa</i> HUB 5-2-4 W368 W334	Sous limitation de N : 24% moins de MCYST 20% plus de MCYST 49% moins de MCYST	réduction de croissance jusqu'à 0,40 $\mu_{\text{max}}$ donne 47% - de N intracell 0,30 $\mu_{\text{max}}$ donne 29% - de N intracell 0,45 $\mu_{\text{max}}$ donne 32% - de N intracell	Hesse & Kohl 2001

**Tableau 7: Influence de la concentration en phosphore sur la quantité de microcystine**

Gamme (P)	Méthode	Unité de biomasse à laquelle la MCYST a été rapportée	Cyanobactérie	Degré d'impact sur MCYST	Commentaires	Référence
23-460 $\mu\text{M}$	Cultures batch	toxicité LD50	<i>Microcystis aeruginosa</i> M228	Toxicité légèrement + haute à fort P.		Watanabe & Oishi 1985
0, 225 $\mu\text{M}$	Cultures batch	toxicité LD50	<i>Microcystis aeruginosa</i> 7813	Toxicité + forte dans cultures sans P.		Codd & Poon 1988
3-177 $\mu\text{M}$	Cultures batch	MCYST par poids sec [ $\mu\text{g mg}^{-1}$ ]	<i>Planktothrix agardhii</i> 97, CYA 128	2 fois + de MCYST à conc. moy. de P-conc.: 48 $\mu\text{M}$ (97), 13 $\mu\text{M}$ (CYA 128)	Pas de corrélation entre P et MCYST	Sivonen 1990
0.71-71 $\mu\text{M}$	Cultures batch	MCYST par poids sec [ $\mu\text{g mg}^{-1}$ ]	<i>Microcystis aeruginosa</i> UTEX 2388	MCYST +importante (env. 15% +) à faible conc. en P. – pas de tendance.	Pas de différences de croissance entre cultures jusqu'à échantillonnage (récolte)	Lee et al. 2000

Gamme (P)	Méthode	Unité de biomasse à laquelle la MCYST a été rapportée	Cyanobactérie	Degré d'impact sur MCYST	Commentaires	Référence
3.2-10 µM	Cultures batch	Nodularine par volume de culture [µg ml <sup>-1</sup> ]	<i>Nodularia spumigena</i> BY1, HEM	BY1 23%, HEM 35% + de nodularine à P moy (6.3 µM)	Nodularine totale la + faible à P + le faible	Lehtimäki et al. 1994
14.4, 144 µM	Cultures continues	MCYST: par poids sec [µg mg <sup>-1</sup> ] par protéine [µg mg <sup>-1</sup> ]	<i>Microcystis aeruginosa</i> CYA 228/1	2.3 fois + de MCYST à haute conc. en P.		Utkilen & Gjølme 1995
1.6-177 µM	Cultures batch	MCYST par poids sec [mg g <sup>-1</sup> ]	<i>Anabaena</i> 90, 202A1	90, 202A1: 2.3 fois + de MCYST à fort P	Corrélation entre conc de P, croissance et MCYST	Rapala et al. 1997
46, 460 µM	Cultures batch	MCYST par poids sec [µg mg <sup>-1</sup> ]	<i>Microcystis viridis</i>	1.6 fois + de MCYST dans milieu déficient en P.	Croissance + fortes des cultures dans milieu réduit en P	Song et al. 1998
	Chemostat Limité en P	MCYST: par poids sec [µg mg <sup>-1</sup> ] par protéine [mg g <sup>-1</sup> ]	<i>Microcystis aeruginosa</i> UTEX 2388	2 fois + de MCYST à faible taux de croissance.	P intracellulaire : 0.85 mg g <sup>-1</sup> par poids sec à µ=0.1 d <sup>-1</sup> 2,57 mg g <sup>-1</sup> par poids sec à µ=0.8 d <sup>-1</sup>	Oh et al. 2000
5-150 µM	chemostat	MCYST: par poids sec [µg mg <sup>-1</sup> ] par protéine [mg g <sup>-1</sup> ]	<i>Microcystis aeruginosa</i> CYA 228/1	2.4 fois + de MCYST par poids sec (6 fois + de MCYST par protéine) à fort P + faible MCYST à 15 µM	corrélation entre charge d'énergie et MCYST à toutes concentrations en P.	Bickel et al. 2000
0-2 mM	Cultures batch	MCYST: par poids sec [µg mg <sup>-1</sup> ] quota cellulaire [fmol cell <sup>-1</sup> ]	<i>Microcystis aeruginosa</i> MASH-01A19	env. 30% moins de MCYST par poids sec à haute conc. en P. (MCYST maxi à 0.2 mM)	Détermination de teneur en MCYST lors phase de croissance exponentielle.	Long et al. 2001b
	chemostat semi-continu	MCYST par biovolume [µg mm <sup>-3</sup> ]	<i>Microcystis aeruginosa</i> HUB 5-2-4 W368 W334	Sous limitation en P: 21% moins de MCYST 2-fold plus de MCYST 14% moins de MCYST	Réduction de croissance de 0,61 µ <sub>max</sub> donne 83% - de P intracell 0,35 µ <sub>max</sub> donne 65% - de P intracell 0,45 µ <sub>max</sub> donne 51% - de P intracell. P	Hesse & Kohl 2001

### ***1.2.3. Expériences en cultures batch***

Les cultures continues ayant dans un premier temps rencontré des problèmes d'aggrégats (voir paragraphe suivant), des cultures batch ont pu croître avec plus de succès. Elles ont été utilisées avec la phase de croissance exponentielle comme référence de croissance illimitée et la phase stationnaire en tant que situation de forte limitation en azote et phosphore.

#### ***Protocole expérimental***

Les cultures batch ont été réalisées avec la souche *Planktothrix agardhii* HUB 076. Pour chaque nutriment, trois cultures ont été menées en parallèle, avec N ou P respectivement manquants. Deux échantillons ont été prélevés sur chaque culture durant la phase exponentielle ainsi que pendant la phase stationnaire. Durant la phase de croissance exponentielle, les cellules ont un taux de croissance maximal et l'apport de nutriments est illimité. Dans la phase stationnaire, la croissance est limitée par N ou P, selon le support utilisé. Pendant cette phase le contenu intracellulaire en nutriments a diminué de 44% par rapport à la valeur maximale mesurée pendant la croissance exponentielle.

Le contenu en microcystine intracellulaire a été analysé par HPLC, les concentrations extracellulaires par ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay).

La quantité de microcystine a été reliée à la DO (densité optique des cultures à 700 nm). Les variances assez fortes dans les résultats présentés peuvent être attribuées aux imprécisions dans la détermination de la DO des cultures contenant des aggrégats de filaments.

#### ***Résultats***

La réduction de N ou P n'a pas eu d'impact sur la quantité de microcystines pendant la phase de croissance exponentielle (Tableau 8). En cas de limitation des nutriments pendant la phase stationnaire, la quantité de microcystines intracellulaires est distinctement plus faible, d'un facteur 2 environ, à la fois dans les cultures limitées en azote et en phosphore.

Un détail intéressant est que le contenu en microcystine extracellulaire reste identique pendant la croissance de cultures limitées en phosphore (comparaison des résultats des phases exponentielle et stationnaire dans le tableau 8), alors que dans les cultures limitées en azote on observe une forte diminution de la quantité de microcystine extracellulaire entre la phase de croissance exponentielle et la phase stationnaire. Ceci suggère que les cellules évitent la « perte » de peptides en cas de déficience en azote. Cependant, étant donné la faible proportion de microcystine extracellulaire par rapport à la quantité totale, ceci n'a pas d'impact important sur le bilan total.

**Tableau 8 : Résultats des cultures batch avec *Planktothrix agardhii* HUB 076**

	Quantité de microcystine [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ] par unité de densité optique				
	Intracellulaire		Extracellulaire (milieu sans cellules)		Total
<b>Phase exponentielle</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Variance</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Variance</b>	
- N	357	182	45	29	<b>402</b>
- P	393	148	85	89	<b>478</b>
<b>Phase stationnaire</b>					
- N	171	69	6	3	<b>176</b>
- P	173	41	83	51	<b>255</b>

La conclusion globale de ces résultats préliminaires est que ni la limitation en azote ni celle en phosphore n'ont d'impact conséquent sur la production de microcystine. Ceci confirme l'hypothèse de travail issue des recherches bibliographiques sur les microcystines de *Microcystis*, à savoir que l'impact de la limitation en nutriments sur la quantité de microcystine n'est pas supérieur à un facteur 2.

#### ***1.2.4. Expériences en cultures continues***

##### ***Approche***

Pour déterminer les réactions physiologiques des cellules aux conditions environnementales, telles que les changements dans les taux de croissance ou la production et le contenu en métabolites, des cultures continues sont préférables aux cultures batch car l'état de limitation peut être clairement défini : bien que dans les cultures batch bien conçues il soit possible de déterminer qualitativement le facteur limitant, il n'est pas possible de quantifier le degré de limitation. Ceci est possible avec des cultures continues, où le milieu de culture est constamment remplacé pour maintenir les cellules dans un état stationnaire défini. Deux approches différentes sont possibles : le principe du turbidostat, dans lequel une mesure en ligne de la turbidité contrôle le débit de milieu nutritif de la culture pour maintenir la turbidité (et donc la densité cellulaire) constante, et le principe du chemostat, dans lequel le flux de milieu de culture est permanent et égal au taux de croissance de la culture – une fois que celle-ci a atteint son état stationnaire.

La méthode du turbidostat est appropriée pour étudier l'impact d'une limitation de l'éclairement, alors que la méthode par chemostat est nécessaire pour évaluer la limitation en nutriments. Ceci est dû au fait que le taux d'écoulement détermine le taux de croissance,

qui à son tour détermine le statut de limitation en nutriments des cellules (« quota cellulaire », c.à.d. le contenu en nutriments des cellules).

Des travaux précédents de l'UBA (Böttcher et al. 2001) avec *Planktothrix agardhii* (HUB 076) en turbidostat ont étudié l'impact de la limitation de l'éclairement sur les concentrations en microcystine intra- et extracellulaire en réalisant des expériences à 6 intensités d'irradiation différentes (de 2,4 à 73  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ). Les résultats montrent que l'impact de l'éclairement sur le contenu en microcystine intracellulaire est négligeable, ne représentant qu'un facteur inférieur à 2 sur toute la large gamme testée. Les concentrations extracellulaires ne représentaient qu'environ 1% de la quantité totale de microcystine, mais tout en restant dans ces faibles proportions, elles ont augmenté avec l'intensité lumineuse.

Dans le contexte du projet sur l'Erdre, des expériences complémentaires étaient donc uniquement nécessaires pour déterminer l'impact de la limitation en nutriments sur le contenu en microcystine.

### **Protocole expérimental**

Des cultures continues ont été obtenues avec succès avec une souche de *Planktothrix agardhii* productrice de microcystine, et ne formant pas d'aggrégats : CYA 126/8. Deux systèmes (utilisés tous les deux comme turbidostats et chemostats) ont été installés en parallèle pour tester l'impact de la limitation en azote aussi bien qu'en phosphore sur le contenu en microcystine des cultures. Celles-ci ont d'abord été opérées en turbidostats (c'est à dire avec la turbidité gardée constante, par réponse automatique de la pompe à nutriments aux changements détectés en ligne par la sonde de turbidité) pour déterminer les taux de croissances maximaux sous les conditions choisies. L'éclairement était de 60  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Le mode de dilution a ensuite été changé pour le principe du chemostat, c'est à dire avec un débit constant de milieu et l'opération des cultures jusqu'à la phase stationnaire. Une fois que celle-ci est atteinte, la limitation en nutriments est déterminée par le taux de dilution (puisque la division cellulaire est déterminée par la quantité de nutriments cellulaires, et cette quantité est rechargée par l'apport de nutriments par la dilution). Lors de la phase stationnaire, des échantillons ont été prélevés pour détermination du biovolume, analyse de la microcystine et des nutriments.

### **Méthode d'analyse de la microcystine**

Des cellules lyophilisées ou congelées (issues des expériences de culture) ont été extraits trois fois avec 1,5 mL de méthanol aqueux à 75% (Fastner *et al.* 1999). Les échantillons ont été soumis à une sonication pendant 5 min puis agités pendant 30 min à chaque étape d'extraction. Après centrifugation, les surnageants ont été asséchés à l'azote. Avant l'analyse par HPLC les extraits ont été redissous dans du méthanol aqueux à 50%.

L'analyse de la microcystine a été réalisée par HPLC couplée à un détecteur à barrettes de photodiodes, avec fournisseur de solvant Waters 616, un auto-échantillonneur 717 WISP et un détecteur à barrettes de photodiodes 991 (Waters, Eschborn, Allemagne). Les extraits ont été séparés sur un système de cartouches LiChrospher® 100, ODS, 5  $\mu\text{m}$ , LiChroCART® 250-4 (Merck, Darmstadt, Germany) à un taux d'écoulement de 1mL/min.

Les spectres UV ont été obtenus à 200-300 nm et les microcystines identifiées par leur spectre d'absorption caractéristique et leurs temps de rétention (Lawton *et al.* 1994). Les microcystines ont été quantifiées à 240 nm à l'aide de microcystine-LR, -YR et -RR

(Calbiochem, Bad Soden, Germany) comme standards externes. Les autres microcystines ont été quantifiées avec de la microcystine-LR.

### **Méthode d'analyse du biovolume**

L'analyse microscopique des filaments de *Planktothrix agardhii* a été réalisée soit sur des échantillons frais soit sur des échantillons fixés avec une solution de Lugol. Le biovolume de *Planktothrix agardhii* a été déterminé par mesure de la longueur et largeur des filaments dans un volume défini de culture, selon la méthode d'Utermöhl (1958). La mesure des filaments a été faite à l'aide d'un microscope inverse.

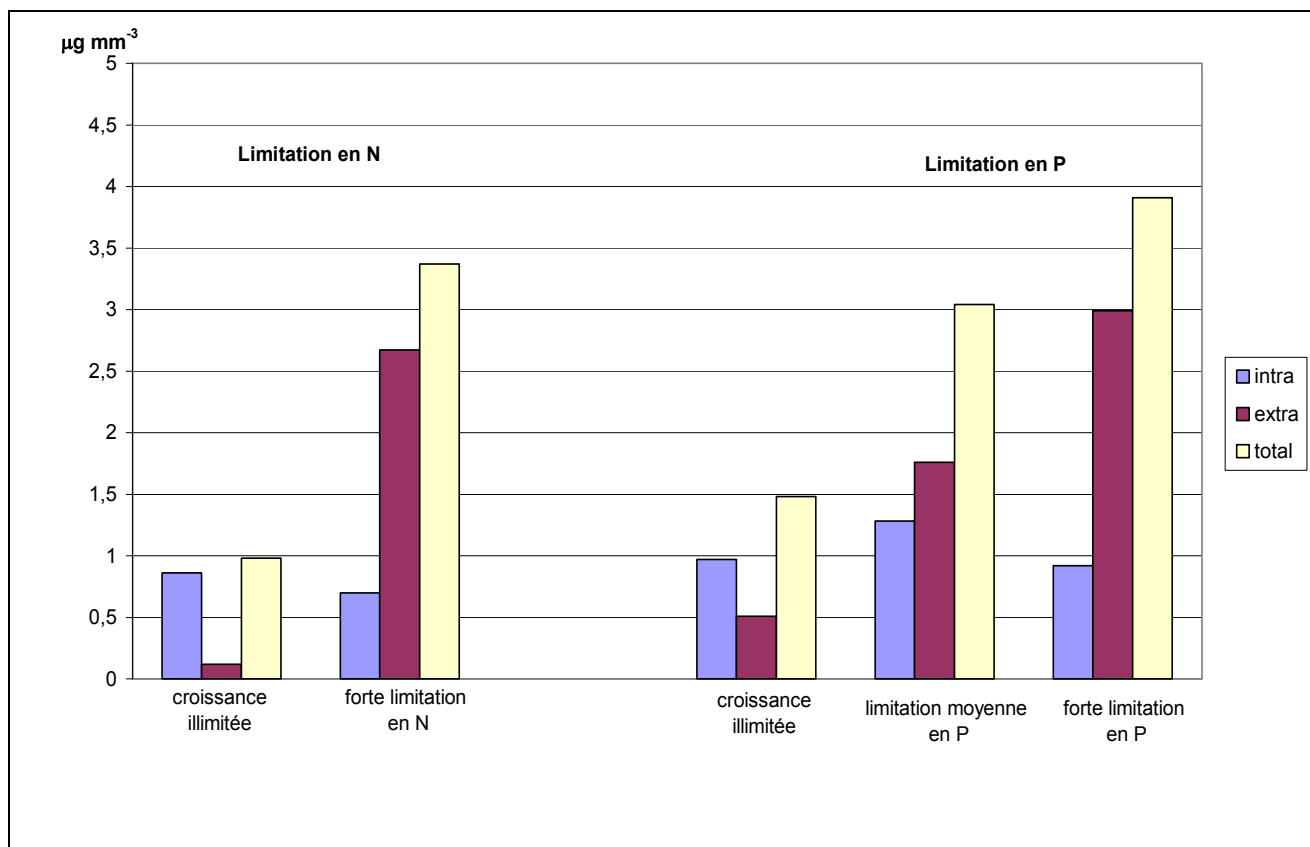
### **Résultats**

Les résultats des cultures continues sur les concentrations en microcystine en conditions de limitation des nutriments ont été obtenus pour une limitation très prononcée respectivement en P ou en N correspondant à un taux de croissance de 0,1  $\mu_{max}$ , de même qu'un stade de limitation moyenne en P à un taux de croissance de 0,22  $\mu_{max}$ .

Les données sont indiqués dans le tableau 9 ci-dessous et reprises dans la figure 22 (page suivante).

	$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	Microcystine intracellulaire ( $\mu\text{g mm}^{-3}$ )	Microcystine extracellulaire ( $\mu\text{g mm}^{-3}$ )	Microcystine totale ( $\mu\text{g mm}^{-3}$ )	% de microcystine extracellulaire %
Croissance illimitée ( $\mu_{max}$ )	0,426	0,86	0,12	0,98	12,2
Forte limitation en N	0,046	0,70	2,67	3,37	79,2
Croissance illimitée ( $\mu_{max}$ )	0,458	0,97	0,51	1,48	34,5
Limitation moyenne en P	0,100	1,28	1,76	3,04	57,9
Forte limitation en P	0,044	0,92	2,99	3,91	76,5

**Tableau 9 : Taux de croissance, concentrations en microcystine intra- et extracellulaire (en  $\mu\text{g}$  de microcystine par  $\text{mm}^3$  de biovolume) de *Planktothrix agardhii* CYA 126/8 à croissance illimitée (c.à.d. saturation en nutriments) et sous limitation en P ou N.**



**Figure 22 : Influence d'une limitation en N ou P sur le contenu en microcystine de *Planktothrix* (en µg de microcystine par mm<sup>3</sup> de biovolume)**

Le contenu intracellulaire en microcystine des souches de *Planktothrix* CYA 126/8 reste quasiment inchangé et n'est pas affecté par une limitation en nutriments. En revanche, les concentrations extracellulaires en microcystine dans le milieu ont augmenté de façon significative lors d'une limitation en N aussi bien qu'en P. En conséquence, la concentration en microcystine totale était environ 3 fois plus importante sous des conditions de forte limitation qu'en cas de saturation en nutriments. Cette réaction physiologique à la limitation en nutriments ne semble pas être générale mais plutôt spécifique à chaque souche, comme les tests préliminaires en culture batch avec la souche HUB 076 (voir paragraphe I.2.3) l'ont montré, avec un contenu en microcystine nettement plus faible dans les cellules limitées en nutriments lors de la phase de croissance stationnaire. Ceci est en accord avec des investigations antérieures sur l'impact d'une limitation en nutriments sur la production en microcystine de six différentes souches de *Microcystis aeruginosa* : il a été également montré que la limitation provoquait une quantité de microcystine totale plus importante seulement pour certaines souches (Hesse & Kohl 2001). Cependant, ces nouveaux résultats obtenus pour *Planktothrix* confirment le concept d'une spécificité des souches de cyanobactéries dans la réaction à l'apport en nutriments, qui a pu être ainsi déterminée pour une espèce supplémentaire (*Planktothrix*, dont la réaction n'avait pas été étudiée avant ces travaux, contrairement à *Microcystis*).

Les concentrations extrêmement fortes en microcystine extracellulaire sont très inhabituelles – des quotas de microcystine extracellulaire jusqu'à 80% de la quantité totale de



microcystine sont très rarement trouvés, et ne sont connus jusqu'ici que pour des événements courts de lyse des cellules, mais pas sur de longues périodes. L'examen microscopique et la détermination du biovolume ont indiqué qu'une présence sporadique de cellules lysées dans les filaments de *Planktothrix* sous conditions limitées en nutriments, avec une proportion relative très faible de ces cellules lysées par rapport à la biomasse vivante, trop faible pour expliquer de telles concentrations élevées en toxine extracellulaire. Dans l'état actuel de la science, il n'est pas clair si le rejet de toxines par les cellules en conditions de stress – de façon intéressante à la fois sous stress mécanique (voir les expériences sur l'écoulement, partie II) et sous stress physiologique en cas de limitation en nutriments – est un processus actif ou passif. La réponse à cette question est liée à la compréhension de la fonction écophysologique de la microcystine pour les cyanobactéries elles-mêmes.

Pour transférer les résultats à la situation dans l'écosystème de l'Erdre, il est important de noter que l'augmentation potentielle de la microcystine totale par biovolume (d'un facteur 3 environ) lors d'une limitation sévère en nutriments doit être considérée en lien avec la baisse significative et simultanée de la biomasse de cyanobactéries (d'un facteur 10 ou plus). Le résultat net d'une limitation en nutriments serait donc une baisse significative des concentrations en microcystine.

## II. Impact de la vitesse d'écoulement sur le relargage de microcystine par *Planktothrix agardhii*

La réaction de *Planktothrix agardhii* à un stress physique est très peu connue, en particulier en ce qui concerne la croissance, la rupture des cellules, la lyse et le relargage de microcystine. Des observations ponctuelles faites lors de la manipulation de *Planktothrix* en laboratoire ont suggéré que ces espèces sont plutôt sensibles au stress physique (tel que le cisaillement) et y répondent par une rupture des cellules.

Pour maîtriser la population de *Planktothrix agardhii* de l'Erdre, l'importance du stress physique induit par la vitesse d'écoulement et ses changements soudains a fait l'objet d'une évaluation par des expériences utilisant le système de rivière artificielle de l'UBA ainsi qu'une culture en masse de *Planktothrix agardhii* HUB 076. Les expériences prévues dans le programme de travail ont débuté comme prévu en août 2003. Ces tests ont été définis comme un système de culture batch pour évaluer l'impact de la vitesse d'écoulement sur l'adaptation de la population et la croissance de *Planktothrix* pendant la phase de croissance exponentielle, de même que les concentrations intracellulaires et extracellulaires de microcystine à diverses vitesses d'écoulement.

Nous avons complété ce programme expérimental par un test supplémentaire à échelle de laboratoire, en utilisant des appareils de floculation (jar-tests utilisés traditionnellement pour étudier la floculation lors du traitement des eaux potables). Les avantages de cette approche supplémentaire sont de permettre (i) l'étude d'une gamme de vitesses et de forces de cisaillement plus large et (ii) la réalisation d'expériences par une seconde approche indépendante.

### II.1. Expériences de laboratoire par agitation continue en appareil de jar-test

**Approche et méthode** : Quatre expériences ont été lancées avec diverses vitesses de rotation des agitateurs, dans des béciers de 2 L équipés d'un stator pour augmenter les turbulences et donc les forces de cisaillement (appareil de « jar-test » pour tester la floculation). Le gradient moyen de cisaillement  $G$  peut être déduit de la fréquence de rotation  $r$  et la géométrie du montage expérimental à l'aide de l'équation :

$$\lg G = 1,47 \lg r - 0,768 \quad \text{c.à.d.} \quad G = 0,171 r^{1,47}$$

(voir la feuille de travail DVGW – W218 : Coagulation et floculation pour le traitement des eaux ; Partie 2 Méthodes de test).

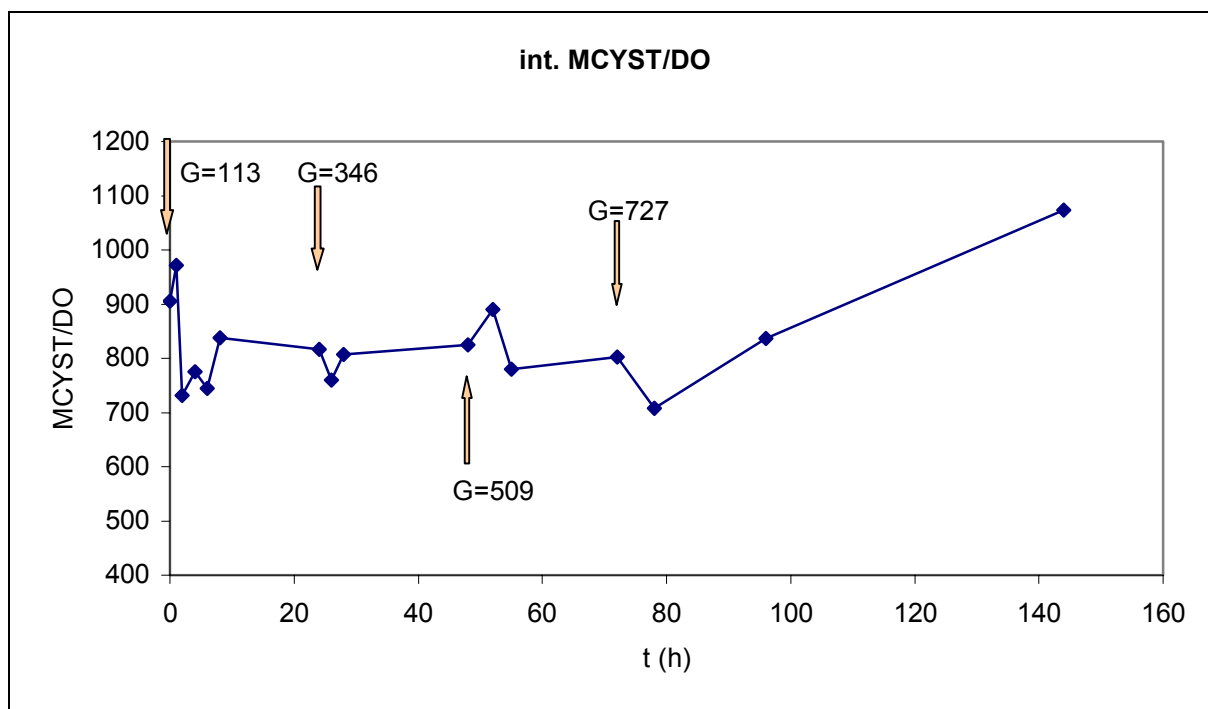
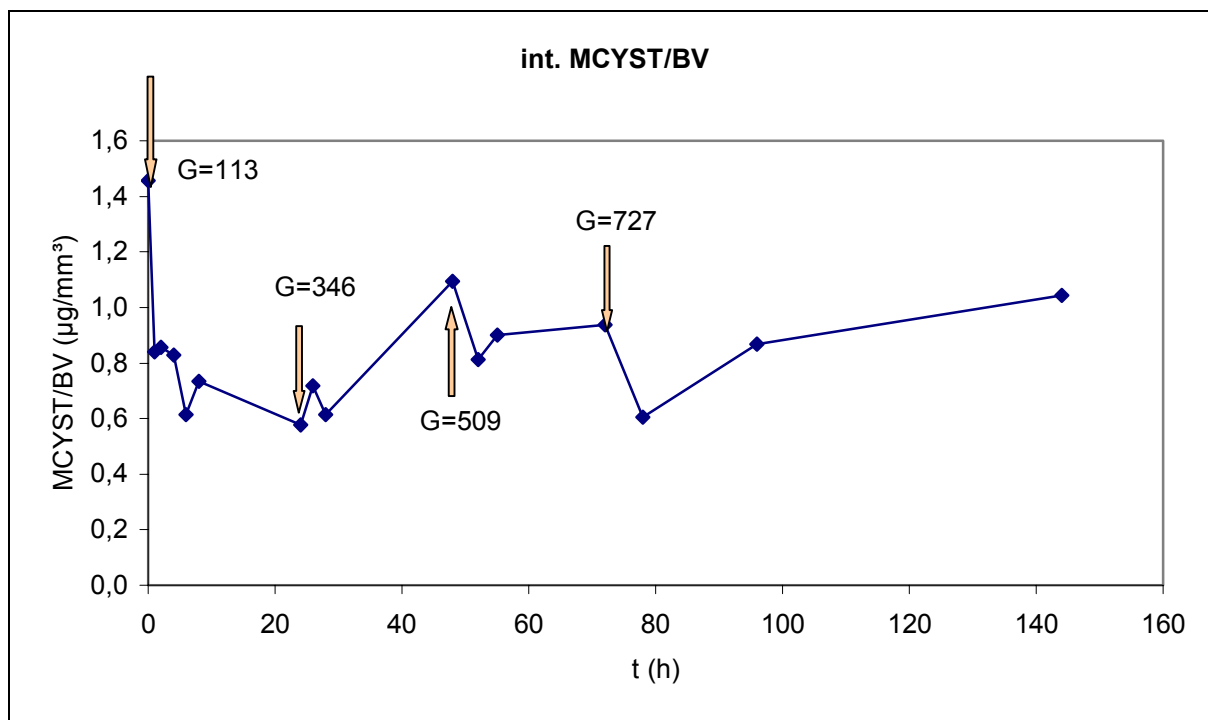
La souche testée ici était HUB 076. Les cultures ont été menées avec un milieu de culture HUB (désignation UBA) à  $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  et  $20^\circ\text{C}$ . L'une de ces expériences a dû être stoppée prématurément suite à une panne du moteur de l'agitateur.

Après qu'aucune différence substantielle n'ait été détectée entre ces tests, la vitesse rotationnelle a été augmentée dans chaque appareil, avec une vitesse plus grande toutes les 24 heures. A chaque augmentation, des échantillons ont été prélevés pour analyse de la microcystine intra- et extracellulaire, détermination de la distribution de longueur des filaments et de la courbe de croissance. Après la dernière accélération les cultures se sont développées pendant 8 jours supplémentaires à vitesse rotationnelle maximale.

**Résultats** : Le contenu en microcystine intracellulaire au cours du temps est montré dans la figure 23, en lien avec la DO de la culture (1<sup>er</sup> graphe) de même que le biovolume compté et calculé [ $\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$ ] (2<sup>o</sup> graphe). En général, les diminutions du contenu de microcystine intracellulaire ont été observés après chaque augmentation du gradient de cisaillement. En relation avec la DO, cette diminution apparaît délérement décalée dans le temps, bien que pas plus de 4h après l'augmentation du gradient de cisaillement. Cette diminution n'a été que temporaire, et la quantité de microcystine par unité de DO a atteint à nouveau son niveau d'origine dans les 9h qui ont suivi le changement du gradient de cisaillement.

Par rapport au biovolume, la réponse a été similaire. Cependant, la baisse du contenu de microcystine intracellulaire a suivi immédiatement, sans aucun délai temporel.

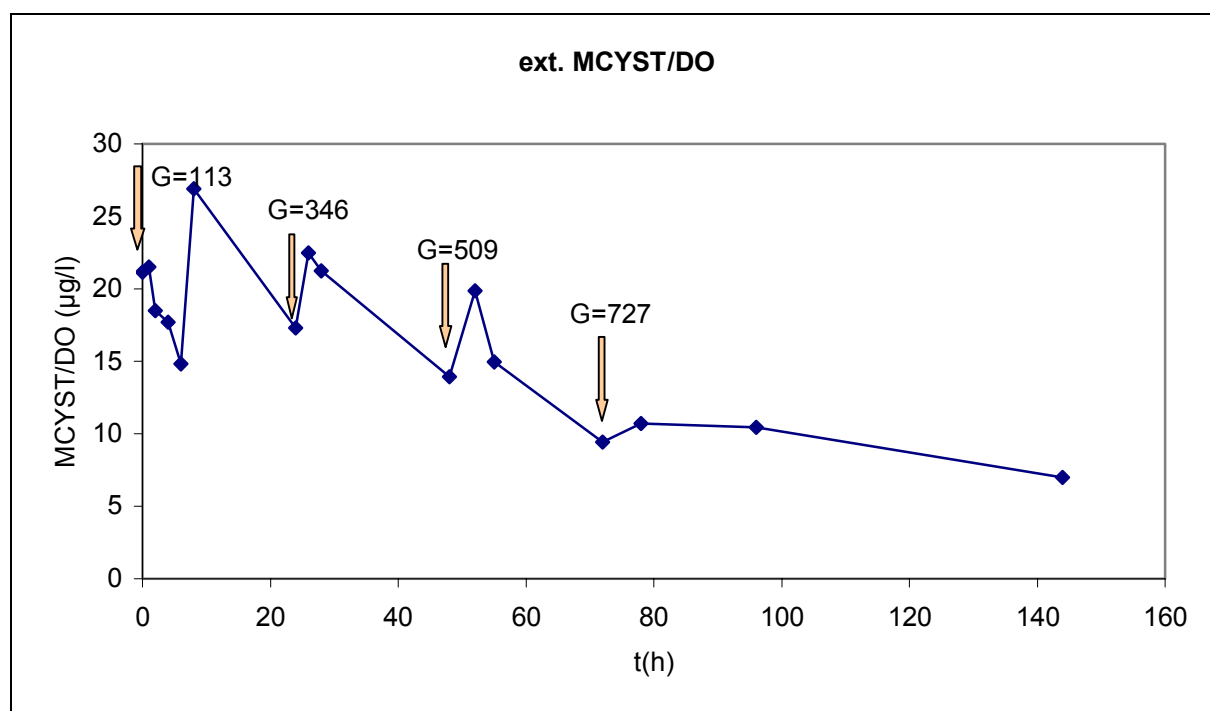
Toutes ces observations correspondent avec les résultats de mesure de la croissance (Lot 2), suggérant une période d'adaptation à croissance réduite, lors de laquelle les filaments soumis à un stress mécanique se rompent probablement davantage.



**Figure 23 : Concentrations de microcystine intracellulaire au cours du temps – en relation avec le biovolume de cyanobactéries (1<sup>er</sup> graphe) et la densité optique (2<sup>e</sup> graphe).**

Cette hypothèse a été vérifiée par analyse des microcystines dans le milieu de culture sans cellules. Ceci est montré dans la figure 24, par rapport à la DO comme indicateur de la densité des cellules dans la culture. En termes absolus, les concentrations de microcystine

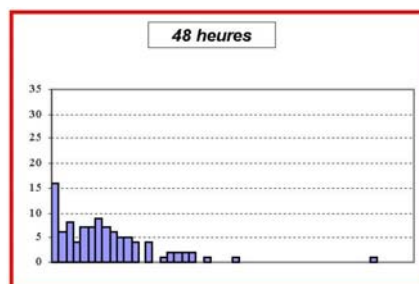
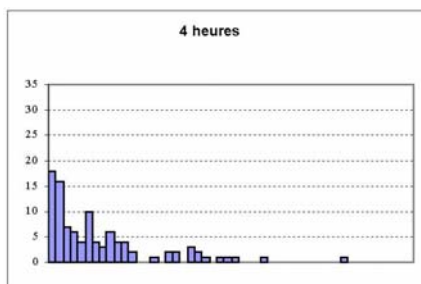
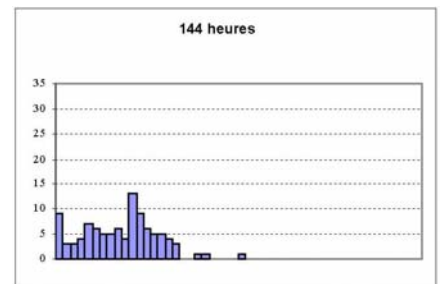
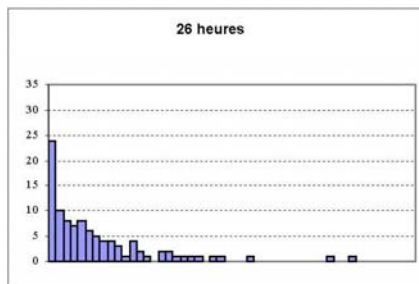
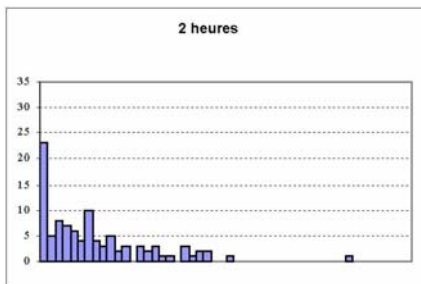
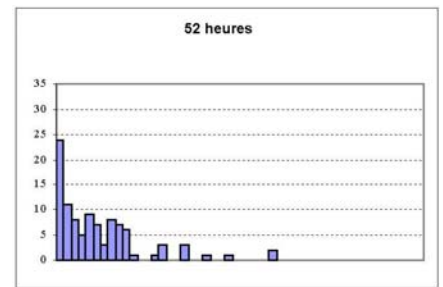
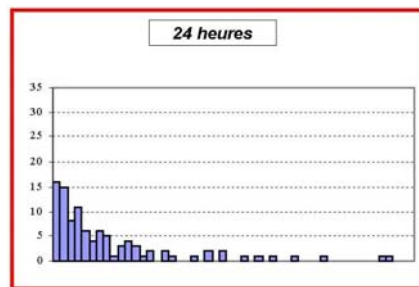
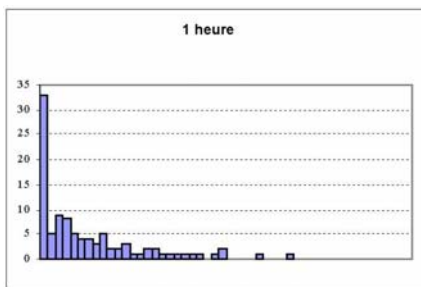
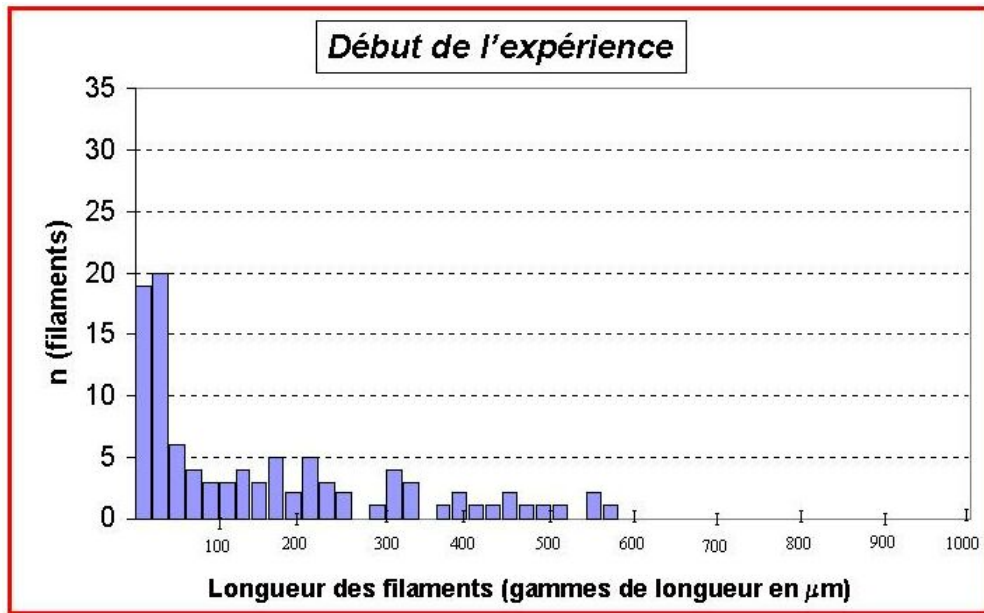
dissoute ont atteint un maximum de  $6,6 \mu\text{g L}^{-1}$ , ce qui est faible compte-tenu de la très forte densité de la culture (jusqu'à une DO de 0,4 et un biovolume de  $410 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ ). En comparaison, la concentration la plus forte observée pour la microcystine intracellulaire par rapport au volume de culture était  $424 \mu\text{g L}^{-1}$ . En fait, de remarquables augmentations des concentrations en microcystine extracellulaire ont pu être détectées immédiatement après l'augmentation du gradient de cisaillement. Cependant, aucun relargage supplémentaire de microcystine dans le milieu n'a été observé, ce qui indique une adaptation rapide des cellules à une turbulence accrue. Les diminutions rapides de la concentration de microcystine extracellulaire observées immédiatement après chaque augmentation résultent probablement de la décomposition bactérienne.



**Figure 24 : Concentrations de microcystine extracellulaire dans le milieu de culture sans cellules, par rapport à la DO.**

Une autre réponse potentielle à une turbulence accrue et aux forces de cisaillement est la rupture des filaments, qui résulterait dans une plus grande proportion de filaments courts. Ainsi, la distribution de la longueur des filaments a été étudiée. Les résultats sont donnés dans la figure 25 (page suivante).

Les échantillons prélevés 1 à 2 heures après chaque accélération de l'agitateur montrent un taux plus élevé de filaments courts ( $<20 \mu\text{m}$ ). ceci confirme l'hypothèse de travail selon laquelle les forces de cisaillement ont un impact sur la stabilité des filaments. Cependant, cet impact n'a été que de courte durée et n'a eu qu'une faible influence sur la population de la culture : après 4 jours d'agitation intensive à un gradient de cisaillement de  $727 \text{ s}^{-1}$  la culture a montré une nette diminution du nombre de filaments courts et une augmentation simultanée du nombre de filaments  $> 180 \mu\text{m}$ .



La vitesse a été augmentée au départ, après 24h puis 48h.

**Figure 25 :** Distribution de longueur des filaments de *Planktothrix* lors des expériences en appareil de floculation (nombre de filaments répartis par classes de longueur en µm)

En résumé, les résultats indiquent une phase courte et temporaire d'effets négatifs sur les filaments, qui résultent dans un certain relargage de microcystine et une rupture des filaments lorsque la turbulence est accrue. Cependant, l'adaptation à cette nouvelle situation est très rapide, en moins de 4 jours, et a peu d'impact sur la population et son contenu en microcystine.

De plus, bien que des gradients de cisaillement plus forts fassent augmenter les concentrations de microcystine extracellulaire, cet effet ne se produit qu'à une très faible proportion relative (moins de 50%) de même qu'en valeurs absolues : si l'on évalue les risques, même à la plus forte concentration de microcystine intracellulaire de  $424 \mu\text{g L}^{-1}$  pour un biovolume de  $413 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ , qui a peu de probabilités de se produire sur le terrain où la densité totale des cellules est beaucoup plus faible que cette culture, la proportion de microcystine extracellulaire n'a atteint que  $6,6 \mu\text{g L}^{-1}$ .

## II.2. Simulations d'écoulement en rivière artificielle

**Approche :** La réalisation de cultures batch de souches *Planktothrix agardhii* HUB 076 productrices de microcystine et non-axéniques (=cultures contenant également d'autres bactéries, mais pas d'autres cyanobactéries ou algues), à grande échelle et à diverses vitesses d'écoulements dans le système de rivière artificielle de l'UBA, permet de déterminer la croissance et les concentrations intra- et extracellulaires de microcystine qui en résultent.

Les expériences en canal ont débuté par 2 semaines d'adaptation de la culture (après une phase de stagnation) à un écoulement très faible, avec une densité de culture d'environ 50 µg/L de microcystine totale. Des tests précédents avec HUB 076 indiquent que ceci correspond à une quantité de 100 à 450 µg/L de chlorophylle-a, soit la densité de population dans des situations d'eutrophie importante voire légèrement au dessus de celles-ci. De plus, on peut s'attendre à des taux de microcystine extracellulaire de l'ordre de 0,1 à 0,3 µg/L pour cette densité cellulaire. Les expériences en canal ont été menées en mode semi-continu en rapport avec la densité cellulaire : si la turbidité (et donc potentiellement le signal fluorescent) indique une hausse de densité de plus de 20%, la culture est diluée. Les concentrations de nutriments étaient en excès pour éviter une limitation, et l'éclairement était faible (de l'ordre de 5-10 µE/m<sup>2</sup> s) de façon à simuler les conditions d'eutrophie et de forte turbidité et d'éviter la compétition avec d'autres algues. L'intensité de l'écoulement a été augmentée progressivement, pour laisser à la population dans le canal le temps de s'adapter avant une nouvelle hausse. Les vitesses d'écoulement n'ont pas été pré-déterminées ; elles ont été augmentées jusqu'au point de rupture des cellules ou jusqu'à ce qu'aucune croissance ne soit détectée pendant 2 semaines.

### **Protocole expérimental - Description du système de rivière artificielle**

Le système consiste d'une boucle couverte de plastique transparent, avec les dimensions suivantes :

- Diamètre du canal : 1 m
- Hauteur d'eau : 29 cm au niveau de l'agitateur
- Longueur de la boucle : 21 m

Le volume a été maintenu constant à 4,4 m<sup>3</sup>. L'écoulement était provoqué par un agitateur qui peut être régulé sur une gamme de 0 à 20 Hz (Figure 27) et cause des turbulences déjà considérables à 15 Hz (Figure 28).



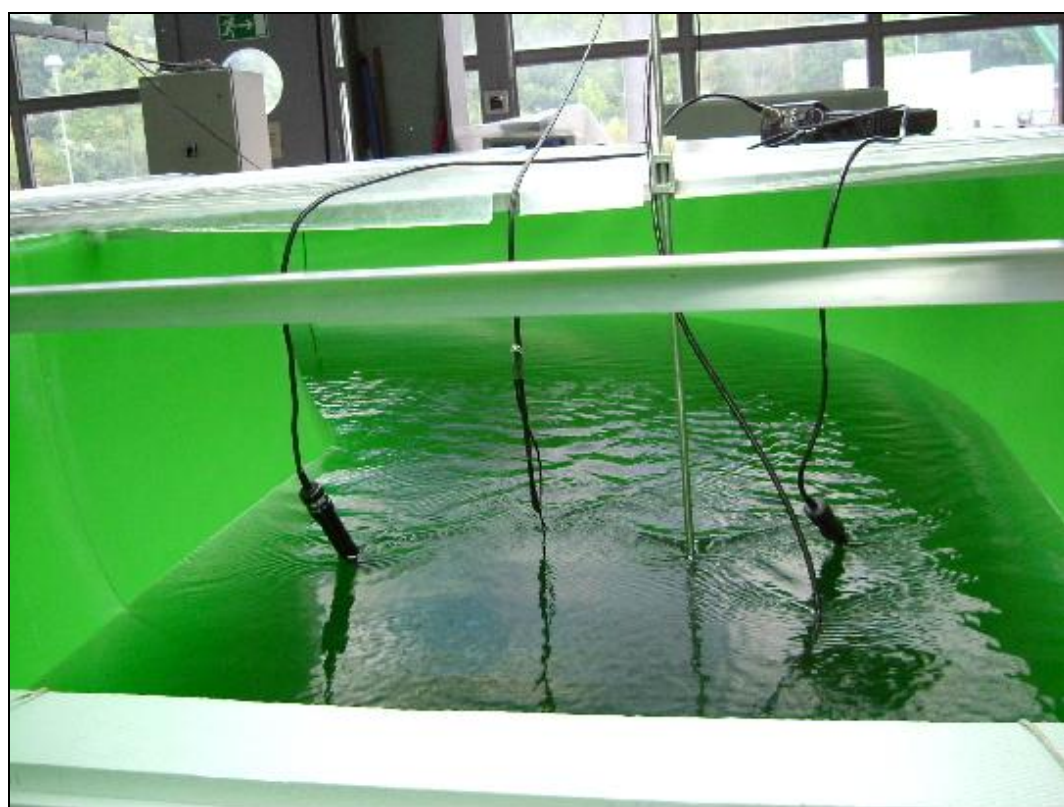
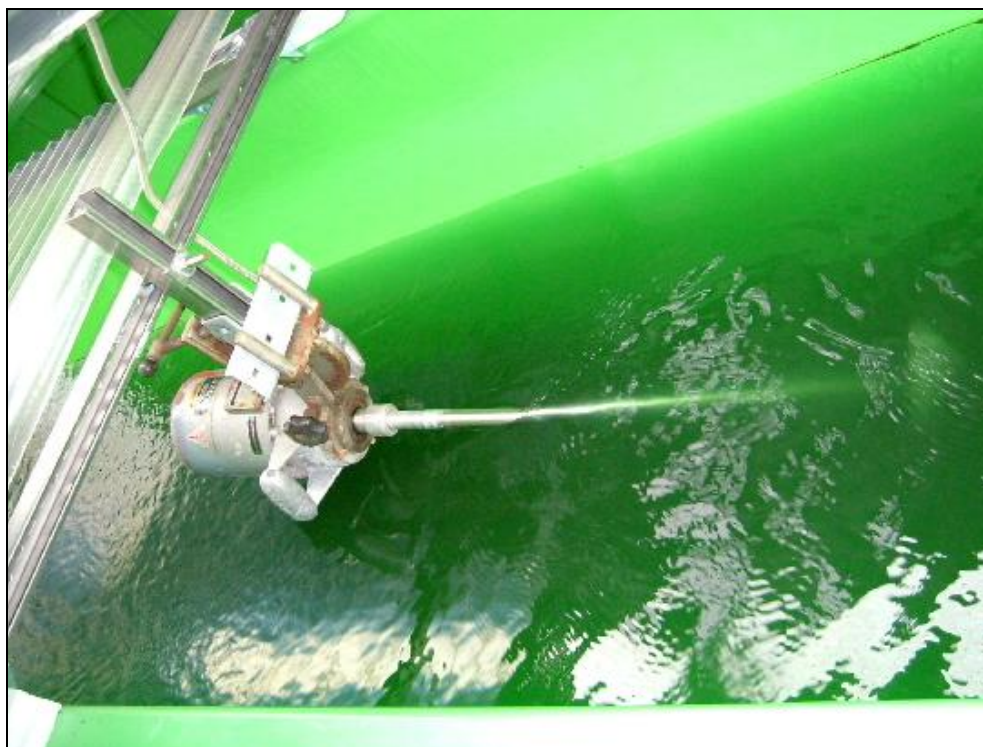
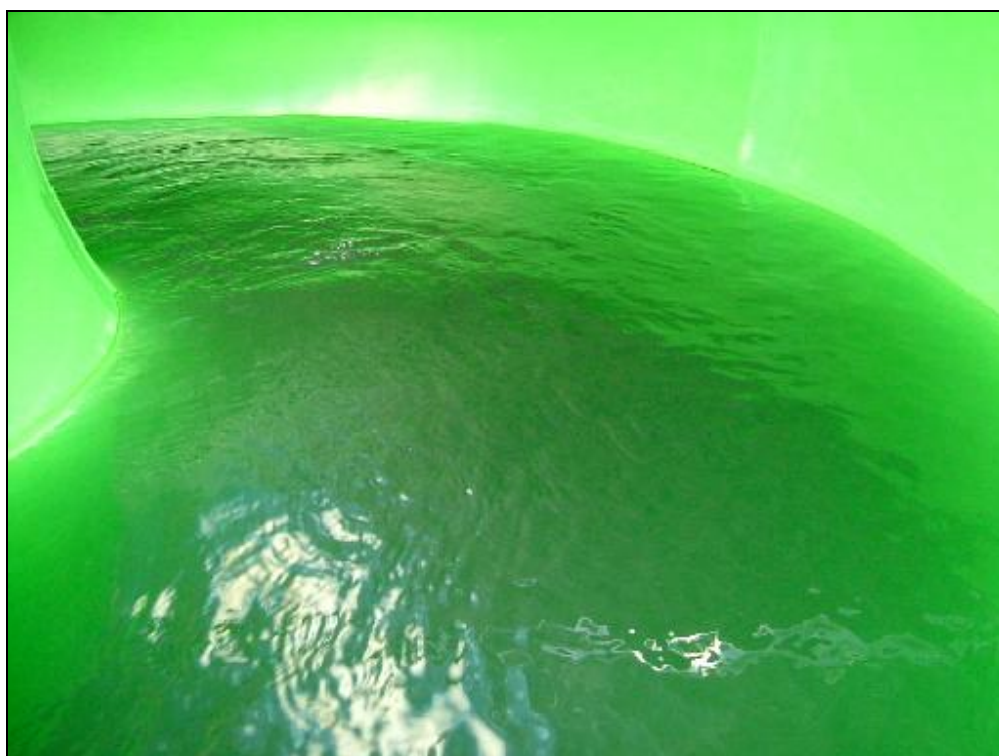


Figure 26 : Système de rivière artificielle de l'UBA préparé pour les expériences sur *Planktothrix* de l'Erdre



**Figure 27 : Agitateur dans la rivière artificielle**



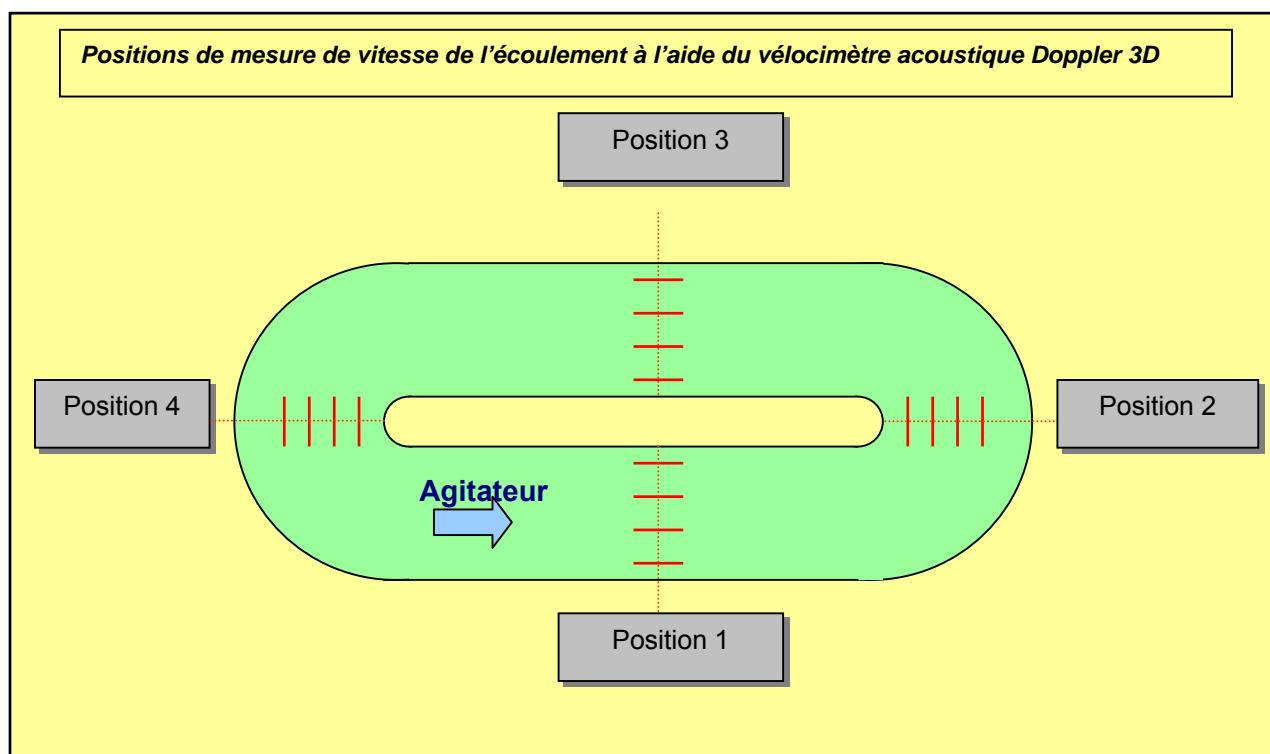
**Figure 28 : Ecoulement à 15 Hz (turbulence visible)**

La température était maintenue à  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . La culture était éclairée à  $35 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  avec un rythme éclaircissement/obscurité de 16/8 h avec des lampes OSRAM Biolux, qui fournissent une lumière comparable à la lumière du jour naturelle. Le milieu utilisé était un milieu HUB.

Les expériences étaient menées à quatre taux d'écoulement différents en ajustant la fréquence de rotation de l'agitateur respectivement à 10, 15, 20 et 7,5 Hz ; chaque fréquence a été opérée pendant 144 h (1 semaine). Un essai au début du mois d'août à 2,5 Hz a montré que l'écoulement induit à cette faible fréquence n'était pas suffisant pour maintenir les filaments en suspension – ils se sont déposés au fond et ont dépéri.

### Mesure des vitesses d'écoulement

Pour les 4 vitesses rotationnelles testées, les vitesses d'écoulement ont été mesurées avec un vélocimètre acoustique Doppler 3D (ADV) à quatre positions dans le chenal, comme ceci est indiqué dans la figure 29, avec des points de mesures répartis régulièrement sur la section transversale et la profondeur, comme ceci est indiqué sur la grille de la figure 30.



Positions horizontales des points de mesure (Distance par rapport aux bords du chenal)						
	Par rapport au bord extérieur			Par rapport au bord intérieur		
<b>Position 1</b>	11 cm gauche	25 cm gauche	42 cm gauche	42 cm droite	25 cm droite	11 cm droite
<b>Position 2</b>	11 cm gauche	25 cm gauche	42 cm gauche	<b>Pas de mesure</b>	25 cm droite	11 cm droite
<b>Position 3</b>	11 cm gauche	25 cm gauche	42 cm gauche	42 cm droite	25 cm droite	11 cm droite
<b>Position 4</b>	11 cm gauche	25 cm gauche	42 cm gauche	<b>Pas de mesure</b>	25 cm droite	11 cm droite

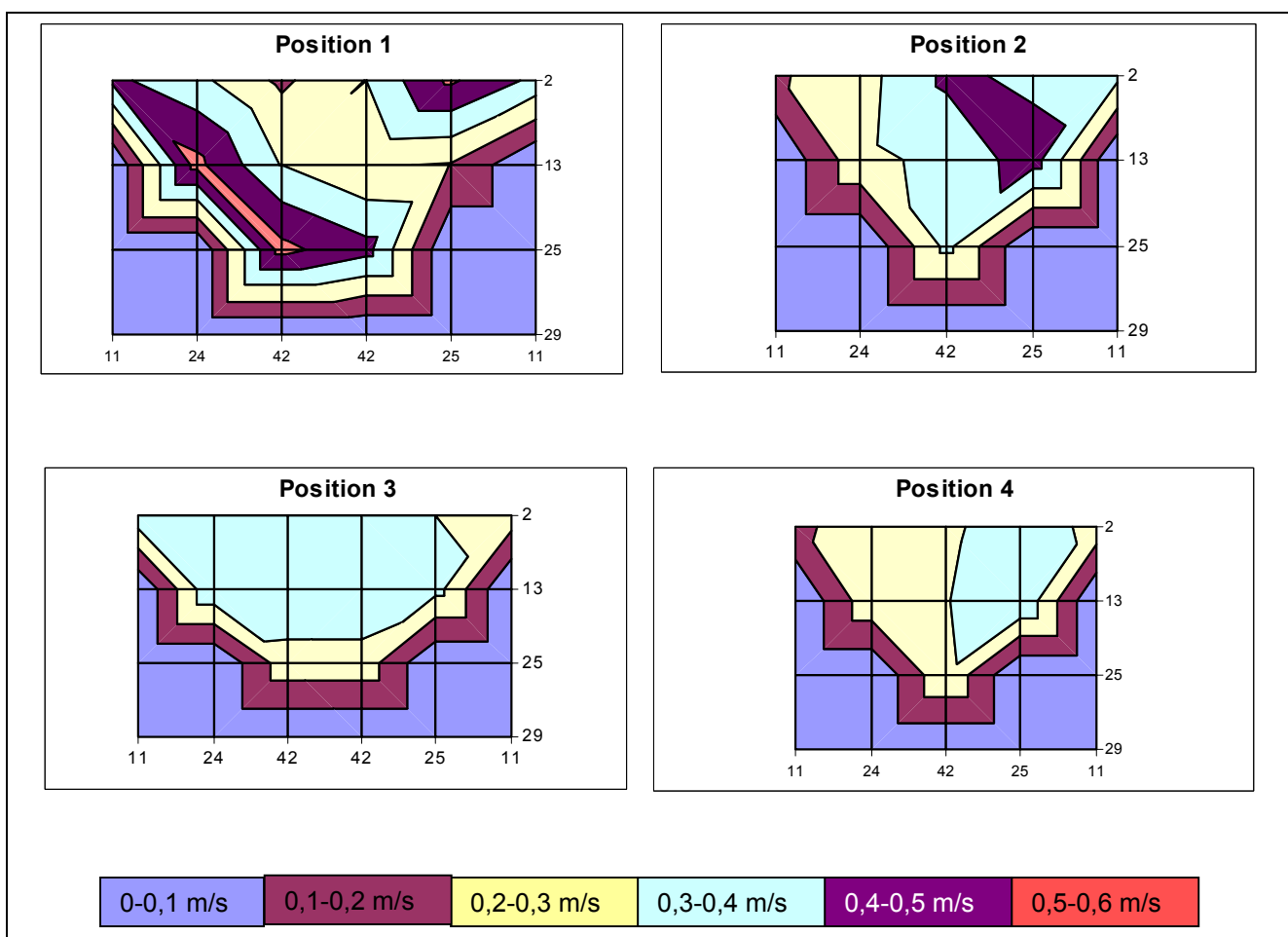
Positions verticales des points de mesure (profondeur sous à la surface de l'eau)			
<b>Position 1</b>	2 cm	13 cm	25 cm
<b>Position 2</b>	2 cm	13 cm	25 cm
<b>Position 3</b>	2 cm	13 cm	25 cm
<b>Position 4</b>	2 cm	13 cm	25 cm

Figure 29 : Positions de mesure des vitesses d'écoulement dans le chenal



Le principe de fonctionnement de l'appareil de mesure de l'écoulement utilisé (type PVM-PD) est basé sur le principe de la mesure de la pulsation doppler. Un cristal piezo-électrique envoie et reçoit à courts intervalles des séries d'impulsions d'ultra-sons d'une fréquence connue dans le fluide dont on veut mesurer l'écoulement. Le décalage de fréquence provoqué par l'effet Doppler sur le signal renvoyé fournit une mesure de la vitesse d'écoulement au point de mesure se trouvant directement devant l'appareil (référence : notice d'utilisation PVM-PD NIVUS, 2001).

La distribution des vitesses d'écoulement est montrée dans la figure 30. Selon la position du vélocimètre, une augmentation jusqu'à 0,6 m/s est possible à la vitesse d'agitation maximale de 20 tours/min. Cela montre également une répartition très hétérogène de l'écoulement sur la section transversale, en particulier à la position 1 juste après l'agitateur et les courbes, alors que l'écoulement est plutôt uniforme à la position 3. Une modélisation hydrodynamique pour obtenir une mesure intégrale de l'écoulement aurait donc été inadaptée au projet.



**Figure 30 : Répartition horizontale de la vitesse d'écoulement dans le chenal, mesurée à une fréquence d'agitation rotationnelle de 20 Hz et une profondeur d'eau de 29 cm.**

Remarque : Cette figure déforme le contour semi-circulaire du chenal en un rectangle.

Le tableau 10 (page suivante) donne la vitesse d'écoulement moyenne à la position 3 à 42 cm de distance du bord extérieur du chenal, en tant que valeur moyenne sur 2, 13 et 25 cm de profondeur (profondeur totale : 29 cm).

**Tableau 10 : Vitesse d'écoulement moyenne déterminée à la position 3**

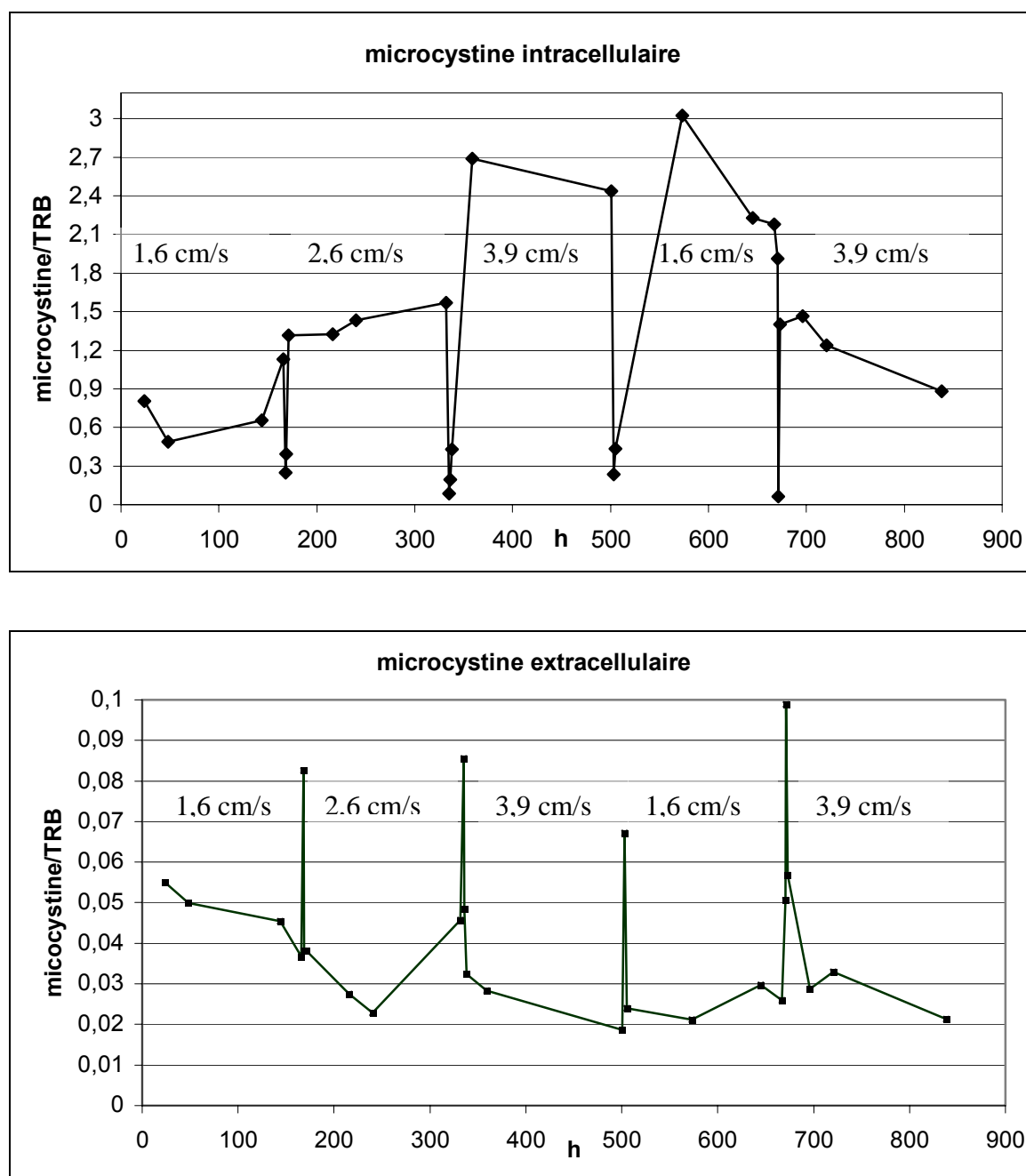
10 Hz	1,57 ± 0,02 cm/s
15 Hz	2,57 ± 0,08 cm/s
20 Hz	3,86 ± 0,03 cm/s

Chaque expérience a débutée avec la même densité de filaments, déterminée en diluant la culture à une valeur de turbidité de 32-35 FNU. La température, le pH et la turbidité ont été enregistrés en continu pendant l'expérience (à l'aide d'une sonde Dr Lange Solitarx t-line). Des échantillons ont été prélevés à 0, 1, 3, 48, 72 et 144h pour mesurer les paramètres suivants :

- Conductivité
- Concentration de microcystine intracellulaire
- Concentration de microcystine extracellulaire
- Concentration de chlorophylle
- Détermination microscopique de la longueur des filaments et du biovolume (fixation de l'échantillon avec une solution de Lugol) et évaluation de l'état des filaments

**Résultats :**

Les résultats pour la microcystine sont donnés par unité de turbidité dans la figure 31, la turbidité correspondant à la densité de filaments dans la culture.



**Figure 31: Concentrations en microcystine intracellulaire (graphe du haut) et extracellulaire (en-dessous) rapportées à la turbidité, pour 5 expériences successives menées à différentes vitesses d'écoulement.**

Les chutes de microcystine intracellulaire et les pics de microcystine extracellulaire reflètent les changements de vitesse.

De façon intéressante, on observe des pics très distincts de microcystine extracellulaire à chaque changement de la vitesse d'écoulement, que celle-ci soit augmentée ou diminuée. Ceci était toujours accompagné d'une baisse correspondante des concentrations en microcystine intracellulaire (figure 31, 1<sup>er</sup> graphe). Cependant, les concentrations extracellulaires n'ont jamais excédé 3,5 µg par litre de volume de culture, même lorsque la culture était très dense. Cet effet était également transitoire, de façon surprenante, ne durant

que 1 à 4 heures, c.à.d. que les concentrations extracellulaires retrouvaient leur niveau normal au moment où l'échantillon suivant était prélevé. Ceci pourrait s'expliquer par une dégradation microbienne très rapide de la microcystine dissoute.

Ce résultat est cohérent avec l'augmentation de microcystine extracellulaire et la baisse correspondante de microcystine intracellulaire observée lors des expériences en appareil de jar-test (partie II.1). L'effet est même plus prononcé, bien que pour la turbulence la plus faible dans le chenal, les forces de cisaillement ont été nettement plus faibles que dans les appareils de jar-test agités vigoureusement.

De plus, ces résultats sont cohérents avec le rejet de microcystine observé en cas de limitation de nutriments (voir partie I).

Ces résultats sont inattendus ; des observations similaires ne sont pas connues – à notre connaissance. Cela représente un intérêt scientifique certain et mérite des investigations plus poussées.

Cependant, en termes de gestion du risque lié à la microcystine issue de la population de *Planktothrix* dans l'Erdre, nous estimons que les concentrations extracellulaires détectées lors de ces expériences ne sont pas d'une importance majeure : elles n'ont jamais représenté plus de quelques  $\mu\text{g/L}$ , malgré une densité de filaments nettement plus forte que la population dans l'Erdre, et ont été apparemment biodégradées très rapidement. Le seul scénario pouvant impliquer un risque de fortes concentrations de microcystine dissoute serait un stress mécanique ou physiologique (nutriments) à une forte densité de population et des températures très en dessous de  $10^{\circ}\text{C}$ . Un tel scénario serait plus probable en Scandinavie que dans la région de Nantes.

### III. Résultats de l'analyse du rejet potentiel de microcystine provenant des sédiments de la rivière Erdre

Deux approches ont été utilisées :

- l'analyse de la quantité de microcystines dans les sédiments par intervalles (les sédiments étant fournis par les partenaires locaux en France)
- l'introduction de microcystine standard dans divers échantillons de sédiments de l'Erdre pour tester leur capacité d'adsorption, de dégradation et de relargage.

Les échantillons étudiés étaient les suivants :

Nom	Rivière	Ville	Site	Date
S2a	Erdre	Nantes	La Jonelière	Mai 03
S2b	Erdre	Nantes	La Jonelière	Dec. 02
S3	Erdre	Carquefou	Port-Jean	Dec. 02
S4	Erdre	Sucé-sur-Erdre	La Bézirais	Dec. 02
S5	Canal de Nantes à Brest	Sucé-sur-Erdre	La Blanchetière	Dec. 02
S6	Erdre	Petit-Mars	Le Breil	Dec. 02
S7	Erdre	Nort-sur-Erdre	Port Mulan	Dec. 02
S2c	Erdre	Nantes	La Jonelière	Sept. 03
S2d	Erdre	Nantes	La Jonelière	Dec. 03

**Tableau 11 : Points de prélèvement des échantillons fournis**

Les sites d'échantillonnage sur l'Erdre sont indiqués sur la carte (Figure 32).



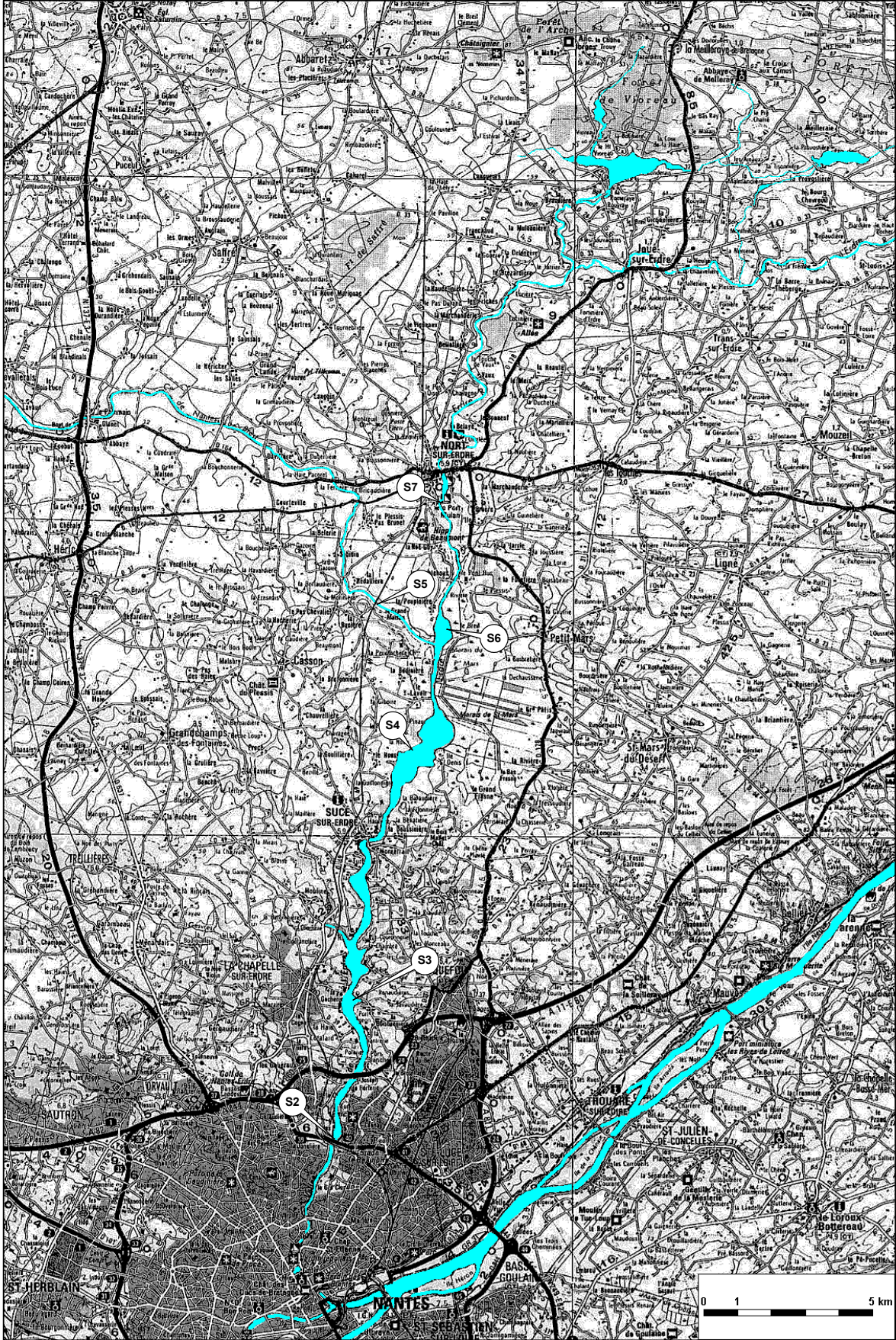


Fig. 32: Sites de prélèvement des échantillons de sédiments dans l'Erdre



### III.1. Caractérisation des sédiments

L'analyse de la taille des grains de l'échantillon S2a (fourni en mai 2003) a montré la prédominance de limon et d'argile (Fig 33), et la boue s'est révélée très riche en matière organique (fortes pertes au feu).

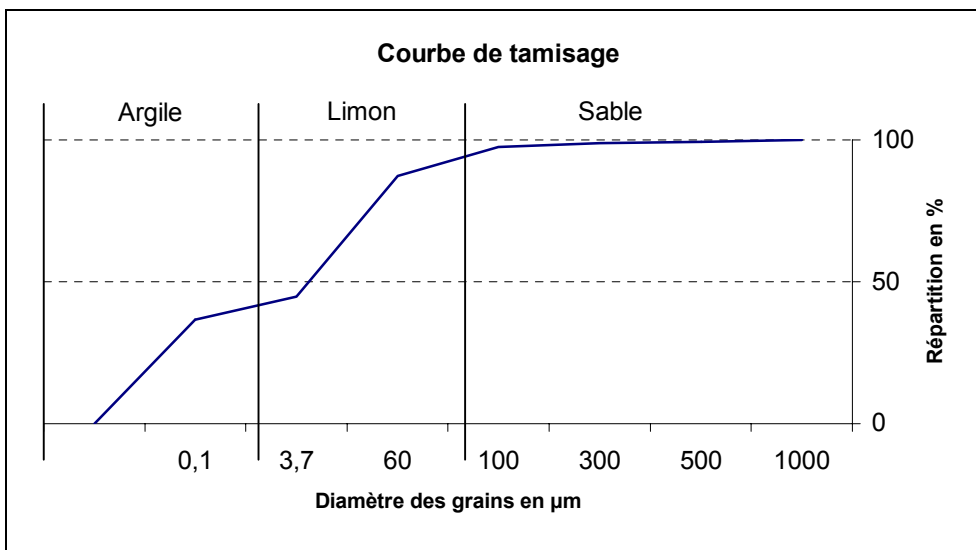


Figure 33 : Distribution de taille des grains de l'échantillon S2a (mai 2003)

L'analyse de la taille des grains des échantillons S2b à S7 (fournis en décembre 2002) a montré la prédominance du limon à plus de 90% (figure 34) et la vase apparaît très riche en matière organique (fortes pertes au feu).

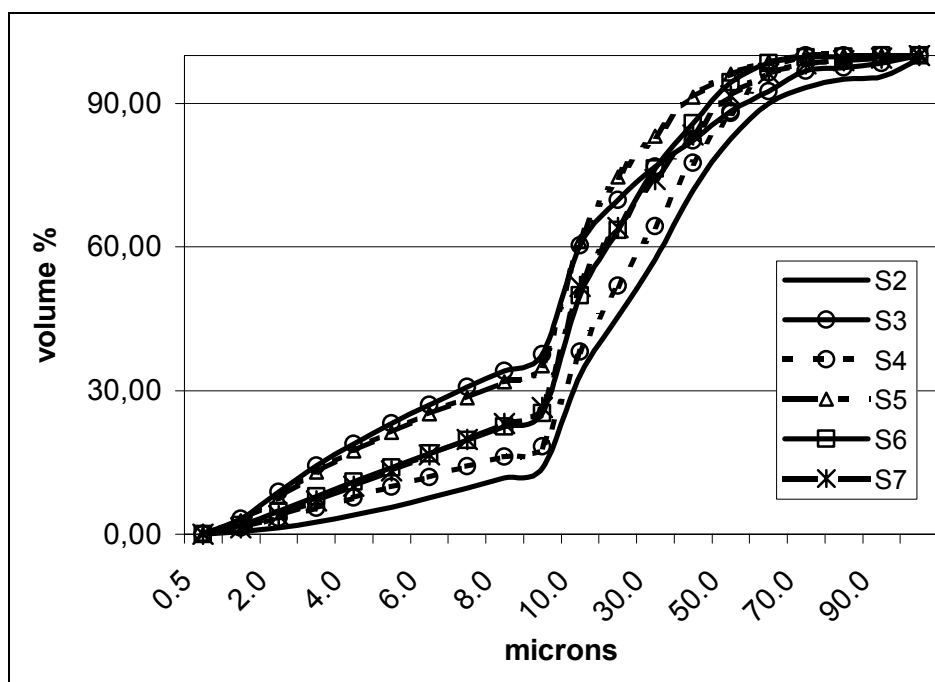


Figure 34 : Distribution de taille des grains des échantillons S2b à S7 (décembre 2002).

### III.2. Analyse des concentrations de microcystine dans les échantillons de sédiments de l'Erdre

Le surnageant des échantillons de sédiments fournis a été filtré puis les microcystines dissoutes ont été analysées par ELISA.

Résultats : Dans les échantillons S2b à S7 (décembre 2002), l'échantillon S2a (mai 2003), et les échantillons de septembre 2003, aucune microcystine n'a été détectée par ELISA. Pour les analyses par HPLC, le rinçage des échantillons a été décidé pour une meilleure sensibilité. Ces échantillons ne contenaient pas non plus de microcystine après utilisation de cartouches C-18 et détection par HPLC.

### III.3. Tests sur l'adsorption, la dégradation et le relargage de microcystine

**Approche et méthodes :** Comme les échantillons de boue de l'Erdre ne contenaient pas de microcystine, ils ont pu être utilisés pour des expériences de type batch avec ajout de microcystine. Dans ce but, 10 mg de boue de l'Erdre, humide et homogénéisée, provenant des échantillons S2b (mai 2003) et ceux de décembre 2002 (S3 à S7), ont été mixés avec 10 mL d'eau contenant 0 (témoin), 1, 3, 10 et 50 µg/L de microcystine-LR standard. Les surnageants ont été analysés pour connaître la teneur en microcystine (par ELISA) après 24 heures, pour quantifier l'adsorption.

Afin de quantifier la désorption, les échantillons ont été centrifugés (à 13 000 g) et le centrifugat des échantillons contenant initialement 50 µg/L, de même que l'échantillon témoin, ont été rincés avec 10 mL d'eau distillée et analysés après 24, 48 et 72 heures, après forte agitation et centrifugation des échantillons quotidiennement.

Afin de quantifier la biodégradation, 10 g de sédiment ont été incubés avec 10 mL d'eau distillée contenant 50 µg/L de microcystine-LR. Les échantillons ont été agités une fois par jour et stockés à température ambiante. Après 24, 48, 72, 96 et 144 heures, trois exemplaires ont été centrifugés et la quantité de microcystine dans le surnageant a été analysée par ELISA. Un échantillon témoin a été réalisé avec un mélange eau-microcystine sans ajout de sédiments.

**Résultats :** Alors que la microcystine n'a pas été dégradée dans l'échantillon témoin (sans sédiments), aucune microcystine n'a été détectée dans les surnageants analysés (< 0,4 µg/L). Au plus, 0,5 µg/L ont été détectés dans la phase aqueuse (comparé aux 50 µg/L initiaux), et aucune confirmation n'a été apportée par des dilutions complémentaires. Ces 0,5 µg/L sont donc très probablement dûs uniquement aux incertitudes de mesure, ce qui n'est pas atypique pour des résultats par ELISA à de faibles concentrations.

Ces résultats confirment les résultats donnés dans les rapports intermédiaires. Ceci signifie que la microcystine ajoutée aux sédiments a été immédiatement adsorbée à cause de la faible taille des grains et la forte teneur en matières organiques. Le fait qu'aucune microcystine n'ait été désorbée mène à l'hypothèse qu'elle a été probablement rapidement dégradée en même temps qu'elle était adsorbée ou lentement désorbée. Compte tenu de leur exposition antérieure aux microcystines, les sédiments étudiés renferment vraisemblablement des bactéries capables de dégrader les microcystines présentes.

## IV. Contexte scientifique actuel sur les toxines et les risques sanitaires associés

Des indices de la toxicité potentielle des cyanobactéries existent depuis 125 ans, mais une compréhension plus globale des cyanotoxines, notamment la connaissance de leur structure, n'a été développée que dans les 2-3 dernières décennies. Actuellement, les cyanotoxines les plus importantes pour la santé humaine sont probablement connues, bien que les résultats de nombreux essais biologiques restent une cause d'interrogation, indiquant que la toxicité n'est pas liée à ces toxines connues mais probablement à d'autres métabolites.

Concernant les risques liés à l'exposition pour les humains, il existe très peu d'études établissant scientifiquement la relation entre présence de cyanobactéries toxiques et troubles médicaux observés. Les seuls accidents mortels clairement attribuables aux cyanotoxines sont de façon rassurante limités à un cas d'exposition lors de dialyse au Brésil, et une exposition potentielle par de l'eau potable issue d'un réservoir brésilien (voir [3] Chorus & Bartram). Les cyanobactéries sont impliquées dans de nombreux cas de mort d'animaux et un certain nombre de cas de troubles de la santé humaine. Il est intéressant de noter que la plupart des accidents sanitaires rapportés anecdotiquement après exposition lors d'activités de loisirs ne peuvent pas être expliqués par les mécanismes de toxicité des cyanotoxines connues. La seule étude épidémiologique liant la maladie à l'exposition aux cyanobactéries lors d'usages récréatifs a permis d'établir une relation entre la probabilité de développer des symptômes et la densité de cellules de cyanobactéries dans l'eau (avec une probabilité 3 fois plus importante pour le niveau d'exposition le plus fort), mais aucune relation avec les cyanotoxines connues.

La fonction biologique des toxines et des autres métabolites bioactifs pour les cellules de cyanobactéries elles-mêmes, c.à.d. « pourquoi produisent-elles des toxines », est toujours complètement incertaine. Des hypothèses de travail émises lors de divers travaux de recherche évoquent des signaux chimiques (par ex. entre cellules d'une même colonie), un mécanisme de défense face au broutage par le zooplancton, des effets allélopathiques (activateurs ou inhibiteurs) sur d'autres organismes du phytoplancton, ou la liaison avec des métaux (pour les microcystines), mais tous les résultats ne mènent pour l'instant à aucune conclusion.

L'importance des cyanotoxines connues pour la santé humaine, dans l'état actuel des connaissances, peut être résumé ainsi :

**Les neurotoxines** sont un ensemble de substances assez différentes par leur structure chimique (saxotoxines, anatoxine-a, anatoxine-a(S)) et hautement toxiques même à de faibles concentrations ( $DL_{50}$  de 10 à 200  $\mu\text{g}$  par kg (poids du corps) lors d'une injection intrapéritonéale ou « i.p. »). De nombreux cas de morts d'animaux domestiques et sauvages ont pu être attribués à des blooms de cyanobactéries neurotoxiques, car l'ingestion d'une dose létale provoque la mort en quelques minutes et les animaux morts ont été observés près des sources d'eau, permettant d'établir le lien de cause à effet avec les cyanobactéries toxiques. Les neurotoxines ont été trouvées jusqu'ici dans les espèces du genre *Anabaena* et de façon beaucoup moins fréquente dans les espèces *Aphanizomenon*, *Planktothrix* et *Oscillatoria*.

Relativement peu d'études existent sur leur présence. Les résultats disponibles montrent que les populations de cyanobactéries ne contiennent souvent pas de neurotoxines, et lorsque c'est le cas, rarement en fortes concentrations. De plus, il n'y a pas de signes d'effets chroniques provoqués par ces neurotoxines. Une dose orale aigue présentant un risque pour les humains supposerait d'ingérer de grande quantités d'algues – via quelques litres d'eau – ce qui semble assez peu probable. L'exposition à des blooms neurotoxiques par ingestion ou aspiration devrait cependant être évitée, en particulier pour les jeunes enfants. La base de données toxicologiques sur les trois groupes de neurotoxines issues des cyanobactéries n'est pas suffisante pour établir des valeurs-guide pour l'eau potable.

Pour l'anatoxine-a, des travaux en culture ont montré que les concentrations intra- et extracellulaires peuvent être du même ordre de grandeur.

**La cylindrospermopsine** est une cyanotoxine hépatotoxique primaire trouvée principalement chez l'espèce *Cylindrospermopsis raciborskii*, mais aussi récemment chez d'autres espèces, par exemple *Aphanizomenon*, *Anabaena* et *Raphidiopsis*. En Europe, la cylindrospermopsine n'a jusqu'ici été détectée qu'une seule fois, et il n'a pu être identifié clairement si elle avait été produite par *Cylindrospermopsis raciborskii* ou par d'autres espèces potentiellement productrices de cylindrospermopsine comme *Aphanizomenon*. (Ceci fera l'objet d'un projet soutenu par le KWB démarrant début 2004).

*Cylindrospermopsis raciborskii* est un « néophyte » en Europe, qui s'étend actuellement rapidement vers le nord. Sa présence a été reportée d'un certain nombre de pays, incluant la France et plus récemment les régions plus nordiques comme la Norvège. Sa niche écologique est assez similaire à celle de *Planktothrix agardhii*.

La cylindrospermopsine inhibe la synthèse des protéines, et sa toxicité est cumulative, c.à.d. qu'une dose administrée une fois sans effet pourra provoquer une maladie après une ingestion répétée. Comme pour l'anatoxine-a, une forte proportion de toxine est trouvée à l'extérieur de la cellule.

Une valeur-guide de 1 µg/L pour l'eau destinée à la consommation humaine proposée à l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) est en attente de validation.

**Les microcystines** sont des heptapeptides cycliques avec un acide aminé hautement spécifique (ADDA, jusqu'ici uniquement trouvé dans des microcystines). Environ 70 variantes structurelles présentant différentes toxicités sont connues, les deux d'entre elles les plus toxiques ayant une dose létale aigue DL<sub>50</sub> de 50 µg/ kg (poids du corps, i.p.). Elles bloquent des enzymes importantes (les protéines phosphatases 1 et 2a), surtout dans le foie. Les microcystines sont produites par les espèces *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* et *Nostoc*.

Les microcystines ont été au centre de l'attention de la recherche sur les cyanotoxines, car leur présence fréquente et leur toxicité chronique prononcée (pouvant notamment initier des tumeurs) sont un problème majeur pour la santé humaine. Bien que la plupart des risques sanitaires liés à l'eau proviennent des bactéries pathogènes, des virus et des protozoaires davantage que des substances

chimiques, les microcystines apparaissent plus fréquemment dans des concentrations à risque que la plupart des autres substances chimiques présentes dans l'eau et potentiellement dangereuses.

L'Organisation Mondiale pour la Santé a proposé une valeur-guide provisoire pour l'eau potable de 1 µg/L pour la microcystine la plus toxique, la microcystine-LR. Ceci est calculé pour une exposition à vie par rapport à des études sur des animaux durant plusieurs semaines, lors desquelles une exposition quotidienne de souris à 40 µg par kg (poids du corps) n'a provoqué aucun effet, contrairement à une exposition quotidienne à 200 µg par kg. La valeur-guide a été déterminée en utilisant des facteurs de sécurité tels que les humains ne soient pas exposés à plus d'1/1000<sup>e</sup> de 40 µg par kg du sujet. Cette valeur de 1 µg/L de microcystine-LR a également été fixée comme valeur limite de qualité pour les eaux potables en France par le décret n° 2001-1220 du 12/12/2001.

L'exposition lors d'activités de loisirs sous le climat européen est limitée, et l'ingestion orale est la plupart du temps de l'ordre de 100 mL plutôt que 1 à 2 L par personne. Des concentrations plus fortes de microcystines peuvent donc être tolérées. L'OMS suggère la valeur de 20 µg/L comme limite pour « restriction de la baignade » ; l'Allemagne recommande une « fermeture temporaire des sites de loisirs » pour des teneurs au-dessus de 100 µg/L.

**Les lipopolysaccharides** sont des composés constitutifs des parois cellulaires de toutes les bactéries à gram négatif, y compris les cyanobactéries. Par exemple, dans les salmonelles, ils sont la cause des symptômes de la fièvre typhoïde. Les lipopolysaccharides des cyanobactéries sont assez peu connus ; cependant, ils semblent être nettement moins toxiques que ceux de la salmonelle. Toutefois, il est possible que des symptômes d'irritation signalés parfois après exposition aux cyanobactéries, telles que des réactions dermatologiques, des infections des yeux, des oreilles, de la gorge et des tissus nasaux soient provoqués par leurs lipopolysaccharides. Très peu d'études sont disponibles, car elles sont difficiles à mettre en place : pour des résultats sans ambiguïtés, il faudrait utiliser des cultures ne contenant pas les autres bactéries présentes, mais ceci est difficile à obtenir et ces cultures se développent rarement bien.

La bioaccumulation des cyanotoxines, en particulier les microcystines, est un problème fréquemment évoqué mais peu étudié. Ce phénomène a été observé pour les moules. Pour les poissons, la bioaccumulation dans les tissus musculaires semble plutôt faible, ce qui n'est pas surprenant car les microcystines ne sont pas très lipophiles.

L'existence de nombreux autres métabolites dans les cyanobactéries est connue, mais leur activité biologique, leur toxicité et leur présence ne sont pas bien comprises. L'importance de cette toxicité supplémentaire, qui n'est pas liée aux cyanotoxines connues, fait actuellement l'objet de projets de recherche étudiant l'activité biologique et la toxicité des métabolites connus (par exemple dans le contexte du projet soutenu par l'Union Européenne « Peptides dans les cyanobactéries » coordonné par l'Agence Fédérale de l'Environnement).

# *Références bibliographiques*

---

**Etude sur les cyanobactéries dans l'Erdre**  
Travaux de recherche en laboratoire – LOTS 2 et 3

Rapport final KWB / UBA, Janvier 2004

### **Méthodes d'analyse (Lots 2 et 3)**

**ERHARD, M., DÖHREN H. v. and JUNGBLUT P.** (1997): Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. *Nature Biotechnology* 15:906-909.

**FASTNER, J., ERHARD M., CARMICHAEL W. W., SUN F., RINEHART K. L., RÖNICKE H. and CHORUS I.** (1999): Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the genera *Microcystis* and *Planktothrix* from German freshwaters. *Arch. Hydrobiol.* 145 : 147-163.

**LAWTON, L. A., EDWARDS, C. & CODD, G. A.** (1994): Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst.* 119: 1525-1530.

**UTERMÖHL, H.** 1958.: Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplanktonmethodik. *Mitt. Int. Ver. Limnol.* 9, 1-38.

### **Synthèse préliminaire sur l'impact de la limitation en N et P sur le contenu de microcystine cellulaire (Lot 3, I.2.2)**

**CODD, G.A. & POON, G.K.** (1988) Cyanobacterial toxins. in: Rogers, L.J. & Gallon, J.R. (eds.) *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe – Biochemistry of the algae and cyanobacteria.* Clarendon Press, Oxford, 283-296

**HESSE, K. & KOHL, J.G.** (2001) Effects of light and nutrient supply on growth and microcystin content of different strains of *Microcystis aeruginosa*. in: Chorus, I. (Ed.) *Cyanotoxins – occurrence, causes, consequences.* Springer, Berlin Heidelberg, 104-115

**LEE, S.J.; JANG, M.H.; KIM, H.S.; YOON, B.D. & OH, H.M.** (2000) Variations of microcystin content of *Microcystis aeruginosa* relative to medium N:P ratio and growth stage. *J. Appl. Microbiol.* 89, 323-329

**LEHTIMÄKI, J.; SIVONEN, K.; LUUKKAINEN, R. & NIEMELÄ, S.I.** (1994) The effects of incubation time, temperature, light, salinity, and phosphorus on growth and hepatotoxin production by *Nodularia* strains. *Arch. Hydrobiol.* 130/3, 269-282

**LONG, B.M.; JONES, G.J. & ORR, P.T.** (2001a) Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Appl. Environ. Microbiol.* 67/1, 278-283

**LONG, B.M.** (2001b) The influence of growth conditions on the intracellular microcystin quota of *Microcystis aeruginosa*. PhD Thesis, La Trobe University, Bundoora

**OH, H.M.; LEE, S.J.; JANG, M.H. & YOON, B.D.** (2000) Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat. *Appl. Environ. Microbiol.* 66/1, 176-179

**RAPALA, J.; SIVONEN, K.; LYRA, C. & NIEMELÄ, S.I.** (1997) Variations of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Appl. Environm. Microbiol.* 63/6, 2206-2212



**SIVONEN, K.** (1990) Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. Appl. Environ. Microbiol. 56/9, 2658-2666

**SONG, L.; SANO, T.; Li, R.; WATANABE, M.; LIU, Y. & KAYA, K.** (1998) Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. Phycol. Res. 46 (Suppl.), 19-23

**UTKILEN, H. & GJØLME, N.** (1995) Iron stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 61/2, 797-800

**WATANABE, M.F. & OISHI, S.** (1985) Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. Appl. Environ. Microbiol. 49/5, 1342-1344

### **Impact de la lumière**

**BÖTTCHER, G., CHORUS, I., EWALD, S., HINZE, H., WALZ, N.** 2001: Light-limited growth and microcystin content of *Planktothrix agardhii* and *Microcystis aeruginosa* in turbidostats. In: Chorus, I. (ed.): Cyanotoxins – Occurrence, Causes, Consequences. Springer, Berlin, 357 pp.

### **Rôle des sédiments (Lot 2, III)**

**[1] BARBE J., LAVERGNE E., ROFES G., LASCOMBE M., RIVAS, BERNARD Ch., De BENEDITTIS J.** (1990) « Diagnose rapide des plans d'eau », Informations techniques du CEMAGREF, 79, pp 1-8

**[2] BRUNBERG A.K., BLOMQUIST P.,** 2002. „Benthic overwintering of *Microcystis* colonies under different environmental conditions”. J. Plankton Res. 24:1247-1252.

**[3] CAVALCANTE S.** (1995) « Etude sur la mobilisation du phosphore, des formes azotées et de quelques métaux associés dans les vases eutrophes : experimentation sur les vases de l'Erdre « in situ » et en laboratoire»

**[4] CHORUS I., BARTRAM J.,** (1999) “Toxic Cyanobacteria in Water : a guide to their public health consequences, monitoring and management” Organisation Mondiale pour la Santé (OMS), 1999. [http://www.who.int/docstore/water\\_sanitation\\_health/toxicyanobact/begin.htm](http://www.who.int/docstore/water_sanitation_health/toxicyanobact/begin.htm)

**[5] CRC-FE** (Cooperative Research Centre for Freshwater Ecology, Australia), (2000) “Quantifying nutrient-algae relationships in freshwater systems”. Technical report n° 8/2000, November 2000  
[http://enterprise.canberra.edu.au/WWW/www-directreps.nsf/5918f95283aa103d4a256658001a500a/11c76c5925e349bccca2569dc001f76dc/\\$FILE/Quantifying+Nutrient.pdf](http://enterprise.canberra.edu.au/WWW/www-directreps.nsf/5918f95283aa103d4a256658001a500a/11c76c5925e349bccca2569dc001f76dc/$FILE/Quantifying+Nutrient.pdf)

**[6] HÖLL K., GROHMANN A.,** „Wasser“, Editions Walter de Gruyter, 2002

**[7] HOUSE W. A. House and DENISON F. H.** “Phosphorus dynamics in a lowland river.” Wat.Res. 32 (6):1819-1830, 1998.

**[8] HUPFER M., SCHARF B.W.,** „Seentherapie: Interne Massnahmen zur Verminderung der Phosphorkonzentration“, Handbuch Angewandte Limnologie, VI-2.1., 14. Erg.Lfg. 4/02

- [9] JEPPESEN E., JENSEN J.P., SONDERGAARD M., LAURIDSEN T., PEDERSEN L.J., JENSEN L. (1997) "top-down control in freshwater lakes: the role of nutrient state, submerged macrophytes and water depths". *Hydrobiologia* 342/343, 151 - 164
- [10] JEPPESEN E., SONDERGAARD Ma, SÖNDERGAARD Mo., CHRISTOFFERSEN K. (Hsg.) „The structuring role of submerged macrophytes in lakes. *Ecological Studies*". Springer Vlg. Heidelberg. 131 pp
- [11] JUNGO E., VISSER P.M., STROOM J., MUR L.R. "Artificial mixing to reduce growth of the blue-green alga *Microcystis* in Lake Nieuwe Meer, Amsterdam : an evaluation of 7 years of experience". *Water Science and Technology : Water Supply* Vol 1 No 1 pp 17-23 (2001)
- [12] KOSKI-VÄHÄLÄ J. "Role of resuspension and silicate in internal phosphorus loading" Academic dissertation in limnology, University of Helsinki, 2001.  
<http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/limno/vk/koski-vahala/>
- [13] LEWANDOWSKI „Untersuchungen zum Einfluss seeinterner Verfahren auf die Phosphor-Diagenese in Sedimenten“, thèse de doctorat 2002  
<http://dochostrz.hu-berlin.de/dissertationen/lewandowski-joerg-2002-12-06/PDF/Lewandowski.pdf>
- [14] McDOWELL R. W., SHARPLEY A. N. and CHALMERS A. T., "Land use and flow regime effects in phosphorus chemical dynamics in the fluvial sediment of the Winooski River", Vermont. *Ecological Engineering* 18:477-487, 2002.
- [15] MDBC (Murray-Darling Basin Commission, Australia). "The Darling River : algal growth and the cycling and sources of nutrients" Project report 1999  
[http://www.mdbc.gov.au/naturalresources/policies\\_strategies/algalgrow\\_project.html](http://www.mdbc.gov.au/naturalresources/policies_strategies/algalgrow_project.html)
- [16] RUBAN V.. "Prise en compte du phosphore des sédiments pour une meilleure gestion des écosystèmes aquatiques. Application à la retenue hydroélectrique de Bort-les-orgues (Massif central) »  
Colloque 24° journées de l'hydraulique, Paris, 18-20 sept 1996  
Agence de l'eau Adour-Garonne, centre de documentation (<http://www.eaufrance.com>)
- [17] RÜCKER J., WIEDNER C., ZIPPEL P. (1997) (Brandenburg Technical University Cottbus, Faculty Environmental Sciences, Waterprotection) "Factors controlling the dominance of *Planktothrix agardhii* and *Limnothrix redekei* in eutrophic shallow lakes" *Hydrobiologia* 342/343 : 107-115, 1997.
- [18] SCHAUSER I., LEWANDOWSKI J., HUPFER M., „Decision support for the selection of an appropriate in-lake measure to influence the phosphorus retention in sediments“, *Water Research* 37 (2003) 801-812.
- [19] SETUDE Ingénieur Conseil, Juillet 2003, Rapport Lot 1, Etude Globale des Cyanobactéries dans l'Erdre
- [20] SONDERGAARD M., JENSEN J.P., JEPPESEN E. « Retention and internal loading of phosphorus in shallow, eutrophic lakes », *The Scientificworld* (2001) 1, 427-442
- [21] SOUTH FLORIDA WATER MANAGEMENT DISTRICT, "Goals and Performance Measures, Lake Okeechobee Sediment - Management Feasibility Study", Technical report, 2001. [http://www.sfwmd.gov/org/wrp/wrp\\_okee/projects/final\\_goals/final\\_goals.pdf](http://www.sfwmd.gov/org/wrp/wrp_okee/projects/final_goals/final_goals.pdf)

**[22] Syndicat des Eaux d'Ile de France (2001)** "Assessment of risks to drinking water production due to cyanobacterial growth in Seine basin rivers", Consultancy study carried out by the Australian Water Quality Centre and the University of Adelaide for the Syndicat des Eaux d'Ile de France, final report

**[23] UNEP-IETC** (United Nations Environment Programme – International Environmental Technology Centre) "Planning and Management of Lakes and Reservoirs : An Integrated Approach to Eutrophication". Technical publication  
<http://www.unep.or.jp/ietc/publications/techpublications>

**[24] VAN BEUSEKOM J. E. E. and BROCKMANN U. H.** „Transformation of phosphorus in the Elbe Estuary". Estuaries 21 (4A):518-526, 1998.

**[25] WEBSTER I. T., FORD P. W. and HANCOCK G.** (2001): "Phosphorus dynamics in Australian lowland rivers". Marine and Freshwater Research 52: 127-137.

**[26] WIEDNER C.** „Toxische und nicht-toxische Cyanobakterien in Gewässern der Scharmützelseeeregion : ihr Vorkommen in Gewässern unterschiedlicher Trophie und Morphometrie und Steuermechanismen ihrer Dynamik in polymiktischen Flachseen". Ph-D. Thesis, Brandenburg Technical University Cottbus, 1999.  
[http://www.ub.tu-cottbus.de/hss/diss/fak4/wiedner\\_c/](http://www.ub.tu-cottbus.de/hss/diss/fak4/wiedner_c/)

**[27] WIEDNER C., NIXDORF B., HEINZE R., WIRSING B., NEUMANN U., WECKESSER J.** (Brandenburg Technical University Cottbus, Faculty Environmental Sciences, Waterprotection.). (2002) "Regulation of cyanobacteria and microcystin dynamics in polymictic shallow lakes", Arch. Hydrobiol. 155 3 : 383-400 (October 2002)

**[28] WORKSHOP „Cyanobacteria in sediments“, Umweltbundesamt, Berlin, 20.08.2003**

Nous remercions **M. HUPFER** (Institut d'Ecologie et des Pêcheries d'eau douce, Berlin, spécialiste des procédés biogéochimiques dans les sédiments, liés en particulier au phosphore et à la restauration de lacs eutrophes) pour ses conseils sur la question du recyclage de phosphore dans les sédiments.

#### ***Impact des pesticides sur le développement des cyanobactéries (Lot 2, IV)***

**BUENO M. et al**, 2003, "Effects of lindane on the photosynthetic apparatus of the cyanobacterium *Anabaena*", <http://www.scientificjournals.com/sj/espr/Abstract/ArtikelId/6137>

**ECOTOX**, Ecotoxicology Database, Environmental Protection Agency (US)  
<http://www.epa.gov/ecotox/>

**GIOVANNI R.**, 1998, « Produits phytosanitaires et milieux aquatiques », Colloque Pesticides de l'association « Eau et Rivières de Bretagne », <http://assoc.wanadoo.fr/erb/colqP7.htm>

**KURITZ T., WOLK P.**, 1995, „Use of filamentous cyanobacteria for biodegradation of organic pollutants", Applied and Environmental Microbiology, Jan. 1995, p 234-238  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=167278&action=stream&blobtype=pdf>

**LAMPERT W. et al**, 1989, « Herbicide effects on planktonic systems of different complexity". Hydrobiologia 188/189, 415-424.

**LEGUBE B.**, 1996, « Traitement des eaux de surface pour la production d'eau potable », Partie 2 p 119, Guide technique de l'Agence de l'Eau Loire-Bretagne.

**MITCHELL G.C. et al**, 1993, "Effects of lindane on macroinvertebrates and periphyton in outdoor artificial streams", *Ecotoxicol. Environ. Safety* 25, 90-102.

**MONOD G.**, 1998, « Dangers des pesticides pour les organismes aquatiques – difficultés rencontrées pour l'estimation des effets en milieu naturel », Colloque Pesticides de l'association « Eau et Rivières de Bretagne », <http://assoc.wanadoo.fr/erb/colqP8.htm>