

ETUDE DES CYANOBACTERIES DANS LA RIVIERE TARN

- CAMPAGNE ETE 2005 -

SOMMAIRE

CONTEXTE ET RESUME DE L'ETUDE	1
INTRODUCTION GENERALE	5
I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	6
I. 1. CYANOBACTERIES	6
I. 1. 1. HABITATS	7
I. 1. 2. ORGANISATION DES THALLES	7
I. 1. 2. 1. Diversité structurale	7
I. 1. 2. 2. Diversité cytologique	7
I. 1. 3. CLASSIFICATION DES PRINCIPAUX GENRES TOXIQUES	8
I. 1. 3. 1. Chroococcales	9
I. 1. 3. 2. Oscillatoriales	9
I. 1. 3. 3. Nostocales	10
I. 1. 3. 4. Stigonematales	11
I. 1. 4. PROLIFERATION	12
I. 1. 4. 1. L'intensité lumineuse	13
I. 1. 4. 2. Les vésicules de gaz ou vacuoles de gaz	14
I. 1. 4. 3. Le taux de croissance	15
I. 1. 4. 4. Le phosphore et l'azote	15
I. 1. 4. 5. La stabilité de la population	16
I. 1. 4. 6. La température	16
I. 1. 4. 7. Autres facteurs	16
I. 1. 5. « ECOSTRATEGIES »	16
I. 1. 5. 1. «Ecostrategists» formant des «mousses» ou «agrégatifs»	17
I. 1. 5. 2. «Ecostrategists» dispersés de façon homogène	17

I. 1. 4. 3. «Ecostrategists» formant des strates	18
I. 1. 5. 4. «Ecostrategists» fixateurs d'azote	18
I. 1. 5. 5. Petit taxa formant des colonies	18
I. 1. 5. 6. Cyanobactéries benthiques	18
I. 2. CYANOTOXINES	19
I. 2. 1. STRUCTURES ET PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES CYANOTOXINES	20
I. 2. 1. 1. Les neurotoxines	20
• Les Anatoxines	20
• Les saxitoxines et dérivés	22
I. 2. 1. 2. Les hépatotoxines	23
• Les microcystines	23
• La nodularine	24
I. 2. 1. 3. Les cytotoxines	25
• La cylindrospermopsine et son analogue	25
I. 2. 1. 4. Les dermatotoxines	25
• Les aplysiatoxines	25
• La lyngbyatoxine	25
I. 2. 1. 5. Les toxines dites irritantes ou LipoPolySaccharides (LPS)	25
I. 2. 1. 6. Autres composés bioactifs	26
I. 2. 2. EXTRACTION, CONCENTRATION ET PURIFICATION DES CYANOTOXINES	26
I. 2. 3. ANALYSE DES CYANOTOXINES	27
I. 2. 3. 1. Analyse par chromatographie	27
I. 2. 3. 2. Analyse par méthodes bioanalytiques	27
• Microcystines	27
• Anatoxine-a	29

• Anatoxine-a(s)	30
I. 2. 4. TOXICITE	30
I. 2. 4. 1. Les microcystines	30
• Doses létales	30
• Symptomatologie	30
I. 2. 4. 2. L'anatoxine-a	31
• Doses létales	32
• Symptomatologie	32
• Diagnostic différentiel	32
• Traitement	33
I. 2. 4. 3. L'anatoxine-a(s)	33
• Doses létales	33
• Symptomatologie	33
• Traitement	33
I. 2. 5. TOXINOGENESE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE – PRODUCTION ET REGULATION	34
I. 2. 5. 1. Régulation par les facteurs chimiques et physiques	34
I. 2. 5. 2. Cyanotoxines potentielles en fonction de la composition en différentes espèces et souches d'un bloom	35
I. 2. 5. 3. Variation saisonnière dans les concentrations en toxines d'un bloom	36
I. 2. 5. 4. Répartition entre cellules et eau	36
II. MATERIELS ET METHODES	37
II. 1. PROTOCOLES TERRAIN	37
II. 1. 1. CHECK-LIST DU MATERIEL NECESSAIRE PAR CAMPAGNE	37
II. 1. 2. CHECK-LIST DU FLACONNAGE NECESSAIRE PAR SITE (5 SITES PAR CAMPAGNE)	37

II. 1. 3. MESURES TERRAIN : PH, CONDUCTIVITE, OXYGENE DISSOUS ET TEMPERATURE DE L'EAU	38
II. 1. 4. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS D'EAU POUR L'IDENTIFICATION ET LE COMPTAGE DES CYANOBACTERIES	38
II. 1. 5. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS D'EAU POUR LE DOSAGE DES TOXINES	39
II. 1. 6. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS SUR GALETS POUR L'IDENTIFICATION ET LE COMPTAGE DES CYANOBACTERIES	40
II. 1. 7. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS SUR GALETS POUR LA DETERMINATION DU POIDS SEC	40
II. 1. 8. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS SUR GALETS POUR LE DOSAGE DES TOXINES	41
II. 1. 9. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS DE FLOCS POUR L'IDENTIFICATION ET LE COMPTAGE DES CYANOBACTERIES	41
II. 1. 10. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS DE FLOCS POUR LE DOSAGE DES TOXINES	42
II. 2. COMPTAGE DES CYANOBACTERIES	42
II. 2. 1. COMPTAGE DES CYANOBACTERIES SUR EAU	42
II. 2. 2. COMPTAGE DES CYANOBACTERIES SUR FLOC	44
II. 3. EXTRACTION ET DOSAGE DES TOXINES	45
II. 3. 1. EXTRACTION ET DOSAGE DES MICROCYSTINES LR ET RR	45
II. 3. 1. 1. Structures et propriétés physicochimiques des Microcystines	45
II. 3. 1. 2. Extraction des microcystines	46
<u>Méthodes</u>	46
<u>Protocoles</u>	46
II. 3. 1. 3. Analyse par chromatographie en phase liquide des microcystines	47
<u>Méthodes</u>	47
<u>Protocoles</u>	48

II. 3. 2. EXTRACTION ET DOSAGE DE L'ANATOXINE A	49
II. 3. 2. 1. Structures et propriétés physicochimiques de l'anatoxine-a	49
II. 3. 2. 2. Extraction de l'anatoxine-a	49
<u>Méthodes</u>	49
<u>Toxines d'origine intracellulaire</u>	49
<u>Toxines dissoutes dans des milieux aqueux</u>	50
<u>Protocoles</u>	51
II. 3. 2. 3. Analyse par chromatographie en phase liquide de l'anatoxine-a	52
<u>Méthodes</u>	52
<u>Protocoles</u>	52
II. 3. 3. DOSAGE DE L'ANATOXINE A(S)	53
II. 3. 3. 1. Méthode	53
II. 3. 3. 2. Définitions	54
II. 3. 3. 3. Protocoles	54
II. 3. 3. 4. Résultats	55
III. RESULTATS	56
III. 1. OBSERVATIONS PRELIMINAIRES	56
III. 2. CAMPAGNES DE ROUTINE	57
III. 2. 1. PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES	58
III. 2. 1. 1. Température	58
III. 2. 1. 2. pH	60
III. 2. 1. 3. Conductivité	62
III. 2. 1. 4. O₂ dissous	64
III. 2. 2. ANALYSE DE L'EAU	66

III. 2. 2. 1. Dénombrement des cyanobactéries présentes dans l'eau	66
III. 2. 2. 2. Identification des cyanobactéries présentes dans l'eau	68
III. 2. 2. 3. Toxines dans l'eau	71
III. 2. 3. ANALYSE DES BIOFILMS DES GALETS	71
III. 2. 3. 1. Dénombrement des cyanobactéries dans les biofilms des galets	71
III. 2. 3. 2. Identification des cyanobactéries dans les biofilms des galets	73
III. 2. 3. 3. Matières sèches sans cendre dans les biofilms des galets	76
III. 2. 3. 4. Toxines dans les biofilms des galets	77
<u>anatoxine a</u>	77
<u>anatoxine a(s)</u>	78
<u>microcystines LR et RR</u>	79
III. 2. 4. ANALYSE DES FLOCS	80
III. 2. 4. 1. Comptage des cyanobactéries dans les flocs	80
III. 2. 4. 2. Identification des cyanobactéries dans les flocs	82
III. 2. 4. 3. Toxines dans les flocs	85
<u>anatoxine a</u>	86
<u>anatoxine a(s)</u>	87
<u>microcystines LR et RR</u>	87
III. 2. 5. CONCLUSIONS	87
III. 3. CAMPAGNES D'URGENCE	89
III. 3. 1. CHIEN DECEDE LE 26 JUIN 2005 AU MAS DE LAFONT (P6)	91
III. 3. 1. 1. Identification / comptage des cyanobactéries dans l'eau	92
III. 3. 1. 2. Identification / comptage des cyanobactéries dans les biofilms des galets	92
III. 3. 1. 3. Toxines dans les biofilms des galets	92

III. 3. 1. 4. Identification / comptage des cyanobactéries dans les floes	92
III. 3. 1. 5. Toxines dans les floes	93
III. 3. 1. 6. Toxines dans le contenu stomacal	93
III. 3. 2. CHIEN DECEDE LE 03 JUILLET 2005 A SAINT GEORGES DE LEVEJAC – LE SOULIO (P7)	93
III. 3. 2. 1. Identification / comptage des cyanobactéries dans l'eau	93
III. 3. 2. 2. Identification / comptage des cyanobactéries dans les biofilms des galets	94
III. 3. 2. 3. Toxines dans les biofilms des galets	94
III. 3. 2. 4 Toxines dans le contenu stomacal et dans le foie	95
III. 3. 3. CHIEN DECEDE LE 27 JUILLET 2005 A SAINTE ENIMIE - MAISONNEUVE (P8)	95
III. 3. 3. 1. Identification / comptage des cyanobactéries dans l'eau	95
III. 3. 3. 2. Identification / comptage des cyanobactéries dans les biofilms des galets	96
III. 3. 3. 3. Toxines dans les biofilms des galets	96
III. 3. 3. 4. Identification / comptage des cyanobactéries dans les floes	97
III. 3. 3. 5. Toxines dans les floes	97
III. 3. 3. 6. Toxines dans le contenu stomacal et dans le foie	98
III. 3. 4. CHIEN DECEDE LE 05 AOUT 2005 A LES VIGNES (P9)	99
III. 3. 4. 1. Identification / comptage des cyanobactéries dans l'eau	99
III. 3. 4. 2. Identification / comptage des cyanobactéries dans les biofilms des galets	99
III. 3. 4. 3. Toxines dans les biofilms des galets	100
III. 3. 4. 4. Identification / comptage des cyanobactéries dans les floes	100
III. 3. 4. 5. Toxines dans les floes	100
III. 3. 4. 6. Toxines dans le contenu stomacal et dans le foie	100

III. 3. 5. CHIEN DECEDE LE 25 AOUT 2005 A SAINT GEORGES DE LEVEJAC – DEBARCADERE (P10)	102
III. 3. 5. 1. Identification / comptage des cyanobactéries dans l'eau	102
III. 3. 5. 2. Identification / comptage des cyanobactéries dans les biofilms des galets	102
III. 3. 5. 3. Toxines dans les biofilms des galets	103
III. 3. 5. 4. Identification / comptage des cyanobactéries dans les floes	103
III. 3. 5. 5. Toxines dans les floes	103
III. 3. 5. 6. Toxines dans le contenu stomacal et dans le foie	104
III. 3. 6. CONCLUSION	104
CONCLUSION GENERALE	106
ANNEXES	109

CONTEXTE ET RESUME DE L'ETUDE

Au cours des étés 2002 et 2003, la vallée du Tarn a connu dans le secteur des communes de Sainte Enemie et de Florac, plusieurs incidents de mortalités de chiens, suite à une baignade ou une promenade le long de la rivière Tarn. Les animaux parfois de poids importants (jusque 40 kg) sont décédés à la suite de convulsions, une quinzaine de minutes après le contact avec la rivière où ils ont bu de l'eau, léché les cailloux ou mangé de la « vase ».

L'hypothèse d'empoisonnements avait été écartée suite aux analyses réalisées sur les cadavres de chiens. Comme les symptômes de convulsions et d'hypersalivation observés chez les chiens mourants ressemblaient à ceux provoqués par l'ingestion de neurotoxines produites par des cyanobactéries toxiques et que l'été 2003 a été particulièrement chaud et sec, ce qui est favorable au développement de ces algues, la piste des cyanobactéries avait été suivie. Ainsi, des échantillons d'eau ont été prélevés par la DDASS aux endroits où les chiens étaient morts pour une analyse du phytoplancton et une recherche de microcystines conformément aux recommandations de la Direction Générale de la Santé pour les eaux de baignade et l'anatoxine-a(s) a été recherchée dans les foies des chiens morts. Les analyses d'eau ont mis en évidence la présence de cyanobactéries potentiellement toxiques appartenant aux genres *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* et *Lyngbya* à des concentrations cellulaires parfois supérieures aux recommandations de la DGS pour les eaux de baignade avec production de microcystines à de faibles concentrations. Par ailleurs, des traces de neurotoxines (anatoxine-a) ont été détectées par l'Institut Pasteur sur un échantillon prélevé à Sainte-Enemie au mois d'août et contenant essentiellement le genre *Lyngbya*, qui est une cyanobactérie benthique (c.-à-d. formant des biofilms sur les galets). Les analyses (inhibition de l'enzyme acétylcholinestérase) réalisées sur les échantillons de foie de chien par l'Ecole Vétérinaire de Lyon, se sont révélées positives ce qui atteste de la présence soit d'une neurotoxine, l'anatoxine-a(s), soit d'un pesticide de type carbamate mais la méthode utilisée ne permettait pas d'identifier l'agent responsable. La mortalité des chiens n'avait donc pas pu être attribuée de façon certaine à l'ingestion de cyanobactéries toxiques ou à l'ingestion de composés particuliers (toxine ou pesticide) par manque de données.

Suite à ces évènements l'Agence de l'Eau Adour-Garonne a demandé en 2004 au CRITT Bio-Industries de réaliser une étude sur la rivière Tarn. Cette étude comprenait deux parties, la première étant un bilan des données existantes au niveau du bassin versant afin d'évaluer si les conditions de milieu étaient favorables à la prolifération des cyanobactéries, la seconde portant sur la réalisation de campagnes de mesure sur les algues et leurs toxines en particulier, au cours de l'été 2004. L'étude des données des paramètres physico-chimiques relevées dans la rivière Tarn au cours des années 1994-2004 a mis en évidence des pics en phosphore total parfois supérieurs à 0,2 mg/L au cours de l'été 2003 en plusieurs endroits, et ce parfois dès le mois de juin (stations Ferrat et Le Menial). Cette même année les débits du Tarn étaient particulièrement bas dès le mois de juin. Ce fait combiné à la température relativement élevée de l'eau et peut-être à une plus faible transparence de celle-ci (plus de MES qu'en 2004 par exemple) a sans doute favorisé la formation de zones où l'eau était peu renouvelée, voire de flaques ou de mares dans lesquelles le phosphore a pu se concentrer favorisant ainsi le développement de cyanobactéries. Quant aux campagnes de mesure portant sur les algues et leurs toxines présentes dans les échantillons d'eau et de biofilms de galets prélevés sur cinq sites retenus sur la base des incidents survenus les années précédentes, dans la mesure où il n'y a pas eu de développement particulier de cyanobactéries au cours de l'été 2004 ni d'incidents, aucune conclusion n'a pu être tirée de cette étude.

Malgré une année 2004 sans incident, les autorités ont maintenu un ensemble de mesures en 2005 pour prévenir et mieux gérer d'éventuels incidents. Une campagne d'information a été mise en place (panneaux conseillant aux touristes de ne pas laisser leurs chiens patauger ou boire dans la rivière) et une nouvelle étude sur les cyanobactéries du Tarn, financée par l'Agence de l'Eau Adour-Garonne, a été confiée au CRITT Bio-Industries qui l'a réalisée en partenariat avec le LDA 48, le CSP de la Lozère, le Conseil Général de la Lozère et la société Protein BioSensor. Dans cette étude il était prévu un ensemble de huit campagnes de « routine » avec des prélèvements et analyses de l'eau et des biofilms se développant sur les galets des cinq sites retenus en 2004, les prélèvements et mesures des paramètres physico-chimiques ainsi que les identifications et comptages des cyanobactéries devant être effectués par le LDA 48, l'acheminement des échantillons du LDA 48 au CRITT Bio-Industries par un chauffeur du Conseil Général de la Lozère, les analyses d'anatoxine-a(s) par la société Protein BioSensor, la coordination de l'étude et des interventions étant assurée par le CRITT Bio-Industries de même que les déterminations de matières sèches et matières sèches sans cendre ainsi que les analyses d'anatoxine-a et de microcystines-RR et -LR. Cette étude avait pour objectif de suivre un éventuel développement de cyanobactéries accompagné ou non d'une production de cyanotoxines, et de rechercher le cas échéant dans la littérature les conditions favorisant le développement de ce ou ces genre(s) de cyanobactéries et la production de la ou des cyanotoxine(s) en question, afin d'émettre si possible des recommandations.

Dès le mois de juin 2005 sont apparus les premiers flocs et le premier cas de mortalité de chien. Suite à ces premiers constats nous avons décidé de réaliser des prélèvements sur trois compartiments, l'eau, les biofilms de galets et les flocs quand ceux-ci seraient présents, que ce soit lors des huit campagnes de « routine » prévues initialement (deux par mois de juin à septembre) ou des cinq campagnes « d'urgence » consécutives à des décès de chiens. Bien qu'il ne soit pas habituel de réaliser des dénombrements de cyanobactéries dans les biofilms de galets et dans les flocs, ces estimations ont été réalisées en plus de la recherche de microcystines et d'anatoxines, car elles sont intéressantes. En ce qui concerne les campagnes « d'urgence » nous avons suggéré et proposé des protocoles pour l'extraction et l'analyse en termes de toxines et notamment d'anatoxine-a des contenus stomacaux des chiens décédés en complément des analyses d'anatoxine-a(s) dans les foies qui étaient demandées. En effet, la description de symptômes n'est pas toujours simple à faire chez les animaux intoxiqués, et cela complique d'autant plus le diagnostic différentiel. Le seul moyen de conclure de façon certaine quant à la toxine ingérée est le diagnostic de laboratoire, avec identification de la toxine.

Lors des campagnes de prélèvements de « routine » de l'été 2005, trois compartiments ont été étudiés : l'eau, les biofilms de galets et les flocs. Les mesures des paramètres physico-chimiques de l'eau ont révélées que la température moyenne de l'eau aux différents points de mesure était sensiblement la même en 2005 qu'en 2004. Cependant, en 2005 les maxima ont été atteints fin juin avec des valeurs supérieures à 25°C sur certains sites, alors qu'en 2004 ces maxima avaient été relevés en août. De plus nous pouvons noter qu'en 2004 les courbes de température de l'eau mesurées aux différents points suivaient la même évolution, alors qu'en 2005 les sites P2-Prades et P4-Pougnadoires se distinguent des trois autres avec une évolution différente surtout début juillet avec des valeurs globalement plus élevées. Des températures élevées ont notamment un effet négatif sur la solubilité de l'oxygène, pouvant favoriser de ce fait le développement de cyanobactéries par rapport à d'autres algues dépourvues de chloroplastes. Pour ce qui est de l'oxygène dissous, en 2004 les fluctuations dans l'eau du Tarn aux points de mesure étaient mineures. Des fluctuations plus importantes ont pu être notées en 2005 toujours sur les sites P2-Prades et P4-Pougnadoires. Il faut noter de plus que les débits du Tarn à la station de mesure de La Muse étaient particulièrement bas cette année, tout comme en 2003. Ce phénomène combiné à des températures élevées en début de saison peut contribuer au développement de cyanobactéries. Toujours en ce qui concerne l'eau, les concentrations en cyanobactéries étaient inférieures au seuil

d'alerte 1 sauf dans un cas isolé. Dans la mesure où seuls deux compartiments devaient être analysés initialement (eau et biofilms de galets), et où des analyses de campagnes d'urgence non prévues dans le contrat ont du être réalisées, l'analyse des toxines n'a pas été réalisée dans le compartiment eau. Il nous a semblé plus opportun de rechercher les toxines dans les biofilms se développant sur les galets et dans les floes.

Dans le cas des biofilms de galets, des concentrations élevées en cyanobactéries pouvant atteindre 261 870 cellules par cm² ont été relevées avec présence de six genres de cyanobactéries potentiellement productrices d'hépatho- ou de neurotoxines (*Anabaena*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothrix* et *Pseudanabaena*). La recherche de microcystines -LR et -RR, d'anatoxines-a et -a(s) a donc été réalisée sur ces échantillons. Seule de l'anatoxine-a a été mise en évidence dans un échantillon de biofilm. Dans cet échantillon, deux genres de cyanobactéries potentiellement productrices d'anatoxine-a ont été identifiés (*Oscillatoria* et *Pseudanabaena*).

Pour ce qui est des floes, ils ont été observés et prélevés sur les cinq sites à des fréquences différentes. Les sites présentant le plus souvent ce type de formation sont P4-Pougnadoires ainsi que P2-Prades et P5-La Malène. Des concentrations très élevées en cyanobactéries pouvant atteindre 570 800 000 cellules par gramme de matière humide ont été relevées avec présence de cinq genres de cyanobactéries susceptibles de produire des hépatho- ou des neurotoxines (*Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothrix* et *Pseudanabaena*). Une recherche de toxines a mis en évidence la présence d'anatoxine-a dans cinq échantillons (trois prélevés à P4-Pougnadoires et deux à P5-La Malène). Sur ces cinq échantillons, trois genres de cyanobactéries potentiellement productrices de toxines (*Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Pseudanabaena*) ont systématiquement été identifiés. Les genres *Phormidium* et *Planktothrix* également potentiellement producteurs de toxines n'ont été trouvés que dans deux échantillons. L'anatoxine-a est susceptible d'être produite par seulement deux d'entre eux (*Oscillatoria*, *Pseudanabaena*). Il est à noter que les genres *Lyngbya* et *Planktothrix* sont également susceptibles de produire des saxitoxines et gonyautoxines.

Cinq décès de chiens ayant eu lieu au cours de cet été 2005, des campagnes de prélèvements et d'analyses dites « d'urgence » ont été réalisés afin de tenter de déterminer la cause de ces incidents mortels. Lors de ces campagnes « d'urgence », les prélèvements d'eau, de biofilms et de floes ont été réalisés par les agents du CSP de Lozère. Les identifications et comptages des cyanobactéries dans ces trois compartiments ont été effectués par le LDA 48, de même que la prise en charge des organes des chiens décédés (foie et estomac) pour les extractions en vue des analyses de toxines. Les analyses d'anatoxine-a(s) dans la biomasse algale et les organes ont été réalisées par la société Protein BioSensor. Les analyses d'anatoxine-a et de microcystines -RR et -LR sur la biomasse algale et les extraits animaux ont été faites au CRITT Bio-Industries. Ces analyses complémentaires et systématiques étaient nécessaires pour établir ou non un lien direct entre les cyanobactéries et les décès des chiens. Pour cela il était indispensable de disposer de la concentration en cyanobactéries dans les différents compartiments de la rivière (eau, biofilm et floe) prélevés sur les lieux où les chiens sont susceptibles d'en avoir ingéré et de leur identification, ainsi que de données sur les différentes cyanotoxines évoquées en 2002-2003 dans les biofilms et floes, de même que dans les organes des chiens décédés (contenus stomacaux et foies).

La recherche de toxines dans les prélèvements de biomasse algale (biofilms ou floes) a mis en évidence la présence d'anatoxine-a dans trois échantillons de floes prélevés sur les lieux où les chiens décédés le 27 juillet 2005, le 05 août 2005 et le 26 août 2005 sont susceptibles d'être allés. L'anatoxine-a a une DL₅₀ par voie orale de 5000 µg par kg de poids vif chez la souris. Ne disposant pas de ce type de données chez le chien, nous avons pris comme hypothèse le fait que cette valeur est la même pour l'espèce canine. En prenant l'exemple d'un chien de 10 kg, la

consommation d'environ 30 g du floc prélevé au point P8 - Maisonneuve le 27 juillet 2005 exprimé en matière sèche soit environ 300 g de matière humide correspondrait à une dose létale. Pour les deux autres cas où de l'anatoxine-a a été trouvée dans des floes, les quantités supposées être létales obtenues par calcul apparaissent comme invraisemblables. Cependant les floes sont hétérogènes, des concentrations variables en anatoxine-a peuvent être trouvées sur différents échantillons prélevés sur la même zone. Cette toxine a également été détectée dans deux contenus stomacaux, celui du chien décédé le 03 juillet 2005 et celui décédé le 05 août 2005, à raison de 7 et 4 µg / g de matière humide.

Même si les propriétés toxiques de certaines cyanobactéries commencent à être bien connues, les intoxications d'animaux domestiques en 2002 et 2003 dans les gorges du Tarn ont montré qu'il n'était pas aisé de mettre en évidence un lien de cause à effet entre la présence de cyanobactéries dans l'eau et la mortalité des animaux. Une combinaison d'analyses systématiques nous a permis en 2005 lors de nouveaux incidents d'établir ce lien de cause à effet entre les cyanobactéries du Tarn via une cyanotoxine et la mort des chiens de cette année. En effet, de l'anatoxine-a ayant été trouvée dans le contenu stomacal du chien décédé le 05 août 2005 et dans un échantillon de floes qu'il est susceptible d'avoir ingéré établi un lien direct entre la présence de floes contenant de l'anatoxine-a produite par une cyanobactérie appartenant au genre *Oscillatoria* ou *Pseudanabaena* et ce décès.

Au vu des résultats de cette année certains éléments doivent être pris comme signaux d'alerte pour le déclenchement des campagnes de prévention : de faibles débits et une température élevée de l'eau dès les mois de mai-juin. En termes de prévention, il est important de réaménager le cours d'eau en priorité dans les zones concernées par les incidents passés afin de limiter la formation de bras morts de la rivière en période de sécheresse. Des mesures pratiques de prévention de surcharge en nutriments des eaux usées ménagères et de l'agriculture doivent également être mises en place, ainsi qu'une mise aux normes des stations d'épuration qui sont sous-dimensionnées.

INTRODUCTION GENERALE

Le présent rapport comporte en première partie une synthèse bibliographique sur les cyanobactéries (habitat, organisation, classification, prolifération, « écostratégies » développées), ainsi que sur les cyanotoxines (structures, propriétés physico-chimiques, extraction, analyse, toxinogénèse).

Dans un second temps sont développés les matériels et méthodes.

En troisième partie figurent les résultats et conclusions des campagnes de « routine » et « d'urgence » réalisées au cours de l'été 2005.

La conclusion générale est centrée sur la toxine détectée et sur les données existantes s'y rapportant.

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette synthèse a été élaborée à partir de deux ouvrages de référence dans le domaine des cyanobactéries et cyanotoxines, et d'une thèse pour ce qui est des parties relatives à la classification des principales espèces toxiques et d'une partie des données sur la toxicité :

- Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. 1999. CHORUS I., BARTRAM J eds. E & FN Spon, London and New York.
- Toxines d'algues dans l'alimentation. 2001. FREMY J.-M., LASSUS P. eds. Editions IFREMER
- Toxicité des cyanobactéries d'eau douce vis-à-vis des animaux domestiques et sauvages. 2005. Thèse de Jérémy SILVANO présentée et soutenue à l'Université Claude Bernard – Lyon 1

I. 1. CYANOBACTERIES

Le terme « cyanobactéries », le plus usité actuellement, désigne les microorganismes procaryotes à pigmentation généralement bleu-vert. Ces microorganismes présentent des propriétés communes à la fois aux algues et/ou aux bactéries.

Comme les algues, les cyanobactéries possèdent de la chlorophylle a, et non de la bactériochlorophylle, ainsi que deux photosystèmes ; elles utilisent l'eau comme donneur d'électrons et font une photosynthèse productrice d'oxygène. Elles renferment aussi des phycobiliprotéines comme les algues rouges, les dinophycées et les cryptophytes. Certaines d'entre elles ont aussi de vraies ramifications et des jonctions cellulaires permettant les échanges de cellule à cellule.

Les caractéristiques communes des cyanobactéries et des bactéries sont l'absence de membrane nucléaire et plastidiale, de mitochondries, de réticulum endoplasmique et de dictyosome, et la présence d'une paroi cellulaire caractéristique des bactéries Gram- avec de la muréine.

Ces diverses propriétés donnent ainsi lieu à une confusion apparente dans la terminologie. En effet, ces organismes sont désignés par de nombreux noms suivant la spécialité des chercheurs qui les étudient :

- Algues bleues ou Cyanophytes ou Cyanophycées, pour les botanistes ;
- Cyanobactéries pour les microbiologistes.

D'un point de vue systématique, ce sont des procaryotes placés dans le règne des Eubacteria. La classification de ces organismes dépend à la fois du Code International de Nomenclature Botanique (ICBN) et du Code International de Nomenclature des Bactéries (ICNB).

A l'heure actuelle, le terme de cyanobactéries englobe donc les mêmes organismes que celui des Cyanophytes (représentés par une seule classe, celle des Cyanophycées) et les deux sont valides pour la systématique. Cependant, il est utile de préciser que les noms de genres et d'espèces utilisés actuellement pour l'identification et la systématique des cyanobactéries (Cyanophytes) sont empruntés à la botanique.

Les cyanobactéries, qui ne possèdent pas de membrane autour de leur noyau mais qui contiennent de la chlorophylle a, réalisant ainsi la photosynthèse, peuvent proliférer de façon massive avec formation possible d'efflorescences, nommées aussi fleurs d'eau ou blooms, dans certaines conditions environnementales. Il est désormais établi que l'eutrophisation croissante des

écosystèmes aquatiques contribue au développement des cyanobactéries, même si les conditions d'apparition des efflorescences sont encore mal connues. Les eaux calmes des lacs, réservoirs et marais sont plus atteintes par les développements de cyanobactéries que les rivières agitées.

I. 1. 1. HABITATS

Les cyanobactéries sont répertoriées dans la plupart des habitats. Elles supportent de larges variations de salinité (lacs hypersalés, lacs oligotrophes...), de température (sources thermales, glaciers...), de pH (tourbières acides, eaux carbonatées...) et d'éclairement (cavernes...). Elles colonisent aussi les surfaces des sols humides, les parties internes des sols arides, la partie superficielle des roches (organismes épilithiques) ou leur partie profonde (organismes endolithiques).

Beaucoup vivent aussi en association avec d'autres êtres vivants, étant alors endozoïques (avec des animaux comme les protozoaires, des éponges, des ascidies...), endophytiques (avec des végétaux comme des fougères aquatiques, des angiospermes...) ou encore symbiotiques (avec des champignons, constituant les phycobiontes des lichens).

Lorsqu'elles sont strictement aquatiques, elles peuvent être planctoniques, vivant alors dans la colonne d'eau, ou benthiques, étant, dans ce cas, fixées ou très proches des divers substrats (roches, coraux, algues, animaux...) ou se développant même à l'intérieur des sédiments.

I. 1. 2. ORGANISATION DES THALLES

I. 1. 2. 1. Diversité structurale

L'organisation des thalles de cyanobactéries est caractérisée par une grande variété. Les formes les plus simples sont unicellulaires, sphériques, ellipsoïdales, cylindriques, ovoïdes ou piriformes, nues ou entourées d'une gaine mucilagineuse homogène ou stratifiée. Plus complexes sont les colonies, agrégats de cellules (aux formes identiques à celles décrites précédemment) au nombre généralement variable, non jointives, enrobées dans un mucilage commun. La forme des colonies est très diversifiée, allant de la structure monostromatique (colonie plane à une seule couche de cellules) à la structure amorphe (nombreuses cellules dans un mucilage commun sans contour défini), en passant par les formes cubiques, sphériques, linéaires.

Les thalles les plus élaborés sont organisés sur le modèle filamentueux unisériel (une seule série de cellules jointives) ou plurisériel (plusieurs séries de cellules jointives), non ramifié ou de vraies ou fausses ramifications, sans gaine ou avec gaine mucilagineuse homogène ou stratifiée. Une entité organisée en une seule série de cellules est qualifiée de trichome, tandis que la même accompagnée d'une gaine porte le nom de filament. La gaine, constituée de polysaccharides, est incolore ou colorée (jaune, orangé, rouge...), car elle est souvent imprégnée par des sels de fer et de manganèse... Elle peut renfermer un ou plusieurs trichomes selon les genres considérés.

I. 1. 2. 2. Diversité cytologique

Il existe trois types principaux de cellules :

- Les cellules végétatives, au contenu peu différencié (en microscopie photonique) sauf lorsqu'elles renferment des vacuoles gazeuses (aérotopes), très réfringentes (responsables

de la flottabilité des thalles qui en possèdent), et de couleurs très diverses, conséquence des teneurs respectives en pigments photosynthétiques tels que la chlorophylle a (vert), la phycocyanine (bleu) et la phycoérythrine (rouge) et en substances hélioprotectrices ;

- Les hétérocystes, à paroi épaisse et au contenu homogène faiblement coloré. Leur forme est sphérique, cylindrique, voire conique. Leur position dans le trichome est soit intercalaire, soit terminale à l'une des extrémités seulement ou aux deux, ou encore latérale (pédicellée). Les hétérocystes sont généralement solitaires mais peuvent aussi apparaître en paire et, plus rarement, en série. La présence, dans les hétérocystes, de la nitrogénase leur confère la capacité de fixer l'azote moléculaire dissous dans l'eau pour le transformer en azote assimilable par la cellule. Les hétérocystes ne sont présents que chez certaines formes filamenteuses et, ce, seulement lorsque les conditions écologiques nécessaires à leur formation sont réunies ;
- Les akinètes. Ce sont des cellules généralement plus grandes que les cellules végétatives et les hétérocystes. Leur paroi est très épaissie et peut être colorée et ornementée. Leur contenu apparaît rempli de gros granules sphériques ou polyédriques. Leur teneur en ADN est plus importante, de même que celles de la cyanophycine (réserve protéique) et du glycogène (réserve de glucides). Les akinètes sont des cellules de repos, capables de résister à des conditions écologiques très défavorables et qui, après retour à une situation environnementale normale, peuvent germer et redonner un thalle. Les akinètes n'existent que dans certaines structures filamenteuses. Ils sont solitaires ou disposés en série dans le trichome, en position intercalaire ou subterminale, adjacente ou éloignée des hétérocystes.

I. 1. 3. CLASSIFICATION DES PRINCIPAUX GENRES TOXIQUES

L'appartenance des cyanobactéries aux algues ou aux bactéries procaryotes est toujours discutée. Cependant, il est cependant possible de combiner les observations faites par les botanistes sur le terrain avec celles faites par les microbiologistes en culture pure. Par exemple, *Nostoc muscorum*, algue filamenteuse dans la nature, se transforme en culture en un organisme coccoïde solitaire lorsqu'il est placé à l'obscurité sur un substrat contenant du glucose et du saccharose. La morphologie, même en culture, varie énormément en fonction des conditions de l'environnement.

La classification des botanistes est basée sur :

- la taille des cellules,
- la présence ou l'absence de gaine,
- la présence ou l'absence d'hétérocystes ou d'akinètes,
- la nature des organes reproducteurs (spores, homogonies).

A cette classification, il est nécessaire de faire les remarques suivantes :

- les caractères morphologiques peuvent varier en fonction du milieu,
- le diamètre des trichomes et la présence ou l'absence de gaine varient également en fonction du milieu,
- la présence ou l'absence d'hétérocystes dépend de la concentration en azote combiné autant que du génome. En effet, en présence de nitrates, l'algue bleue ne forme pas d'hétérocystes.

La classification des microbiologistes qui s'appuie uniquement sur les observations faites sur des cultures de cyanobactéries ne tient pas compte des observations faites par les botanistes sur le terrain.

Avec ces quelques réserves émises sur la variabilité des caractères en fonction du milieu naturel ou de la culture, SILVANO propose la classification botanique d'ANAGOSTIDIS et KOMAREK pour les ordres Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales et de DESIKACHARY un peu améliorée pour les Stigonematales.

I. 1. 3. 1. Chroococcales (décrites par Welts en 1924)

Les Chroococcales sont formées de thalles coccoïdes (cellules solitaires ou agrégées en colonies mucilagineuses), elles sont rarement équipées de pseudofilaments, et ne possèdent pas d'hétérocystes ni d'akinètes. Elles sont équipées de vésicules gazeuse (sauf les Chamaesiphonacées), se multiplient par division binaire (un plan de division) ou division multiple (deux ou n). Elles sont caractérisées par la formation facultative d'exocytes ou de nanocytes par division multiple d'une cellule végétative. Elles sont monocytes ou planocytes.

- Microcystaceae (Elenk. 1933)
 - *Cyanothece* Kom. 1976
 - *Microcystis* Kuetz 1833 (= *Anacystis* Menegh. 1837, sensu Kuetzing 1849)
C'est l'un des genres les plus connu et répandu, et réputé pour être potentiellement toxique
 - *Gloeocapsa* Kuetz 1843
 - *Synechococcus* Naeg 1849
 - *Coleosphaerium* Naeg 1849
 - *Gomphosphaeria* Kuetz 1833
 - *Merismopedia* Meyen 1839
 - *Synechocystis* Sauv. 1892
- Chroococcaceae Naeg 1849
 - *Chroococcus* Naeg 1849
- Entophysalidaceae Geitl 1925
 - *Chlorogloea* Wille 1900
- Chamaesiphonaceae Borzi 1882
 - *Chamaesiphon* A. Br et Grunow 1965
- Xenococcaceae Erceg 1932
 - *Xenococcus* Thur. 1875
- Hydrococcaceae Kuetz 1843
 - *Hydrococcus* Kuetz 1843
 - *Pleurocapasa* Thur. Ex Hauck 1885

I. 1. 3. 2. Oscillatoriales (Elenk. 1934)

Les Oscillatoriales sont pourvues de thalles filamenteux (filaments solitaires ou agrégés en colonies) et possèdent des trichomes typiques, mobiles ou immobiles. Il y a présence facultative de gaine, de fausses ramifications. Comme les Chroococcales, elles ne possèdent ni hétérocystes, ni akinètes. Elles sont caractérisées par la présence de vésicules gazeuses. Elles se divisent par divisions successives des cellules du trichome (un seul plan de division). La multiplication se fait par hormogonies et hormocystes, rarement par phanocytes.

- Borziaceae (Borzi 1914)
 - *Borzia* Cohn ex. Gom. 1892
- Pseudanabaenaceae (Anagn. Et Korm. 1988)
 - *Pseudanabaena* Lauter. 1915
- Schizotrichaceae (Elenk 1934)
 - *Schizothrix* Kuetz ex. Gom ; 1892
- Phormidiaceae (Anagn. Et Korm. 1988)
 - *Phormidium* Kuetz ex. Gom ; 1892
 - *Trichodesmium* Ehremb. Ex. Gom. 1892
 - *Microcoleus* Desm. Ex. Gom. 1892
 - *Spirulina* Turp.. Ex. Gom. 1892
- Oscillatoriaceae (S. F. GRAY) Harv. Ex. Kirchn. 1898
 - *Oscillatoria* Vauch. Ex. Gom. 1892
 - *Lyngbya* C. Ag. Ex. Gom. 1892
 - *Plectonema* Thur. Ex. Gom. 1892

Les cyanobactéries du genre *Oscillatoria* et *Lyngbya* sont régulièrement suspectées lors d'intoxications par des efflorescences à cyanobactéries.
- Homeotrichaceae (Elenk 1934)
 - *Homeothrix* (Thur. Ex. Born et Flah.) Kirch 1898

I. 1. 3. 3. Nostocales (Borzi 1914) Geilt 1925

Elles possèdent des thalles filamenteux, ainsi que des trichomes typiques isopolaires ou hétéropolaires. On note une absence de ramification du trichome. Les Nostocales sont pourvues d'hétérocystes et d'akinètes, akinètes facultatifs, elles ont aussi des vésicules gazeuses. Il y a divisions successives des cellules du trichome (un seul plan de division). La multiplication se fait principalement par hormogonies ou hormocytes.

- Scytonemataceae (Kuetz 1843)
 - *Scytonema* Ag. Ex. Born. Et Flah. 1886
- Microchaetaceae (Lemm. 1910)
 - *Tolypothrix* Kuetz 1843 ex. Born. Et Flahaut 1896
- Nostococaceae (Dumort 1829)

La majorité des Nostococaceae, en particulier les genres *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia*, *Aphanizomenon* sont retrouvés lors de diagnose cellulaire dans les blooms à cyanobactéries, dans le cadre de la recherche de la toxicité éventuelle de telles efflorescences.

 - *Anabaena* Bory 1822 ex. Born et Flah 1896
 - *Aphanizomenon* Morr 1838 ex. Born et Flah 1896
 - *Cylindrospermopsis* Seenaya et Skubba Raju 1972
 - *Anabaenopsis* (Wolosz.) v. Mill. 1923
 - *Cylindrospermum* Kuetz 1843 ex Born. Et Flah. 1886
 - *Hormothamnion* Grun 1867
 - *Nodularia* Mert. Ex. Born et Flah. 1886
 - *Nostoc* Vauch ex. Born et Flah. 1886
- Rivulariaceae (Kuetz 1943)
 - *Calothrix* Ag. Ex. Born et Flah. 1886
 - *Gloeotrichia* J. Ag. Ex. Born et Flah. 1886

I. 1. 3. 4. Stigonematales Geitler 1925

Les Stigonematales possèdent des thalles filamenteux souvent hétérotriches (rampants et dressés). Leurs trichomes sont souvent multisériés. Elles présentent de véritables ramifications, ainsi que des hétérocystes. Par contre, elles n'ont pas d'akinètes, sauf exception. Elles possèdent des communications intercellulaires appelées microplasmodesmes. Elles sont aussi caractérisées par la présence de vésicules gazeuses. La division des cellules du trichome se fait par des cloisonnements perpendiculaires à l'axe ou parallèles à l'axe, et elles se multiplient par hormogonies ou pseudohormogonies, rarement par akinètes.

- Capsosiraceae (Borzi) Geitler 1924
 - *Capsosira* Kuetz 1948
- Nostochopsidaceae (Geitler 1924) (Lemm. 1910)
 - *Nostochopsis* Wood 1869
- Borzinemataceae (Geitler 1942)
 - *Borzinema* J. De Toni 1936
- Mastigocladaceae (Geitler 1925)
 - *Mastigocladus* Cohn, 1862 ou *Ficherella* Gomont 1895
- Mastigocladopsidaceae (Iyengar et Desikachary 1946)
 - *Mastigocladopsis* Iyengar et Desikachary 1946
- Stigonemataceae (Hassal 1846)
 - *Stigonema* Ag. 1824
 - *Hapalosiphon* Naegeli in Kuetzing 1849
 - *Geitleria* Friedmann 1955

La **Figure 1** regroupe les morphologies des cyanobactéries les plus fréquemment rencontrées.

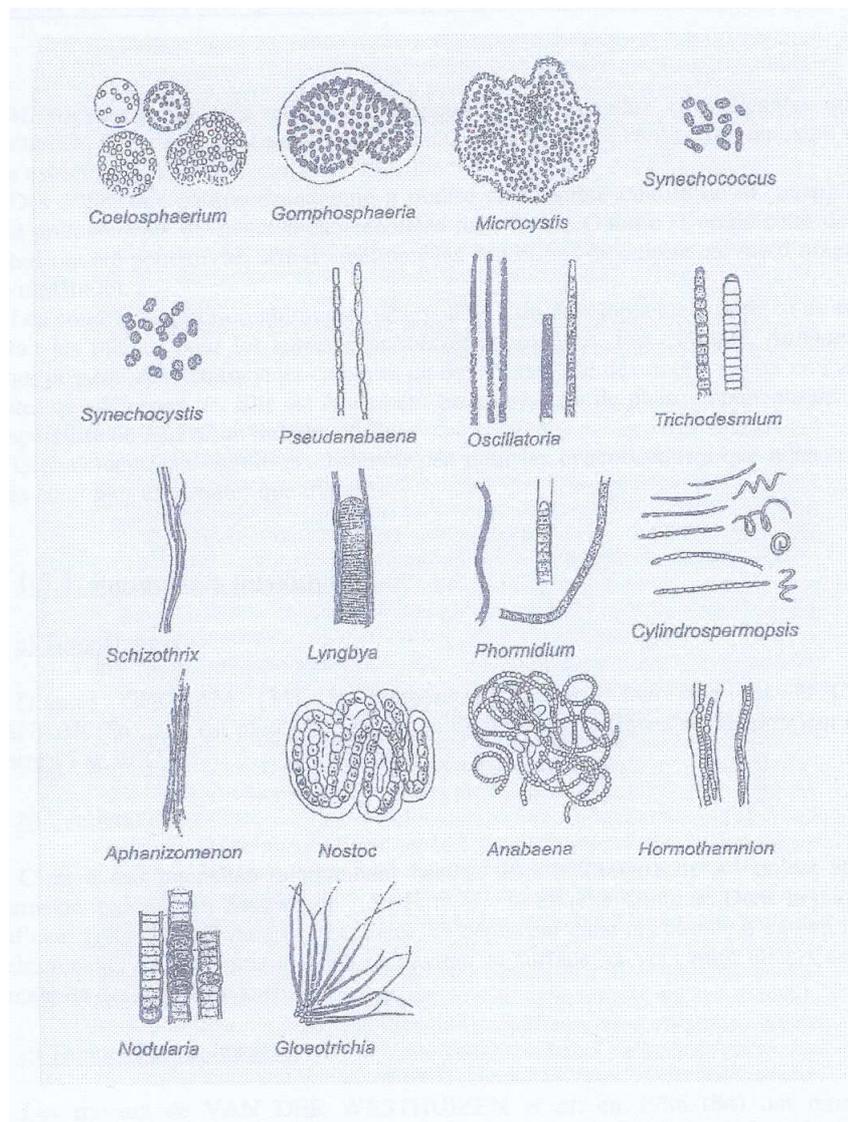


Figure 1 : Morphologie des cyanobactéries les plus fréquemment rencontrées (SILVANO 2005)

I. 1. 4. PROLIFERATION

La majorité des cyanobactéries est aérobie photoautotrophe. Elles n'ont besoin que d'eau, de dioxyde de carbone, de substances inorganiques et de lumière. La photosynthèse est leur principal mode de métabolisme énergétique. Dans un environnement naturel, il est cependant connu que certaines espèces sont capables de survivre de longues périodes dans l'obscurité complète. En outre certaines cyanobactéries montrent une capacité particulière pour la nutrition hétérotrophe.

Le succès adaptatif des cyanobactéries repose sur des propriétés physiologiques remarquables qui leur permettent souvent d'occuper un grand nombre de niches écologiques et, dans certains cas, plus problématiques pour l'usage humain des eaux concernées, de supplanter les autres espèces phytoplanctoniques. Leur composition pigmentaire (entre autres, les phycobiliprotéines) leur permet d'utiliser une large partie du spectre solaire et de croître à de faibles intensités lumineuses. La motilité (certaines espèces glissent ou se déplacent dans le milieu par un mouvement hélicoïdal) et/ou la présence de vésicules gazeuses chez différents genres ou espèces leur confèrent la capacité de se déplacer dans la colonne d'eau en fonction de l'éclairement et de la concentration en éléments nutritifs. L'utilisation de l'azote moléculaire dissous dans l'eau, par les formes

hétérocystées, est également un avantage compétitif. Enfin, les cyanobactéries ont assez peu de prédateurs, étant rarement consommées par le zooplancton ou les poissons.

Leur développement massif est un phénomène largement répertorié dans le monde, quel que soit le climat. Ces proliférations apparaissent dans des eaux souvent eutrophes, suite à un enrichissement en nutriments par les activités urbaines et/ou agricoles. Selon les conditions physiques du plan d'eau, on peut observer soit la formation d'une mousse bleu-verdâtre laiteuse à la surface de l'eau, soit une coloration uniforme (bleu-vert, jaune, rouge, verte...) de la colonne d'eau. Ces deux phénomènes sont la conséquence d'une densité importante d'individus correspondant à une multiplication exceptionnelle appelée bloom, « fleur d'eau » ou encore efflorescence algale. Suivant les espèces de cyanobactéries, des blooms peuvent apparaître et disparaître aussi vite lorsque les conditions environnementales changent.

Ces efflorescences sont la source de nuisances de plus en plus importantes dans l'environnement. Elles perturbent le fonctionnement des écosystèmes aquatiques, sont souvent la cause de mauvaises odeurs et sont parfois à l'origine du mauvais goût de l'eau et de la chair des poissons. La couleur intense et l'aspect de l'eau qu'elles confèrent aux aires de baignade ou de loisirs sont peu engageants pour les utilisateurs. Leur densité peut également endommager les systèmes de potabilisation de l'eau. Enfin, les efflorescences à cyanobactéries peuvent aussi produire des toxines (dermatotoxines, hépatotoxines et neurotoxines) et poser ainsi de réels problèmes sanitaires.

Plusieurs facteurs peuvent avoir une influence sur la formation des blooms.

I. 1. 4. 1. L'intensité lumineuse

Ressource indispensable au développement des organismes photosynthétiques, la lumière est souvent considérée comme non limitante. Pourtant, la physiologie et l'équipement pigmentaire bien particuliers des cyanobactéries font de la compétition pour l'énergie lumineuse l'un des facteurs les plus pertinents pour l'apparition de proliférations ou de blooms. Des modèles construits à partir d'expérimentations de laboratoire ont montré que l'exclusion d'une espèce au profit d'une autre pouvait être prédite par « l'intensité lumineuse critique ». Cette expression se rapporte à la lumière qui n'est pas effectivement absorbée par une espèce et qui reste donc utilisable par une autre espèce compétitrice. En d'autres termes, cela a permis de formaliser mathématiquement, la manière dont une espèce pouvait progressivement exclure les autres simplement en utilisant toute la ressource énergétique ; les cyanobactéries sont particulièrement efficaces en ce sens, d'une part, par leur capacité à se placer au-dessus des autres espèces de la communauté phytoplanctonique en régulant leur flottabilité, d'autre part, par leur plus large exploitation de la lumière grâce à la présence de phycobilines.

Comme les algues, les cyanobactéries contiennent de la chlorophylle a comme pigment majoritaire pour la « capture » de la lumière et pour effectuer la photosynthèse. Elles contiennent également d'autres pigments telles que les phycobiliprotéines qui comprennent l'allophycocyanine (bleue), la phycocyanine (bleue) et parfois la phycoérythrine (rouge). Ces pigments captent la lumière dans les parties verte, jaune et orange du spectre (500-650 nm) qui sont difficilement utilisées par d'autres espèces phytoplanctoniques. La phycobiliprotéine, avec la chlorophylle a, permettent aux cyanobactéries de capter efficacement l'énergie lumineuse et de vivre dans un environnement où il n'y a que de la lumière verte.

De nombreuses cyanobactéries sont sensibles à des périodes prolongées à de hautes intensités lumineuses. La croissance de *Planktothrix (Oscillatoria) agardhii* est inhibée quand elle est

exposée à des intensités lumineuses supérieures à $180 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. De longues expositions à des intensités de $320 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ sont létales pour de nombreuses espèces. Cependant, si elles sont exposées de façon intermittente à ces hautes intensités, les cyanobactéries ont une croissance à approximativement leur taux maximal. Cette intensité lumineuse s'élève à moins de la moitié de l'intensité lumineuse à la surface d'un lac, qui peut atteindre $700\text{-}1000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Les cyanobactéries qui forment des blooms de surface semblent avoir une plus forte tolérance pour les fortes intensités lumineuses.

Les cyanobactéries sont de plus caractérisées par une balance énergétique favorable. Leur constante de maintenance est basse ce qui signifie qu'elles n'ont besoin que de peu d'énergie pour maintenir les fonctions cellulaires et la structure. Cela a pour résultat que les cyanobactéries peuvent maintenir un taux de croissance relativement élevé par rapport à d'autres organismes phytoplanctoniques quand l'intensité lumineuse est basse. Les capacités des cyanobactéries à croître à de faibles intensités lumineuses et de capter certaines zones spécifiques du spectre lumineux, leur permet de croître dans « l'ombre » d'autres organismes phytoplanctoniques.

Un exemple de démonstration de la compétition entre les cyanobactéries (*Planktothrix*) et du phytoplancton autre (*Scenedesmus*) est le suivant : Alors que les algues vertes croissent rapidement à de hautes intensités lumineuses, la croissance des cyanobactéries est plus rapide à de faibles intensités. Si les deux organismes sont mis dans une même culture continue à basse intensité, les cyanobactéries peuvent supplanter les algues vertes. A de hautes intensités lumineuses, la biomasse de l'algue verte croît rapidement entraînant une augmentation de la turbidité et une diminution de la disponibilité lumineuse. Cela augmente le taux de croissance des cyanobactéries qui deviennent dominantes en 20 jours. Bien que les cyanobactéries ne puissent pas atteindre le taux de croissance maximal des algues vertes, à de très faibles intensités lumineuses leur taux de croissance est plus fort. De ce fait dans les eaux à forte turbidité elles ont de meilleures chances de supplanter les autres espèces. Cela peut expliquer pourquoi les cyanobactéries qui peuvent croître dans des conditions nutritionnelles très pauvres peuvent développer des blooms dans des eaux eutrophes riches en nutriments favorables au développement des algues autres que les cyanobactéries.

I. 1. 4. 2. Les vésicules de gaz ou vacuoles de gaz

La valeur sélective de ce type d'organisme repose d'abord sur une capacité particulière à réagir à divers stimuli (lumineux, gravitaires, thermiques ou chimiques) afin d'optimiser la position des individus dans la colonne d'eau pour que les ressources soient toujours disponibles en quantité suffisante. Cela veut concrètement dire : assez de lumière pour assurer l'incorporation de sels nutritifs assez abondants. Pour de très nombreuses espèces de cyanobactéries, ce déplacement vertical dans la colonne d'eau est autorisé par l'existence de vésicules à gaz qui sont des inclusions cytoplasmiques cylindriques contenant des gaz et dont le volume est régulé selon l'activité métabolique des cellules. L'activité photosynthétique, intense dans la couche la plus éclairée, provoque l'accumulation de métabolites dans le cytoplasme. Cette accumulation accroît la pression osmotique dans les cellules et réduit, par voie de conséquence, le volume des vésicules, provoquant l'enfoncement. A l'inverse, la réduction de la lumière disponible en profondeur diminue l'activité métabolique et augmente le volume des vésicules à gaz, ce qui se traduit par la remontée en surface des cellules.

Plusieurs cyanobactéries planctoniques contiennent des vacuoles gazeuses. Ces structures sont des agrégats de vésicules remplies de gaz, qui sont des alvéoles creuses avec une surface externe hydrophile et une surface interne hydrophobe. Une vésicule de gaz a une densité d'environ 1/10 de

celle de l'eau et de ce fait les vésicules de gaz peuvent conférer aux cellules de cyanobactéries une densité inférieure à celle de l'eau.

I. 1. 4. 3. Le taux de croissance

Le taux de croissance des cyanobactéries est habituellement plus faible que celui de la plupart des espèces algales. A 20°C et en saturation lumineuse, la plupart des cyanobactéries planctoniques atteignent des taux de 0,3-1,4 doublement par jour, contre 0,8-1,9 pour les diatomées et 1,2-2,3 pour les algues vertes monocellulaires. De faibles taux de croissance nécessitent des temps de rétention de l'eau longs pour permettre à un bloom de cyanobactéries de se former. Par conséquent les cyanobactéries ne forment pas de bloom dans l'eau ayant de forts taux de renouvellement.

I. 1. 4. 4. Le phosphore et l'azote

Parce que les blooms de cyanobactéries se développent souvent dans les lacs eutrophes, il a été admis qu'elles avaient besoin de fortes concentrations en phosphore et azote. Cette hypothèse a été maintenue alors que des blooms de cyanobactéries apparaissent souvent quand les concentrations en phosphates sont basses. Des données expérimentales ont montré que l'affinité de nombreuses cyanobactéries pour l'azote et le phosphore est supérieure à celle de nombreux organismes photosynthétiques. Cela signifie qu'elles peuvent supplanter d'autres organismes phytoplanctoniques dans des conditions limitantes en azote et phosphore. En plus de leur grande affinité pour les nutriments, les cyanobactéries ont une capacité importante de stockage du phosphore. Elles peuvent stocker suffisamment de phosphore pour assurer 2 à 4 divisions cellulaires, ce qui correspond à une augmentation de la biomasse d'un facteur 4 à 32. Quoi qu'il en soit, si le phosphore total plutôt que le phosphate dissous est considéré, de fortes concentrations soutiennent indirectement les cyanobactéries car elles fournissent une forte capacité de développement pour le phytoplancton. Une forte densité de phytoplancton conduit à une forte turbidité et une faible disponibilité de la lumière, et les cyanobactéries sont le groupe phytoplanctonique qui peut le mieux croître sous ces conditions.

Le phosphore est le nutriment majeur contrôlant l'apparition d'efflorescences de cyanobactéries dans de nombreuses régions du monde, bien que les composés azotés soient parfois déterminants pour la concentration de cyanobactéries. Par opposition aux algues planctoniques, certaines cyanobactéries sont capables de passer outre les limitations en azote en fixant l'azote atmosphérique, grâce, la plupart du temps, à des cellules spécialisées, les hétérocystes, et à l'activité de l'enzyme nitrogénase qu'elles contiennent. Le manque de nitrates ou d'ammoniaque, dans ce cas, favorise la dominance de certaines espèces. Cette autosuffisance pour le carbone (grâce à la photosynthèse) et pour l'azote (grâce à la nitrogénase) fait que ces organismes sont parmi les moins exigeants en ce qui concerne les ressources nutritionnelles.

Par ailleurs, les faibles ratios entre les concentrations en azote et phosphore peuvent favoriser le développement de blooms de cyanobactéries. Une comparaison entre le ratio N/P optimum pour les algues eucaryotes (16-23 moles de N pour 1 mole de P) et un ratio optimum pour les cyanobactéries formant des blooms (10-16 moles de N pour 1 mole de P) montre que ce ratio est plus faible pour les cyanobactéries. D'autres ratios ont par ailleurs été avancés. Jérémy SILVANO dans sa thèse (SILVANO) considère que les cyanobactéries tendent à prendre le pas sur les autres microalgues lorsque $N/P < 29$.

I. 1. 4. 5. La stabilité de la population

Alors que de nombreuses algues planctoniques sont prédatées par des copépodes, daphnies et protozoaires, les cyanobactéries ne sont pas autant prédatées, et l'impact de la prédation par certains protozoaires cillés et rhizopodes spécialisés n'est habituellement pas important. Les cyanobactéries sont attaquées par les virus, bactéries et actinomycètes, mais l'importance de ces ennemis naturels sur la décimation des populations n'est pas bien connue. Parce qu'elles n'ont que peu d'ennemis naturels et parce que leur capacité à réguler leur flottabilité empêche la sédimentation, la chute des populations de cyanobactéries sont généralement faibles. De plus, leurs faibles taux de croissance sont compensés par la haute prévalence des populations quand elles sont établies.

I. 1. 4. 6. La température

Les taux de croissance maximums sont atteints par la plupart des cyanobactéries à des températures supérieures à 25°C. Les températures optimales sont supérieures à celles des algues vertes et diatomées.

I. 1. 4. 7. Autres facteurs

Un point moins souvent évoqué, mais qui pourra peut-être illustrer de plus en plus la concomitance de plusieurs phénomènes d'origine anthropique, est l'effet des xénobiotiques sur l'apparition et le maintien de blooms cyanobactériens. En effet, les pollutions par les pesticides par exemple, qui représentent maintenant bien plus qu'un bruit de fond dans les écosystèmes aquatiques en France, sont soupçonnées de favoriser certaines espèces au détriment d'autres. Par exemple, *Oscillatoria limnetica*, cyanobactérie faisant partie des peuplements habituels du lac Léman, a montré une faible sensibilité à l'atrazine (un herbicide couramment rencontré dans les milieux aquatiques) par rapport à d'autres espèces phytoplanctoniques du même lac, au moins dans certaines conditions.

I. 1. 5. « ECOSTRATEGIES »

Les cyanobactéries ont plusieurs propriétés particulières qui déterminent leur importance relative dans les communautés phytoplanctoniques. Quoiqu'il en soit le comportement des différents taxa de cyanobactéries dans la nature n'est pas homogène car leurs propriétés écophysiologiques diffèrent. Parce que certaines cyanobactéries ont les mêmes caractéristiques écologiques et écophysiologiques, elles peuvent être groupées par leur comportement dans des écosystèmes planctoniques comme « ecostrategists » habitant typiquement différentes niches des écosystèmes aquatiques. Un certain nombre de propriétés et réactions aux conditions environnementales sont discutées plus loin dans le but de décrire ces « ecostrategists » et aider à la compréhension de leur comportement spécifique.

La question majeure et rémanente lorsque l'on constate une soudaine apparition de ces organismes en grand nombre, accompagnée ou non d'un potentiel toxique, reste le déterminisme de ces phénomènes. Pour simplifier, il est aisé de définir les cyanobactéries comme des organismes « ecostrategists » pouvant adopter plusieurs comportements qui les conduisent à dominer les peuplements algaux.

I. 1. 5. 1. « Ecostrategists » formant des « mousses » ou « agrégatifs »

C'est le cas, par exemple, pour les genres *Microcystis*, *Anabaena* et *Aphanizomenon* qui utilisent au maximum la flottabilité assurée par les vésicules à gaz mais aussi par la constitution d'agrégats et/ou de faisceaux de cellules. Cela se traduit par la formation d'un tapis épais d'individus à la surface de l'eau où ils peuvent avoir une activité photosynthétique maximale.

Au cours de la période végétative un certain nombre de cyanobactéries développent de larges agrégats (colonies) de cellules coccoïdes ou de filaments qui ne sont pas distribués de façon homogène dans la colonne d'eau. Les genres importants présentant ce type de développement sont *Microcystis*, *Anabaena* et *Aphanizomenon*. A la surface de l'eau le taux de photosynthèse des colonies est élevé et les cellules stockent de grandes quantités de sucres. Bien que les cellules contiennent des vésicules de gaz, les sucres agissent comme ballastes et entraînent un enfoncement de la colonie. D'après la loi de Stoke le taux d'enfoncement est dépendant de la différence de densité entre l'eau et les cellules, et sur le carré du diamètre de la colonie. Les grosses colonies s'enfoncent plus rapidement que les petites, et les cellules isolées montrent difficilement une migration verticale. En s'enfonçant, les colonies s'éloignent de la zone euphotique (zone où peut avoir lieu la photosynthèse) pour les couches plus profondes et plus sombres où elles utilisent leurs réserves de sucres durant la respiration et synthétisent de nouvelles vésicules de gaz. Elles redeviennent ainsi flottantes et retournent dans la zone euphotique. La régulation de la flottabilité permet aux colonies de se positionner elles-mêmes dans des conditions lumineuses qui sont optimales pour leur croissance. Un pré-requis est que le plan d'eau ne soit pas trop turbulent. Au cours de la nuit, toutes les colonies peuvent devenir flottantes et une fraction de la population peut s'accumuler à la surface de l'eau où elles peuvent être entraînées par le vent, formant des « mousses » stables le long des berges. La fréquence de la migration verticale est dépendante de la taille de la colonie.

Dans les régions tempérées, alors que la température diminue à l'automne, la photosynthèse devient plus rapide que la respiration, et le ballaste de sucres n'est pas consommé. Les colonies s'enfoncent alors jusqu'au fond du plan d'eau où elles survivront jusqu'au printemps, en consommant graduellement leurs réserves par la fermentation ou la respiration.

La régulation de la flottabilité peut être un avantage non négligeable dans la compétition avec d'autres organismes phytoplanctoniques. Cependant ce type de régulation n'est possible que dans les plans d'eau avec une zone euphotique peu profonde par rapport à profondeur de la zone de mélange vertical.

I. 1. 5. 2. « Ecostrategists » dispersés de façon homogène

Cet écotype comprend les espèces filamenteuses, telles que *Planktothrix (Oscillatoria) agardhii* et *Limnothrix (Oscillatoria) redekei*. Ces espèces sont extrêmement sensibles aux fortes intensités lumineuses et ne forment pas de colonies. Parce que les filaments sont relativement petits, la migration verticale par régulation de la flottabilité est moins prononcée que leur entraînement passif par la circulation de l'eau. Par conséquent ces espèces sont dispersées de façon homogène sur l'épilimnion (profondeur de la zone superficielle de mélange), arrivant parfois à éliminer les autres organismes phytoplanctoniques par simple ombrage. Ce type d'« ecostrategists » se trouve dans les lacs profonds eutrophes ou hypertrophes.

Cependant, les mêmes espèces peuvent adopter une stratégie différente en se développant au niveau de la thermocline où leur richesse en phycoérythrine leur permet d'absorber efficacement la

lumière dans les longueurs d'onde 490-570 nm (le bleu et le vert), seules abondantes à cette profondeur et généralement non utilisables par les autres groupes phytoplanctoniques.

I. 1. 4. 3. « Ecostrategists » formant des strates

Les représentants de cet écotype développent des populations d'été stables dans la zone intermédiaire des lacs stratifiés thermiquement et des réservoirs. Ces organismes contiennent un pigment rouge (phycoérythrine) qui absorbe la lumière verte, qui est la longueur d'onde dominante à ces profondeurs. La plus commune de ces espèces est *Planktothrix (Oscillatoria) rubescens*.

Les filaments isolés de ces espèces ont du mal à migrer verticalement. Cependant à la fin de l'automne à la fin de la saison de croissance, les cellules deviennent flottantes et forment des mousses de surface rouge.

I. 1. 5. 4. « Ecostrategists » fixateurs d'azote

Si la fixation de l'azote atmosphérique n'atteint des proportions significatives à l'échelle de l'écosystème mondial que chez un genre marin, de nombreuses espèces de cyanobactéries (genres *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia* et *Nostoc*) peuvent profiter d'une limitation momentanée de la disponibilité de l'azote sous forme directement assimilable (NO_3^- ou NH_4^+) pour supplanter les autres organismes photosynthétiques.

Cependant même si ces « ecostrategists » dominant dans les écosystèmes avec de faibles niveaux d'azote inorganique dissous, l'inverse n'est pas toujours vrai. De nombreux lacs avec une limitation en azote nette ne sont pas dominés par des cyanobactéries fixatrices d'azote. La faible disponibilité de la lumière peut être la raison à cela, car la fixation d'azote nécessite de grandes quantités d'énergie. Dans les lacs turbides une énergie lumineuse insuffisante à la fixation de l'azote peut être présente.

I. 1. 5. 5. Petit taxa formant des colonies

Peu de choses sont connues sur ce taxa. Les espèces appartiennent au genre *Aphanothece*.

I. 1. 5. 6. Cyanobactéries benthiques

À côté des « ecostrategists » planctoniques décrit plus haut, les cyanobactéries peuvent croître sur le fond des plans d'eau qui sont suffisamment limpides pour permettre la pénétration de la lumière. Ces espèces benthiques peuvent former un tapis. Surtout de forts taux de photosynthèses par ces tapis conduisent parfois au piégeage de l'oxygène produit par photosynthèse sous forme de bulles au sein du tapis ; une partie du tapis peut ainsi devenir suffisamment flottante pour se détacher et monter à la surface. On ne s'attend généralement pas à ce type de problème dans des eaux claires et oligotrophes. Cependant, des cyanobactéries toxiques ont entraîné la mort d'animaux en Ecosse ou des flocs échoués sur les berges d'un lac limpide ont été consommés par des chiens, et en Suisse où des populations d'*Oscillatoria limosa* benthique toxique ont été ingérées par des vaches buvant dans des lacs de montagne.

I. 2. CYANOTOXINES

La quasi-totalité des phycotoxines d'eau douce et d'eau saumâtre est générée par les cyanobactéries. Tous les ordres de cyanobactéries reconnus actuellement renferment des genres toxicogènes. Les Nostocales (ordre suivant le code de nomenclature botanique ICBN comportant les genres *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia*), suivies par les Oscillatoriales (second ordre suivant le code de nomenclature botanique ICBN comportant les genres *Borzia*, *Limnothrix*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Pseudanabaena*, *Spirulina*) semblent les plus impliquées.

Les toxines sont des métabolites secondaires : les moins toxiques sont responsables de dermatites alors que les plus toxiques sont des hépatotoxines (telles les microcystines et les nodularines) ou des neurotoxines (telles les anatoxines, les saxitoxines et dérivés), à l'origine de nombreux accidents mortels chez les animaux domestiques et sauvages, et d'un nombre non négligeable d'intoxications chez l'homme. Ce dernier peut être affecté directement par l'ingestion d'eau contenant les toxines et indirectement par baignade puisque de nombreux plans d'eau sont utilisés comme réservoirs d'eau potable ou comme aires récréatives en période estivale. Les genres les plus détectés comme producteurs de toxines sont *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Nodularia* et *Planktothrix*. Parmi les toxines élaborées (aujourd'hui une centaine), les microcystines (hépatotoxines) et l'anatoxine-a (neurotoxine), et leurs dérivés sont les plus cités. Toutefois, il est pour l'instant difficile d'établir des relations objectives entre structure moléculaire (alcaloïdes, peptides...), mode d'action (hépatotoxicité, neurotoxicité...) et organisation des thalles (unicellulaire, colonial).

Dans les blooms, les souches toxiques coexistent avec des souches non toxiques. Une même souche peut synthétiser plusieurs toxines du même groupe (par exemple, plusieurs hépatotoxines), mais certaines souches sont capables de synthétiser à la fois des hépatotoxines et des neurotoxines, ce qui rend plus complexes les analyses si les toxines produites ont des propriétés physicochimiques différentes. Les toxines des cyanobactéries sont essentiellement des endotoxines qui s'accumulent à l'intérieur des cellules algales. Elles agissent soit après ingestion de ces microalgues, soit après leur libération au cours de la lyse algale.

Les toxines peuvent être classées selon leur structure chimique en trois familles : les peptides cycliques, les alcaloïdes et les lipopolysaccharides. Selon leur mode d'action, on distingue deux groupes principaux : ce sont, d'une part, les cytotoxines, ainsi nommées parce que les bioessais utilisent des lignées cellulaires et qu'elles ont une activité cytotoxique et, d'autre part, les biotoxines, dont la toxicité aiguë mesurée par la mortalité induite est détectée par des tests sur animaux (souris ou invertébrés aquatiques). Les cytotoxines ne sont pas mortelles à faible dose pour les animaux. Leur nom évoque celui de l'espèce qui les synthétise. Ce sont par exemple des scytophytines, l'hapalindole A, la tubercidine, les acutiphycines ou des lipopolysaccharides produits par la plupart des cyanobactéries. Parmi ces biotoxines, selon les symptômes présentés chez l'animal ou l'homme, on distingue les neurotoxines et les hépatotoxines. D'après les études rapportées dans la bibliographie, les blooms formés par les cyanobactéries produisant des hépatotoxines sont beaucoup plus répandus que les blooms neurotoxiques.

Le contrôle environnemental des toxines requiert deux types de méthodes qui sont complémentaires dans leur utilisation mais très différentes dans leur mise en œuvre et dans l'information fournie. Un premier type doit permettre l'identification et la quantification des diverses toxines présentes dans tout échantillon (aqueux, cellulaire, tissus biologiques, etc.). Ces méthodes font appel à des techniques analytiques parfois sophistiquées et coûteuses. Elles sont nécessaires pour le contrôle de l'eau potable par exemple, puisque les recommandations de l'OMS indiquent de quantifier l'ensemble des hépatotoxines jusqu'à une concentration seuil de un

microgramme par litre. Dans les eaux environnementales, les toxines étant généralement présentes à des concentrations faibles, il faut une étape de préconcentration préalable. Le second type consiste en des méthodes bioanalytiques, tels des tests immunologiques de type ELISA, des tests cellulaires et diverses méthodes de dosages enzymatiques. Ces tests doivent permettre d'estimer rapidement le risque toxique associé à un bloom pour prendre, par exemple, les décisions qui s'imposent s'il s'agit d'une aire récréative. Ces tests sont simples, rapides et peu coûteux. Souvent très sensibles, ils ne nécessitent pas d'étape de préconcentration et donnent accès à une « concentration équivalente » en une toxine prédéterminée, généralement celle utilisée pour l'étalonnage du test.

Les cyanobactéries appartiennent à différents groupes de substances chimiques, chacune montrant des mécanismes spécifiques de toxicité chez les vertébrés. Certaines toxines sont de puissantes neurotoxines (anatoxine-a, anatoxine-a(s), saxitoxines), d'autres sont principalement toxiques pour le foie (microcystines, nodularines et cylindrospermopsine), et d'autres encore (tels que les lipopolysaccharides) semblent causer des problèmes de santé (tels que les gastro-entérites) qui sont peu compris. C'est cette classification que nous utiliserons pour la description des structures et propriétés physicochimiques des cyanotoxines.

I. 2. 1. STRUCTURES ET PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES CYANOTOXINES

I. 2. 1. 1. Les neurotoxines

Les neurotoxines sont regroupées en deux familles : les anatoxines et les aphantoxines, constituées de la saxitoxine et de ses dérivés.

- **Les Anatoxines**

Ce sont des alcaloïdes spécifiques aux cyanobactéries, principalement synthétisés par des espèces des genres *Anabaena*, *Planktothrix* et *Aphanizomenon*.

L'**anatoxine-a** comporte une fonction amine secondaire dont l'état d'ionisation varie avec le pH et qui présente une constante d'ionisation, pKa, égale à 9,4. Elle se présente sous forme protonée à pH neutre et acide. Sa masse moléculaire est de 165. C'est un composé très soluble dans l'eau et polaire, d'où la difficulté rencontrée pour l'extraire des milieux aqueux. L'anatoxine-a a été trouvée dans des espèces des genres *Anabaena* (*Anabaena flos-aquae*, *Anabaena* spp., *Anabaena planktonica*), *Oscillatoria*, *Cylindrospermum* et *Aphanizomenon*.

Peu de travaux ont été réalisés sur la biodégradation de l'anatoxine-a. L'anatoxine-a peut être rapidement dégradée par des bactéries associées aux filaments de cyanobactéries. Des études de laboratoire utilisant des souches de cyanobactéries non axéniques dans le milieu montrent de faibles concentrations en anatoxine—a dissoute dans le milieu, alors que de fortes concentrations ont été trouvées dans un milieu de culture continue réalisé avec une souche axénique de la même espèce. Une souche de *Pseudomonas* sp capable de dégrader l'anatoxine-a un taux de 6-10 µg/mL tous les 3 jours a été isolée. En présence de sédiments de lacs et de bactéries naturelles, la ½ vie de l'anatoxine-a en laboratoire est d'environ 5 jours.

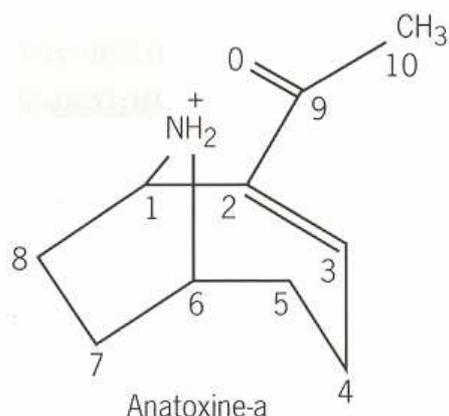


Figure 2 : Structure de l'anatoxine-a

Son homologue méthylé, l'**homoanatoxine-a** possède des propriétés très voisines. A des pH élevés (au-delà de pH 10-11), l'anatoxine-a et l'homoanatoxine-a sont instables et se dégradent sous l'effet de la lumière solaire directe en formes non toxiques (dihydro et époxy analogues). Sa masse moléculaire est de 179. L'anatoxine-a et son homologue méthylé se fixent sur le récepteur de l'acétylcholine. L'anatoxine-a entraîne la mort rapidement (en moins de 30 minutes) sans dommage organique apparent, à cause du blocage du récepteur de l'acétylcholine empêchant la transmission de l'influx nerveux au niveau des synapses. L'homoanatoxine-a a été trouvée dans le genre *Oscillatoria* (*Oscillatoria formosa* ou *Phormidium formosum*).

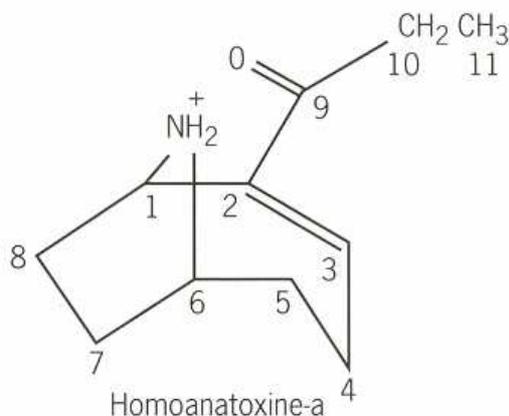


Figure 3 : Structure de l'homoanatoxine-a

L'**anatoxine-a(s)** est le seul inhibiteur d'acétylcholinestérase organophosphoré naturel. Sa masse moléculaire est de 252. Elle a été différenciée de l'anatoxine-a car elle provoque chez la souris une salivation et un larmoiement important avant l'arrêt respiratoire. L'anatoxine-a(s) est rarement rencontrée et on connaît peu de choses sur ses propriétés en raison de son instabilité chimique. L'anatoxine-a(s) a seulement été trouvée dans le genre *Anabaena* (*Anabaena flos-aquae*, *Anabaena lemmermannii*).

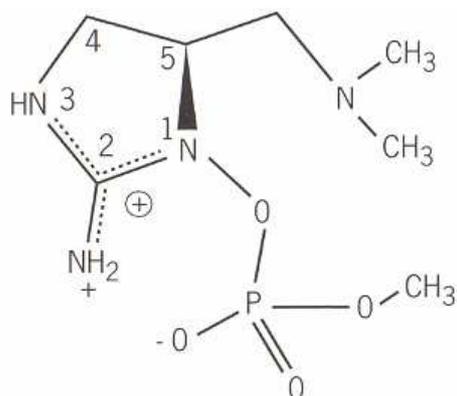


Figure 4 : Structure de l'anatoxine-a(s)

- **Les saxitoxines et dérivés**

La seconde famille des neurotoxines ou aphantoxines (première appellation de ces toxines) produites par certaines cyanobactéries est constituée par la saxitoxine, la néosaxitoxine et leurs dérivés. Ces toxines ne sont pas spécifiques aux cyanobactéries puisqu'elles sont également produites en milieu marin par des dinoflagellés. Elles sont plus connues sous le nom de « toxines paralysantes » ou « paralytic shellfish poisons » (PSPs). Ces alcaloïdes neurotoxiques sont des carbamates. Seize variantes ont été isolées à partir des cyanobactéries. La saxitoxine et sa variante hydroxylée (néosaxitoxine) ne contiennent pas de groupement sulfate, les gonyautoxines en contiennent un et les toxines dites toxines C sont caractérisées par la présence de deux groupements sulfate. Les saxitoxines et dérivés inhibent la transmission de l'influx nerveux par blocage des canaux sodiques. Les aphantoxines représentent un groupe de composés très polaires et solubles dans l'eau. Les saxitoxines et dérivés ont été trouvés dans des espèces des genres *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Lyngbya* et *Cylindrospermopsis*.

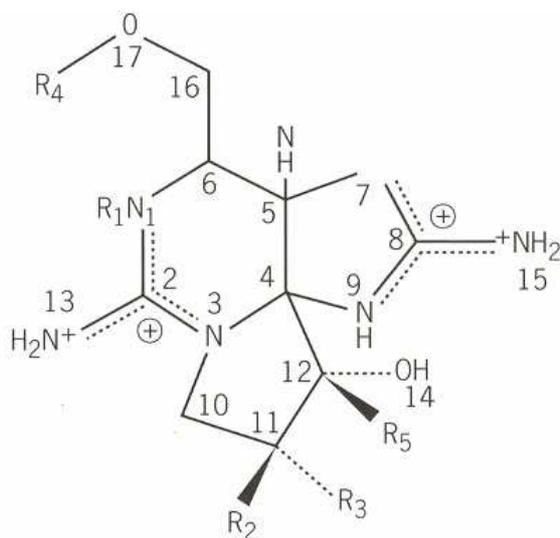


Figure 5 : Structure générale des saxitoxines

I. 2. 1. 2. Les hépatotoxines

Les hépatotoxines, microcystines et nodularines, sont des peptides cycliques de faibles poids moléculaires. Les hépatotoxines de structure peptidique, surtout les microcystines, sont les plus fréquemment impliquées dans les épisodes d'intoxication. Elles sont synthétisées majoritairement par certaines espèces des genres *Microcystis*, *Nodularia*, *Planktothrix*, *Anabaena* et *Nostoc*.

- **Les microcystines**

Les microcystines sont des heptapeptides cycliques de poids moléculaire compris entre 800 et 1100. Deux acides aminés sont inhabituels : la N-méthyl-déhydroalanine (Mdha) et l'acide 3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényl-4,6-diénoïque (Adda).

La séquence la plus fréquemment rencontrée est : D-Ala¹-L-X²-D-Masp³-L-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷ où D et L représentent les formes dextrogyre et lévogyre des acides aminés, Masp l'acide méthyl aspartique et X et Z deux acides aminés variables qui donnent leur nom aux microcystines sous la forme XZ (par exemple, la microcystine LR pour X=leucine et Z=arginine). Les variations peuvent intervenir sur tous les acides aminés mais certaines sont plus fréquentes, comme la méthylation et la déméthylation des acides Masp³ et Mdha⁷ ou l'estérification de l'acide glutamique en position 6. Plus de la moitié est synthétisé par le genre *Microcystis*.

Plusieurs études ont démontré qu'une même cyanobactérie synthétise généralement plusieurs microcystines. Pour confirmer la production par une espèce, il est nécessaire d'isoler et de cultiver une souche pure de cette espèce. L'amélioration des techniques de culture, d'extraction, de purification, d'analyse et de détection permet actuellement d'identifier de nouvelles variantes. En effet, dans la mesure où seulement 2 standards sont disponibles (Mcyst-LR et -RR) la présence de variantes ne peut être mise en évidence que par des techniques chromatographiques couplées à des modes d'identification type MS.

Les microcystines possèdent en général deux fonctions de type acide carboxylique et peuvent posséder des fonctions basiques sur les acides aminés variables. Leur état d'ionisation varie donc avec le pH. Elles sont considérées comme solubles dans l'eau, bien qu'aucune donnée n'existe. La solubilité de la Mcyst-LR est supérieure à 1 gramme par litre. Néanmoins, la solubilité des microcystines plus hydrophobes (variantes LY, LW, LA et LF) est inférieure à 200-500 microgrammes par litre. Les diverses microcystines possèdent des polarités variables, mais elles sont toutes plutôt hydrophobes, avec des constantes de partage octanol-eau ($\log K_{ow}$) estimées entre 2,2, et 4,4 à partir de mesures chromatographiques. Leur forte stabilité chimique associée à une assez bonne solubilité dans l'eau et une hydrophobie non négligeable expliquent leur persistance dans l'environnement.

Bien que la toxicité ne soit pas une donnée nécessaire pour mettre au point les protocoles analytiques, il est utile de la connaître pour l'étude des réponses des bioessais. Il est connu que la toxicité des microcystines varie avec leur structure. La structure tridimensionnelle a été définie et modélisée afin d'expliquer la toxicité et le mode d'action. Les formes déméthylées sur Masp³ et Mdha⁷ sont cinq à dix fois moins toxiques que les formes équivalentes méthylées. La stéréochimie de la double liaison en position 6 sur le fragment Adda est très importante. Elle est généralement sous forme E dans les structures toxiques et, sous forme Z, la molécule n'est pas toxique.

Les microcystines ont été trouvées dans des espèces des genres *Microcystis*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*), *Anabaena*, *Anabaenopsis* et *Nostoc*.

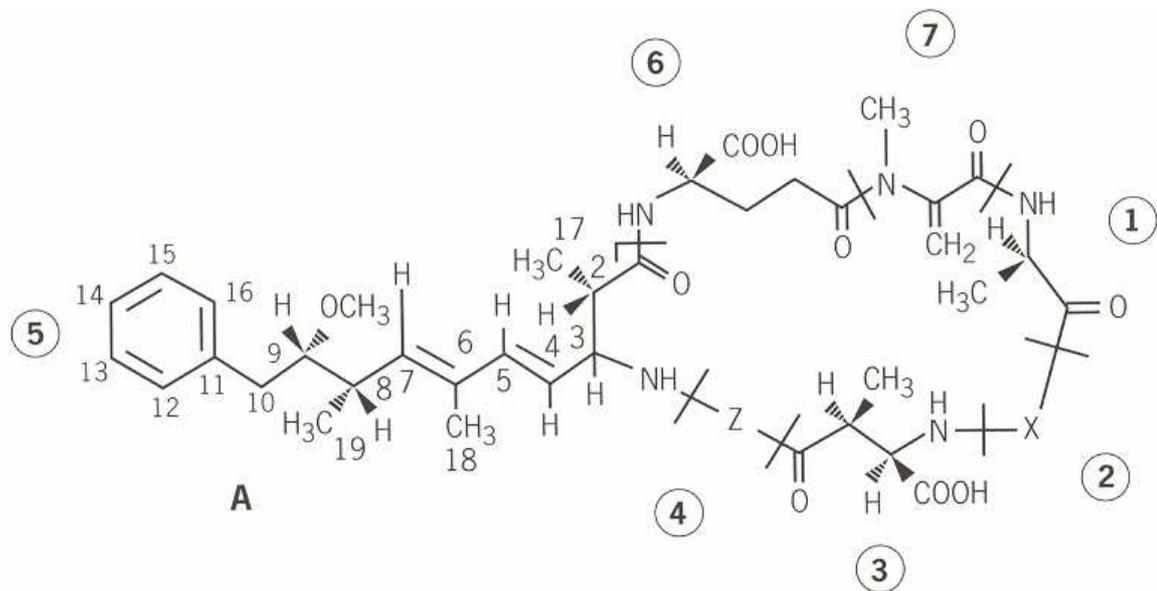


Figure 6 : Structure générale des microcystines

- **La nodularine**

La nodularine est un pentapeptide cyclique de formule dhBut1-D-MAsp2-L-Arg3-Adda4-D-Glu5. Elle contient la N-méthyl-déhydrobutyrine et l'acide aminé Adda caractéristique des microcystines. Six variantes de la nodularine ont été caractérisées. Les nodularines ont été trouvées dans *Nodularia spumigena*.

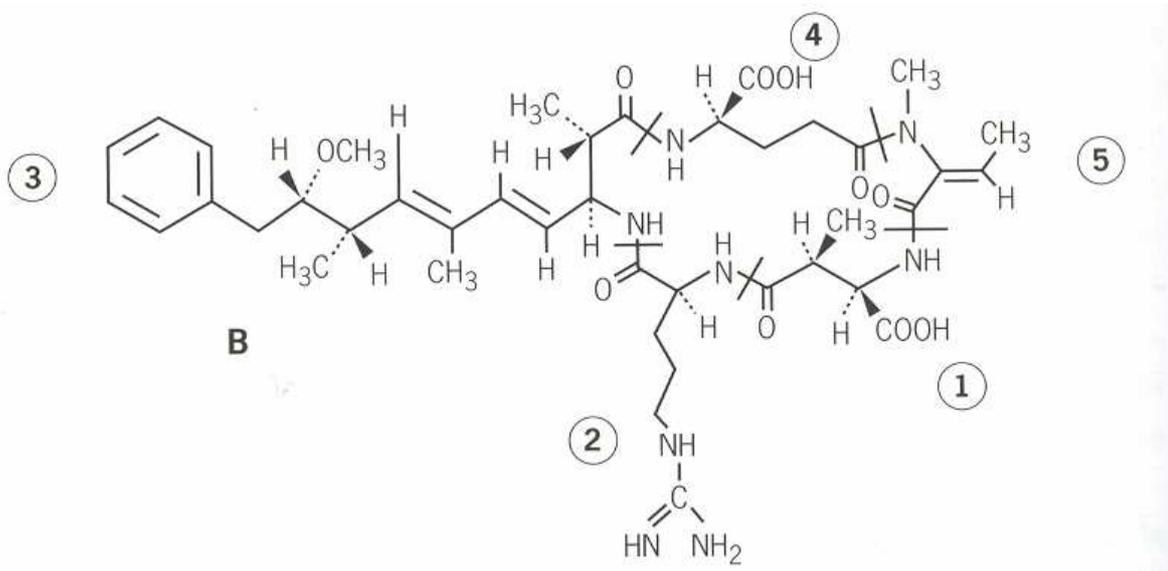


Figure 7 : Structure générale de la nodularine

I. 2. 1. 3. Les cytotoxines

- **La cylindrospermopsine et son analogue**

Les études récentes montrent que **la cylindrospermopsine** possède un mode d'action différent de celui des hépatotoxines, aujourd'hui cette toxine n'est plus considérée comme une hépatotoxine. La cylindrospermopsine possède une structure chimique radicalement différente de celles des hépatotoxines avec, en particulier, une unité guanidine cyclique. La cylindrospermopsine est une toxine très polaire et très soluble dans l'eau avec une structure de Zwitterion. Sa masse moléculaire est de 415 La cylindrospermopsine a été trouvée dans des espèces des genres *Cylindrospermopsis*, *Umezakia* et *Aphanizomenon*.

Un analogue, **la désoxycylindrospermopsine** a été identifiée et isolée récemment. Il s'est avéré nettement moins toxique.

I. 2. 1. 4. Les dermatotoxines

Les cyanobactéries marines benthiques comme *Lyngbya*, *Oscillatoria* et *Schizothrix* peuvent produire des toxines causant des dermatites sévères aux nageurs en contact avec les filaments.

- **Les aplysiatoxines**

Les aplysiatoxines et debromoaplysiatoxine qui sont des promoteurs tumoraux potentiels et des activateurs de protéines kinase C ont une activité inflammatoire.

- **La lyngbyatoxine**

La lyngbyatoxine-a peut causer une dermatite et une inflammation orale et gastro-intestinale sévère.

I. 2. 1. 5. Les toxines dites irritantes ou LipoPolySaccharides (LPS)

Les LPS sont généralement trouvés dans la membrane externe de la paroi cellulaire des bactéries Gram-, incluant les cyanobactéries, où ils forment des complexes avec les protéines et les phospholipides. Ils sont pyrogènes et toxiques. Les LPS, comme leur nom l'indique, sont composés d'un sucre, habituellement un hexose, et d'un lipide, normalement un acide gras C14-C18 hydroxylé. Les nombreux variants structuraux de LPS sont généralement liés à la phylogénie. Différents genres ont typiquement des compositions de LPS différents qui sont largement retrouvés au sein du genre. Les genres particuliers ont des LPS dont les composants acides gras et sucres sont identiques ou similaires. C'est généralement le composant acide gras qui provoque la réponse irritante ou allergique chez l'homme ou les mammifères.

Structurellement le LPS est un polymère complexe composé de 4 régions. La région I, région de l'antigène-O consiste en une répétition d'unités oligosaccharides qui peuvent varier en structure, avec de nombreuses combinaisons de résidus sucres et liaisons glycosidiques associées. Comme le suggère son nom, l'antigène-O présente de nombreux déterminants antigéniques qui constituent les sites récepteurs pour plusieurs bactériophages lysogéniques. Les régions II et II sont le cœur externe et la colonne vertébrale d'un noyau polysaccharide. Il n'y a généralement que des variations mineures dans le noyau au sein des espèces. La colonne vertébrale du polysaccharide est connectée à un glycolipide, lipide A (région IV), via un court lien normalement composé d'acide

3-déoxy-D-mannoosaminique (DKO). Le lipide A est un disaccharide de glucosamine fortement substitué par du phosphate, des acides gras et KDO, bien que la proportion de KDO soit faible ou absente dans les cyanobactéries comparé à d'autres LPS bactériens. Le composé lipide A est aussi acétylé avec une amide et des esters d'acides gras hydroxylés.

Ces composés bien que peu étudiés doivent contribuer aux problèmes de santé humaine associés à l'exposition aux cyanobactéries.

I. 2. 1. 6. Autres composés bioactifs

Les cyanobactéries sont connues pour produire de nombreux autres composés bioactifs, certains ayant un intérêt médical (antitumoraux, antiviraux, antibiotiques, antifongiques) de même que des composés toxiques pour les autres cyanobactéries, les bactéries, les algues et le zooplancton.

I. 2. 2. EXTRACTION, CONCENTRATION ET PURIFICATION DES CYANOTOXINES

Les cyanotoxines sont des métabolites secondaires qui restent plutôt à l'intérieur des cellules pendant la période de croissance et sont libérés dans le milieu aqueux lors de la lyse des cellules. De ce fait, dans le milieu naturel, au début des blooms, la concentration des toxines dans le milieu aqueux est en général extrêmement faible et le potentiel toxique se mesure plus facilement à partir de l'analyse des cellules que de celle de l'eau. Pour évaluer le risque toxique d'une eau, certains auteurs mesurent des valeurs de concentration en milieu aqueux en incluant le contenu intracellulaire, ce qui pose le problème de connaître le nombre de cyanobactéries par litre d'eau. Dans les situations où un bloom est constitué presque dans sa totalité d'une seule espèce de cyanobactérie, la mesure de la biomasse est obtenue facilement soit par la mesure directe du poids sec (séchage à 40°C pendant 12 h pour éviter toute dégradation), soit par estimation à partir de la mesure de la chlorophylle a. Si le phytoplancton contient des cyanobactéries en présence d'autres espèces, l'estimation est plus délicate. Une solution simple consiste à prélever un volume d'eau connu, de le filtrer (sur le terrain préférablement) et de déterminer le contenu de toxines dans l'eau filtrée et sur le filtre, ce qui permet d'accéder aux deux concentrations extra et intracellulaire exprimées en microgrammes par litre d'eau. Ceci suppose des prélèvements d'échantillons qui soient représentatifs de la biomasse du milieu, ce qui n'est pas toujours facilement réalisable, surtout en cas de blooms, car les cyanobactéries s'agglutinent entre elles de façon non homogène. Les microcystines ont également été analysées dans des eaux douces utilisées comme aires récréatives de baignade en concentrant la biomasse par des prélèvements à l'aide de filet à plancton : le contenu total de microcystines par litre d'eau représente la quantité de microcystines intracellulaires, calculée à partir de la mesure de la concentration totale de microcystines dans l'extrait (microgrammes par gramme de biomasse sèche), de la mesure de la chlorophylle a dans l'échantillon, concentré en biomasse et de la mesure de la chlorophylle a dans le réservoir d'eau.

La conservation des échantillons est très importante car il faut éviter tout risque de dégradation des toxines. Dès leur prélèvement, il est important de stocker les échantillons à 4°C et à l'abri de la lumière, et pas plus de 24 heures si possible. Dès l'arrivée au laboratoire, il est préférable de traiter les échantillons immédiatement. Sinon, il faut les conserver au congélateur, ce qui peut entraîner le relargage des toxines par les cellules. Donc, si l'on veut déterminer les toxines dans l'eau et dans les cellules, la filtration doit se faire avant la congélation des échantillons.

Nous ne développerons pas ici les méthodes d'extraction et de concentration des différentes cyanotoxines, elles sont développées pour ce qui des anatoxines-a et a(s) et microcystines-LR et RR, toxines que nous avons recherchées, dans la partie « Matériels et méthodes ».

I. 2. 3. ANALYSE DES CYANOTOXINES

La détermination et l'identification des toxines ne sont pas simples et requièrent aujourd'hui un appareillage assez coûteux. Le manque de standards est un point crucial pour l'aspect quantitatif des résultats. Le suivi des sites à risque et la détection rapide de toxicité lors de bloom nécessitent le développement et l'utilisation de tests biologiques, plus rapides et plus simples à mettre en œuvre que les méthodes analytiques. Il est cependant utile de quantifier et d'identifier les toxines produites pour interpréter au mieux les valeurs quantitatives fournies par les bioessais. Les méthodes analytiques sont nécessaires et doivent être utilisées pour confirmer les résultats positifs des bioessais. Les tests bioanalytiques sont appelés à se développer dans le futur proche pour le suivi des sites. Des biocapteurs utilisant les mêmes concepts que les tests bioanalytiques sont en cours de réalisation pour l'analyse des microcystines.

I. 2. 3. 1. Analyse par chromatographie

Nous ne développerons pas ici les différentes méthodes d'analyse par chromatographie en phase liquide ou gazeuse couplée à différents détecteurs des différentes cyanotoxines. Elles sont développées pour ce qui de l'analyse de l'anatoxines-a et des microcystines-LR et RR par chromatographie en phase liquide (CPL ou HPLC), toxines que nous avons recherchées, dans la partie « Matériels et méthodes ».

I. 2. 3. 2. Analyse par méthodes bioanalytiques

Plusieurs méthodes biologiques peuvent être envisagées, basées sur la potentielle bioactivité des toxines, telles l'hépatotoxicité, la neurotoxicité, la cytotoxicité, l'activité enzymatique et les interactions immunologiques. Etant donné la diversité des toxines produites par les souches environnementales, des méthodes permettant d'accéder rapidement et facilement à une concentration totale en toxines appartenant à un même groupe ou ayant le même mode d'action sont bien adaptées au suivi des blooms sur le terrain. La difficulté réside en une validation de ces méthodes en raison du manque de standards.

Les méthodes bioanalytiques sont particulièrement développées pour la recherche de microcystines. L'anatoxine-a(s) est également détectée par une méthode de ce type. Une méthode bioanalytique type ELISA est décrite pour l'anatoxine-a, mais elle n'est pas commercialisée.

- **Microcystines**

Immunoessais (tests ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Ces tests sont basés sur une reconnaissance antigène-anticorps, l'antigène étant la ou les molécules à détecter. Les microcystines ont des structures très proches et il est relativement facile d'obtenir des anticorps. Plusieurs tests ELISA à compétition directe ont été décrits, mettant en œuvre des anticorps polyclonaux anti-Mcyst-LR. Ces tests présentent une CL50 (concentration en toxine pour laquelle l'absorbance est égale à 50 % de l'absorbance du blanc) de 1 à 3 µg/l pour Mcyst-LR

et un domaine de linéarité compris entre 0,5 et 5-10 microgrammes par litre. Le test de laboratoire le plus sensible est un test indirect obtenu à partir d'un anticorps monoclonal anti-Mcyst-LR avec une CL50 de 0,125 µg/l et un domaine de linéarité compris entre 0,05 et 0,5 µg/l.

Les anticorps reconnaissent de façon variable les autres microcystines. Un des tests possède une bonne réactivité croisée avec certaines microcystines toxiques, Mcyst-LR, -RR, -YR, et la nodularine, mais a peu d'affinité pour Mcyst-LY et -LA qui sont pourtant toxiques. Un autre test réagit avec une quinzaine de microcystines, avec une sensibilité variable. Il ne reconnaît pas les microcystines où le fragment Adda est déméthylé. Le test le plus sensible possède une bonne réactivité croisée avec quatre microcystines et reconnaît très peu les variants pour lesquels la double liaison du carbone 6 de Adda est Z au lieu de E.

Deux kits ELISA sont actuellement commercialisés : l'un utilise les anticorps polyclonaux et l'autre les anticorps monoclonaux. Les performances du premier d'entre eux ont été évaluées avec des échantillons réels d'eau de surface et des extraits d'algues. De bonnes répétabilité et reproductibilité des mesures (deux à cinq répliquats par kit, trois kits testés, coefficient de variation inférieur à 10 %) ont été obtenues. Aucun faux négatif n'a été détecté. Les limites de détection déterminées avec de l'eau ultrapure sont de 0,05 microgramme par litre. Un effet de matrice a été observé avec les eaux potables et de surface aux faibles concentrations en toxines, ce qui se traduit par une détection limite dans ces eaux comprises entre 0,10 et 0,15 µg/l et un risque de faux positifs dans ces gammes de concentration. Les limites de quantification dans les eaux de surface et les eaux potables sont de 0,2 microgramme par litre. Une étape simple d'enrichissement sur cartouche remplie de silice greffée C18 est alors recommandée pour éviter le risque de faux positifs. L'enrichissement avec une phase immunosélective permet de s'affranchir des effets de matrices des échantillons. De bonnes corrélations ont été observées entre des mesures par ELISA et des mesures obtenues par enrichissement suivi de détermination par CPL pour des eaux potables et de surface dopées. Avec les extraits d'algues, la réactivité croisée avec d'autres variantes a été mise en évidence par analyse des extraits par CPL-SM, mais la réactivité croisée n'a pas été évaluée avec les divers variants par manque de standards. L'utilisation des tests ELISA pour le suivi d'un site est tout à fait envisageable. Elle nécessite de valider la méthode, c'est-à-dire de connaître la production des variants toxiques de microcystines par la souche toxique prédominante du site, la composition et le pourcentage avec les variants individuellement.

Tests d'inhibition enzymatique : inhibition de phosphatases

Puisque les hépatotoxines agissent sur certaines protéines (sérine/thréonine) phosphatases de type 1 et 2A (PP-1 et PP-2A), des méthodes enzymatiques basées sur l'inhibition de l'activité de ces PP ont été envisagées, d'autant plus que ces enzymes sont très sensibles. De même que l'acide okadaïque, les microcystines inhibent spécifiquement ces enzymes *in vitro* et *in vivo*, à des concentrations d'environ 0,1 µg/l pour Mcyst-LR. Les premiers tests ont été radiochimiques mais, par la suite, les tests colorimétriques ont été développés. L'un d'eux est basé sur la transformation d'un substrat incolore, le p-nitrophényl-phosphate, en un produit jaune, le p-nitrophénol par action de la protéine phosphatase. Lorsque l'enzyme se trouve en présence d'un inhibiteur, elle déphosphoryle moins de substrat et la coloration est moins intense. L'intensité de la coloration est reliée à la concentration inhibitrice en toxine et est évaluée en mesurant l'absorbance à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Un des tests utilise une protéine recombinante de type PP-1 exprimée chez E. coli. La CL50 obtenue pour Mcyst-LR lorsque le test contient 2,5 ou 5 µg/ml de PP-1 est de 0,25 µg/l et la réponse est linéaire pour une gamme de concentration variant entre 1 et 25 µg/l, soit entre 0,05 et un nanomolaire. Six autres microcystines et deux nodularines ont été testées, montrant des

résultats en accord avec ceux obtenus par le test souris, les variants non toxiques ne donnant pas de réponse alors que les toxiques inhibent l'enzyme à des concentrations très faibles. Le seul inconvénient de ce test provient de la difficulté de se procurer l'enzyme.

Un autre test repose sur la mesure de l'acide okadaïque en utilisant une enzyme commerciale de type PP-2A purifiée à partir d'hématies humaines. Ce test a été adapté à l'analyse des microcystines. Le test utilise les microplaques 96 puits permettant l'analyse simultanée de nombreux échantillons en moins d'une heure. Il a été mis au point avec deux milieux réactionnels différents, le premier permettant d'estimer la concentration en microcystines dans une gamme 0,4-10 µg/l et le second d'affiner la détermination dans une gamme 0,2-0,8 µg/l, compte tenu des dilutions à effectuer lors de la mise en œuvre du test.

Ces deux tests ont donné de bons résultats dans les eaux potables mais des effets de matrice sont observés dans certaines eaux de surface à des concentrations très faibles, si bien que l'on peut observer de faux positifs. Bien que la limite de détection, du second test optimisé soit de 0,1 µg/l, une procédure d'enrichissement est recommandée pour la mesure de concentrations inférieures à 0,2 microgramme par litre. Ce test a fait l'objet d'une procédure de validation en utilisant des cultures de cyanobactéries (in vitro) et des échantillons environnementaux. Les cultures de cyanobactéries ont permis d'isoler et de purifier quelques variantes afin d'évaluer leur réponse au test d'inhibition enzymatique. Les courbes d'inhibition associées aux diverses variantes ont été tracées individuellement : ces microcystines toutes de toxicité importante conduisent à des valeurs de CL50 proches. Pour les échantillons environnementaux, une bonne corrélation entre les valeurs obtenues par la CPL (somme de la concentration des variantes toxiques identifiées dans les échantillons) et celles obtenues par le test (concentration équivalente en Mcyst-LR). Ainsi, pour 15 extraits obtenus lors de la culture de la souche *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 de concentrations comprises entre 0,1 et 4 mg/l, la pente moyenne de la corrélation est de 0,73, avec un coefficient de corrélation de 0,91. Pour 18 extraits obtenus à partir d'un même site naturel la pente moyenne est de 0,68 avec un coefficient de corrélation de 0,94. Ces corrélations sont satisfaisantes et valident le test. Néanmoins, pour valider le test, il faut connaître la production toxinique du site. Une fois celle-ci établie, le test peut être utilisé pour le suivi du potentiel toxique. En effet, différents résultats indiquent qu'une souche dans un environnement donné produit des proportions semblables en toxines d'une année à l'autre.

Ceci permet d'envisager le suivi des zones sensibles aux microcystines. Les échantillons prélevés sur le terrain sont préconcentrés puis criblés à l'aide du test. Même s'il est nécessaire d'analyser par CPL-UV-SM ceux qui se révèlent positifs, le test validé permet d'évaluer rapidement le risque associé à un bloom. L'association d'une préconcentration basée sur une reconnaissance structurale par immuno-extraction et de ce test basé sur le mode de toxicité semble un bon compromis, d'autant plus que des effets de matrice éventuels sont supprimés par la préconcentration. Ceci requiert cependant d'appliquer la même procédure de validation à l'immuno-extractant, ce qui est en cours. Actuellement, l'association du test ELISA et de ce test est la procédure de suivi de terrain recommandée.

- **Anatoxine-a**

Un test ELISA a été décrit pour l'analyse de l'anatoxine-a mais n'est pas commercialisé. Ce type de test est basé sur une reconnaissance antigène-anticorps, l'antigène étant la ou les molécules à détecter.

- **Anatoxine-a(s)**

L'activité biochimique de l'anatoxine-a(s) a été exploitée dans un test enzymatique pour détecter l'inhibition de l'acétylcholinestérase. Ce test a été développé pour l'analyse des pesticides organophosphorés.

I. 2. 4. TOXICITE

Même si les propriétés toxiques de certaines cyanobactéries commencent à être bien connues, les intoxications d'animaux domestiques en 2002 et 2003 dans les gorges du Tarn ont montré qu'il n'était pas aisé de mettre en évidence un lien de cause à effet entre la présence de cyanobactéries dans l'eau et la mortalité des animaux.

Nous développerons ci-après les données relatives aux microcystines et anatoxines, toxines pour lesquelles il y a le plus d'informations disponibles.

I. 2. 4. 1. Les microcystines

Les microcystines sont véhiculées par le système de transport de la bile dans le foie essentiellement, mais aussi vers les reins et l'intestin. Les cellules atteintes sont les hépatocytes. L'activité toxique des microcystines résulte de leur pouvoir inhibiteur sur les protéines phosphatases de types 1, 2A et 3A à la fois *in vitro* et *in vivo*. Elles empêchent ainsi la déphosphorylation des protéines du cytosquelette et induisent la réorganisation de ce dernier. Des boursofflures apparaissent à la surface des hépatocytes, les cellules se rétractent, s'écartent les unes des autres et se détachent des vaisseaux sinusoidaux. Les cellules des vaisseaux se détachent également, le sang s'accumule dans le tissu hépatique provoquant une hémorragie puis la mort. Ce pouvoir inhibiteur sur les protéines phosphatases a été mis à profit pour réaliser un test enzymatique.

La microcystine-LR, la plus commune, semble être la plus toxique. Elle provoque un arrêt de l'écoulement biliaire en un temps beaucoup plus court que les autres microcystines.

- **Doses létales**

La DL₅₀ par voie intrapéritonéale de la microcystine-LR varie entre 25 et 150 µg/kg de poids vif chez la souris, une valeur de 50 à 60 µg/kg est couramment admise.

La DL₅₀ par voie intranasale est du même ordre que par voie intrapéritonéale.

La DL₅₀ par voie orale est de 5000 µg/kg chez une souche de souris, 10900 µg/kg dans une autre souche, et plus haute chez les rats.

- **Symptomatologie**

Les signes cliniques de l'hépatotoxicité due à des cyanobactéries ont été observés lors d'intoxications naturelles. Par la suite, c'est par des intoxications expérimentales effectuées en laboratoire sur différents animaux qu'ils ont été le mieux cernés. Tout d'abord les chercheurs ont montré que les espèces concernées sont les oiseaux et les mammifères (vaches, brebis, cochons, chiens, chevaux...). Les crustacés cladocères, les amphibiens, les poissons téléostéens, qui vivent dans les eaux douces ne sont pas atteints.

Ces études peuvent être pratiquées soit par administration orale de lyophilisat, soit par injection intraveineuse ou intrapéritonéale de toxines pures. Si l'on utilise des blooms lyophilisés, il est important de savoir qu'il faut une assez grande quantité de lyophilisat pour obtenir une dose létale ou sublétale par voie orale ou voie parentérale. Par voie orale, la DL100 pour les grands animaux est quatre à cinq fois supérieure à celle des petits animaux.

- Chez le rongeur de laboratoire

Chez la souris ou le rat (voie intraveineuse ou intrapéritonéale avec une DL 100 à 19 mg/kg de lyophilisat), les premiers symptômes apparaissent dix minutes après l'injection. Les symptômes observés sont la pâleur des muqueuses, la prostration, des convulsions, la paralysie des membres postérieurs, une respiration difficile et irrégulière, la diminution de la pression artérielle jusqu'au choc hypovolémique. La mort survient en une à trois heures par un choc hémorragique. A l'autopsie, le foie est congestionné et hypertrophié.

- Chez le mouton

Chez le mouton, par voie orale, avec une DL 100 de 1040 mg/kg de lyophilisat, les premiers symptômes apparaissent au bout de 15 heures. Les symptômes relevés sont ceux d'un animal abattu avec des fréquences cardiaque et respiratoire augmentées ainsi qu'un arrêt de la rumination. Puis l'animal se couche souvent en décubitus sternal, les muscles de la face et des membres sont atteints de contractures. Les troubles respiratoires s'accroissent. Un nystagmus apparaît et l'animal perd ses réflexes oculaires. La mort survient entre la 18^{ème} et la 23^{ème} heure. A l'autopsie, la carcasse présente un subictère, le sang est noir et coagule lentement. Le foie est hypertrophié, pâle et présente des zones de pétéchies. Des pétéchies et ecchymoses sont présentes dans les tissus sous-cutanés, intermusculaires, sous pleuraux, cardiaques, particulièrement sur l'endocarde du ventricule gauche. Les poumons sont légèrement œdémateux et les autres organes semblent normaux.

- Chez les bovins

Chez les bovins, la plupart des symptômes sont semblables à ceux rencontrés chez le mouton. Ces premiers symptômes chez la vache laitière peuvent être confondus avec la fièvre vitulaire ou l'hypomagnésémie. La mort survient entre la 8^{ème} heure et quelques jours après l'ingestion du bloom. Elle est précédée d'un état comateux, de tremblements musculaires, d'agitation, de nystagmus, et de difficultés respiratoires. Les lésions à l'autopsie ressemblent à celles rencontrées chez le mouton.

La mort est due à un choc hypovolémique causé par une hémorragie interstitielle intrahépatique. Ce choc hémorragique entraîne la destruction des sinusoides. Le doublement du poids du foie suite à l'empoisonnement traduit ce choc hémorragique. Les animaux qui survivent après la phase aigue meurent quelques jours après d'insuffisance hépatique, suite à de nombreux troubles métaboliques dont l'hyperkaliémie et l'hypoglycémie.

I. 2. 4. 2. L'anatoxine-a

L'anatoxine-a a un puissant effet agoniste pour le récepteur nicotinique sur les canaux ioniques des fibres musculaires. Quand l'acétylcholine est l'agoniste, le canal s'ouvre quelques instants puis se referme brusquement pour ne s'ouvrir qu'à la stimulation suivante. Une stimulation engendre une salve correspondant à une seule ouverture, franche et bien séparée de la suivante. Quand l'agoniste est l'anatoxine-a, le canal s'ouvre mais l'ouverture correspondant à une salve est interrompue par une fermeture de courte durée. L'acétylcholine a une capacité de dissociation plus grande que celle de l'anatoxine-a. Pour l'acétylcholine, la fermeture du canal doit correspondre à sa libération par le