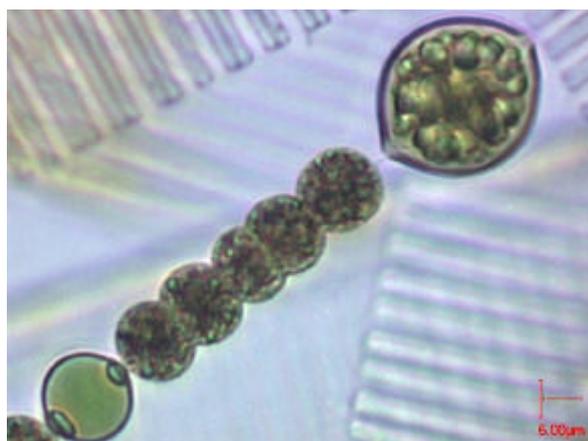


**Département de la Loire Atlantique  
Entente pour le Développement de l'Erdre Navigable**

---

**Etude du développement des cyanobactéries  
Etude des toxines liées aux cyanobactéries  
(lots 2 - 3)**



**Rapport de recherche en laboratoire**

E 02102 – Avril 2004



11 boulevard Pershing  
75858 Paris Cedex 17  
Téléphone : (1) 45 72 97 60  
Télécopie : (1) 45 72 97 63  
E.Mail : setude@setude.com

## sommaire

---

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>2</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>4</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>6</b>
<b>I. ROLE DES VASES DANS LA PROLIFERATION DES CYANOBACTERIES</b> .....	<b>7</b>
I.1. INFLUENCE DU RECYCLAGE INTERNE DE NUTRIMENTS.....	8
I.1.1. <i>Evaluation du stock de phosphore dans les vases de l'Erdre</i> .....	8
I.1.2. <i>Actions éventuelles sur le recyclage interne</i> .....	10
I.1.3. <i>Les formes de nutriments</i> .....	13
I.1.4. <i>Mécanismes de recyclage</i> .....	14
I.1.5. <i>Méthodologie pour estimer l'importance du recyclage interne</i> .....	18
I.2. INFLUENCE D'UNE REMISE EN SUSPENSION DES CYANOBACTERIES CONTENUES DANS LES SEDIMENTS .....	23
I.2.1. <i>Analyse de la présence de cyanobactéries dans les sédiments de l'Erdre en hiver</i> .....	23
I.2.2. <i>Resuspension des cyanobactéries dans la colonne d'eau</i> .....	25
I.3. RESULTATS DE L'ANALYSE DU REJET POTENTIEL DE MICROCYSTINE PROVENANT DES SEDIMENTS DE L'ERDRE ...	26
I.3.1. <i>Objectif</i> .....	26
I.3.2. <i>Caractérisation des échantillons de sédiments</i> .....	27
I.3.3. <i>Analyse des concentrations de microcystine dans les échantillons de sédiments de l'Erdre</i> 30	
I.3.4. <i>Tests sur l'adsorption, la dégradation et le relargage de microcystine</i> .....	30
I.4. CONCLUSION SUR LE ROLE DES SEDIMENTS .....	31
<b>II. FACTEURS LIMITANT LA CROISSANCE ET LE CONTENU EN TOXINES DES SOUCHES DE PLANKTOTHRIX AGARDHII DANS L'ERDRE</b> .....	<b>32</b>
II.1. OBJECTIFS .....	32
II.2. PLAN D'EXPERIMENTATIONS.....	33
II.3. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES SOUCHES DE <i>PLANKTOTHRIX AGARDHII</i> DE L'ERDRE.....	35
II.3.1. <i>Protocole expérimental</i> .....	35
II.3.2. <i>Résultats : spectre MALDI-TOF des souches isolées</i> .....	36
II.4. IMPACT DU PHOSPHORE ET DE L'AZOTE SUR LA CROISSANCE DES SOUCHES DE <i>PLANKTOTHRIX</i> ISOLEES DE L'ERDRE .....	39
II.4.1. <i>Objectif</i> .....	39
II.4.2. <i>Méthode</i> .....	39
II.4.3. <i>Résultats</i> .....	39
II.5. IMPACT DU PHOSPHORE ET DE L'AZOTE SUR LE CONTENU EN MICROCYSTINE CELLULAIRE DE <i>PLANKTOTHRIX AGARDHII</i> .....	42
II.5.1. <i>Objectifs</i> .....	42
II.5.2. <i>Contexte scientifique et synthèse bibliographique</i> .....	42
II.5.3. <i>Expériences en cultures batch</i> .....	48
II.5.4. <i>Expériences en cultures continues</i> .....	49
II.6. INFLUENCE DE L'ECLAIREMENT .....	53
II.7. CONCLUSION SUR LES FACTEURS LIMITANTS POUR <i>PLANKTOTHRIX AGARDHII</i> .....	54

<b>III. IMPACT DE LA VITESSE D'ÉCOULEMENT SUR LA CROISSANCE ET LE CONTENU EN TOXINES DE <i>PLANKTOTHRIX AGARDHII</i></b> .....	<b>55</b>
III.1. OBJECTIFS .....	55
III.2. EXPERIENCES DE LABORATOIRE PAR AGITATION CONTINUE EN APPAREIL DE JAR-TEST .....	56
<i>III.2.1. Méthode</i> .....	56
<i>III.2.2. Résultats</i> .....	57
III.3. SIMULATIONS D'ÉCOULEMENT EN RIVIERE ARTIFICIELLE .....	62
<i>III.3.1. Approche</i> .....	62
<i>III.3.2. Résultats</i> .....	69
III.4. CONCLUSION SUR L'IMPACT DE LA VITESSE D'ÉCOULEMENT .....	72
<b>IV. IMPACT EVENTUEL DES PESTICIDES ET PRODUITS PHYTOSANITAIRES SUR LES CYANOBACTERIES</b> .....	<b>73</b>
<b>V. CONTEXTE SCIENTIFIQUE ACTUEL SUR LES TOXINES ET LES RISQUES SANITAIRES ASSOCIES</b> .....	<b>74</b>
<b>VI. CONCLUSION GENERALE SUR LES TRAVAUX DE RECHERCHE</b> .....	<b>77</b>
<b>VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>79</b>

## 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 agardhii* de l'Erdre, à l'aide d'expériences et des sources bibliographiques disponibles.

Les résultats des cultures en laboratoire ont montré que des conditions limitées en nutriments provoquent peuvent favoriser la prédominance de certains génotypes ayant des besoins réduits parmi la population de *Planktothrix agardhii*. Dans l'état actuel des connaissances scientifiques, on ne peut toutefois déceler des différences de compétition entre *Planktothrix agardhii* 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). Des résultats publiés précédemment montrent que la limitation de l'éclairement modifie le contenu en microcystine de *Planktothrix agardhii* (et des autres espèces de cyanobactéries) au plus d'un facteur 2-3. 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 de relargage 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 research in cooperation with the German Federal Environmental Agency (UBA), about 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, both through experiments and through use of available literature.

Results from the lab-scale cultures showed that nutrient-limited conditions 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. Previous literature results show that for *Planktothrix* (as well as for other cyanobacterial genera) light limitation changes microcystin content at most by a factor of 2-3. 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 has no substantial impact on *Planktothrix* growth and microcystin release. Only a short transition phase with release effects was observed.

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 et pour le lot 3.

---

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

## I. 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 éclairage), 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 :

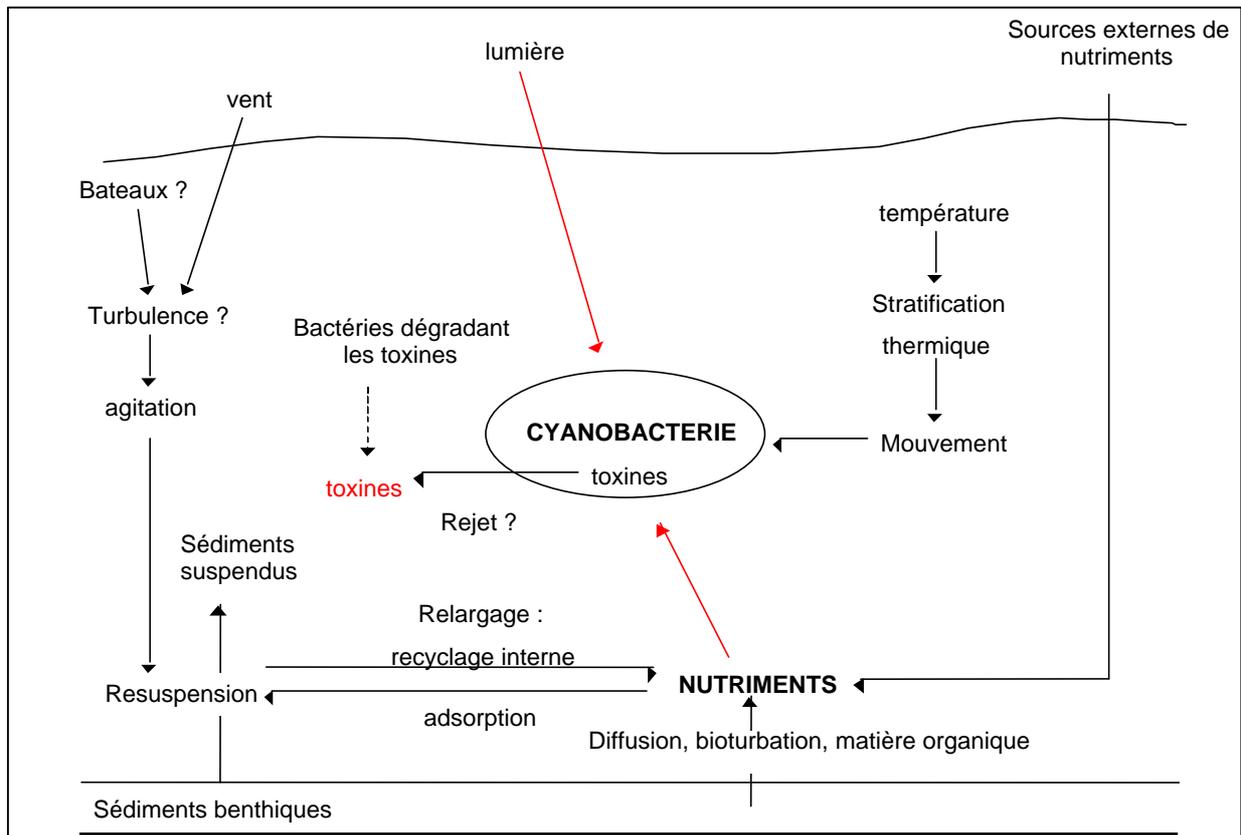


Figure 1 : Principaux facteurs favorisant la croissance de cyanobactéries

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*.

## I.1. Influence du recyclage interne de nutriments

### I.1.1. Evaluation du stock de phosphore dans les vases de l'Erdre

#### ▪ 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 :

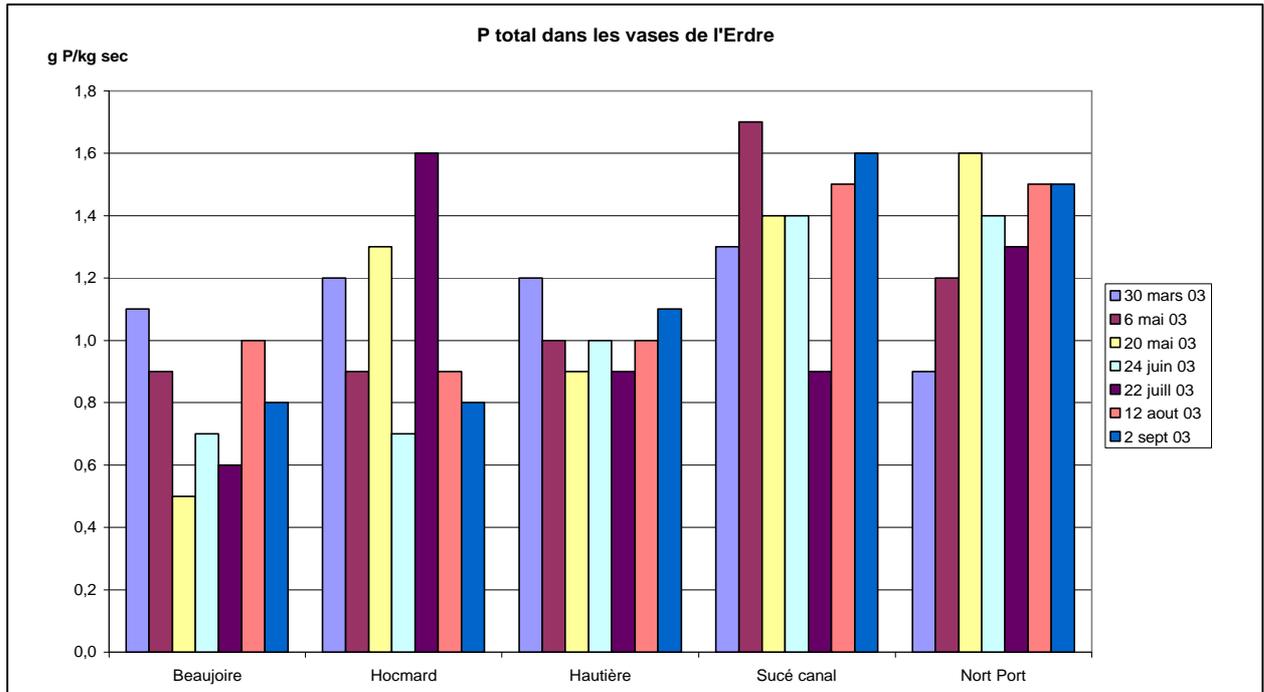


Figure 2 : Concentrations en phosphore total des vases de l'Erdre en 2003

La concentration moyenne en P total dans les vases sèches est de 1,1 g P total/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 [BARBE *et al*] 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 %

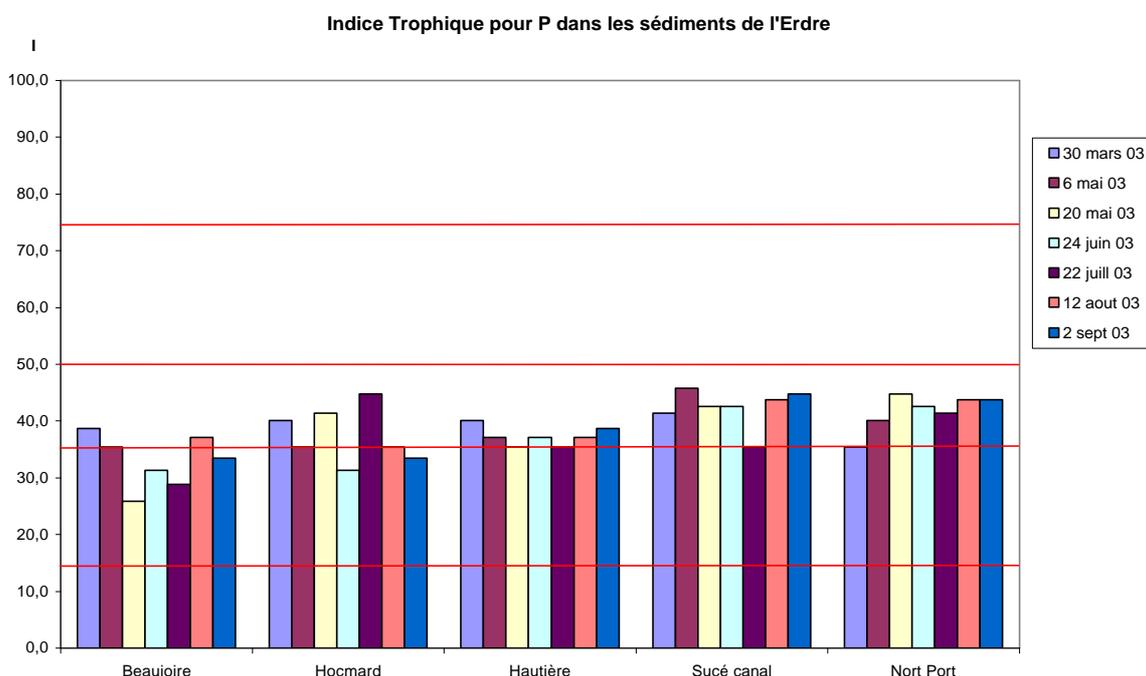
La grille d'évaluation est la suivante :

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 cana	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 1 : Indice trophique de l'Erdre (à partir de la concentration en P des vases)**



**Figure 3 : 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.

Les observations de l'année 2003 sur la rivière ont montré qu'en l'absence d'apports notables de nutriments (la quasi-absence de précipitations pendant l'été a provoqué un fonctionnement de l'Erdre similaire à celui d'un plan d'eau fermé), le développement des cyanobactéries restait modeste, et les teneurs en phosphore dissous étaient très faibles. L'existence de phénomènes notables de relargage aurait entraîné des pics de phosphore, qui n'ont pas été observés. Ceci corrobore le fait que le relargage de phosphore par les vases est, en l'état actuel, négligeable sur l'Erdre.

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 en 1995 [CAVALCANTE] portant sur Sucé-sur-Erdre et la plaine de Mazerolles.

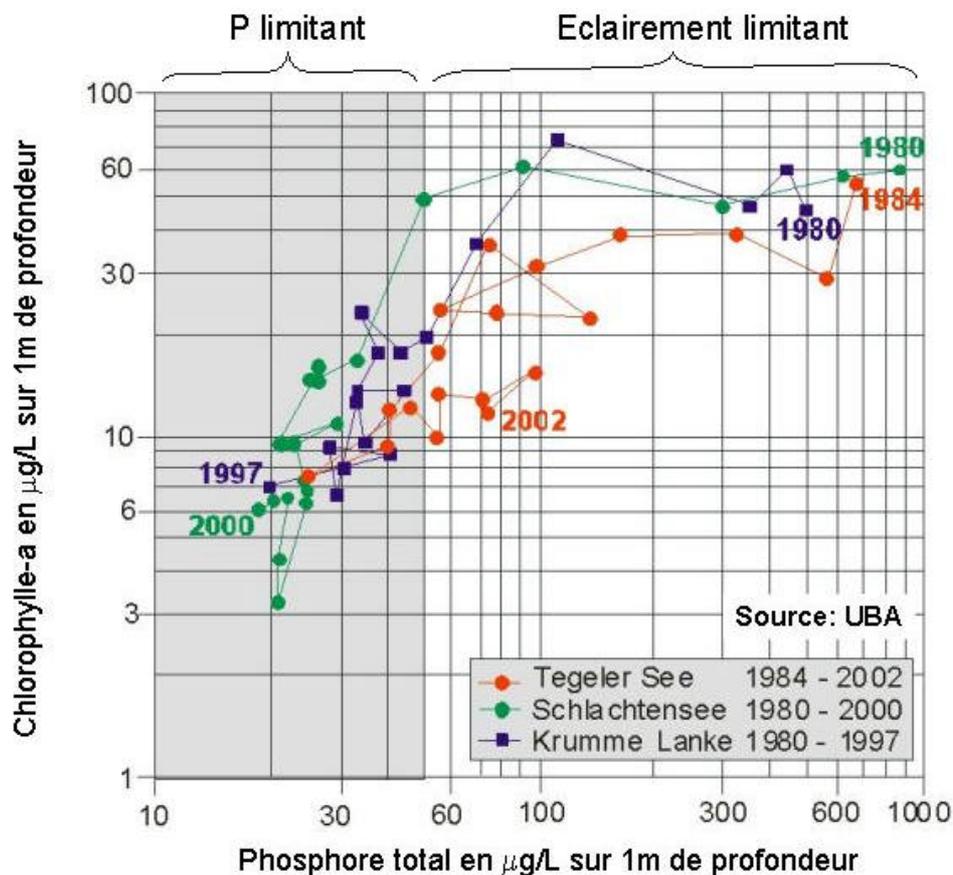
Le phénomène de recyclage interne à partir des vases de l'Erdre est donc globalement beaucoup moins important que les apports externes (détaillés dans le lot 1 de l'étude). C'est donc sur ces apports exogènes que doivent porter les actions en priorité.

### I.1.2. 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  $\mu\text{g P/L}$** .

Cette limite est issue des observations faites par les scientifiques de l'Agence Fédérale de l'Environnement (UBA) dans des lacs peu profonds de la région de Berlin par le suivi des concentrations en biomasse (chlorophylle-a) en fonction des concentrations en phosphore total pendant une vingtaine d'années :



**Figure 4 : Evolution des concentrations en chlorophylle-a en fonction de la concentration en phosphore total dans 3 lacs peu profonds de la région de Berlin de 1980 à 2002 [CHORUS et al].**

Tant que la concentration en phosphore totale est supérieure à 50  $\mu\text{g P/L}$ , la concentration en chlorophylle-a ne diminue pas et c'est la lumière qui représente un facteur potentiel pour limiter la biomasse. En revanche, l'abaissement de la concentration en phosphore total en dessous du seuil de 50  $\mu\text{g P/L}$  permet d'observer une diminution de la biomasse : le phosphore devient alors limitant.

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

## 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 :

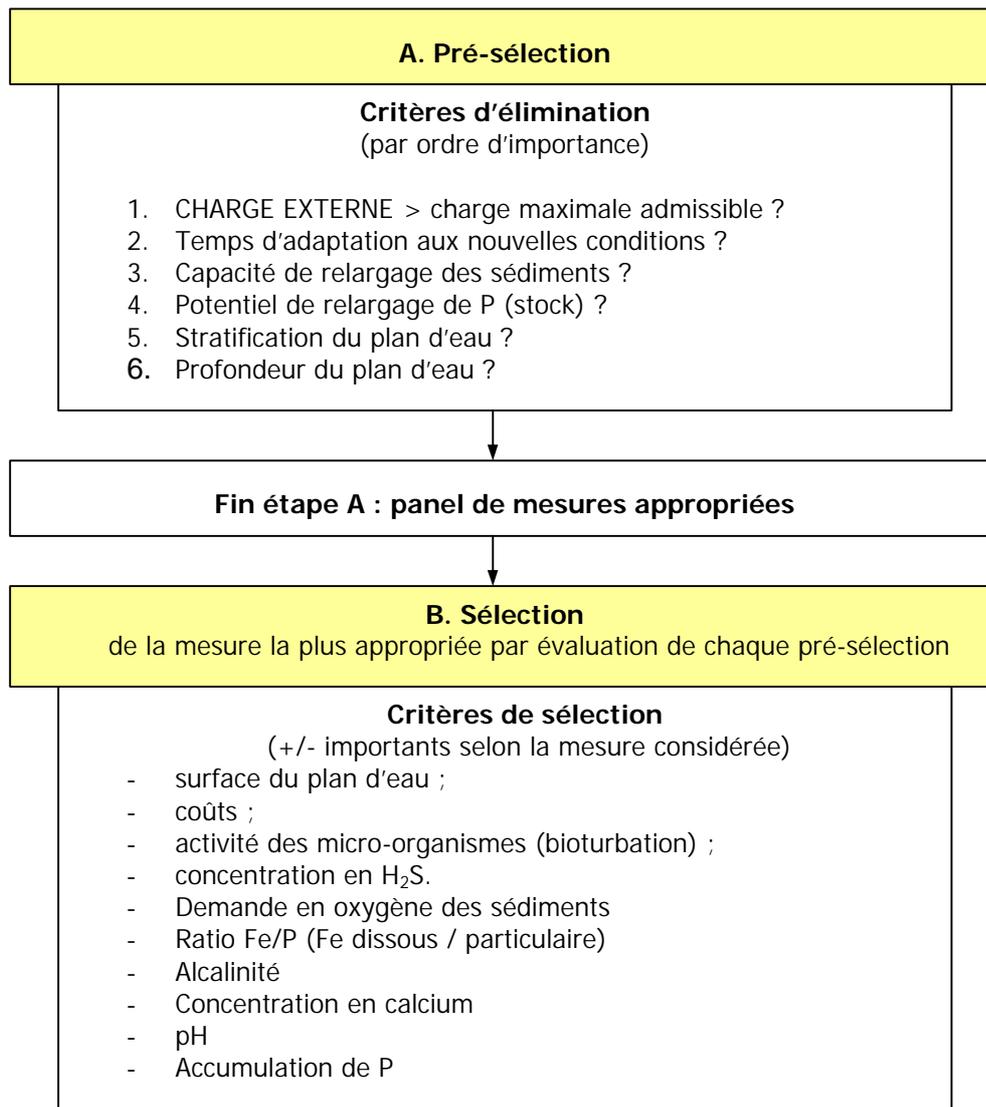
- Les gradients de concentrations dans les sédiments (diffusion)
- La spéciation des formes de phosphore pour quantifier le phosphore biodisponible
- Les isothermes de désorption sur les sédiments resuspendus

## 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 ([CAVALCANTE], [HUPFER *et al*], [MDBC], [SCHAUSER *et al*], [SONDERGAARD *et al*]). Les principales mesures utilisables sont :

- 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* 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 5).



**Figure 5 : Sélection de mesures contre le relargage interne de phosphore  
(d'après SCHAUSER *et al*)**

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 [**South Florida Water Management District**]. 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.

### I.1.3. Les formes de nutriments

#### Phosphore

Différentes formes de phosphore co-existent [**Syndicat des eaux d'Ile de France**]:

Phosphore			
dissous		particulaire	
organique	inorganique $\text{PO}_4^{3-}$ (orthophosphates)	organique	inorganique
		Dans le plancton ou les détritrus	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 [**MDBC**]. De plus, le phosphore particulaire organique est relargué sous forme de détritrus 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) [**RUBAN**]. 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.

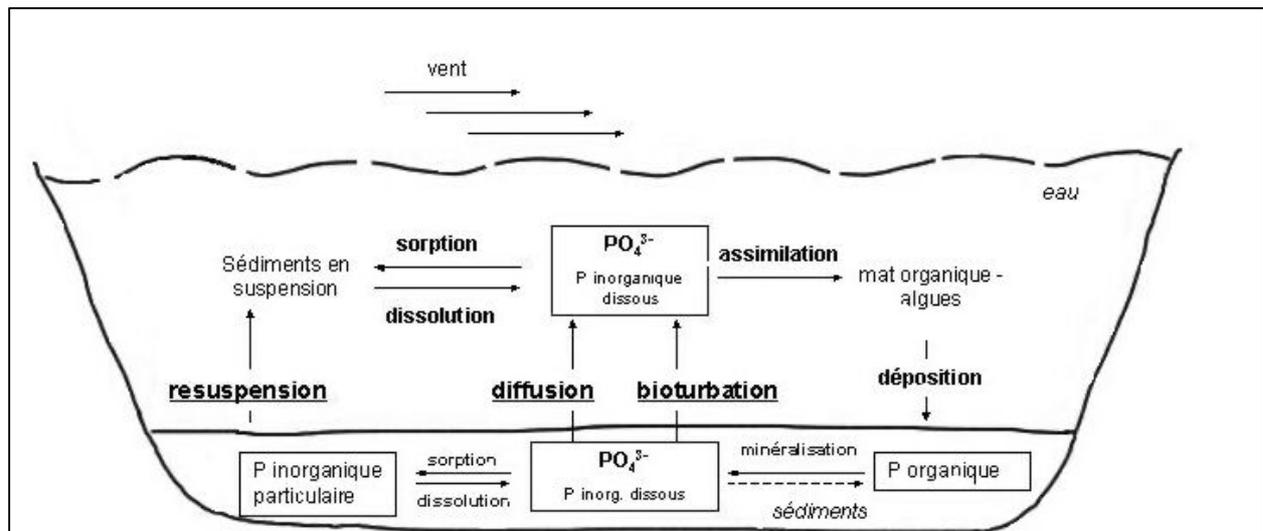
### I.1.4. Mécanismes de recyclage

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 6 : Principaux processus de recyclage interne du phosphore (source : [South Florida Water Management District])**

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  $PO_4$  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 [CRC-FE] 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 [KOSKI-VÄHÄLÄ] [SONDERGAARD *et al*] [WIEDNER *et al*, BTU].

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 : **[KOSKI-VÄHÄLÄ] [SONDERGAARD et al]**

- 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 **[WIEDNER]**. 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 **[WIEDNER]**. 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 oxygène.

### 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 **[UNEP-IETC]**. 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 **[RUBAN] [UNEP-IETC]**.

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 **[WORKSHOP UBA]**.

#### 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 **[SONDERGAARD *et al*]**. 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 » **[HÖLL] [JEPPESEN *et al*]**.

#### d) Synthèse

L'action de ces facteurs physiques, chimiques et biologiques sur les mécanismes d'échange du phosphore est résumée dans le tableau 2.

Facteurs physiques		Mécanisme concerné
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 Sorption/Dissolution
Facteurs chimiques		Mécanisme concerné
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) Sorption/dissolution
Conditions redox	Conditions oxydantes favorisent sorption	Sorption/ 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 $\text{NO}_3^-$ favorise sorption	
pH	Influence réactions d'échange	
Facteurs biologiques		Mécanisme concerné
Organismes aquatiques dans les sédiments	Déplacent les couches de sédiments	Transport et assimilation du stock de P dans les sédiments
Macrophytes submergés	Rejet d' $\text{O}_2$	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 2 : Rôle des facteurs physiques, chimiques et biologiques sur la dynamique du phosphore dans un système aquatique (synthèse)**

### I.1.5. 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 (notamment [HOUSE] [LEWANDOWSKI] [McDOWELL *et al*] [VAN BEUSEKOM *et al*] [WEBSTER *et al*] [WIEDNER]).

[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.

#### 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 :

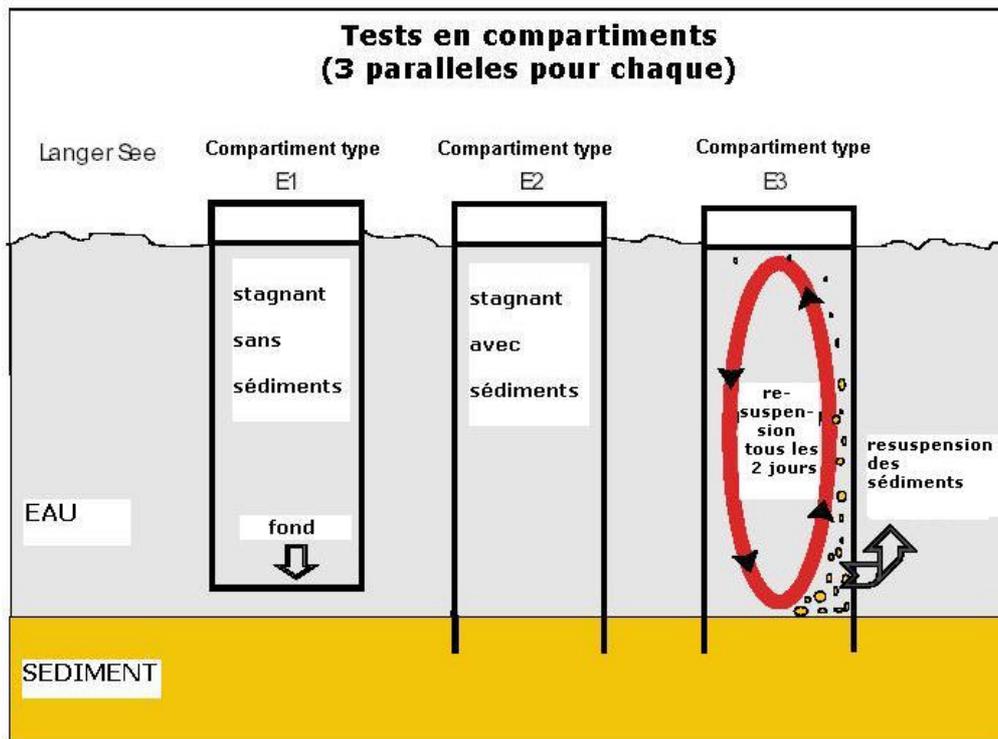
1. En cas de mélange régulier de l'eau menant à une resuspension des sédiments, une charge de nutriments plus importante est provoquée que lors d'une stagnation prolongée de la colonne d'eau, et la croissance de *Planktothrix agardhii* est favorisée par rapport à *Limnothrix*.
2. Lors d'une stagnation 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 7 présente ces diverses situations.



**Figure 7 : Tests de resuspension des sédiments dans le Langer See [WIEDNER]**

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 (1<sup>ère</sup> 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 <sup>2</sup> /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)

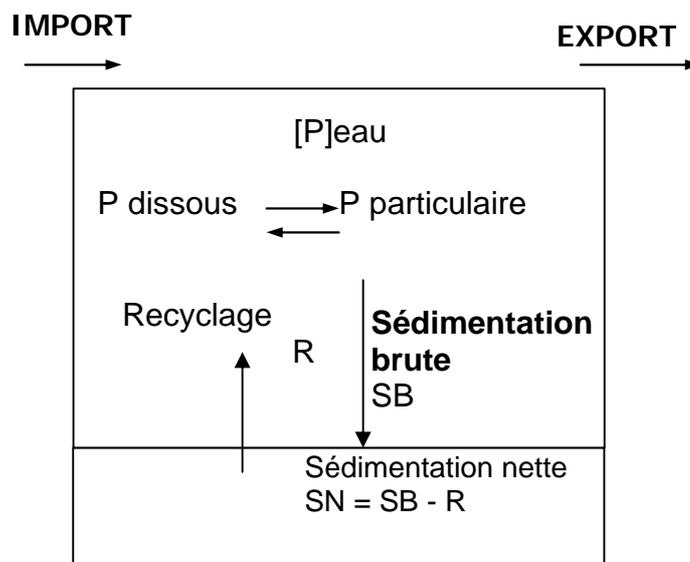
Les concentrations de phosphore dues à la diffusion ne dépendent pas que de la concentration en phosphore dans les sédiments. HUPFER a montré qu'il n'y a pas de corrélation directe entre concentration dans les sédiments et concentrations dans la colonne d'eau, tout dépend des conditions du milieu. En 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 8 (page suivante).



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

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 [HÖLL] ont montré que des concentrations en phosphore bien en dessous de 50 µg/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 µg/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 [CAVALCANTE], [MDBC], [SONDERGAARD et al], [South Florida Water Management District]).

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 [SONDERGAARD et al]. Ces techniques peuvent se révéler assez coûteuses et ne sont pas toujours efficaces [MDBC].

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.

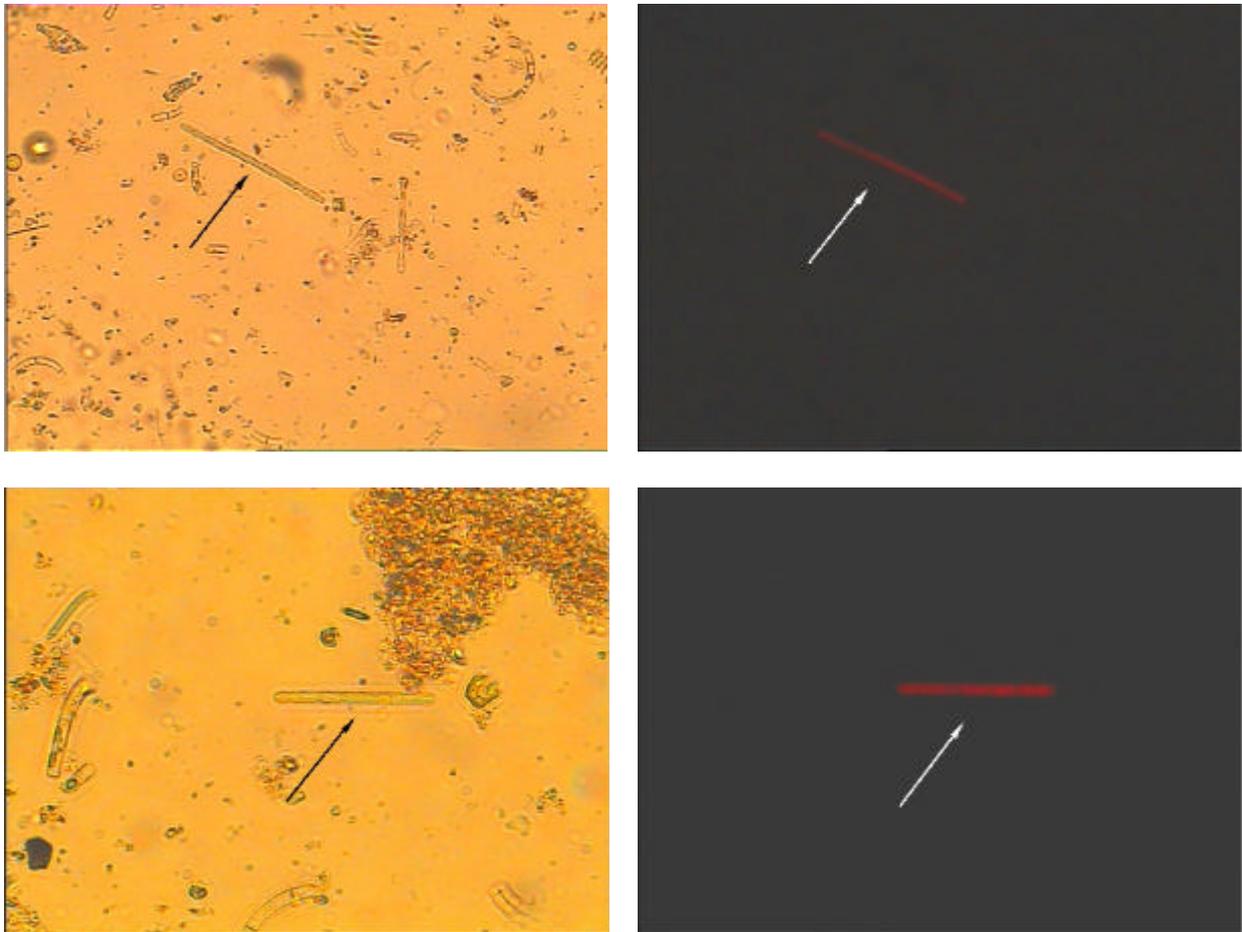
## I.2. Influence d'une remise en suspension des cyanobactéries contenues dans les sédiments

### I.2.1. 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 contenant les 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. Une quantification n'a pas été envisagée, car celle-ci nécessite des méthodes de laboratoire plus intensives ; l'approche choisie ici ne propose qu'une appréciation brute de la quantité de filaments vivants.

Du 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 9.



**Figure 9 : 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 [BRUNBERG et al].

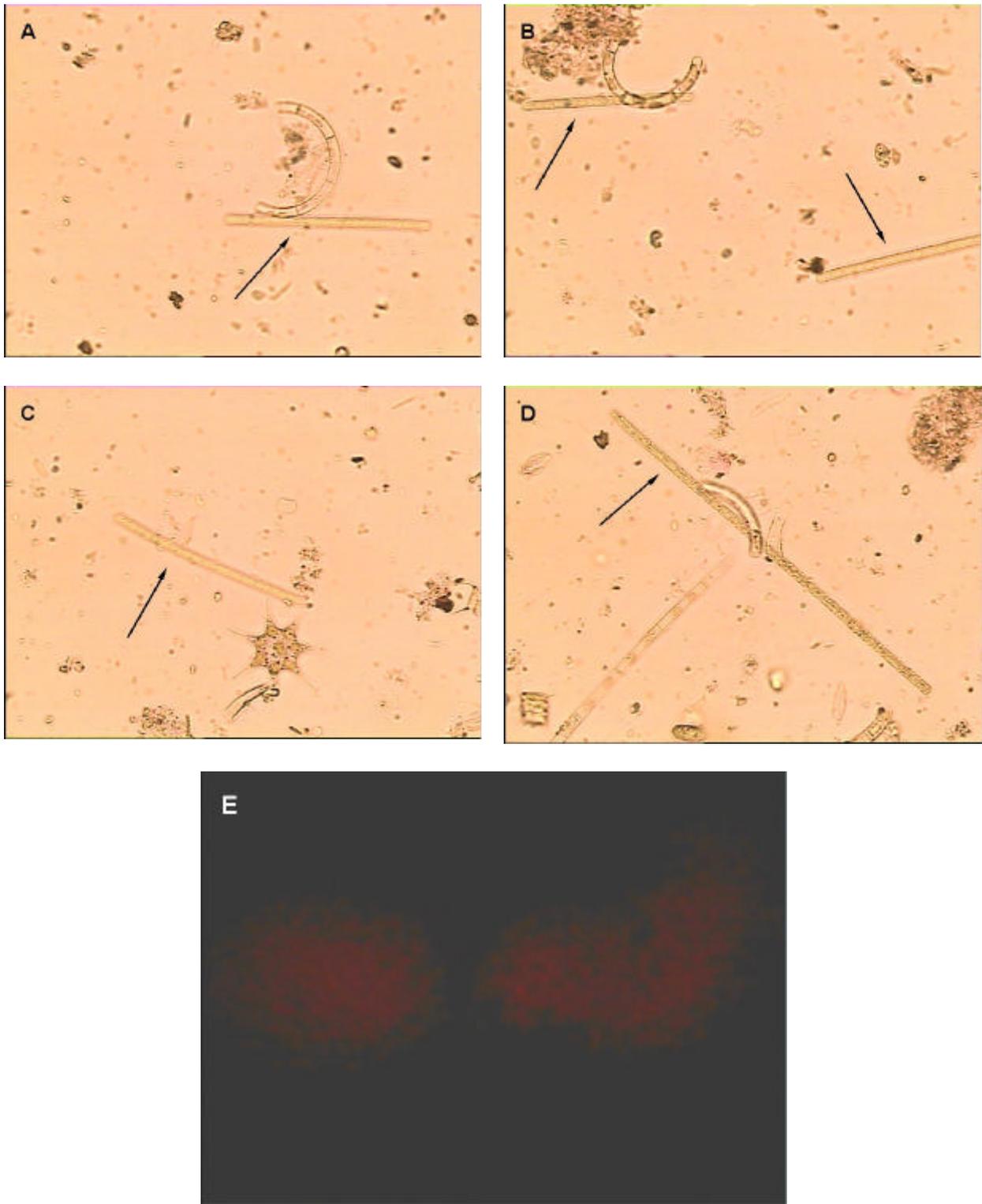


Figure 10 : Autres exemples d'échantillons de sédiments contenant des cyanobactéries en hiver : *Planktothrix* (A-D) et *Microcystis* (E).

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 ( $< 1 \text{ cm}^3$ ).

### **I.2.2. Resuspension des cyanobactéries dans la colonne d'eau**

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.

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 **[SONDERGAARD et al], [WORKSHOP UBA]**. 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 et leur recrutement l'été suivant. Une grande quantité de 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 micro-organismes.

L'analyse des sédiments a montré que *Planktothrix agardhii* survit dans les sédiments de l'Erdre en période hivernale. On peut estimer que la quantité de cellules observées pourrait être suffisante pour initier le développement de *Planktothrix agardhii* lors de la prochaine période de croissance algale : l'évaluation microscopique visuelle a été faite sur des filaments issus de 1 mL d'échantillon de sédiments (voir les pages précédentes), et un nombre significatif de filaments vivants (fluorescents) a été détecté dans ce faible volume.

## I.3. Résultats de l'analyse du rejet potentiel de microcystine provenant des sédiments de l'Erdre

### I.3.1. Objectif

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.

L'approche expérimentale est présentée dans le tableau ci-dessous.

Objectifs des expériences avec leur importance pour l'Erdre	Approche expérimentale Paramètres étudiés	Détails sur les protocoles
<p><b>Impact des sédiments sur les concentrations en microcystine dans la colonne d'eau</b></p> <p>Rejet potentiel de microcystine dans la rivière à partir des sédiments</p>	<p>⇒ Caractérisation des sédiments avec évaluation de leur composition en matière organique, argile, limon.</p> <p>⇒ Analyse des concentrations réelles en microcystines dans les échantillons de sédiments.</p> <p>⇒ Expériences d'inoculation pour tester la capacité des sédiments à adsorber et dégrader la microcystine</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Détermination des <b>courbes de distribution de taille des grains de sédiments</b> (échantillons de décembre 2002, notés 2b à 7, et échantillon 2a de mai 2003).</li> <li>▪ Détermination de la <b>perte au feu</b>.</li> <li>▪ Remise en suspension des échantillons de sédiments de décembre 2002, mai et septembre/octobre 2003.</li> <li>▪ <b>Analyse des surnageants</b> par ELISA (trois réplicats) et HPLC-PDA.</li> <li>▪ Ajout de 0, 3, 10 et 50 µg/L de microcystine-LR pure à des sédiments de l'Erdre sans toxines.</li> <li>▪ Analyse de la microcystine dans les surnageants (ELISA) après 24h pour détermination de la capacité d'adsorption <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Test du relargage de microcystine par ajout d'eau pure et analyse des concentrations en toxines après 24, 36, 48 et 144 heures.</li> <li>▪ Quantification de la biodégradation par détermination des concentrations de microcystine à 21, 36, 48 et 144 heures après ajout de 50 µg/L de microcystine-LR pure.</li> <li>▪ Toutes les analyses ont été répétées trois fois.</li> </ul> </li> </ul>

**Tableau 3 : Tests effectués sur le rejet potentiel de microcystine par les sédiments**

### I.3.2. Caractérisation des échantillons de sédiments

#### Méthode : description des échantillons de sédiments

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 4 : Points de prélèvement des échantillons fournis**

Les sites d'échantillonnage sur l'Erdre sont indiqués sur la carte (Figure 11).



Fig. 11: Sites de prélèvement des échantillons de sédiments dans l'Erdre

### Résultats : distribution de taille 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 12), et la boue s'est révélée très riche en matière organique (fortes pertes au feu).

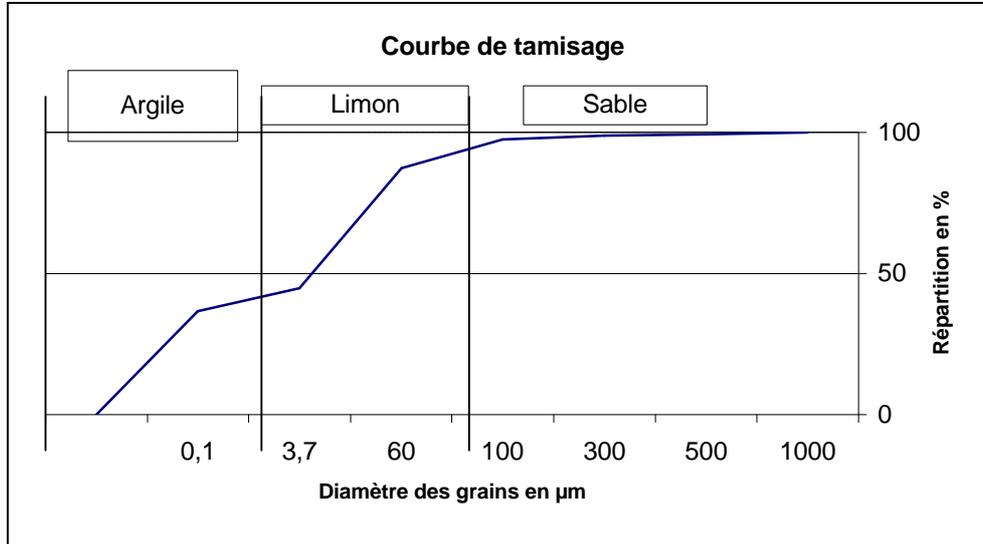


Figure 12 : Distribution de taille des grains de l'échantillon S2a (mai 2003)

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 13) et la vase apparaît très riche en matière organique (fortes pertes au feu).

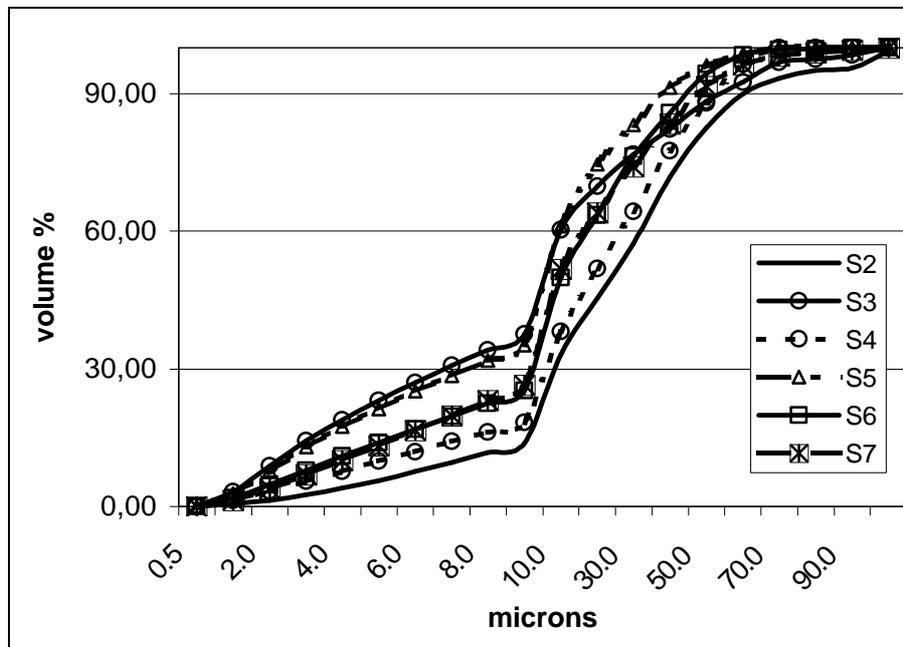


Figure 13 : Distribution de taille des grains des échantillons S2b à S7 (décembre 2002).

### I.3.3. Analyse des concentrations de microcystine dans les échantillons de sédiments de l'Erdre

**Méthode** : 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.

### I.3.4. Tests sur l'adsorption, la dégradation et le relargage de microcystine

**Méthode** : Comme les échantillons de boue de l'Erdre ne contenaient pas de microcystine, ils ont été utilisés pour des expériences de type batch avec ajout de microcystine standard.

Pour quantifier l'adsorption, 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.

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. Ils ont été analysés après 24, 48 et 72 heures, après forte agitation et centrifugation quotidienne des échantillons.

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.

## I.4. Conclusion sur le rôle des sédiments

### Recyclage interne de nutriments

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 g P total /kg sec. L'indice trophique estimé pour la concentration en phosphore total des vases de l'Erdre laisse prévoir un état mésotrophe. Le stock de phosphore présent dans les vases de l'Erdre ne représente donc pas une source majeure de nutriments.

### Survie des cyanobactéries dans les sédiments de l'Erdre en hiver

Des filaments vivants de *Planktothrix agardhii* ont été retrouvés dans les échantillons de sédiments de l'Erdre prélevés en hiver (La Jonelière, Janvier 2004), ce qui traduit la survie de *Planktothrix* dans les sédiments de la rivière. Le mécanisme de remise en suspension des filaments dans la colonne d'eau – par remise en suspension de la surface des sédiments ou par le propre déplacement des cyanobactéries – n'est pas clair et n'a pu être déterminé dans le cadre de cette étude. Cependant, le nombre de filaments observés pourrait représenter un inoculum assez important pour initier un développement d'une population de *Planktothrix* au printemps suivant, si une remise en suspension et / ou une migration des cellules a lieu.

### Rejet potentiel de microcystine par les sédiments de l'Erdre

Aucune microcystine n'a été détectée dans les sédiments de l'Erdre. Ceci peut s'expliquer par deux observations.

- Pendant la période de l'étude, aucune cyanobactérie productrice de microcystine n'a été détectée. On n'a donc observé aucune microcystine dissoute, aussi bien dans la colonne d'eau que dans les sédiments.
- De plus, les sédiments analysés ont une grande capacité à adsorber et dégrader la microcystine. Des microcystines libérées par la population de cyanobactéries ne seraient alors pas accumulées dans les sédiments mais biodégradées. Un relargage de microcystine par les sédiments a pu être exclu. La gestion des sédiments de l'Erdre (c.à.d. l'épandage des boues séchées après dragage) ne devrait donc pas représenter de risque pour le système de l'Erdre.

## II. Facteurs limitant la croissance et le contenu en toxines des souches de *Planktothrix agardhii* dans l'Erdre

---

### II.1. Objectifs

Des expériences ont été réalisées pour identifier l'impact de la limitation en nutriments sur la croissance de *Planktothrix agardhii* dans l'Erdre. Etant donné que la population de cyanobactéries contient plusieurs génotypes - producteurs de microcystines ou non - et que cette population peut être dominée par des génotypes favorisés par certaines conditions environnementales, la question se pose de savoir si les génotypes présents dans la population de *Planktothrix agardhii* de l'Erdre présentent des réponses différentes à une limitation en azote ou en phosphore. De telles différences peuvent être à l'origine d'un glissement vers certains génotypes au sein de la population de *Planktothrix agardhii* lors des phases de limitation des nutriments ou encore de l'éclairement. Pour cette étude, la réponse de *Planktothrix agardhii* à une limitation en nutriments a été étudiée en priorité car c'est dans ce domaine que le manque de connaissances scientifiques est le plus important.

Cet objectif a été défini lors de la phase de préparation du projet pour prendre en compte (1) le temps limité et le financement disponible pour l'étude qui ne permettaient pas des travaux de culture plus détaillés et (2) la quantité relativement importante de données scientifiques actuellement existantes dans la littérature concernant l'impact de la limitation de l'éclairement sur la croissance et la production de microcystine pour plusieurs espèces de cyanobactéries.

En 2003, la population de *Planktothrix agardhii* de l'Erdre ne contenait pas de génotypes producteurs de microcystine. Par conséquent, seules des souches de l'Erdre non-productrices de microcystine ont pu être isolées et étudiées. Il n'a donc pas été possible de comparer la croissance des souches de l'Erdre productrices ou non de microcystine. Cependant, à titre de comparaison, une souche productrice de microcystine ne provenant pas de l'Erdre mais issue d'une culture de laboratoire a été utilisée. Si des différences de croissance entre souches productrices et souches non productrices de microcystine étaient très fortes, cette souche de laboratoire pourrait également fournir une indication sur la réponse potentielle des souches de l'Erdre productrices de microcystine.

Des études précédentes concernant l'influence de l'éclairement sur le contenu en microcystine de *Planktothrix agardhii* n'ont montré qu'un impact faible (inférieur à un facteur 2) sur une large gamme d'éclairement (allant de la limitation jusqu'à la saturation en lumière). Les concentrations en microcystine extracellulaire ne représentaient qu'environ 1% du contenu total en microcystine avec une augmentation pour les plus forts éclaircissements.

En revanche, l'influence des nutriments sur la production de microcystine par *Planktothrix agardhii* est peu connue. L'impact de la limitation en nutriments sur le contenu et le rejet de microcystine par *Planktothrix agardhii* a donc été testé dans le cadre de cette étude par des cultures continues de la souche productrice de microcystine CYA 126/8 et des cultures batch avec la souche HUB 076.

Les expériences réalisées ont pour but de compléter la compréhension des mécanismes de régulation de la production de microcystine par les cyanobactéries. Dans le cadre de cette étude, une relation directe avec la situation de l'Erdre n'a pu être établie à cause du manque de souches toxiques dans la rivière lors de la saison étudiée. Cependant, de nouvelles connaissances sur les mécanismes généraux de régulation de la production de microcystine en fonction des quantités de nutriments permettent d'évaluer la variabilité des quantités de toxines dans le système naturel et peuvent être utilisées pour comprendre la réponse probable de la population de l'Erdre.

## II.2. Plan d'expérimentation

### Isolement de souches

Des filaments simples issus d'une culture d'enrichissement à partir d'un échantillon d'eau de l'Erdre prélevé au printemps 2003 ont été rincés et isolés. Les souches purifiées avec succès (7 sur 50 souches) ont pu être cultivées dans un milieu de type « HUB » (désignation UBA) à 20°C et 20  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### Expériences sur la croissance

La comparaison de 4 souches de l'Erdre concernant la réponse de la croissance par rapport aux nutriments a été réalisée au moyen de cultures batch. La limitation en azote et en phosphore a été testée. Toutes les expériences ont été menées en parallèle, à 20 °C et 34-37,5  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  avec un cycle éclaircissement/obscurité de 16h/8h. Pour le calcul des taux de croissance maximaux, qui représentent la croissance illimitée, la valeur moyenne des taux de croissance quotidiens lors de la phase de croissance exponentielle a été utilisée, avec calcul des écarts-types. De plus, le laps de temps jusqu'au début de la phase de croissance stationnaire a été déterminé pour comparer les capacités de stockage des nutriments des différentes souches.

Les souches ont été cultivées dans des Erlenmeyer de 500 mL. Un volume de 15 mL d'une pré-culture saturée en nutriments a été dilué avec 235 mL d'un milieu de culture en absence d'azote ou bien de phosphore. L'impact éventuel de l'inoculum par un apport supplémentaire de nutriments a été évité en appliquant des conditions identiques à tous les tests.

### Influence des nutriments sur les concentrations en toxines

Pour déterminer les concentrations en microcystine intra- et extracellulaires, des cultures batch de la souche HUB 076 ont été établies avec trois réplicats avec limitation en azote ou en phosphore. Ceci permet de détecter rapidement les changements dans la production de toxines par comparaison du contenu en microcystine lors de la phase de croissance exponentielle avec saturation en nutriments et lors de la phase de croissance stationnaire avec limitation des nutriments. Pour cela deux échantillons de chaque culture ont été pris lors de la phase exponentielle et lors de la phase de croissance stationnaire.

Des cultures continues en conditions de limitation en azote et phosphore ont été démarrées avec la souche CYA 126/8. Des cultures continues permettent d'appliquer des niveaux progressifs de limitation en nutriments. Lors de cette approche par cultures continues, les quotas cellulaires de nutriments ont été gardés constants en vue de définir clairement l'état de limitation. Différents niveaux de limitation ont été obtenus en changeant le taux de dilution des cultures. Une culture limitée en azote et une culture limitée en phosphore ont été réalisées en chemostat à 20°C avec saturation de l'éclaircissement (60  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Des échantillons ont été prélevés à trois reprises lors de phases de régime permanent pour détermination de la microcystine intra- et extracellulaire.

Les différentes expériences et l'approche expérimentale choisie sont résumées dans le tableau suivant.

Tableau 5 : expériences sur l'impact de la limitation en nutriments sur la croissance et le contenu en microcystine de *Planktothrix agardhii*

Objectifs des expériences avec leur importance pour le système de l'Erdre	Approche expérimentale Paramètres étudiés	Détails sur les protocoles
<p><b>Impact de l'azote et du phosphore sur la croissance de <i>Planktothrix agardhii</i></b> Comparaison de souches de l'Erdre pour évaluer les changements possibles dans la population de l'Erdre lors de phases de limitation en nutriments (c.à.d. en cas de gestion de la rivière)</p>	<p>⇒ Isolement et caractérisation de souches de <i>Planktothrix agardhii</i> d'échantillons de l'Erdre prélevés à la Jonelière</p> <p>⇒ Détermination des différences éventuelles du taux de croissance en réponse à une limitation en azote ou en phosphore à l'aide de <b>cultures batch</b>.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cultures monoclonales par <b>isolement de filaments simples</b> en cultures d'enrichissement</li> <li>▪ Analyses <b>HPLC</b> et <b>MALDI-TOF-MS</b> pour vérifier la capacité des souches à synthétiser de la microcystine</li> <li>▪ Tests en absence de P ou N avec 4 souches de l'Erdre (duplicats pour chaque variante)</li> <li>▪ Conditions de départ (inoculum, densité de cultures) identiques pour tous les tests.</li> <li>▪ Calcul des taux de croissance maximum par moyenne des taux de croissance quotidiens mesurés lors de la phase de croissance exponentielle.</li> <li>▪ Détermination du temps jusqu'au début de la limitation de la croissance comme indication de la capacité de stockage de nutriments par les souches.</li> </ul>
<p><b>Impact des nutriments sur la production de microcystine de <i>Planktothrix agardhii</i>.</b> Evaluation de la gamme de variation des concentrations de microcystine pour des conditions en nutriments différentes (c.à.d. en cas de gestion de la rivière)</p>	<p>⇒ <b>Cultures batch</b> avec la souche HUB 076 pour déterminer les différences entre les conditions de saturation et de limitation totale en nutriments</p> <p>⇒ <b>Cultures continues</b> avec la souche CYA 126/8 pour estimation de la production de microcystine avec des conditions progressives de limitation.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tests (3 réplicats) sous limitation en N et P</li> <li>▪ Prélèvement de 2 échantillons lors de la phase exponentielle aussi bien que lors de la phase stationnaire.</li> <li>▪ Analyse HPLC du contenu cellulaire en microcystine ; analyse ELISA des concentrations extracellulaires (3 réplicats pour tous les échantillons).</li> <li>▪ Utilisation d'un <b>chemostat</b> pour la limitation en azote et en phosphore.</li> <li>▪ Application de divers états de limitation par changement des taux de dilution</li> <li>▪ Echantillonnage sur 3 jours dans chaque phase de régime permanent de la limitation.</li> <li>▪ Analyse HPLC du contenu cellulaire en microcystine ; analyse ELISA des concentrations extracellulaires (3 réplicats pour tous les échantillons).</li> </ul>

## II.3. Isolement et caractérisation des souches de *Planktothrix agardhii* de l'Erdre

### II.3.1. Protocole expérimental

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, églement incluse dans le test, ne contenait pas non plus de microcystine (seul un pic tres 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 ( $\lambda=337 \text{ nm}$ ) 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 reflectron ont été réduits progressivement pour enregistrer 12 séquences de segments spectraux.

### II.3.2. 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 14. 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 Briant (voir Fig. 14). Il est remarquable que 2 laboratoires différents aient apparemment isolé des souches avec le même profil de peptides (et donc des phénotypes identiques ou proches) à partir de différents échantillons de l'Erdre pris à différents moments. La figure 14 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).

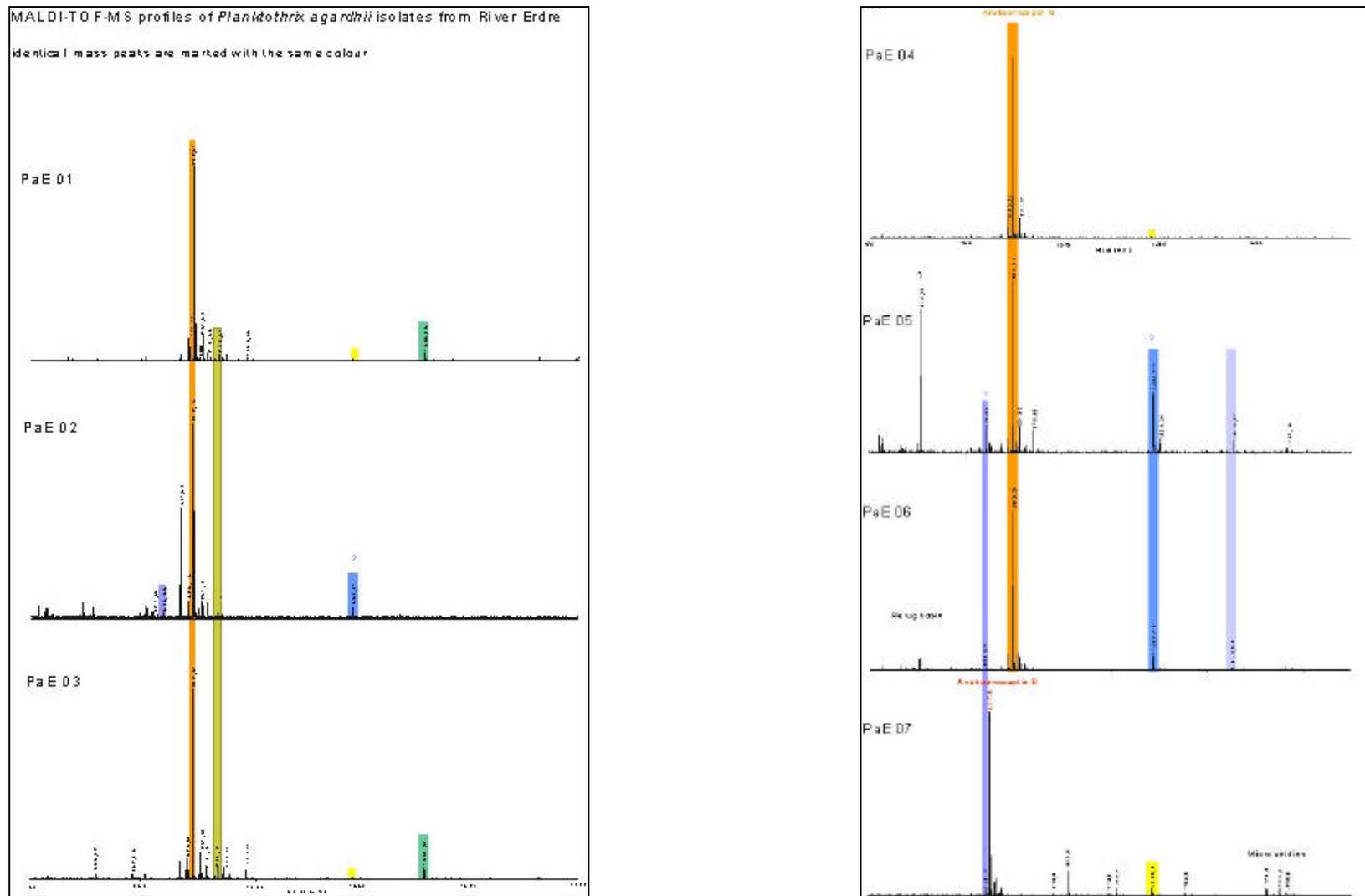


Figure 14a: Profils MALDI-TOF de 7 souches de *Planktothrix agardhii* isolées de l'Erdre en avril 2003 (les pics de masse identique ont la même couleur)

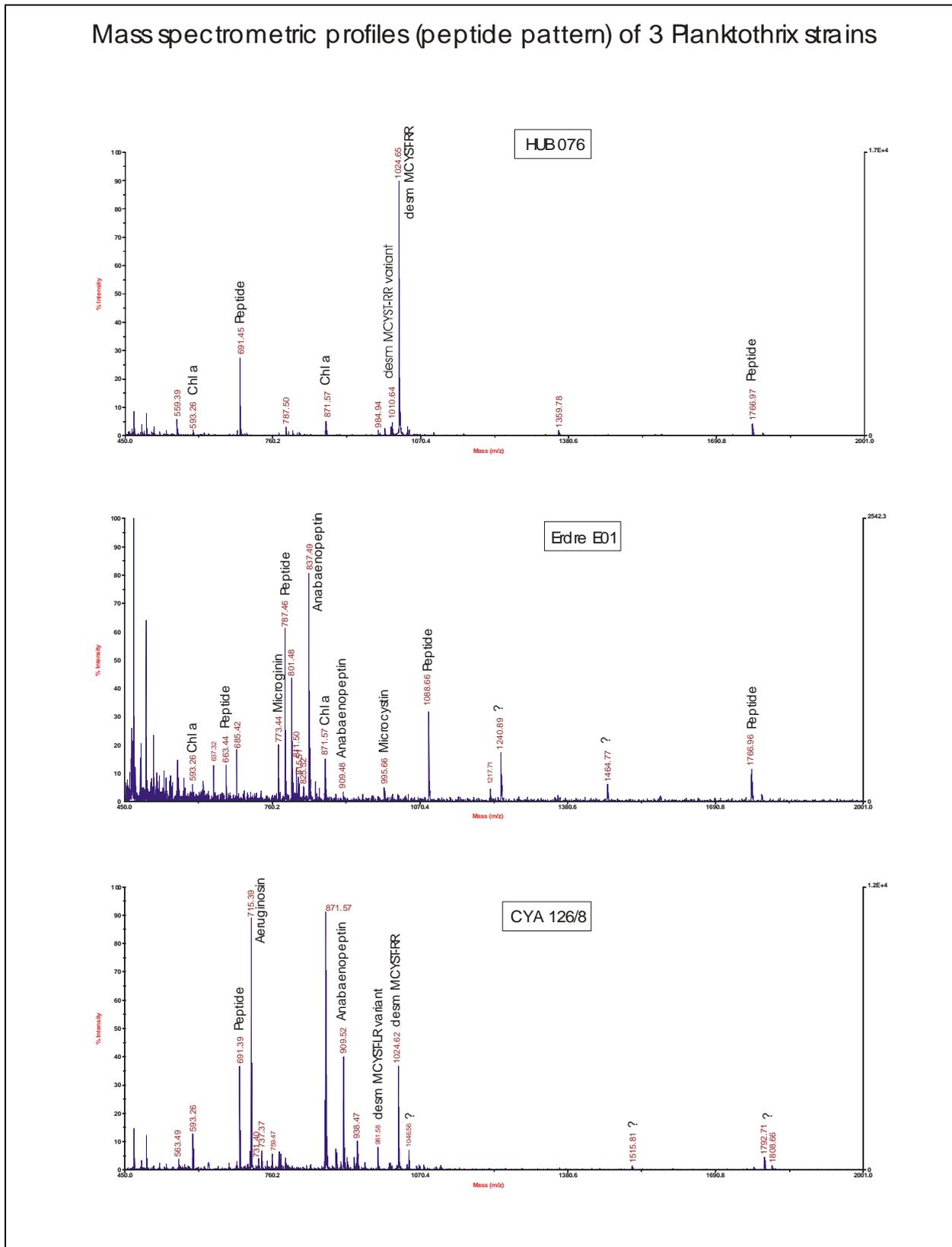


Figure 14b :

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

## II.4. Impact du phosphore et de l'azote sur la croissance des souches de *Planktothrix isolées de l'Erdre*

### II.4.1. Objectif

Il s'agit de déterminer les différences entre taux de croissance et l'impact d'une limitation en nutriments sur la croissance à partir d'expériences en cultures batch sur des souches de l'Erdre.

Bien que les souches de *Planktothrix agardhii* isolées de l'Erdre 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 agardhii* de l'Erdre. Si les taux de croissance sont différents lors d'une limitation en nutriments, ceci peut éventuellement mettre en évidence la dominance d'un génotype au sein de la population de *Planktothrix agardhii*. 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.

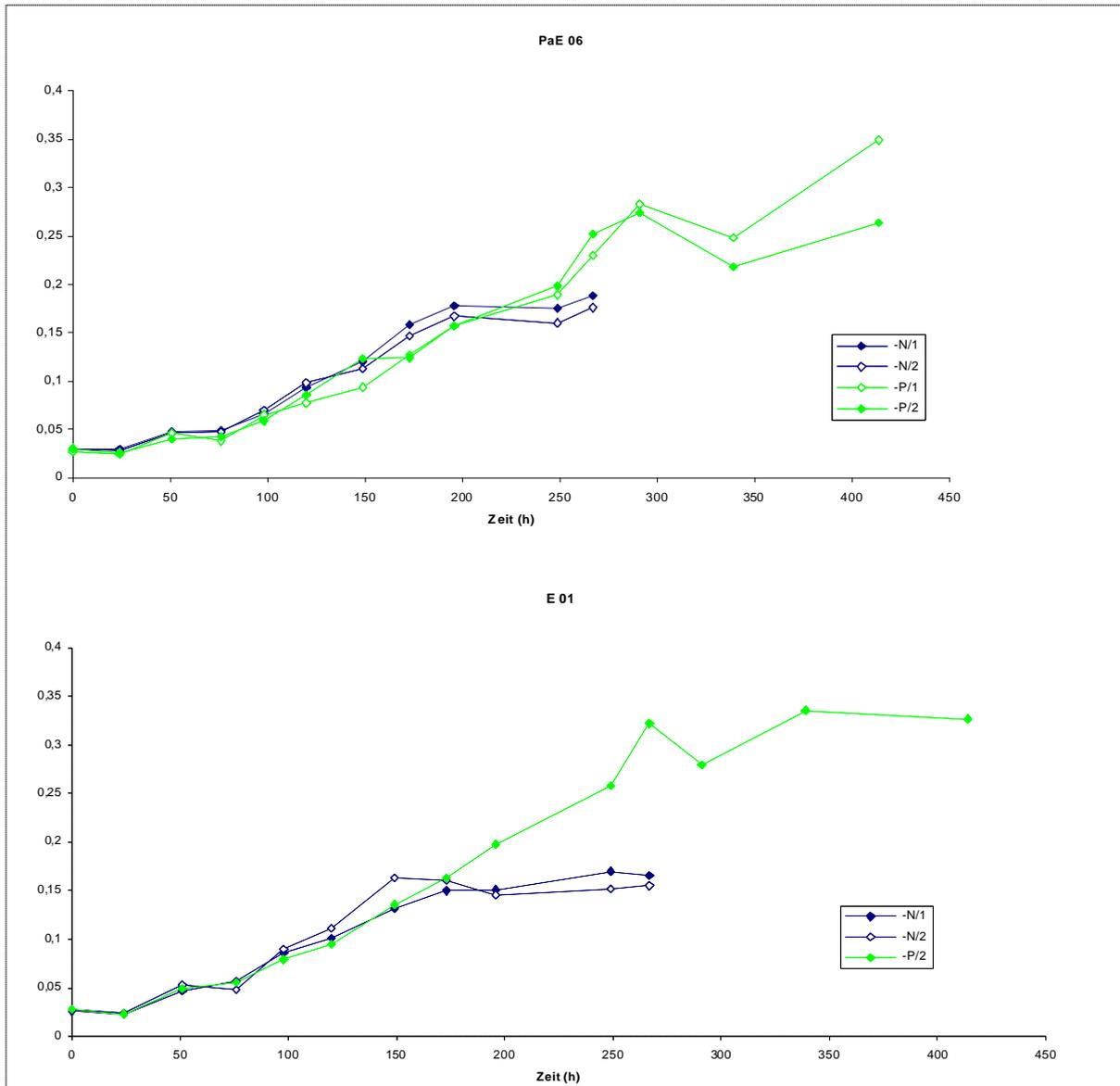
### II.4.2. Méthode

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 de 15mL d'une pré-culture saturée en nutriments avec 235 mL d'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 agités 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 supplémentaires pour la quantification des métabolites peptidiques ont été prélevés pendant 3 jours lors de la phase de croissance exponentielle et 3 jours lors de la phase stationnaire.

### II.4.3. Résultats

La croissance des souches est illustrée ici par les exemples des souches PaE 06 et E01 (Figure 15).



**Figure 15 : 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 essais parallèles sont désignés par des numéros (c.à.d. -N/1, -N/2). Les mesures ont été stoppées lorsque la phase de croissance stationnaire a été atteinte.

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.

Les taux de croissance ont été calculés en faisant la moyenne des taux de croissance quotidiens obtenus lors de la phase de croissance exponentielle des deux tests parallèles.

Le modèle de calcul utilisé pour ces taux de croissance quotidiens est :  $\mu = (\ln ?BV)/t$  avec ?BV est la variation (l'augmentation) du biovolume et t la durée entre deux mesures du biovolume.

Le tableau 6 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 un peu plus fort dans le milieu limité en azote. Bien qu'en théorie une différence aussi prononcée ( $\mu \sim 0.1 \text{ d}^{-1}$ ) 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. 15).

**Tableau 6: 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. 7, Fig 15). 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 7 : 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

## II.5. Impact du phosphore et de l'azote sur le contenu en microcystine cellulaire de *Planktothrix agardhii*

### II.5.1. Objectifs

L'état actuel des connaissances sur le rejet de microcystine par les cyanobactéries ne donne aucune indication d'un rejet plus important lors d'une limitation en nutriments ; cependant, aucune étude à ce sujet concernant l'espèce *Planktothrix agardhii* n'a été publiée à ce jour. L'analyse de la microcystine extracellulaire a donc été ajoutée à l'étude de l'impact des nutriments. Ceci fournit uniquement un résultat net du rejet de microcystine, puisqu'une biodégradation continue des toxines ne peut être évaluée par cette approche. Cependant, des concentrations élevées de microcystine extracellulaire prouveraient que la rejet est favorisé.

### II.5.2. 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'éclairage 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'éclairage, 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'éclairage.

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 8 : Influence de la concentration en azote sur la teneur en microcystine**

Remarque : Dans les tableaux 8 et 9, 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 & Gjørme 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

Gamme (N)	Méthode	Unité de biomasse à laquelle la MCYST a été rapportée	Cyanobactérie	Degré d'impact sur MCYST	Commentaires	Référence
11.8 $\mu\text{M}$ - 1.18mM	Cultures batch	MCYST: quota par cellule [fmol $\text{cell}^{-1}$ ]	<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
6,5-650 $\mu\text{M}$	Cultures batch	MCYST par poids sec [ $\mu\text{g}$ $\text{mg}^{-1}$ ]	<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 [fmol $\text{cell}^{-1}$ ] 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 9 : 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

### II.5.3. Expériences en cultures batch

#### Objectif

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 750 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.

#### Détermination de la concentration en 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 µm, 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.

#### 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 10). En cas de limitation des nutriments pendant la phase stationnaire, la quantité de microcystines intracellulaires est 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 10), 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 10 : 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.

#### II.5.4. Expériences en cultures continues

##### Objectif

Des expériences de cultures continues avec la souche CYA 126/8 ont été réalisées pour évaluer l'impact de la limitation en phosphore ou en azote sur le contenu cellulaire en microcystine.

En effet, même si les cultures batch présentent l'avantage de fournir rapidement des premiers résultats préliminaires, elles ne fournissent que des estimations grossières, car l'état de limitation en nutriments ne peut être défini précisément dans les cultures batch : lorsque la densité de la culture augmente, la limitation en nutriments augmente aussi. Une approche à l'aide de cultures continues est donc nécessaire, avec une définition claire de la limitation en gardant les quotas cellulaires de nutriments constants. Ces tests nécessitent beaucoup de temps et de travail et ne peuvent être réalisés que sur un nombre restreint de souches.

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.

## Approche

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 cultures continues ont été obtenues 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 détectées 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 du 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 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.

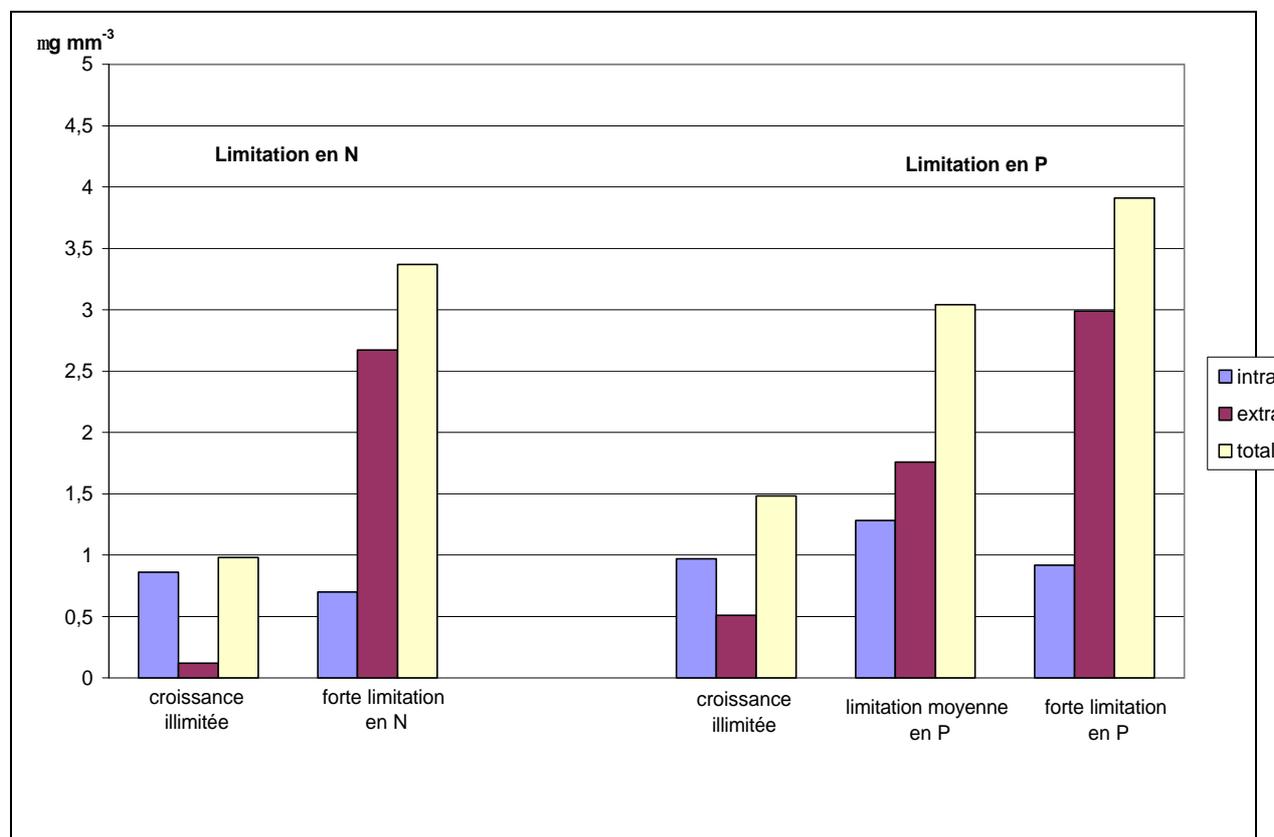
## Résultats

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  $0,1 \mu_{\text{max}}$ , de même qu'un stade de limitation moyenne en P à un taux de croissance de  $0,22 \mu_{\text{max}}$ .

Les données sont indiqués dans le tableau 11 ci-dessous et reprises dans la figure 16 (page suivante). Ces résultats sont des moyennes entre 2 à 5 analyses par méthode ELISA, les écarts-types ne sont pas indiqués du fait du nombre variable d'analyses.

	$\mu$ (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 ( $\mu_{\text{max}}$ )	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 ( $\mu_{\text{max}}$ )	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 11 : 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 16 : Influence d'une limitation en N ou P sur le contenu en microcystine de *Planktothrix* (en  $\mu\text{g}$  de microcystine par  $\text{mm}^3$  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 II.5.3) 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 III) 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.6. Influence de l'éclairement

Des études antérieures de l'Agence Fédérale de l'Environnement avec *Planktothrix agardhii* (HUB 076) à l'aide de cultures continues en turbidostats ont clairement mis en évidence le rôle de l'intensité lumineuse pour la croissance et le contenu en microcystine.

La gamme d'intensité lumineuse testée était de 2.5 à 73  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fournie par des lampes néon OSRAM avec un cycle éclaircissement/obscurité de 16h/8h. Pour ces éclaircissements, les taux de croissance de toutes les souches ont augmenté de façon exponentielle en fonction de l'intensité lumineuse, allant d'un taux de croissance d'environ 0,02  $\text{d}^{-1}$  pour un éclaircissement très faible et jusqu'à 0,52  $\text{d}^{-1}$  pour l'intensité lumineuse maximale de 73  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . L'une des souches était caractérisée par un taux de croissance légèrement plus fort lors d'un éclaircissement plus intense, mais dans l'ensemble les différences entre les taux de croissance des diverses souches n'étaient pas prononcées.

La mesure des concentrations en microcystine intracellulaire et extracellulaire a montré que pour *Planktothrix agardhii*, le quota de microcystine intracellulaire n'augmente que d'un facteur 2 environ lorsque l'intensité lumineuse augmente. Les concentrations de microcystine extracellulaire mesurées dans la culture étaient très faibles, ne représentant jamais plus de 1% de la concentration en microcystine totale. L'éclaircissement n'a donc qu'un faible impact sur le contenu en microcystine des cellules de *Planktothrix agardhii*.

Lors de ces expériences, aucun lien entre la croissance et la capacité des souches de *Planktothrix* à produire des microcystines n'a été établi.

Ces travaux sont décrits en détails par **Böttcher et al. 2001** (voir la référence complète dans la partie VII. Références bibliographiques).

## II.7. Conclusion sur les facteurs limitants pour *Planktothrix agardhii*

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 de laboratoire.

Une approche en culture batch sous conditions strictement contrôlées a été utilisée pour comparer les taux de croissance de différentes souches sous des conditions limitées en phosphore et azote. Les taux de croissance maximaux (sous conditions saturées en nutriments) étaient très similaires. 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.

Des études précédentes concernant l'influence de l'éclairement sur le contenu en microcystine de *Planktothrix agardhii* n'ont montré qu'un impact faible (inférieur à un facteur 2) sur une large gamme d'éclairement.

L'impact de la limitation en nutriments sur le contenu en microcystine a été testé au moyen de cultures batch et de cultures continues sur des souches de *Planktothrix* de laboratoire, car les souches isolées à partir de la population de *Planktothrix* de l'Erdre n'étaient pas productrices de microcystine. La limitation en nutriments n'affecte pas de façon significative le contenu en microcystine intracellulaire. Une action sur la limitation en nutriments n'aura donc pas d'impact par ce mécanisme. Les concentrations en microcystine totale pourraient augmenter d'un facteur 2 à 4 en cas de limitation des nutriments, mais 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.

La réduction effective de la biomasse de *Planktothrix agardhii* dans la rivière Erdre par diminution des apports externes en nutriments permettra de réduire simultanément les concentrations de microcystine dans le milieu.

### **III. Impact de la vitesse d'écoulement sur la croissance et le contenu en toxines de *Planktothrix agardhii***

---

#### **III.1. Objectifs**

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 agardhii* 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'objectif est d'évaluer l'effet lié au stress mécanique dû aux turbulences dans les ouvrages hydrauliques ou au trafic de bateaux de plaisance qui pourrait induire un rejet de microcystine. L'importance du stress physique induit par la vitesse d'écoulement et ses changements soudains a été évaluée par des expériences utilisant le système de rivière artificielle de l'UBA. En 2003, la population de *Planktothrix agardhii* de l'Erdre en 2003 ne produisant pas de microcystine, une culture en masse de *Planktothrix agardhii* HUB 076 (productrice de microcystine) a été utilisée pour pouvoir tester l'effet de la vitesse d'écoulement sur le relargage de toxines. 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 (appareils de 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.

L'ensemble des expériences réalisées est présenté dans le tableau page suivante.

Objectifs des expériences avec leur importance pour l'Erdre	Approche expérimentale Paramètres étudiés	Détails sur les protocoles
<p><b>Influence de la vitesse d'écoulement et de la turbulence</b> sur la croissance et le rejet de microcystine de <i>Planktothrix agardhii</i>. Evaluation du risque de rejet de toxines par les activités de plaisance (bateaux) ou la gestion de la rivière (ouverture des écluses).</p>	<p>⇒ <b>Expériences en laboratoire</b> avec appareils de tests de floculation pour tester l'impact de fortes turbulences sur la croissance et le rejet de microcystine par la souche HUB 076.</p> <p>⇒ <b>Approche à grande échelle dans un système de rivière artificielle</b> avec 4 m<sup>3</sup> de HUB 076 pour tester l'impact des différentes vitesses d'écoulement sur la croissance et le rejet potentiel de microcystine.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 3 essais parallèles avec différentes vitesses d'agitation avec des densités de culture identiques au départ.</li> <li>▪ Toutes les 24h (4 fois), augmentation de la vitesse de rotation (turbulences).</li> <li>▪ Echantillonnage avant et après chaque accélération</li> <li>▪ Analyse HPLC du contenu cellulaire en microcystine ; analyse ELISA des concentrations extracellulaires (trois réplicats pour tous les échantillons analysés par ELISA).</li> <li>▪ Préparation de <b>courbes de distribution des longueurs de filaments</b> pour visualisation des effets du stress mécanique sur les filaments de <i>Planktothrix agardhii</i>.</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Un test avec changement hebdomadaire de la vitesse d'écoulement.</li> <li>▪ Echantillonnage avant et après chaque changement de vitesse.</li> <li>▪ Analyse HPLC du contenu cellulaire en microcystine ; analyse ELISA des concentrations extracellulaires (trois réplicats pour tous les échantillons analysés par ELISA).</li> </ul>

**Tableau 12 : expériences sur l'impact de la vitesse d'écoulement**

## III.2. Expériences de laboratoire par agitation continue en appareil de jar-test

### III.2.1. Méthode

Quatre expériences ont été lancées avec diverses vitesses de rotation des agitateurs, dans des béchers de 2 L équipés d'un stator pour augmenter les turbulences et donc les forces de cisaillement. Le matériel utilisé est en fait un appareil de « jar-test », utilisé traditionnellement pour tester la floculation lors du traitement des eaux potables. 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 :

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

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

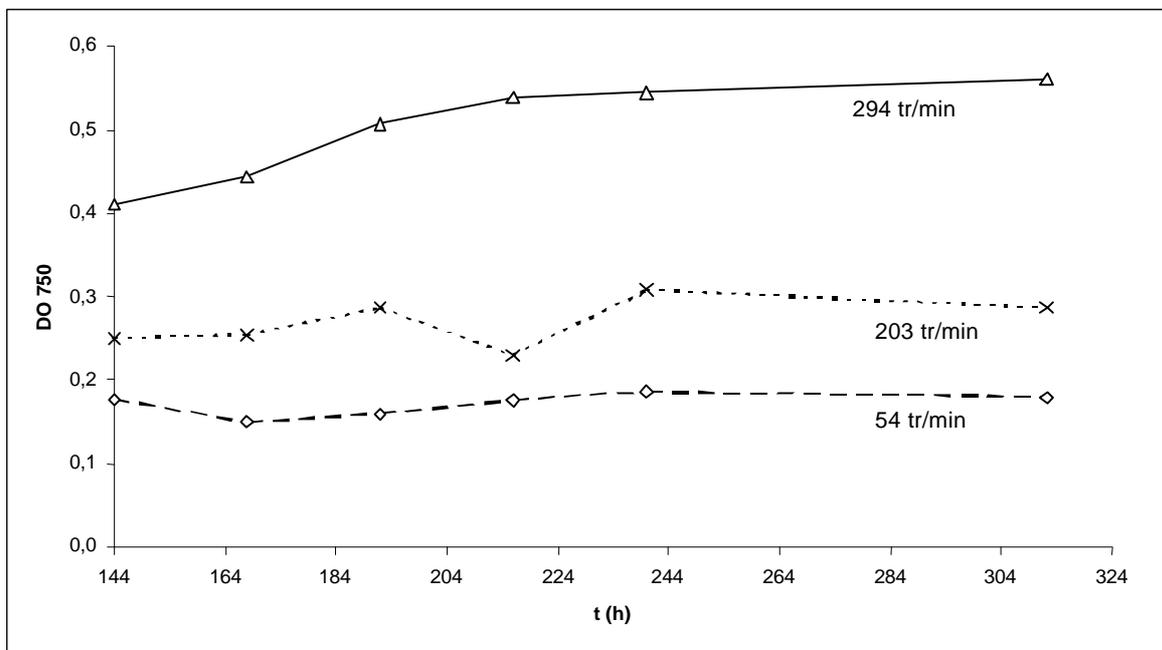
La souche testée ici était HUB 076. Les cultures ont été menées avec un milieu de culture HUB (désignation UBA) à  $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  et  $20^\circ\text{C}$ . L'une de ces expériences a dû être stoppée prématurément suite à une panne du moteur de l'agitateur.

Après qu'aucune différence significative 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 de rotation maximale.

### III.2.2. Résultats

#### Croissance

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 17). Ceci est très probablement dû à un effet positif de l'ajout supplémentaire de  $\text{CO}_2$  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.

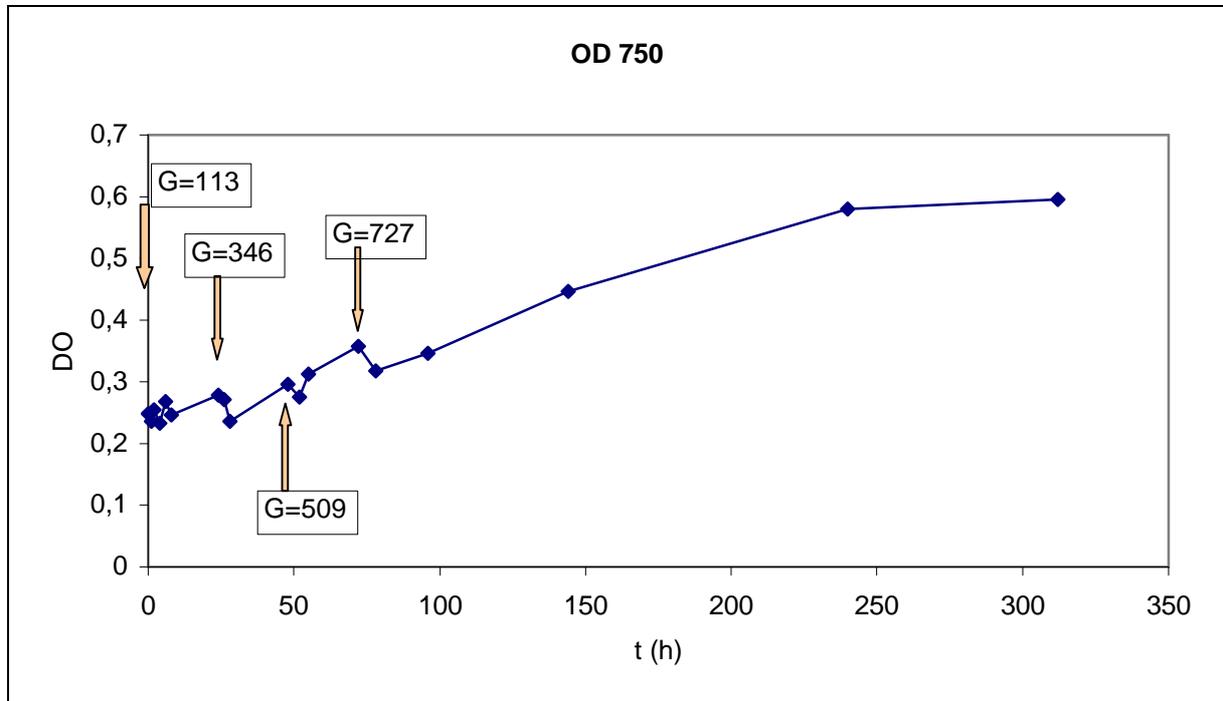


**Figure 17 : Evolution de la densité de culture (mesure photométrique de la densité optique à 750 nm) pour 3 tests parallèles d'agitation, démarrant à diverses vitesses de rotation (à 294, 203 et 54 tr/min) avec *Planktothrix agardhii* HUB 076.**

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

Pour observer les effets provoqués par le stress mécanique sur les autres paramètres que la croissance, le test démarré avec la plus forte vitesse de rotation a été étudié en détail. La figure 18 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 initialement une nette diminution en réponse à chaque augmentation du gradient de cisaillement. 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 18 : 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.

#### Microcystine intracellulaire

Le contenu en microcystine intracellulaire au cours du temps est montré dans la figure 19, en lien avec la DO de la culture de même que le biovolume [ $\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$ ]. 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 légèrement 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 (Fig. 17), suggérant une période d'adaptation à croissance réduite, lors de laquelle les filaments soumis à un stress mécanique se rompent probablement davantage.

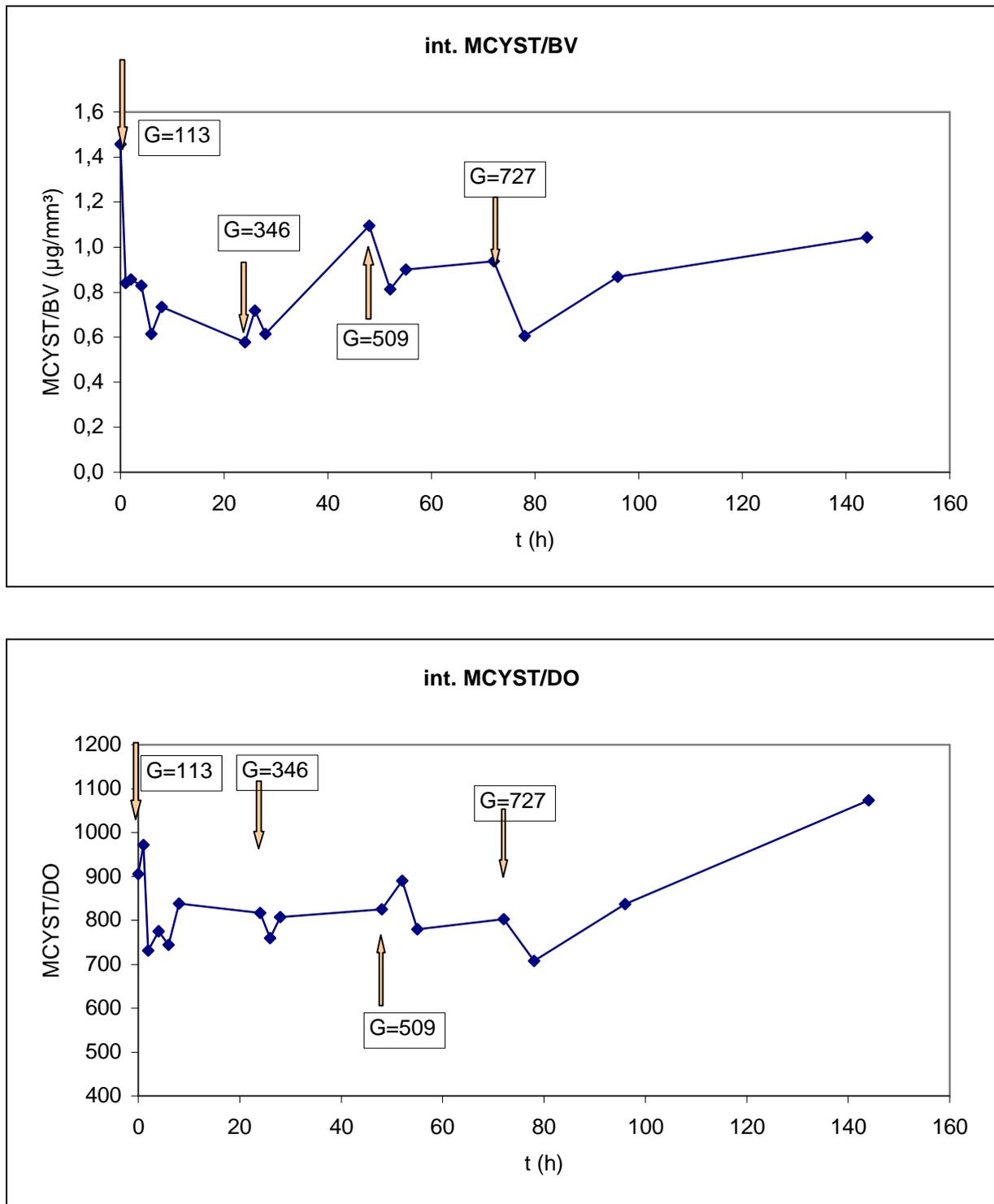


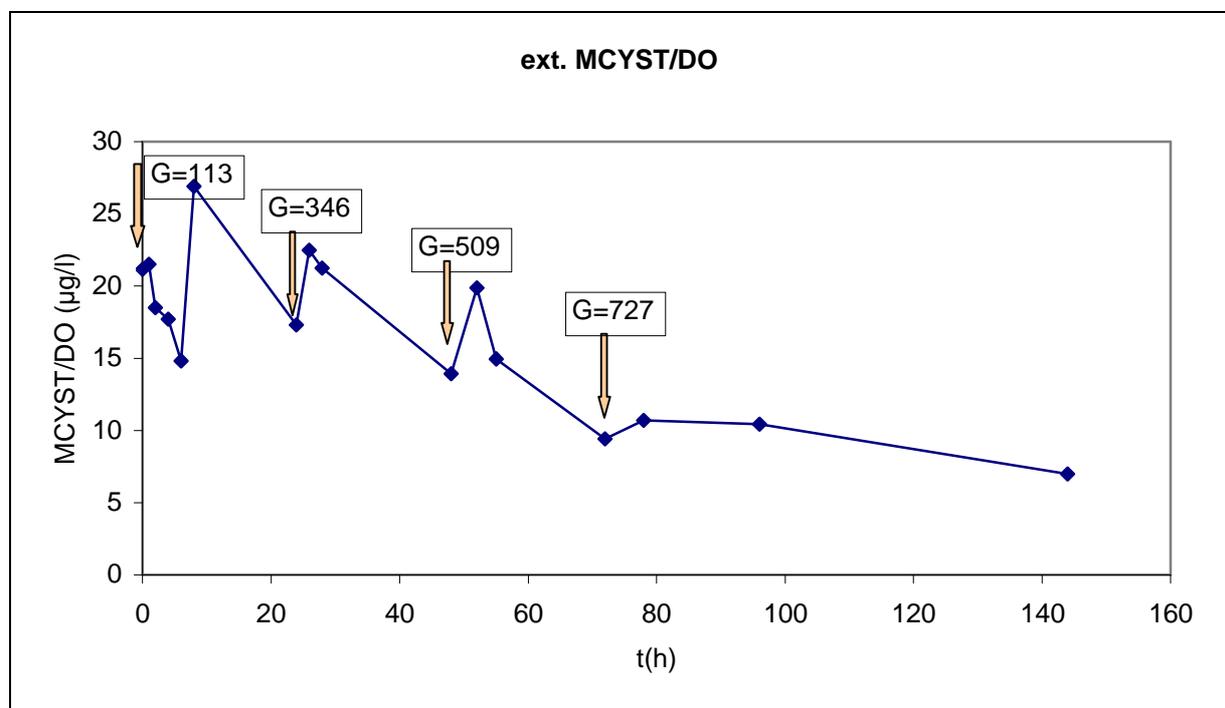
Figure 19 : Concentrations de microcystine intracellulaire au cours du temps – en relation avec le biovolume de cyanobactéries (1<sup>er</sup> graphe) et la densité optique (2<sup>e</sup> graphe).

### Microcystine extracellulaire

Cette hypothèse a été vérifiée par l'analyse des microcystines extracellulaires présentes dans le milieu de culture sans cellules. Ceci est montré dans la figure 20, 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  $424 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Une augmentation remarquable de la concentration en microcystine extracellulaire a pu être détectée 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 20 : Concentrations de microcystine extracellulaire dans le milieu de culture sans cellules, par rapport à la DO.**

### Rupture des filaments

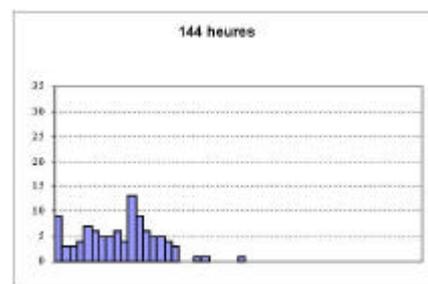
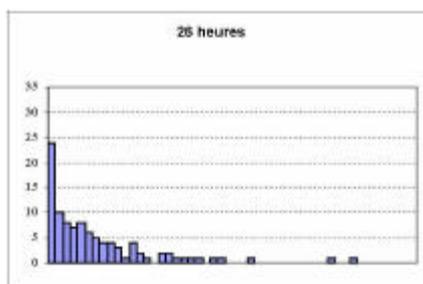
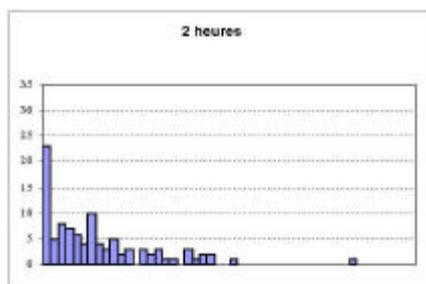
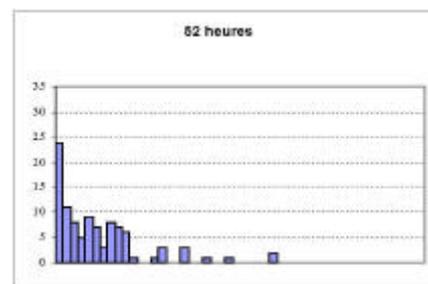
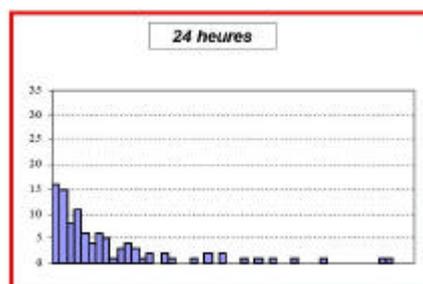
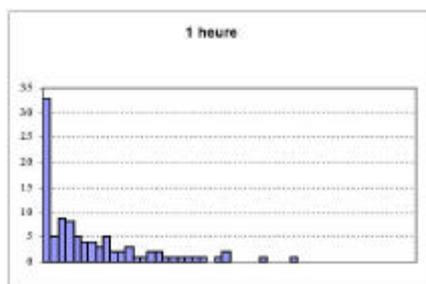
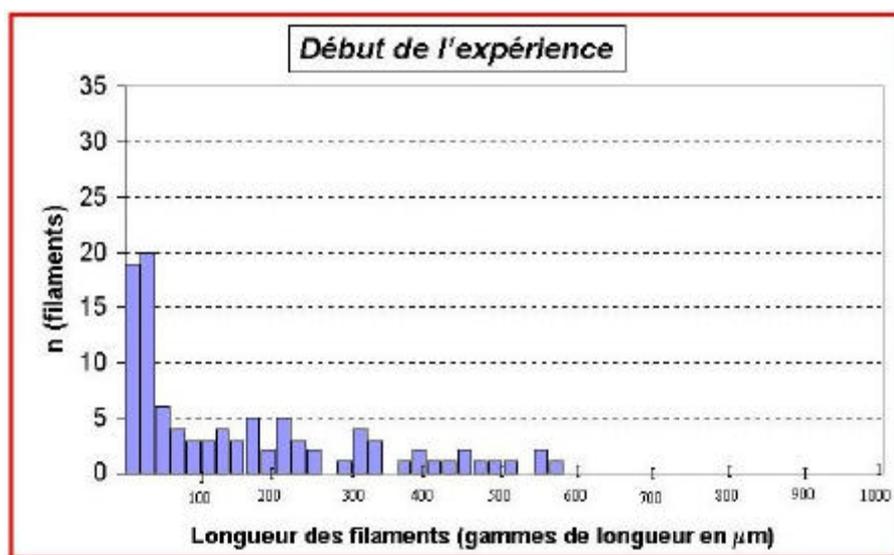
Une autre réponse potentielle à une turbulence accrue et aux forces de cisaillement est la rupture des filaments, qui résulterait dans une plus grande proportion de filaments courts. La distribution de la longueur des filaments a donc été étudiée et les résultats sont donnés dans la figure 21 (voir page suivante).

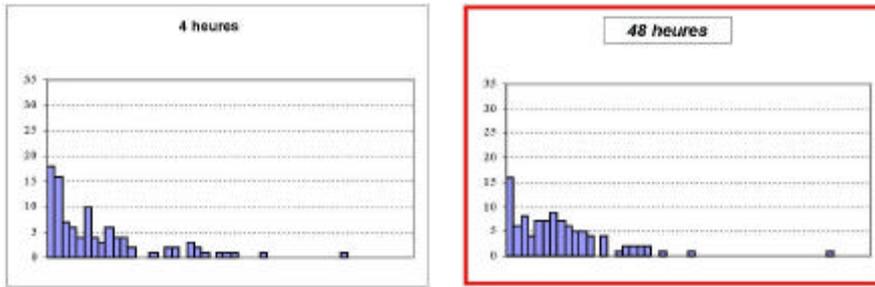
Les échantillons prélevés 1 à 2 heures après chaque accélération de l'agitateur montrent un taux plus élevé de filaments courts ( $< 20 \mu\text{m}$ ). Ceci confirme l'hypothèse de travail selon laquelle les forces de cisaillement ont un impact sur la stabilité des filaments. Cependant, cet impact n'a 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 de rotation de l'agitateur a été augmentée après échantillonnage des prélèvements, qui correspondent aux graphes 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 21 : Distribution de longueur des filaments de *Planktothrix agardhii* lors des expériences en appareil de floculation** (nombre de filaments répartis par classes de longueur en  $\mu\text{m}$ )

En résumé, les résultats indiquent deux effets de l'augmentation de la turbulence : un relargage de microcystine et une rupture des filaments. Cependant, ces deux effets ne sont observés que lors d'une phase courte et transitoire, et 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 reste très faible, aussi bien en proportion relative (moins de 50%) qu'en valeurs absolues : pour la plus forte concentration de microcystine intracellulaire de  $424 \mu\text{g L}^{-1}$  pour un biovolume de  $413 \text{mm}^3 \text{L}^{-1}$ , la proportion de microcystine extracellulaire n'a atteint que  $6,6 \mu\text{g L}^{-1}$ . De plus, la densité totale des cellules sur le terrain est beaucoup plus faible que celle utilisée en cultures de laboratoire. L'effet du cisaillement et les risques associés sont donc encore plus faibles sur le terrain.

### III.3. Simulations d'écoulement en rivière artificielle

#### III.3.1. Approche

Pour déterminer l'effet de l'écoulement sur la croissance et les concentrations intra- et extracellulaires de microcystine qui en résultent à échelle semi-réelle, des cultures batch de souches *Planktothrix agardhii* HUB 076 ont été réalisées à grande échelle et à diverses vitesses d'écoulements dans le système de rivière artificielle de l'UBA à Berlin-Marienfelde. Les souches utilisées, HUB 076, sont productrices de microcystine et non-axéniques, c.à.d. que les cultures contiennent également d'autres bactéries mais aucune autre cyanobactérie ou algue.

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  $50 \mu\text{g/L}$  de microcystine totale. Des tests précédents avec HUB 076 indiquent que ceci correspond à une quantité de 100 à  $450 \mu\text{g/L}$  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  $0,3 \mu\text{g/L}$  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  $5-10 \mu\text{E/m}^2 \text{s}$ ) de façon à simuler les conditions d'eutrophie et de forte turbidité et pour 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 fixées à l'avance, 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  $4,4 \text{ m}^3$ . L'écoulement était provoqué par un agitateur qui peut être régulé sur une gamme de 0 à 20 Hz (Figure 23) et cause des turbulences déjà considérables à 15 Hz (Figure 24).





Figure 22 : Système de rivière artificielle de l'UBA préparé pour les expériences sur *Planktothrix* de l'Erdre

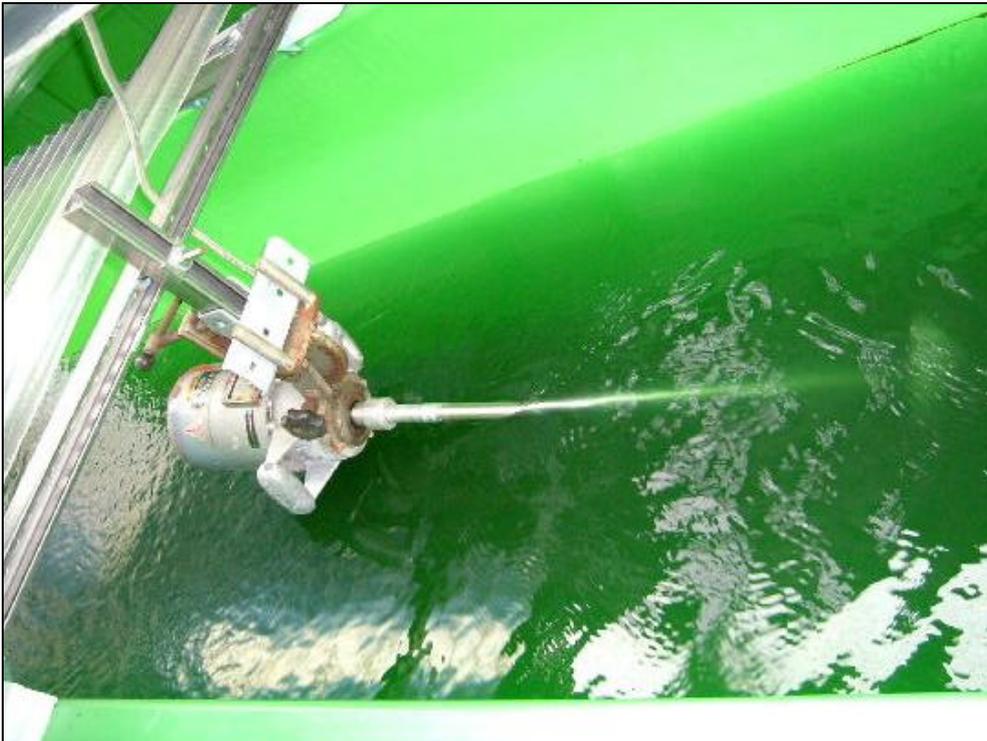
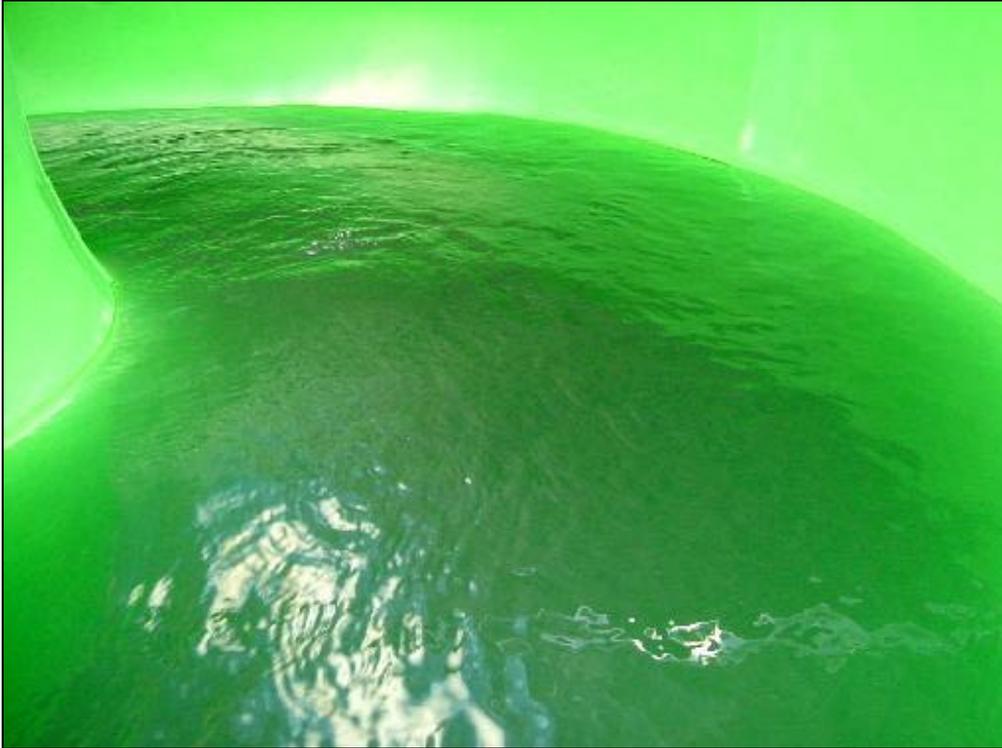


Figure 23 : Agitateur dans la rivière artificielle



**Figure 24 : 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 éclairage/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 déperé.

### Mesure des vitesses d'écoulement

Pour les 4 vitesses de rotation 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 25, avec des points de mesures répartis régulièrement sur la section transversale et la profondeur, comme ceci est indiqué sur le tableau 13.

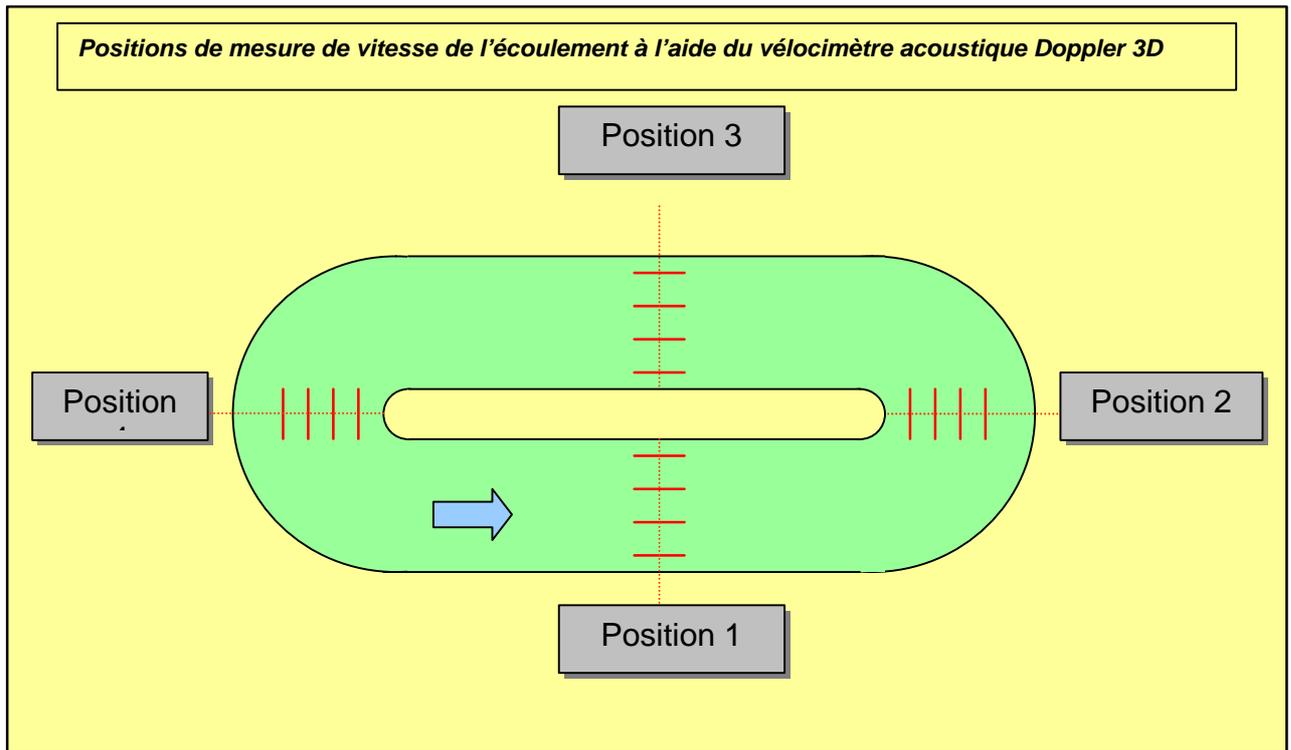


Figure 25 : Positions de mesure des vitesses d'écoulement dans le chenal

<b>Positions horizontales</b> des points de mesure (Distance par rapport aux bords du chenal)						
	<b>Par rapport au bord extérieur</b>			<b>Par rapport au bord intérieur</b>		
<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

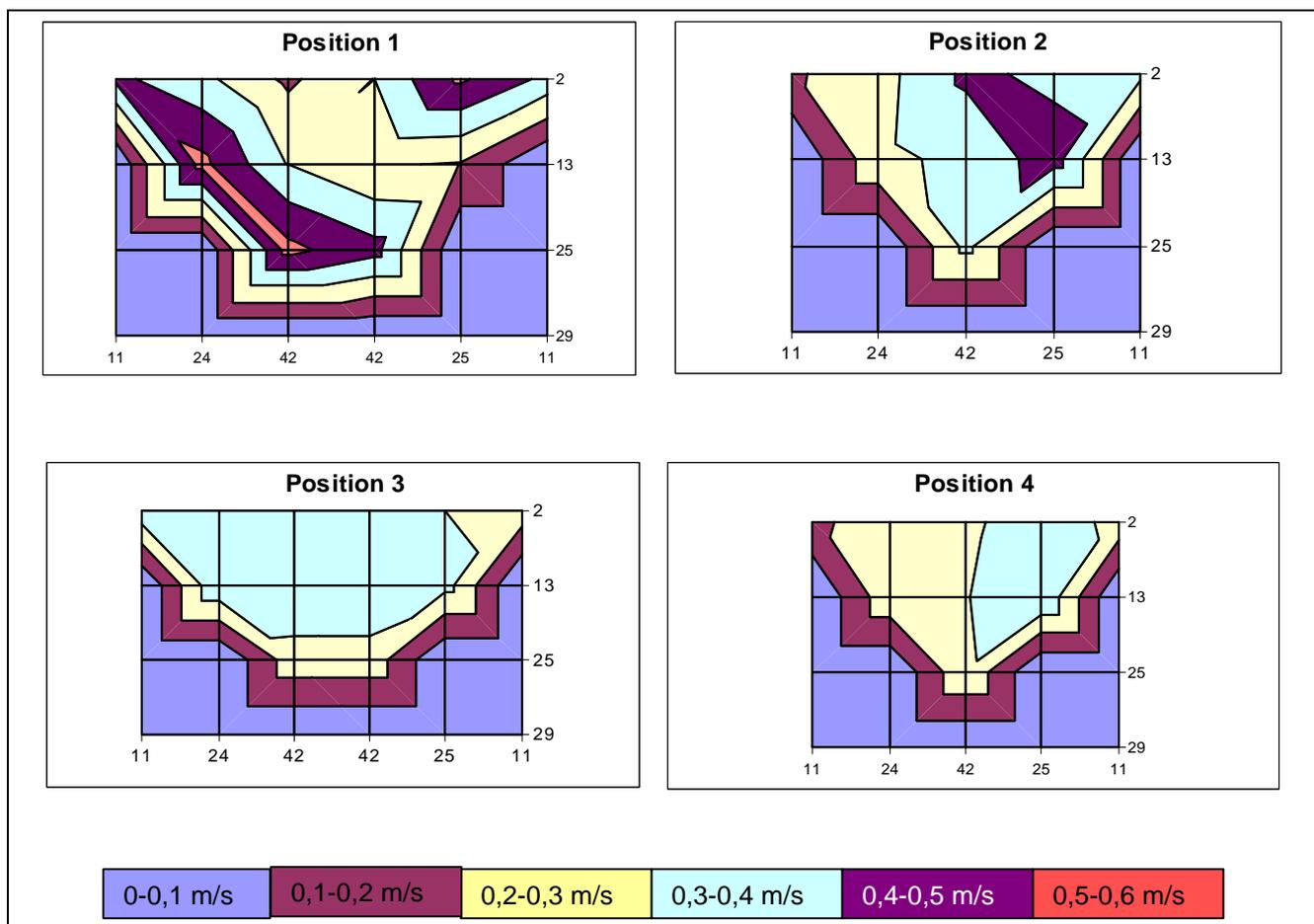
  

<b>Positions verticales</b> des points de mesure (profondeur sous à la surface de l'eau)			
<b>Position 1</b>	2 cm	13 cm	25 cm
<b>Position 2</b>	2 cm	13 cm	25 cm
<b>Position 3</b>	2 cm	13 cm	25 cm
<b>Position 4</b>	2 cm	13 cm	25 cm

**Tableau 13 : 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 26. 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 26 : 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 14 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).

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

**Tableau 14 : Vitesse d'écoulement moyenne déterminée à la position 3**

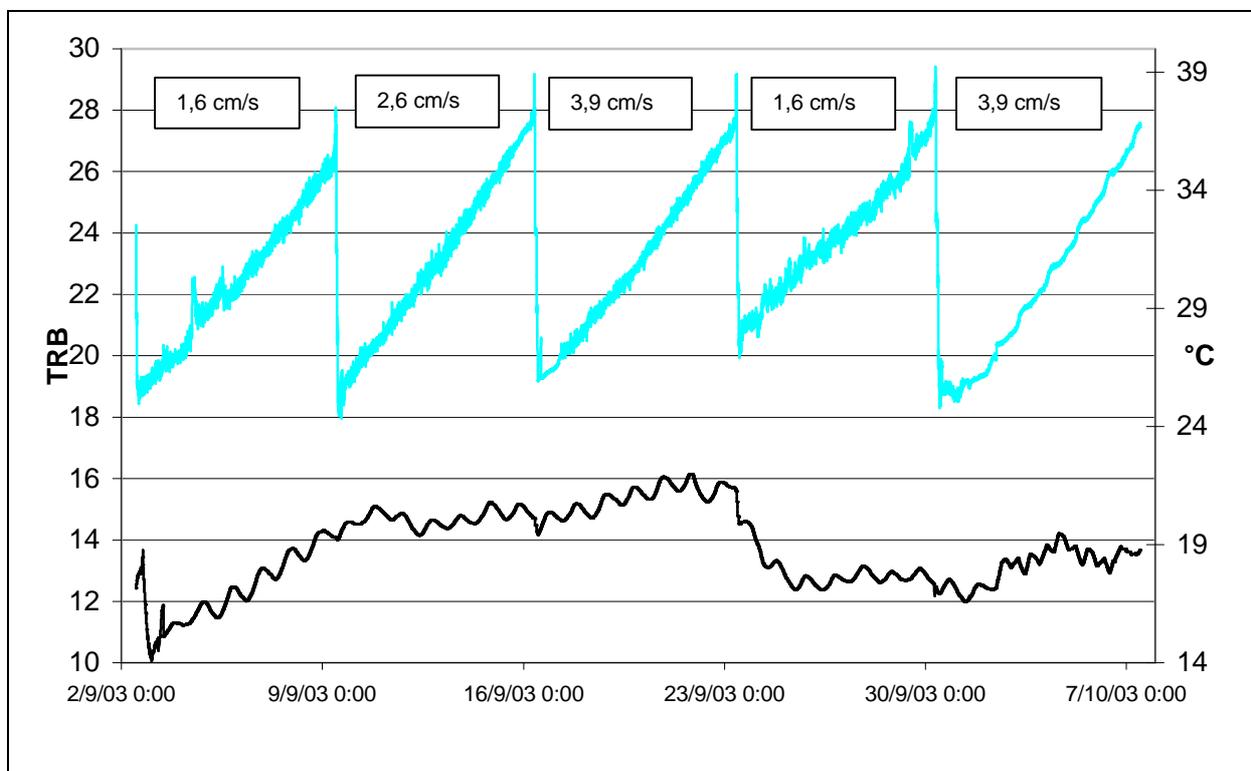
Chaque expérience a débutée avec la même densité de filaments, déterminée en diluant la culture à une valeur de turbidité de 32-35 FNU. La température, le pH et la turbidité ont été enregistrés en continu pendant l'expérience (à l'aide d'une sonde Dr Lange Solitarx t-line). Des échantillons ont été prélevés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

- Conductivité

- Concentration en microcystine intracellulaire
- Concentration en microcystine extracellulaire
- Concentration en 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

### III.3.2. Résultats

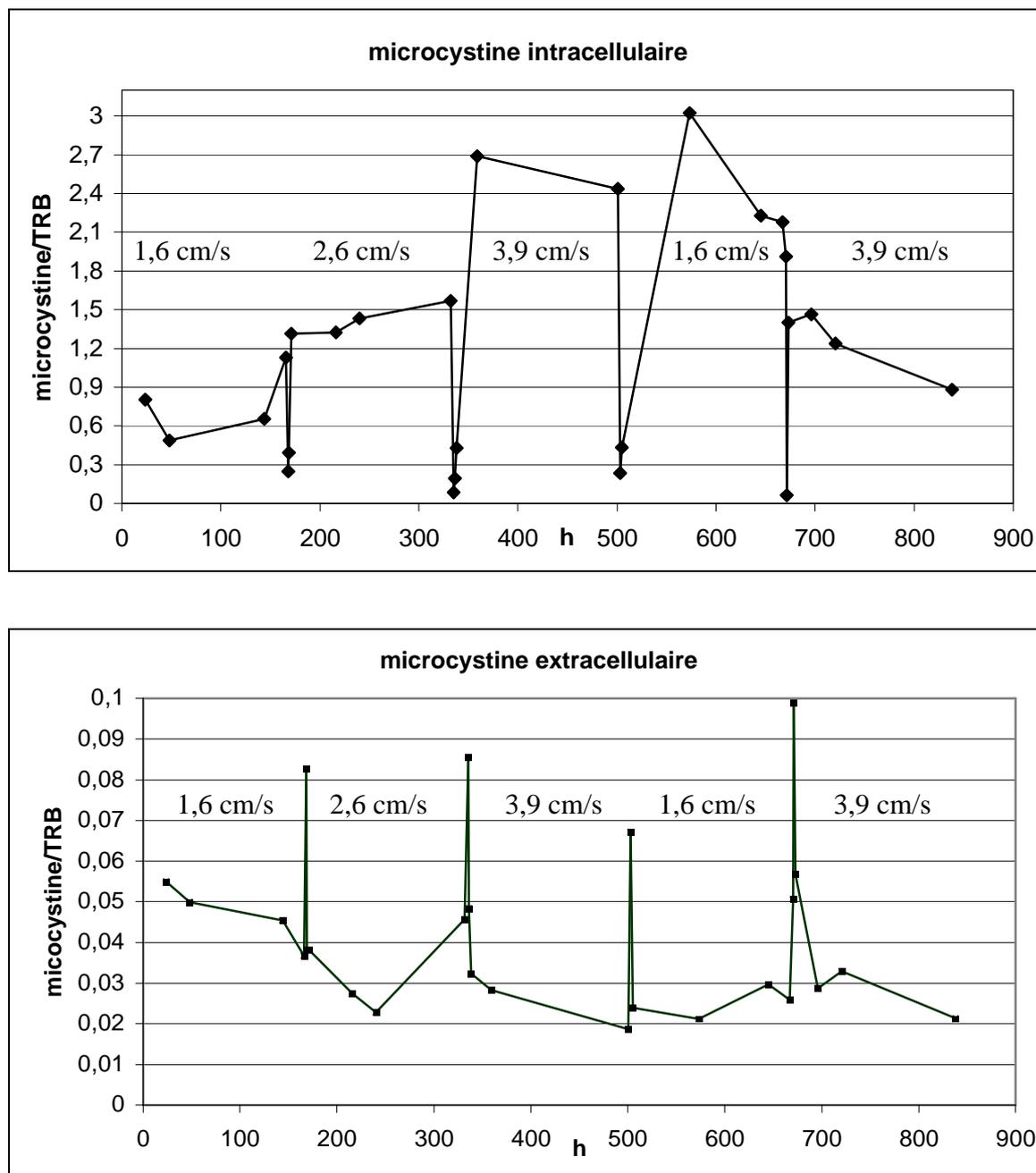
Les taux de croissance des cultures ont été très stables, comme le montre l'augmentation continue de la turbidité lors de expériences (figure 27). De plus, ces taux étaient similaires pour les quatre vitesses d'écoulement, certains taux légèrement plus faibles pouvant s'expliquer par une chute de la 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 27 : 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 27), à part une phase d'adaptation légèrement plus longue.



**Figure 28: 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 la concentration en microcystine intracellulaire et les pics de la concentration en microcystine extracellulaire reflètent les changements de la vitesse d'écoulement.

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 28, 1<sup>er</sup> graphique). 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 III.2). 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.

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.4. Conclusion sur l'impact de la vitesse d'écoulement

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  $6,6 \text{ } \mu\text{g/L}$  (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  $3 \text{ } \mu\text{g/L}$ .

*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.

Des problèmes de rejet de microcystine dû aux forces de cisaillement provoquées par les digues sur l'Erdre sont très improbables. Aucun effet destructeur tel que déclin, lyse des cellules de *Planktothrix* et rejet de toxine n'est à prévoir en cas d'écoulement rapide et de forte turbulence dans l'Erdre. 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 peuvent être utilisés avec succès.

## 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 (voir les références dans la partie VII. Références bibliographiques) 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 des pesticides sur le développement des cyanobactéries est encore mal connu dans le contexte scientifique actuel. Il n'était donc pas prioritaire d'aborder en détail cette problématique complexe dans le cadre de cette étude sur l'Erdre.

## V. 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 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<sub>50</sub> de 10 à 200 µg 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 grandes 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 une espèce dite allochtone (ou invasive) 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. D'après les observations faites dans les lacs de la région de Berlin, sa niche écologique semble 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 1µg/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 structurales 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).

## VI. Conclusion générale sur les travaux de recherche

---

Les travaux de recherche en laboratoire réalisés sur les souches de *Planktothrix agardhii* de l'Erdre ainsi qu'à partir de cultures de laboratoire ont confirmé les connaissances qui émergent actuellement des travaux sur d'autres espèces de cyanobactéries : la limitation de l'éclairement ou des nutriments ne modifie pas le contenu cellulaire en toxines de façon significative, c'est à dire d'un facteur supérieur à 2 ou 3. Puisque ces résultats sur *Planktothrix agardhii* sont cohérents avec ceux obtenus pour d'autres espèces de cyanobactéries, il est peu probable que le fait d'utiliser une souche de l'Erdre productrice de microcystine aurait donné des résultats différents. Ces résultats obtenus pour *Planktothrix agardhii* permettent même de confirmer les connaissances scientifiques actuelles, venant fournir les informations manquantes sur la réponse de cette espèce.

Le seul résultat surprenant était la forte proportion de microcystine extracellulaire observée à la fois lors d'un stress mécanique et lors d'une limitation en nutriments. Pour le stress mécanique, cependant, ces effets ont été très temporaires et les filaments se sont rapidement adaptés aux conditions turbulentes. De plus, en termes absolus, par rapport à la densité de population présente dans les conditions réelles sur le terrain, ces effets ne peuvent probablement pas provoquer de fortes concentrations de toxines dissoutes (les résultats expérimentaux étaient au maximum de 6,6 mg/L de microcystine extracellulaire pour des biovolumes expérimentaux de 400 mm<sup>3</sup>/L, alors que les biovolumes sur le terrain sont dix fois plus faibles).

Pour la limitation en nutriments, ces résultats concernant la microcystine extracellulaire n'ont pas été approfondis car ceci devait constituer l'objectif des expériences sur la vitesse d'écoulement. Pour une évaluation scientifique complète et la quantification de cet effet intéressant sur la microcystine extracellulaire, des travaux plus précis (avec analyse statistique) seront nécessaires. Cependant, ceci était inapproprié dans le cadre de l'étude sur l'Erdre étant donné les objectifs poursuivis.

Dans l'ensemble, les taux de croissance mesurés pour les différentes souches et génotypes de l'Erdre ainsi que des souches de laboratoire productrices de microcystine ont montré l'avantage compétitif de certaines souches de l'Erdre lors d'une limitation en nutriments. Si une limitation prononcée en nutriments était atteinte dans l'Erdre, un avantage compétitif est envisageable pour les souches qui se sont développées plus longtemps dans les cultures batch avant d'atteindre la limitation en nutriments. Cependant, un contrôle fiable des concentrations en microcystine dans l'Erdre peut être obtenu en limitant la capacité de charge de la biomasse de cyanobactéries, c'est à dire en réduisant les concentrations en phosphore, ou –en théorie- également en modifiant les conditions hydrauliques (par augmentation de la vitesse d'écoulement).

Pour les conditions actuelles dans l'Erdre, où les nutriments ne sont pas limités, les résultats ne fournissent pas d'explications pour la situation inhabituelle de l'été 2003, où la population de *Planktothrix agardhii* a consisté presque uniquement de génotypes qui ne produisent pas de microcystine. L'observation d'une population de *Planktothrix agardhii* non productrice de microcystine est rare au vu des publications internationales existantes.

L'hypothèse d'un impact des sédiments par recyclage interne des nutriments a pu être écartée. Les concentrations en phosphore total dans les vases de l'Erdre, de l'ordre de 1,1 g P total /kg sec, laissent prévoir un état mésotrophe. Il est possible que des poches locales de relargage existent, mais le stock de phosphore présent dans les vases de l'Erdre ne représente donc pas une source majeure de nutriments.

La survie de *Planktothrix agardhii* dans les sédiments de l'Erdre en hiver a été observée en janvier 2004 à La Jonelière. Le mécanisme de remise en suspension des filaments dans la colonne d'eau n'a pu être déterminé dans le cadre de cette étude. Cependant, le nombre de filaments observés pourrait représenter un inoculum assez important pour initier un développement d'une population de *Planktothrix* au printemps prochain.

Les tests effectués sur les sédiments de l'Erdre ont montré leur forte capacité à adsorber les microcystines : même après l'ajout de fortes concentrations de microcistine standard, aucune toxine n'a été détectée dans le surnageant des échantillons de sédiments. Pour la gestion de boues de l'Erdre par épandage des boues séchées après dragage des sédiments, un risque lié au rejet de microcistine par lessivage peut être écarté.

## VII. Références bibliographiques

---

### Rôle des sédiments

**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

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

**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»

**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/toxiccyanobact/begin.htm)

**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/11c76c5925e349bcca2569dc001f76dc/\\$FILE/Quantifying+Nutrient.pdf](http://enterprise.canberra.edu.au/WWW/www-directreps.nsf/5918f95283aa103d4a256658001a500a/11c76c5925e349bcca2569dc001f76dc/$FILE/Quantifying+Nutrient.pdf)

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

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

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

**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

**JEPPESEN E., SONDERGAARD Ma, SÖNDERGAARD Mo., CHRISTOFFERSEN K.** (Hsg.) „The structuring role of submerged macrophytes in lakes. Ecological Studies". Springer Vlg. Heidelberg. 131 pp

**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)

**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/>

**LEWANDOWSKI** „Untersuchungen zum Einfluss seeinterner Verfahren auf die Phosphor-Diagenese in Sedimenten“, thèse de doctorat 2002

<http://dochost.rz.hu-berlin.de/dissertationen/lewandowski-joerg-2002-12-06/PDF/Lewandowski.pdf>

**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.

**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)

**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>)

**RÜCKER J., WIEDNER C., ZIPPEL P. (1997)** (Brandenburg Technical University Cottbus, Faculty Environmental Sciences, Waterprotection) "*Factors controlling the dominance of Planktothrix agardhii and Limnithrix redekei in eutrophic shallow lakes*", Hydrobiologia 342/343 : 107-115, 1997.

**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.

**SETUDE Ingénieur Conseil**, Juillet 2003, Rapport Lot 1, Etude Globale des Cyanobactéries dans l'Erdre

**SONDERGAARD M., JENSEN J.P., JEPPESEN E.** « *Retention and internal loading of phosphorus in shallow, eutrophic lakes* », The Scientificworld (2001) 1, 427-442

**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)

**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

**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>

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

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

**WIEDNER C.** „Toxische und nicht-toxische Cyanobakterien in Gewässern der Scharmütelseeregion : 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/)

**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)

**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.

## Méthodes d'analyse

**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

**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. Environ. 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.

### Impact des pesticides sur le développement des cyanobactéries

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