

récepteur (activité normale). En revanche, l'anatoxine-a reste liée au site agoniste du récepteur, elle bloque le canal en dépolarisation permanente, d'où une succession de deux ouvertures séparées par une fermeture de courte durée. Du coup, le récepteur est stimulé en permanence et il est maintenu en dépolarisation permanente. Cela a pour effet de désensibiliser le récepteur et cette désensibilisation peut subsister même après la disparition de l'agent dépolarisant.

- **Doses létales**

La DL₅₀ par voie intraveineuse est inférieure à 100 µg/kg de poids vif.

La DL₁₀ (plus petite dose causant la mort) par voie intrapéritonéale de l'anatoxine-a est de 250 µg/kg de poids vif chez la souris. La DL₅₀ est de 375 µg/kg de poids vif.

La DL₅₀ par voie intranasale est de 2000 µg/kg de poids vif.

La DL₅₀ par voie orale est supérieure à 5000 µg/kg chez une souche de souris.

- **Symptomatologie**

Les animaux utilisés pour l'expérimentation sont le rat, la souris, le veau. L'administration se fait par voie orale ou parentérale (injection de cellules d'algues lyophilisées ou extraits d'algues contenant la toxine). On observe dans tous les cas des fasciculations musculaires précoces et de plus en plus nombreuses avec le temps, des titubations suivies de l'effondrement de l'animal, une respiration abdominale exacerbée, une cyanose des muqueuses, des convulsions et la mort. Chez les oiseaux on a les mêmes symptômes accompagnés d'un opisthotonos durable. Chez les poissons les muscles se raidissent. Chez les animaux de laboratoire, la mort est précédée de sursauts tandis que les intoxications naturelles sont caractérisées par un effondrement et une mort soudaine de l'animal. De façon générale, la mort est rapide, elle est caractérisée par une paralysie respiratoire qui survient quelques minutes à quelques heures après l'intoxication, selon la quantité de toxine ingérée.

- **Diagnostic différentiel**

Les symptômes d'une intoxication par des neurotoxines sont délicats à différencier des symptômes dus à une intoxication par des inhibiteurs des cholinestérases (IDC), et plus précisément par des insecticides organophosphorés ou carbamates. En effet, lors d'intoxication suraiguë par des IDC, la mort de l'animal survient rapidement après une détresse respiratoire brève. Les symptômes sont dans ce cas assez frustrés. Lors d'une intoxication aiguë, les phases muscarinique et nicotinique sont classiquement décrites. La phase muscarinique se caractérise par une stimulation des sécrétions : salivation, sécrétions digestives, sécrétions bronchiques. Les fibres musculaires lisses sont aussi stimulées : on observe une bronchoconstriction, un hyperpéristaltisme (diarrhée), des vomissements, un myosis. La phase nicotinique provoque une augmentation du rythme cardiaque, des troubles nerveux : tremblements, myoclonies, mouvements de pédalage, convulsions cloniques, mydriase. Ces phases sont souvent associées à une phase centrale. Ils peuvent aller de l'anxiété de l'animal aux convulsions, et même au coma.

Cette 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.

- **Traitement**

A dose létale et sublétale, les essais avec respiration artificielle n'ont pas permis la survie des animaux. En effet, le blocage neuromusculaire produit par l'anatoxine-a dure très longtemps, de sorte que la respiration artificielle est inefficace. Toutefois, un traitement symptomatique peut être mis en place. On garde l'animal au calme, dans une obscurité relative. Une perfusion de chlorure de sodium ou de Ringer lactate est mise en place pour soutenir les grandes fonctions. On favorise l'élimination des toxiques par l'utilisation d'adsorbants digestifs, comme le charbon végétal. Enfin, un traitement plus spécifique peut être mis en place : on peut essayer de calmer les convulsions par l'utilisation de Diazépam (Valium®).

I. 2. 4. 3. L'anatoxine-a(s)

Les études *in vitro* montrent que cette toxine est un inhibiteur de l'acétylcholinestérase. Son mécanisme d'action est similaire à celui des insecticides organophosphorés et des carbamates. Cependant, elle n'agit que sur l'acétylcholinestérase périphérique. Elle ne franchirait pas la barrière hémato-méningée du fait de sa polarité. Ce sont les signes cliniques qui expliquent le s de l'anatoxine-a(s), car on observe les mêmes symptômes nerveux qu'avec l'anatoxine-a mais avec une intense salivation en plus. Les tests cinétiques permettent de distinguer une inhibition compétitive d'une inhibition non compétitive. Ces tests sur l'anatoxine-a(s) montrent qu'elle est un inhibiteur non compétitif. L'inhibiteur empêche le site actif de l'acétylcholinestérase de fonctionner. L'enzyme est bloqué et ne peut hydrolyser normalement l'acétylcholine. Le site actif de l'enzyme est occupé momentanément ou durablement par l'inhibiteur. Comme les organophosphorés ou les carbamates, l'anatoxine-a(s) est un inhibiteur irréversible. C'est un inhibiteur très puissant, plus puissant que de nombreux organophosphorés.

- **Doses létales**

La DL₅₀ est de 20 µg/kg de poids vif chez la souris.
Il n'y a pas de données sur la DL₅₀ par voie orale.

- **Symptomatologie**

Les signes cliniques sont fugaces car la mort survient rapidement. De même les lésions sur les organes lors de l'autopsie ne sont pas étendues.

Sur les animaux de laboratoire (porcs d'expérimentation, canards), les sujets auxquels on a administré par voie orale les algues contenant l'anatoxine-a(s) présentent quelques instants après une intense salivation, des tremblements, des fasciculations, de l'ataxie, de la diarrhée, des sécrétions nasales importantes ainsi qu'une dyspnée. Ces symptômes sont suivis de l'effondrement de l'animal, de nystagmus, d'une cyanose des muqueuses puis la mort survient en 10 à 30 minutes.

- **Traitement**

Un traitement symptomatique peut être mis en place. Il faut perfuser l'animal pour soutenir les grandes fonctions et corriger les désordres électrolytiques. On peut essayer de favoriser l'élimination des toxiques par l'utilisation d'adsorbants digestifs, comme le charbon végétal activé. Pour calmer les convulsions, on peut utiliser du Diazépam (Valium®). On peut traiter les animaux

qui présentent une phase muscarinique (salivation, troubles digestifs) avec de l'atropine sulfate, associée ou non à du glycopyrrolate. Par analogie avec les intoxications par les organophosphorés, on peut aussi utiliser les oximes, pour tenter de réactiver les cholinestérases. Si la première dose se révèle inefficace, il ne faut pas la renouveler.

I. 2. 5. TOXINOGENESE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE – PRODUCTION ET REGULATION

Les toxines des microalgues sont considérées comme des métabolites secondaires, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas essentielles à la vie ou à la survie des organismes. Pour aborder les processus de production des toxines (toxinogénèse) et les facteurs favorisant cette production chez les microalgues, il faut prendre en considération la structure chimique des toxines. Du point de vue de la physiologie végétale, il convient de distinguer deux types de toxines selon les éléments qui constituent leur structure : (1) les toxines azotées dont le squelette contient à la fois du carbone et de l'azote, lequel, plus que le carbone, pouvant être pour les algues un élément nutritif limitant dans les milieux naturels ou même en culture et (2) les toxines polyéther au squelette uniquement carboné.

Les études de toxinogénèse s'intéressent aux variations de production de toxines intervenant dans le cycle biologique des cellules algales et à celles observées entre différents organismes appartenant à un même groupe. Dans ce dernier cas, la cause de variation est génétique car la potentialité de produire des toxines est déterminée dans le génome des organismes. Dans le premier cas, la cause de variation est liée aux facteurs environnementaux agissant sur le cycle biologique de l'organisme. Cependant, cette influence environnementale s'exerce sous contrôle génétique, puisque les capacités de réponse des organismes à des variations des caractéristiques du milieu, en termes de physiologie et peut-être de production de toxines, sont déterminées dans le génome des organismes.

Dans la pratique, l'estimation de la toxicité dépend de nombreux facteurs, notamment de la stabilité des toxines (en particulier lors de leur extraction), elle-même liée à leurs caractéristiques chimiques et biochimiques. La spécificité et la sensibilité de la méthode de dosage sont également capitales. Par ailleurs, la variation de la toxicité d'une population de microalgues toxiques peut être décrite de plusieurs façons. La quantité de toxines par cellule, et/ou la toxicité cellulaire exprimée en équivalent de quantité de toxines sont le plus souvent utilisées car ce sont les grandeurs que l'on mesure aussi bien dans les études en cultures que sur des populations naturelles. La production de toxines est mesurée par la variation de la quantité de toxines dans une population microalgale étudiée en fonction du temps, le plus souvent en culture : elle reflète la dynamique de synthèse des toxines dans les organismes.

La détermination quantitative des concentrations en toxines est principalement réalisée à partir de cultures lyophilisées ou d'échantillons de blooms. Les résultats sont exprimés en mg ou µg de toxines / g de poids sec.

I. 2. 5. 1. Régulation par les facteurs chimiques et physiques

La production de toxines par une seule souche de cyanobactéries semble être uniforme et la perte spontanée et permanente de production de toxines a été rarement reportée. Les effets de plusieurs facteurs environnementaux sur la croissance et la production de toxines par les cyanobactéries ont été étudiés en cultures batch et continue. L'âge de la culture en mode batch, et la température, sont

les paramètres les plus étudiés, suivi par la lumière, les nutriments, la salinité, le pH et les concentrations en micronutriments.

Les facteurs environnementaux affectent le contenu des cyanobactéries en toxines, mais seulement dans une faible proportion. La majorité des études montre que les cyanobactéries produisent plus de toxines sous des conditions qui sont favorables à leur croissance.

Par exemple, différentes espèces de cyanobactéries ont différentes exigences en lumière : *Planktothrix* préfère les faibles intensités lumineuses pour sa croissance, *Anabaena* des intensités modérées et *Aphanizomenon* de fortes intensités. Toutes les souches produisent le maximum de toxines quand elles se développent sous leurs conditions optimales de luminosité. Des différences de l'ordre d'un facteur 2 ou 3 ont été reportées en relation avec l'intensité lumineuse.

Les souches et espèces diffèrent également un peu quant à leur température optimale de croissance. Les teneurs en toxines produites dans la plupart des études sont plus élevées pour des températures comprises entre 18 et 25°C, alors que des températures plus basses (10°C) ou beaucoup plus hautes (30°C) correspondent à des teneurs plus faibles.

Il semblerait aussi que les cyanobactéries sont plus toxiques quand elles se développent à fort ou faible pH.

Des études en laboratoire avec des souches pures de cyanobactéries ont montrées que les facteurs environnementaux peuvent induire des changements dans la toxicité ou dans les concentrations de toxines sur la base d'une unité de biomasse, mais couramment par un facteur inférieur de 3-4. Sur la base de la cellule, les changements en termes de toxines sont probablement plus faibles.

Cela apporte des éléments à l'hypothèse selon laquelle la plupart, si ce n'est toutes, les variations en toxicité des blooms naturels « monoespèce » est le fait de la croissance et de la décroissance de souches de la même espèce, mais avec des potentialités-productivités différentes. Les facteurs qui contrôlent la croissance et le contenu en toxines de souches individuelles sont inconnus, mais clairement la régulation génétique de la production de cyanotoxines est importante pour des études ultérieures et la compréhension.

Des souches toxiques et non toxiques existent dans de nombreuses espèces de cyanobactéries.

I. 2. 5. 2. Cyanotoxines potentielles en fonction de la composition en différentes espèces et souches d'un bloom

Les populations de cyanobactéries d'un bloom toxique peuvent être dominées par une seule espèce ou composées de plusieurs espèces, certaines étant non toxiques. Et même au sein d'un bloom composé d'une seule espèce, il peut y avoir un mélange de souches toxiques et non toxiques. Une souche est un sous-groupe génétiquement spécifique au sein d'une espèce particulière, et chaque espèce peut renfermer 10 à 100 souches, chacune ayant des caractéristiques légèrement différentes. Certaines souches sont nettement plus toxiques que d'autres, parfois d'un facteur 3. Cela signifie qu'une souche très toxique, même si elle est minoritaire, peut rendre un échantillon de bloom toxique.

Les souches toxiques et non toxiques ne peuvent pas être différenciées par une observation au microscope. Le développement du génie génétique pourra sans doute conduire à des méthodes d'identification plus précises. Pour confirmer si une souche particulière est productrice de toxines, il est important de l'isoler et de réaliser une culture « pure ».

Les cyanobactéries peuvent produire plusieurs toxines d'une même famille simultanément ou de familles différentes (ex. neurotoxine et hépatotoxine).

I. 2. 5. 3. Variation saisonnière dans les concentrations en toxines d'un bloom

La période et la durée de la saison des blooms de cyanobactéries dépendent largement des conditions climatiques. En France une durée de 4 mois est courante. Des études sur des périodes prolongées montrent que les concentrations en toxines par gramme de matière sèche varient significativement sur une échelle de temps allant des semaines aux mois, mais rarement d'un jour à l'autre comme cela a parfois été reporté.

La concentration en toxines maximale ne coïncide pas forcément avec la biomasse maximale. En fait, il peut y avoir des variations significatives dans la quantité de toxines par masse de cyanobactéries dans le temps, indépendamment de tout changement dans la taille de la population de cyanobactéries. L'explication de ceci est double. Premièrement, il peut y avoir une croissance ou décroissance d'espèces ou souches à productivité en toxines différentes (contenu en toxines par cellule). Deuxièmement, la productivité en toxines peut varier d'un facteur 5 en fonction des conditions environnementales.

De fortes variations régionales, saisonnières, spatiales, temporaires (et journalières) des concentrations en toxines indiquent que prédire ou établir un modèle sur les concentrations en toxines qui peuvent être produites demande une bonne connaissance du développement de la population (de la souche) dans différents types d'écosystèmes aquatiques, de même que de la variabilité de la productivité.

I. 2. 5. 4. Répartition entre cellules et eau

Il apparaît que les cyanotoxines sont produites et contenues dans les cellules en croissance active (intracellulaire ou particulaire). Le relargage dans l'eau, pour former des toxines dissoutes, semble se produire essentiellement, voire exclusivement, au cours de la sénescence cellulaire, la mort et la lyse plutôt que par une excrétion continue.

Il y a quelques indications montrant que l'anatoxine-a peut « sortir » des cellules au cours de la croissance spécialement sous des conditions lumineuses faibles. De fortes concentrations en anatoxine-a excédant parfois le pool intracellulaire ont été trouvées dans le milieu de cultures batch.

Dans la nature, les populations de bloom en « pleine forme » ne produisent que peu de toxines extracellulaires. C'est un point important pour les installations de traitement d'eau car cela signifie que l'élimination des cyanobactéries intactes de l'eau brute peut prévenir ou diminuer significativement l'emploi de substances absorbantes (charbon actif) ou oxydantes (ozone ou chlore) au cours des procédés d'élimination des toxines.

Le relargage des toxines à partir des cellules est accru par les traitements chimiques utilisés pour l'éradication des cyanobactéries, spécialement par l'usage des algicides (à base de cuivre ou d'herbicides organiques).

II. MATERIELS ET METHODES

II. 1. PROTOCOLES TERRAIN

Ces protocoles ont été élaborés par le CRITT Bio-Industries et ont été remis au LDA 48 et au CSP qui ont assuré les campagnes de routine et d'urgence de l'été 2005.

La consigne générale était la suivante : **Mettre des gants et rincer le matériel avant et après tout prélèvement.**

II. 1. 1. CHECK-LIST DU MATERIEL NECESSAIRE PAR CAMPAGNE

- Sonde multiparamètres : T°, conductivité, pH et [O₂] dissous à calibrer avant d'aller sur le terrain
- Fiches terrain (une fiche à remplir par point de prélèvement) + fiches échantillon
- Support rigide pour écrire
- Etiquettes
- Ciseau
- Scotch
- Chemises en plastique pour protéger fiches terrain
- Stylo, crayon à papier et marqueur fin indélébile
- Glacière
- Pains de glace (le jour du départ)
- Sopalin
- Gants
- Pissette d'eau osmosée
- Pissette d'eau vide
- Baguette pour mélanger
- Pipettes compte-goutte
- Bécher gradué de 5L avec bec verseur
- Eprouvette graduée en plastique de 1L
- Eprouvette graduée en plastique de 500 mL
- Eprouvette graduée en plastique de 250 mL
- Eprouvette graduée en plastique de 100 mL
- Système de filtration
- Filtres GF/C (diam : 4,7 cm)
- 2 pinces à bouts plats
- Spatule
- Brosse à dents
- Bac en plastique blanc
- Solution de formol à 40%
- Papier aluminium

II. 1. 2. CHECK-LIST DU FLACONNAGE NECESSAIRE PAR SITE (5 SITES PAR CAMPAGNE)

Pour les échantillons d'eau :

- 1 flacon plastique de 0,5 L + 10 mL de formol 40% pour identification / comptage
- 2 tubes à bouchon de 12 mL pour chlorophylle
- 3 tubes hémolyse en plastique à bouchon de 12 mL pour 3 toxines sur cellules –
filtre
- 1 flacons de 2 L pour 3 toxines sur eau filtrée

Pour les échantillons de galet :

- 1 flacon ambré de 30 mL pour identification / comptage
- 1 pot rouge de 125 mL pour chlorophylle et MSSC
- 2 pots rouge de 125 mL pour 3 toxines

Pour les échantillons de floc :

- 1 flacon ambré de 30 mL pour identification / comptage
- 2 pots rouge de 125 mL pour 3 toxines

II. 1. 3. MESURES TERRAIN : PH, CONDUCTIVITE, OXYGENE DISSOUS ET TEMPERATURE DE L'EAU

Matériel nécessaire:

Sonde multiparamètres

Protocole :

Pour l'utilisation de l'appareil, se référer au manuel d'utilisation qui se trouve dans la mallette (sous les sondes).

Pour plus de commodité, les appareils sont calibrés avant de partir sur le terrain.

S'installer au bord de la rivière, plonger la sonde dans l'eau et faire la lecture des différents paramètres. Bien agiter la sonde et attendre que la valeur affichée soit stable avant de faire la lecture. Noter les valeurs sur la fiche terrain. La T° de l'eau est donnée en °C, la conductivité en µS/cm et la concentration en O₂ en mg/l et en % de saturation.

Après utilisation des sondes, bien les rincer avec de l'eau distillée et les conserver dans les solutions fournies (se référer au mode d'emploi).

II. 1. 4. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS D'EAU POUR L'IDENTIFICATION ET LE COMPTAGE DES CYANOBACTERIES

Matériel nécessaire par campagne :

- Eprouvette de 500 mL
- 5 flacons en plastique de 500 mL
- Solution de formol à 40%
- Bécher gradué de 5 L

CODE étiquettes : ../../.. (date), P .. (N° de la station), E C

NB : Au laboratoire, avant de partir sur le terrain, répartir 10 mL de formol 40% dans les flacons en plastiques destinés au comptage.

Protocole de prélèvement :

Prélever de l'eau brute à l'aide du bécher.

Bien homogénéiser le contenu du bécher avec la baguette.

Mesurer 490 mL d'eau brute à l'aide de l'éprouvette et verser directement dans les flacons en plastique, préalablement identifiées et contenant 10 ml de formol.

Agiter et stocker à température ambiante.

**II. 1. 5. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS D'EAU POUR LE
DOSAGE DES TOXINES**

Matériel nécessaire par campagne :

- Bécher gradué de 5 L
- Baguette
- Eprouvette de 1 L
- 2 pinces à bouts plats
- Glacière
- Système de filtration
- Filtres GF/C
- 15 tubes à hémolyse en plastique préalablement identifiés
- 5 flacons de 2 L

CODE étiquettes tubes :

../../.. (date), P .. (N° de la station), E m

../../.. (date), P .. (N° de la station), E a

../../.. (date), P .. (N° de la station), E as

CODE étiquette flacon :

../../.. (date), P .. (N° de la station), E m + a + a(s)

Protocole de prélèvement :

A l'aide des pinces à bouts plats, prendre un filtre GF/C, le positionner sur le support en plastique puis verrouiller le système de filtration.

Prélever de l'eau brute à l'aide du bécher, bien agiter avec la baguette.

Transférer 1L dans l'éprouvette graduée et filtrer l'eau par tranches de 200 mL jusqu'à colmatage du filtre (le filtre doit être coloré). Si le filtre n'est pas colmaté après filtration de 1L, transférer de nouveau 1L du bécher dans l'éprouvette après agitation et poursuivre la filtration de la même façon jusqu'au début du colmatage du filtre. Ne pas filtrer plus de 2L pour éviter la dégradation du filtre.

Noter sur la fiche terrain **le volume total d'eau brute filtrée.**

Démonter le système de filtration et à l'aide des deux pinces à bouts plats, plier le filtre en quatre, algues à l'intérieur, et l'introduire dans un tube à hémolyse de 5 mL préalablement identifié.
Conserver au congélateur.
Répéter l'opération pour chaque toxine.
Récupérer environ 1,5 litres de filtrat et le mettre dans un flacon de 2L préalablement identifié.
Conserver si possible au congélateur, sinon à 4°C.

II. 1. 6. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS SUR GALETS POUR L'IDENTIFICATION ET LE COMPTAGE DES CYANOBACTERIES

Matériel nécessaire par campagne :

- Brosse à dents
- 5 flacons en plastique ambré de 30 mL
- Solution de formol à 40 %
- Pipettes compte-gouttes
- Bac de récupération en plastique
- Eprouvette de 250 mL
- Eprouvette de 50 mL
- Papier aluminium
- Ciseau

CODE étiquettes : ../../.. (date), P .. (N° de la station), G I

Protocole de prélèvement :

Prélever un gros galet et gratter toute sa surface à l'aide de la brosse à dents au-dessus du bac de récupération.

Après avoir récupéré tout le biofilm, rajouter si nécessaire un peu d'eau du Tarn afin d'obtenir plus de 130 mL d'une « soupe concentrée d'algues ».

Homogénéiser et transvaser dans une éprouvette de 250 mL. **Noter le volume exact.** Transférer après homogénéisation 10 mL, **mesuré précisément dans l'éprouvette** de 50 mL, dans un flacon ambré de 30 mL préalablement identifié.

Rajouter 5 gouttes de formol 40%. Bien agiter et conserver à température ambiante.

Sécher le galet et recouvrir la surface grattée d'un morceau de papier aluminium, dessiner le contour de cette surface sur le papier aluminium, le découper et le glisser dans une pochette en plastique préalablement identifiée.

CODE papier aluminium : ../../.. (date), P .. (N° de la station), G

La surface du galet sera calculée au laboratoire.

II. 1. 7. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS SUR GALETS POUR LA DETERMINATION DU POIDS SEC

Matériel nécessaire par campagne :

- Eprouvette 50 mL
- 5 flacons de 125 mL à capuchon rouge

- Glacière + pains de glace

CODE étiquettes : ../../.. (date), P .. (N° de la station), G CI

Protocole de prélèvement :

Sur les 130 mL environ d'une « soupe concentrée d'algues » obtenus précédemment, transférer après homogénéisation 40 mL, **mesuré précisément dans l'éprouvette** de 50 mL, dans un pot rouge de 125 mL préalablement identifié.

Conserver à 4°C, mais ne pas congeler.

**II. 1. 8. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS SUR GALETS POUR
LE DOSAGE DES TOXINES**

Matériel nécessaire par campagne :

- Eprouvette graduée de 50 mL
- 10 flacons de 125 mL à capuchon rouge préalablement identifiés et pré-pesés au laboratoire
- Glacière

CODE étiquettes : ../../.. (date), P .. (N° de la station), G tox

Protocole de prélèvement :

Avant de partir sur le terrain, pré-peser précisément les flacons rouges de 125 mL avec le capuchon. Identifier le flacon ainsi que le capuchon par un numéro et reporter son poids sur une fiche de pesée.

Sur les 130 mL environ d'une « soupe concentrée d'algues » obtenus précédemment, transférer après homogénéisation 2 X 40 ml, **mesuré précisément dans l'éprouvette** de 50 mL, dans 2 pots à capuchon rouge préalablement identifiés et pesés avec leur capuchon.

Conserver à 4°C, mais ne pas congeler tout de suite.

De retour au laboratoire, peser le flacon à capuchon rouge rempli du floc et noter la masse exacte sur la fiche de pesée (masse humide).

Conserver au congélateur.

**II. 1. 9. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS DE FLOCS
POUR L'IDENTIFICATION ET LE COMPTAGE
DES CYANOBACTERIES**

Matériel nécessaire par campagne :

- 5 flacons ambré de 30 mL
- Formol 40 % + pipette en plastique
- Gants

- Pipettes compte-gouttes

CODE étiquettes : ../../.. (date), P .. (N° de la station), F I

Protocole de prélèvement :

Prélever à la main (! ne pas oublier les gants !) un peu de floc et le mettre dans flacon ambré pour l'identification. Ajouter 5 gouttes de formol.
Bien agiter et conserver à température ambiante.

**II. 1. 10. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS DE FLOCS POUR
LE DOSAGE DES TOXINES**

Matériel nécessaire :

- 10 flacons de 125 mL à capuchon rouge préalablement identifiés et pré-pesés au laboratoire
- Glacière

CODE étiquettes : ../../.. (date), P .. (N° de la station), G tox

Protocole de prélèvement :

Avant de partir sur le terrain, pré-peser précisément les flacons rouges de 125 ml avec le capuchon. Identifier le flacon ainsi que le capuchon par un numéro et reporter son poids sur une fiche de pesée.

Prélever à la main (! ne pas oublier les gants !) un peu de floc et le transférer dans 2 pots à capuchon rouge préalablement identifiés et pesés avec leur capuchon (de façon à avoir une épaisseur d'environ 2 cm dans le flacon).

Conserver à 4°C, mais ne pas congeler tout de suite.

De retour au laboratoire, peser le flacon à capuchon rouge rempli du floc et noter la masse exacte sur la fiche de pesée (masse humide).

Conserver au congélateur.

II. 2. COMPTAGE DES CYANOBACTERIES

Ces analyses de même que les identifications ont été réalisées par le LDA 48.

II. 2. 1. COMPTAGE DES CYANOBACTERIES SUR EAU

➤ **Concentration de l'échantillon :**

- Homogénéiser l'échantillon.
- Verser 500 ml dans une ampoule à décanter.

- Laisser reposer minimum une nuit.

➤ **Préparation de la cuve :**

- ✓ Dans une cuve de 5 ml, placer une lamelle de verre.
- ✓ Fixer la colonne de la cuve par rotation.
- ✓ Déposer au goutte-à-goutte et de façon aléatoire 5 ml de l'échantillon décanté.
- ✓ Poser la lame porte-objet sur la cuve puis le cache blanc (la cuve doit rester à l'abri de la lumière et de toute agitation).
- ✓ Laisser reposer.
- ✓ Au bout du temps de repos, enlever le cache blanc et déposer une deuxième lamelle en verre, de façon à enfermer tout le phytoplancton déposé.
- ✓ Effectuer le comptage.

➤ **Méthode Utermöhl :**

- ✓ Définir le type d'organismes comptés (espèces, groupes d'espèces, genre ou groupe algal).
- ✓ Formes les plus larges ($> 15 \mu\text{m}$) \Rightarrow objectif X10.
Formes les plus petites \Rightarrow objectif X40.
- ✓ Les filaments doivent être comptés comme nombre de filaments en évaluant une moyenne du nombre de cellules par filament. \Rightarrow Moyenne établie sur les 30 premiers filaments comptés.
- ✓ Pour des colonies, si le Lugol n'a pas permis la désintégration au bout de quelques jours, il est possible de faire une hydrolyse alcaline (80-90°C pendant 15 minutes sous agitation) ou d'utiliser les ultrasons.

➤ **Comptage des cellules dans des transects :**

Sur une partie de l'échantillon.

Dans la plupart des cas, un transect (= champ) est défini par les côtés horizontaux et verticaux d'une grille de comptage \Rightarrow **1 transect = bande ayant pour longueur le diamètre de la cuve et largeur le rectangle de l'oculaire.**

- ✓ Placer le rectangle de l'oculaire sur un diamètre de la cuve, contre le bord supérieur.
- ✓ Observer le transect en faisant descendre le rectangle pas-à-pas jusqu'à la partie inférieure de la cuve.
- ✓ Effectuer une rotation de la cuve pour lire de nouveaux transects.
- ✓ Compter au moins 150-200 individus.
- ✓ Compter les cellules viables.
- ✓ Ne pas compter les fragments de cellules.
- ✓ Pour une série du même corps d'eau mais de sites légèrement différents, dénombrer tous les échantillons mais mesurer les cellules d'un seul, sauf si une grande variation de taille est notée.
- ✓ Dans un transect, compter les spécimens situés à cheval sur la marge de droite et ignorer la marge de gauche. Faire de même avec les marges du haut et bas.
- ✓ L'examen est réalisé sous un grossissement total de X200 à 450 (objectif X40).

\Rightarrow **Réaliser un comptage des filaments à X40 sur une partie de la surface de la cuve.**

Calculs :

- ✓ **Compter le nombre de cellules dénombrées sur l'ensemble des champs \Rightarrow nombre de filaments X nombre de cellules par filament.**

$$\text{Cellules/ml} = \frac{N \times A_{\text{cuve}}}{n_{\text{transects}} \times d_{\text{cuve}} \times l_{\text{rectangle}} \times V_{\text{décanté}}}$$

avec N = nombre de cellules comptées dans les transects.

A_{cuve} = aire de la cuve (mm^2)

d_{cuve} = diamètre de la cuve (mm)

$l_{\text{rectangle}}$ = largeur du transect (longueur du rectangle de l'oculaire) (mm)

$V_{\text{décanté}}$ = volume total décanté (ml)

NB :

- ✓ Aire de la cuve = πr^2 avec $r = 25,5 / 2 = 12,75$ mm.

$$\Rightarrow \text{Aire de la cuve} = \pi (12,75)^2$$

- ✓ Longueur du champ = 131 divisions.

A objectif X10, 1 division = $10 \mu\text{m}$ \Rightarrow Longueur = $131 \times 10 = 1310 \mu\text{m} = \mathbf{1,31 \text{ mm}}$

A objectif X40, 1 division = $2,5 \mu\text{m}$ \Rightarrow Longueur = $131 \times 2,5 = 327,5 \mu\text{m} = \mathbf{0,3275 \text{ mm}}$

- ✓ Largeur du champ = 86 divisions.

A objectif X10, 1 division = $10 \mu\text{m}$ \Rightarrow Largeur = $86 \times 10 = 860 \mu\text{m} = \mathbf{0,86 \text{ mm}}$

A objectif X40, 1 division = $2,5 \mu\text{m}$ \Rightarrow Largeur = $86 \times 2,5 = 215 \mu\text{m} = \mathbf{0,215 \text{ mm}}$

II. 2. 2. COMPTAGE DES CYANOBACTERIES SUR FLOC

➤ **Matériel :**

- Cellule de Thomas avec lame couvre-objet
- Tube falcon de 50 ml
- Pipette de 5 ml
- Embouts pipette 5 ml
- Eau du robinet
- Mixer ou sonicateur
- Pipette compte-gouttes en plastique à ouverture large
- Coupelle pour pesée
- Balance

- Pince
- gants

➤ **Protocole :**

Mettre les gants. A l'aide de la pince, prélever un peu de floc (maximum 200 mg) et le mettre dans coupelle. Peser la quantité prélevée et noter le poids sur la fiche comptage. A l'aide de la pince, mettre le morceau de floc pesé dans le tube falcon et rajouter 10 ml d'eau du robinet. Homogénéiser à l'aide du mixer ou du sonicateur. Il faut que le mixage soit suffisant pour homogénéiser la suspension sans broyer les cellules. En cas d'utilisation du sonicateur, faire une sonication courte et à puissance moyenne. Des essais sont à faire avec le matériel dont vous disposez. Après chaque essai de mélange, vérifier l'état des cellules au microscope. Les filaments d'*Oscillatoria* sont cassés par le mixage mais cela n'empêche pas le comptage. Après avoir obtenu une suspension homogène, poser une goutte d'échantillon au centre de la cellule de Thomas après avoir repéré au microscope la position de la grille de comptage. Mettre la lame-couvre objet sur l'échantillon en veillant à ce que le liquide déborde dans les deux gouttières. Compter à l'objectif 40 X jusqu'à 400 cellules de cyanobactéries. Noter sur la fiche le nombre de cyanobactéries comptées par grand carré (1 carré contient 16 petits carreaux).

➤ **Calcul :**

$$[\text{nb de cellules/ml}] = (n * 4.10^6) / (c * 16)$$

n : nombre de cellules comptées

c : nombre de grands carreaux comptés (contenant 16 petits carreaux)

Exprimer le résultat en nombre de cellules par g de matière humide.

II. 3. EXTRACTION ET DOSAGE DES TOXINES

II. 3. 1. EXTRACTION ET DOSAGE DES MICROCYSTINES-LR ET-RR

Ces analyses ont été réalisées par le CRITT Bio-Industries.

II. 3. 1. 1. Structures et propriétés physicochimiques des microcystines

Les microcystines sont des heptapeptides cycliques de poids moléculaire compris entre 800 et 1100. Une soixantaine de variants ont été identifiés. 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. 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.

II. 3. 1. 2. Extraction des microcystines

Méthodes

Comme les cellules sont riches en protéines, il est intéressant de minimiser leur coextraction, ce qui est réalisé en extrayant les cellules avec un milieu contenant de l'acide acétique à 5% qui précipite les protéines. Cependant, ce milieu n'extrait pas toutes les toxines et le choix du solvant d'extraction dépend en premier lieu de la polarité et de la solubilité des toxines. Il est cependant difficile de savoir si les conditions d'extraction sont quantitatives tant qu'il n'existera pas de matrice cellulaire certifiée de référence.

Des extractions de microcystines ont été réalisées avec des solutions d'acide acétique, divers mélanges hydro alcooliques dont le mélange n-butanol-méthanol-eau (5/20/75 ; v/v) largement utilisé, du méthanol pur ou acidifié par l'acide trifluoroacétique (TFA). Si la proportion d'eau est trop élevée, les microcystines les plus hydrophobes sont mal extraites en raison de leur solubilité trop faible dans ce mélange. Pour l'extraction des microcystines hydrophobes, le méthanol pur est le meilleur solvant. Depuis, il y a un consensus pour l'utilisation du méthanol, ce qui facilite grandement l'étape suivante d'évaporation. Si l'on suspecte la présence de microcystines polaires, il est toujours possible de faire une extraction complémentaire avec un mélange eau-méthanol. Les cellules sont généralement isolées du milieu aqueux par filtration et ensuite lyophilisées avant d'être extraites. Un protocole simple et robuste a été expérimenté : après filtration, le filtre est séché à 40°C pendant 12 h puis pesé et éventuellement conservé à -20°C jusqu'à l'étape d'extraction. Il est ensuite extrait dans du méthanol pur (25 mL) par simple trempage et agitation. L'opération est répétée deux fois, la dernière extraction étant réalisée sous ultra-sons. Le solvant est filtré et évaporé à 45°C à l'évaporateur rotatif.

Nous avons opté pour la méthode décrite dans le projet de norme ISO (ISO 2002) qui préconise comme solvant d'extraction le mélange méthanol / eau (75 : 25), en l'adaptant à nos échantillons.

Protocoles

Extraction des microcystines LR et RR de la biomasse algale (biofilm et floc)

- peser environ 40 mg de cellules lyophilisées dans un tube à hémolyse à bouchon à vis et noter la valeur précise de la pesée,
- ajouter 1,5 mL de mélange méthanol / eau (75 : 25),
- soniquer 5 minutes dans un bain à ultra-sons,
- vortexer 1 minute,
- centrifuger 10 minutes à 3000 rpm à 4°C,
- transférer le surnageant dans un nouveau tube à hémolyse,
- recommencer la phase d'extraction sur le culot comme décrit sur les cellules lyophilisées – 2 fois,
- rassembler les surnageants récupérés lors des 3 centrifugations (3 x 1,5 mL) dans le même tube,
- filtrer sur filtre seringue de 0,2 µm l'extrait ainsi obtenu,
- évaporer l'extrait ainsi obtenu sous flux d'azote,
- reprendre l'extrait sec par 500 µL de mélange méthanol / eau (20 : 80),
- centrifuger l'extrait 5 minutes à 3000 rpm à 4°C afin d'éliminer d'éventuels insolubles et récupérer le surnageant,
- conserver l'extrait à -20°C jusqu'à son analyse en HPLC-DAD.

Extraction et concentration des microcystines LR et RR des organes de chien (contenu stomacal et foie)

- peser environ 200-300 mg de contenu stomacal ou de foie broyé et noter la valeur précise de la pesée,
- ajouter 15 mL de mélange méthanol / eau (75 : 25),
- agiter,
- soniquer 5 minutes,
- centrifuger 10 minutes à 3000 rpm à 4°C,
- transférer le surnageant dans un tube,
- recommencer la phase d'extraction sur le culot comme décrit ci-dessus,
- rassembler les surnageants récupérés lors des 2 centrifugations (2 x 15 mL) dans le même tube,
- conserver l'extrait à -20°C jusqu'à son transfert en glacière au CRITT Bio-Industries,
- après décongélation, filtrer sur filtre seringue de 0,2 µ l'extrait décongelé,
- concentrer l'extrait à l'évaporateur rotatif,
- évaporer l'extrait ainsi obtenu sous flux d'azote,
- reprendre l'extrait sec dans 500 µL de mélange méthanol / eau (20 : 80),
- centrifuger l'extrait 5 minutes à 3000 rpm à 4°C afin d'éliminer d'éventuels insolubles et récupérer le surnageant,
- conserver le surnageant à -20°C jusqu'à son analyse en HPLC-DAD.

II. 3. 1. 3. Analyse par chromatographie en phase liquide des microcystines

Méthodes

Du fait de l'hydrophobicité de ces toxines, quel que soit leur état d'ionisation, la plupart des analyses sont réalisées par CPL à polarité de phases inversée et, le plus souvent, avec une silice greffée C18 comme phase stationnaire et un mélange eau-acétonitrile comme phase mobile. Il est recommandé d'ajuster la phase mobile à des pH acides (ajout de 0,05 % de TFA par exemple) pour éviter des traînées de pics, dues à l'ionisation des groupements silanols résiduels de la silice C18 qui interagissent à des pH supérieurs avec les groupements aminés des microcystines. Un gradient entre 30 % et 80 % d'acétonitrile permet d'éluer les microcystines dont les polarités sont très différentes.

Les séparations sont suivies le plus fréquemment d'une détection UV car la majeure partie des microcystines possède un spectre UV similaire avec un maximum à 238 nm. Seules les variants contenant les acides aminés tryptophanes et tyrosine présentent respectivement un maximum à 223 nm et 232 nm. Ainsi, l'emploi d'un détecteur UV à barrette de diodes permet d'enregistrer les spectres d'absorbance et, par comparaison avec ceux des standards, de déterminer la présence éventuelle d'autres variants. Cependant, l'identification n'est pas complète si l'on ne possède pas les variants individuellement. La limite de détection est de l'ordre de quelques nanogrammes.

Nous avons opté pour la méthode décrite dans le projet de norme ISO (ISO 2002) en raccourcissant le programme HPLC puisque nous ne disposons que des étalons de microcystines-LR et -RR. Les variants susceptibles de sortir après ces deux microcystines même s'ils sont présents ne pourraient pas être quantifiés ni identifiés de façon certaine du fait de l'absence de standards.

Protocoles

Dosage des microcystines LR et RR par HPLC – DAD

étalonnage externe : gammes étalons composées de quatre points de 5 à 250 µg/mL du produit « microcystin-LR » (ref. Alexis Biochemicals 350-012-C100) dans le méthanol et de quatre points à 219,74 – 101,81 – 47,01 et 8,43 µg/mL du produit « microcystin-RR » (ref. Alexis Biochemicals 350-043-C250) dans le méthanol, conservées à -20°C.

phase stationnaire : Symmetry C18 5 - 150 x 3,9 mm - 5 µm – Waters

phase mobile : éluant A = acétonitrile + TFA 0,05 %

éluant B = eau + TFA 0,05 %

gradient :

	A (%)	B (%)
0 min	30	70
10 min	35	65
20 min	70	30
22 min	100	0
23 min	100	0
25 min	30	70
35 min	30	70

débit : 1 mL/min

détection : barette de diode 200-300 nm avec chromatogramme standard établi à 238 nm

température : 30°C

matériel : injecteur modèle ASI-100 automated sample injector de Dionex
pompe modèle P680 HPLC pump de Dionex
détecteur modèle UVD 340U de Dionex
logiciel de pilotage et d'intégration Chromeleon de Dionex

Calcul de la concentration en microcystine-LR ou -RR dans les échantillons de biomasse algale

$$C \text{ échantillon} = C \text{ extrait} \times V \text{ extrait} / M \text{ échantillon}$$

avec C échantillon : concentration en microcystine dans l'échantillon (µg/g matière sèche),

C extrait : concentration en microcystine dans l'extrait (µg/mL),

V extrait : volume de l'extrait (mL),

M échantillon : masse de l'échantillon lyophilisé extrait (g).

et seuil de quantification : 5 µg/g de matière sèche

Calcul de la concentration en microcystine-LR ou -RR dans les échantillons d'organes de chien (contenu stomacal et foie)

$$C \text{ échantillon} = C \text{ extrait} \times V \text{ extrait} / M \text{ échantillon}$$

avec C échantillon : concentration en microcystine dans l'échantillon ($\mu\text{g/g}$ matière humide),
C extrait : concentration en microcystine dans l'extrait ($\mu\text{g/mL}$),
V extrait : volume de l'extrait (mL),
M échantillon : masse de l'échantillon humide extrait (g).

et seuil de quantification : $10 \mu\text{g/g}$ de matière humide

II. 3. 2. EXTRACTION ET DOSAGE DE L'ANATOXINE A

Ces analyses ont été réalisées par le CRITT Bio-Industries.

II. 3. 2. 1. Structures et propriétés physicochimiques de l'anatoxine-a

L'anatoxine-a comporte une fonction amine secondaire dont l'état d'ionisation varie avec le pH et qui présente une constante d'ionisation, pK_a , 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 est relativement stable dans le noir, mais en solution pure et en l'absence de pigments elle subit une rapide dégradation photochimique à la lumière du soleil. La dégradation est accélérée par des conditions alcalines. La demi-vie d'une dégradation photochimique est de 1-2 heures. Sous des conditions normales jour-nuit et à pH 8 ou 10, et à de faibles concentrations initiales ($10\mu\text{g/L}$) la $\frac{1}{2}$ vie est d'environ 14 jours.

II. 3. 2. 2. Extraction de l'anatoxine-a

Méthodes

Toxines d'origine intracellulaire

Comme les cellules sont riches en protéines, il est intéressant de minimiser leur coextraction, ce qui est réalisé en extrayant les cellules avec un milieu contenant de l'acide acétique à 5 % qui précipite les protéines. Cependant, ce milieu n'extrait pas toutes les toxines et le choix du solvant d'extraction dépend en premier lieu de la polarité et de la solubilité des toxines. Il est cependant difficile de savoir si les conditions d'extraction sont quantitatives tant qu'il n'existera pas de matrice cellulaire certifiée de référence. Une méthode consiste à comparer à partir du même extrait plusieurs conditions d'extraction.

L'extraction de l'anatoxine-a, en raison de sa forte polarité, nécessite des solutions plutôt aqueuses ; la plupart des extractions décrites ont été obtenues par des milieux aqueux acidifiés ou non, ou des mélanges eau-alcool. L'acidification permet de réduire la coextraction des protéines. Les extraits aqueux sont ensuite concentrés et purifiés par extraction liquide-solide. L'anatoxine-a étant un composé volatil, il faut absolument éviter les pertes lors des évaporations. Or, l'évaporation des solutions aqueuses ne peut se réaliser dans des conditions aussi douces que celles du méthanol pur et prend beaucoup de temps. Une solution consiste à minimiser le volume utilisé pour l'extraction. Lors de l'étude de laboratoire de la souche d'*Anabaena* sp. 86, l'extraction a été optimisée en mettant en contact le filtre avec 2 mL d'une solution 0,05 M d'acide acétique pendant 1 h avec agitation, suivi d'une centrifugation et d'une filtration des extraits. Etant donné les concentrations attendues dans les cellules productrices de toxines, une analyse directe des

solutions surnageantes peut être réalisée par CPL, ce qui supprime totalement l'étape d'évaporation. A titre de comparaison, la même procédure réalisée avec 10 mL de méthanol sur un même échantillon conduit à un rendement de moitié.

Toxines dissoutes dans des milieux aqueux

Les toxines dissoutes dans le milieu aqueux sont extraites par extraction liquide-liquide (ELL) ou par extraction liquide-solide (ELS). Il n'est pas utile d'insister sur l'ELL, non seulement en raison des recommandations pour diminuer l'emploi des solvants organiques dans les laboratoires analytiques mais également parce que cette méthode n'est pas adaptée pour l'extraction des toxines polaires et solubles dans l'eau. L'ELS est très utilisée mais les justifications du choix de l'adsorbant et des conditions opératoires sont souvent contestables. Le mécanisme de l'ELS est un processus apparenté à la chromatographie en phase liquide : les toxines doivent être retenues par l'adsorbant et non éluées par l'eau de l'échantillon. Les adsorbants d'extraction sont donc les mêmes que ceux de la CPL, pour les échantillons aqueux, on utilise ceux de la chromatographie à polarité de phases inversée (silice greffée n-alkyle, copolymères apolaires, carbone graphité) car l'eau est la phase mobile la moins éluante, ou, pour les solutés ionisés, des échangeurs d'ions. Les paramètres d'extraction (choix de l'adsorbant et volume percolable avec un rendement de 100 %) peuvent être calculés à partir de la connaissance de la rétention des solutés, facilement estimables ou mesurables en CPL avec l'eau comme phase mobile.

La silice greffée n-octadécyle (C18) est de loin l'adsorbant le plus utilisé pour l'extraction des composés organiques neutres moyennement polaires et hydrophobes et convient parfaitement à l'extraction des microcystines. Par contre, son emploi est impossible pour les toxines polaires, telles que l'anatoxine-a, vu les faibles temps de rétention obtenus en CPL avec des silices C18 éluées par phases mobiles presque totalement aqueuses.

L'extraction de l'anatoxine-a est plus difficile en raison de sa forte polarité et de sa protonation à des pH inférieurs à 9,4. On trouve peu de procédure de pré concentration à partir des échantillons d'eau et les premiers exemples ont surtout consisté en des concentrations d'extraits cellulaires obtenus en milieu acide acétique 0,05 M. La silice C18 peut être utilisée pour re-extraire et purifier les extraits cellulaires obtenus dans 10 mL de solution acide. Après lavage avec 10 mL d'une solution eau-méthanol (90/10 ; v/v), l'anatoxine-a est éluée de la cartouche par 20 mL de méthanol évaporé à sec dans une seconde étape. Le résidu est reconstitué dans 10 mL d'eau et est purifié par percolation sur un échangeur de cations. L'éluion est réalisée par 20 mL de méthanol acidifié avec 0,01 % de TFA. L'éluion n'a pas été optimisée car le mécanisme d'échange d'ions demanderait plutôt une éluion sous forme moléculaire et donc à pH basique. On peut augmenter le volume percolable sur silice greffée et autre adsorbant apolaire en rendant la molécule neutre.

Il faut noter la commercialisation récente de cartouches d'extraction remplies de nouveaux copolymères de styrène divinylbenzène (SDB) apolaires de grande surface spécifique (900 à 1200 m^2g^{-1}). Par rapport aux silices greffées C18, la rétention des composés est au moins 100 fois plus élevée. Il a été montré que de nombreux pesticides polaires, non extractibles sur silice greffée C18, l'étaient sur ces supports, même sous leur forme ionisée. Un bon rendement a été obtenu en préconcentrant des échantillons de volume égal à 100 mL d'eau dopée. Un cartouche remplie de 200 mg de copolymère SDB (surface spécifique 900 m^2g^{-1}) permet de percoler jusqu'au moins 500 mL d'eau dopée par l'anatoxine-a sans ajustement de pH (ce qui supprime les interférences des acides humiques) et sans aucune perte en rendement. L'éluion est réalisée avec 5 mL de méthanol acidifié par 0,01 % d'HCl qui sont ensuite évaporés sous des conditions de température les plus douces possibles sous flux d'azote, non pas jusqu'à sec, en raison de la volatilité de l'anatoxine-a,

mais jusqu'à un volume de 100 µL environ. Pour des analyses quantitatives, ce volume est ensuite ajusté à 500 µL avec de l'eau ultra-pure pour une analyse par CPL avec détection UV.

Nous avons choisi cette dernière méthode pour concentrer les extraits de foie et d'estomac qui avaient été réalisés avec des volumes importants afin d'abaisser le seuil de quantification de l'anatoxine-a dans ces échantillons.

Protocoles

Extraction de l'anatoxine a de la biomasse algale (biofilm et floc)

- peser environ 40 mg de cellules lyophilisées dans un tube à hémolyse à bouchon à vis et noter la valeur précise de la pesée,
- ajouter 1,5 mL d'eau acide (acide acétique 0,05 M) + 0,75 g de billes (diamètre 0,25-0,5 mm),
- vortexer 5 fois 1 minute avec une phase de repos de 10 minutes entre chaque vortexage,
- centrifuger 10 minutes à 3000 rpm à 4°C,
- transférer le surnageant dans un nouveau tube à hémolyse,
- recommencer la phase d'extraction sur le culot comme décrit sur les cellules lyophilisées – 2 fois,
- rassembler les surnageants récupérés lors des 3 centrifugations (3 x 1,5 mL) dans le même tube,
- filtrer sur filtre seringue de 0,2 µm l'extrait ainsi obtenu,
- conserver l'extrait à -20°C jusqu'à son analyse en HPLC-DAD.

Extraction et concentration de l'anatoxine a des organes de chien (contenu stomacal et foie)

- peser environ 200-300 mg de contenu stomacal ou de foie broyé et noter la valeur précise de la pesée,
- ajouter 15 mL d'eau acide (acide acétique 0,05 M),
- agiter pendant 1 heure,
- centrifuger 10 minutes à 3000 rpm à 4°C,
- transférer le surnageant dans un tube,
- recommencer la phase d'extraction sur le culot comme décrit ci-dessus,
- rassembler les surnageants récupérés lors des 2 centrifugations (2 x 15 mL) dans le même tube,
- conserver l'extrait à -20°C jusqu'à son transfert en glacière au CRITT Bio-Industries,
- après décongélation, filtrer sur filtre seringue de 0,2 µm l'extrait décongelé,
- dépôt de l'extrait par percolation sur une cartouche SPE (Bakerbond SPE SDB 200 mg – 3 mL) préalablement conditionnée (5 mL d'acétonitrile, puis 5 mL de méthanol suivi de 5 mL d'eau ultra-pure),
- éluer par 5 mL de méthanol acidifié (HCl 0,01 %),
- évaporer l'extrait ainsi obtenu sous flux d'azote,
- reprendre l'extrait sec dans 500 µL d'eau ultrapure,
- centrifuger l'extrait 5 minutes à 3000 rpm à 4°C afin d'éliminer d'éventuels insolubles et récupérer le surnageant,
- conserver le surnageant à -20°C jusqu'à son analyse en HPLC-DAD.

II. 3. 2. 3. Analyse par chromatographie en phase liquide de l'anatoxine-a

Méthodes

L'analyse de l'anatoxine-a est réalisée par CPL à polarité de phases inversée en utilisant une colonne remplie de silice greffée C18 et une phase mobile à gradient de tampon phosphate et d'acétonitrile contenant une faible proportion d'acétonitrile ou de méthanol. La détection est généralement réalisée à 227 nm. Si la colonne est correctement sélectionnée, l'anatoxine-a est suffisamment retenue pour ne pas être éluée au temps de rétention nul dans le volume mort, si bien que le couplage CPL-détecteur UV à barrette de diodes permet une identification par le temps de rétention et le spectre UV caractéristique de l'anatoxine-a.

Protocoles

Dosage de l'anatoxine a par HPLC – DAD

étalonnage externe : gamme étalon composée de quatre points 1 à 100 µg/mL du produit « anatoxin a fumarate » (ref. A.G. Scientific A-1065) dans l'eau soit 0,6 à 65 µg/mL d'anatoxine a , conservée à -20°C

phase stationnaire : Symmetry C18 5 - 150 x 3,9 mm - 5 µm – Waters

phase mobile : éluant A = NaH₂PO₄ 4,5 mM et H₃PO₄ 0,5 mM, pH 3,5

éluant B = acétonitrile

gradient :

	A (%)	B (%)
0 min	97,5	2,5
10 min	97,5	2,5
15 min	0,0	100,0
17 min	0,0	100,0
20 min	97,5	2,5
25 min	9,75	2,5

débit : 0,8 mL/min

détection : barette de diode 200-300 nm avec chromatogramme standard établi à 227 nm

température : 30°C

matériel : injecteur modèle ASI-100 automated sample injector de Dionex

pompe modèle P680 HPLC pump de Dionex

détecteur modèle UVD 340U de Dionex

logiciel de pilotage et d'intégration Chromeleon de Dionex

Calcul de la concentration en anatoxine a dans les échantillons de biomasse algale

$$C \text{ échantillon} = C \text{ extrait} \times V \text{ extrait} / M \text{ échantillon}$$

avec C échantillon : concentration en anatoxine dans l'échantillon (µg/g matière sèche),

C extrait : concentration en anatoxine dans l'extrait (µg/mL),

V extrait : volume de l'extrait (mL),

M échantillon : masse de l'échantillon lyophilisé extrait (g),

et seuil de quantification : 50 µg/g de matière sèche.

Calcul de la concentration en anatoxine a dans les échantillons d'organes de chien (contenu stomacal et foie)

Le rendement d'extraction (en %) sur cartouche que nous avons obtenu en dopant un échantillon d'eau acide est de 33,5 %. Ce rendement un peu faible est probablement du au fait que l'évaporation de l'extrait après passage sur cartouche a été conduit pratiquement à sec. Du fait de la volatilité de l'anatoxine-a cela a du conduire à la perte d'une partie de la quantité d'anatoxine-a qui avait été ajoutée dans le témoin. Les échantillons ayant été traités en même temps et donc exactement dans les mêmes conditions que le témoin, ce rendement est applicable à tous.

$$C \text{ échantillon} = C \text{ extrait} \times 1/F \times V \text{ extrait} / M \text{ échantillon}$$

avec C échantillon : concentration en anatoxine dans l'échantillon (µg/g matière humide),

C extrait : concentration en anatoxine dans l'extrait (µg/mL),

V extrait : volume de l'extrait (mL),

F : taux de récupération de l'anatoxine après passage sur cartouche (rendement d'extraction 33,5 % soit F = 0,335),

M échantillon : masse de l'échantillon lyophilisé extrait (g),

et seuil de quantification : 4 µg/g de matière humide.

II. 3. 3. DOSAGE DE L'ANATOXINE A(S)

Ces analyses ont été réalisées par la société Protein BioSensor. Le présent paragraphe a été rédigé par leurs soins.

II. 3. 3. 1. Méthode

Ce protocole est extrait des travaux publiés : Detection of Anatoxin-a(s) in Environmental Samples of Cyanobacteria by Using a Biosensor with Engineered Acetylcholinesterases. Eric Devic, Dunhai Li, Alain Dauta, Peter Henriksen, Geoffrey A. Codd, Jean-Louis Marty, and Didier Fournier. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Aug. 2002, p. 4102–4106.

L'anatoxine-a(S) est un organophosphate naturel produit par des algues de la famille des anabaena. Les organophosphates sont des molécules neurotoxiques qui inhibent l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) présente dans le système nerveux. Ces molécules sont également employées dans des insecticides. Afin de doser la présence de cette neurotoxine à des seuils de détection faible (inférieure au nanomolaire) et de pouvoir la distinguer parmi la présence éventuelle de produits phytosanitaires, plusieurs mutants de cette enzyme ont été conçus. Deux mutants hypersensibles à cette neurotoxine d'algues ont été produits ainsi que deux résistants. Par comparaison des cinétiques enzymatiques d'inhibition de ces quatre mutants par l'échantillon fournis, il est possible de distinguer la présence de cette toxine même en présence d'autres molécules anticholinestérasiques.

II. 3. 3. 2. Définitions

ATCh = Acétylthiocholine

DTNB = Acide dithionitro-2,2'-dithio-5,5'-dibenzoïque = réactif d'Ellman

BSA= Bovine Serum Albumin

II. 3. 3. 3. Protocoles

- **Préparation de l'échantillon à tester**

Lyophiliser l'échantillon à tester.

Sur une balance poser un tube eppendorf et faire la tare.

A l'aide d'une spatule, prélever 10 mg d'échantillon lyophilisé et les déposer dans le tube eppendorf.

Prélever avec une P1000 1 ml d'eau distillée et verser dans le tube eppendorf contenant les 10 mg d'échantillon.

Déposer le tube dans de la glace et soniquer son contenu. Veiller à bien garder le tube dans la glace pour éviter un échauffement de l'échantillon. On doit obtenir une solution homogène sans agrégats. Une fois l'échantillon broyé, rincer la sonde du sonicateur avec de l'H₂O.

Prendre le tube eppendorf contenant l'échantillon soniqué et le centrifuger 5 min à 13000 rpm.

Prélever à l'aide d'une P1000, tout le surnageant et le mettre dans un autre tube eppendorf.

- **Mesure de l'activité enzymatique**

Calculer la concentration de chaque mutant et le volume nécessaire pour obtenir 1 unité de DO soit 0,1 UIE.

- **Dosage**

Echantillon :

A l'aide d'une P200 prélever 100 µl de tampon phosphate à 250 mM, pH 7 et mettre ce volume dans un tube eppendorf vide.

De la même manière rajouter 100 µl de BSA 10 mg/ml.

A l'aide d'une P1000, prélever 500 µl de surnageant préparé précédemment et les rajouter dans le tube eppendorf contenant la BSA et le tampon phosphate 250 mM.

Prélever, avec la pipette adaptée, le volume X de solution d'enzyme nécessaire pour avoir une activité de 1 DO.ml⁻¹ et verser ce prélèvement dans le tube eppendorf.

Enfin compléter avec de l'eau distillée pour atteindre 1 ml de volume total.

Vortexer 5 secondes.

Prélever, à l'aide d'une P1000, 500 µl de réactif d'Ellman à 1 mM d'ATCh et mettre ce prélèvement dans une cuve de spectroscopie. Rajouter avec une P1000 500 µl du mélange enzyme échantillon préparé précédemment et vortexer.

Lire l'absorbance avec le spectrophotomètre.

Témoin :

Dans un tube eppendorf, verser 100 µl de tampon phosphate puis 100 µl de BSA 10 mg/ml, à l'aide d'une P200.

Rajouter de la même manière la quantité X d'enzyme nécessaire puis compléter qsp 1 ml d'eau.

Vortexer 5 secondes puis prélever, à l'aide d'une P1000, 500 µl de cette solution témoin et les mettre dans une cuve de spectroscopie. Rajouter 500 µl de réactif d'Ellman puis vortexer 5 secondes.

Lire l'absorbance avec le spectrophotomètre.

II. 3. 3. 4. Résultats

Pour chaque échantillon, réaliser une courbe d'inhibition avec les quatre mutants pendant 40 minutes : $DO = f(t)$.

Tracer le graphe $DO=f(\text{temps})$ pour suivre la décroissance de l'activité enzymatique si inhibition il y a.

Les valeurs de k_i sont calculées grâce au logiciel GOSA développé par Biolog. Par comparaison des k_i il est possible de distinguer la nature de la molécule inhibitrice si inhibition il y a. (cf. Publication).

En cas d'absence d'inhibition dans ces conditions, cela indique qu'il n'y a pas d'anatoxine-a(s) à des concentrations supérieures à 0,2 nanomoles (0,05 µg) par gramme de matière sèche. La concentration initiale d'anatoxine est à rapporter au volume d'échantillon avant l'étape de déshydratation.

III. RESULTATS

III. 1. OBSERVATIONS PRELIMINAIRES

Lors du déplacement du CRITT Bio-Industries pour la réunion du 23 juin 2005 à Sainte Enemie, une visite des sites P1 (Castelbouc) et P2 (Prades) a été réalisée. A cette date des floccs clairement identifiables se trouvaient sur la rive en aval du pertuis, au niveau du point de prélèvement P2. Un prélèvement a été réalisé pour un dénombrement et une identification des genres de cyanobactéries présentes et une recherche de toxines.

Le dénombrement et l'identification des cyanobactéries a mis en évidence la présence de cyanobactéries du genre *Oscillatoria* à une concentration de 80 000 000 cellules / g de matière humide. Les dosages de toxines n'ont pas mises en évidence l'une ou l'autre des molécules recherchées (microcystine-LR et -RR, anatoxine-a et -a(s)).

Les photographies qui suivent montrent la formation des floccs à partir des biofilms de galets. Tout d'abord la biomasse se développe sur les galets (**Photographie 1**) pour ensuite se détacher (**Photographie 2**), flotter à la surface et s'accumuler là où se présente un obstacle (**Photographie 3**).



Photographie 1 : Développement de biofilm à la surface de galets



Photographie 2 : Détachement de biofilm de la surface de galets



Photographie 3 : Détachement de biofilm de la surface de galets

Suite à cette observation il a été décidé de réaliser des prélèvements sur trois compartiments ; eau, biofilms de galets et flocs quand ceux-ci seraient présents.

III. 2. CAMPAGNES DE ROUTINE

Cette partie regroupe les données recueillies lors des 8 campagnes de prélèvements contractuelles réalisées dans la rivière Tarn au cours de l'été 2005 ainsi que les résultats d'analyse des échantillons prélevés.

Les prélèvements ont été réalisés sur les 5 stations suivantes :

- Castelbouc (P1),
- Prades (P2),
- Sainte Enimie (P3),
- Pugnadoires (P4),
- La Malène (P5).

La localisation de ces sites est reportée sur la carte représentée **Figure 8**.

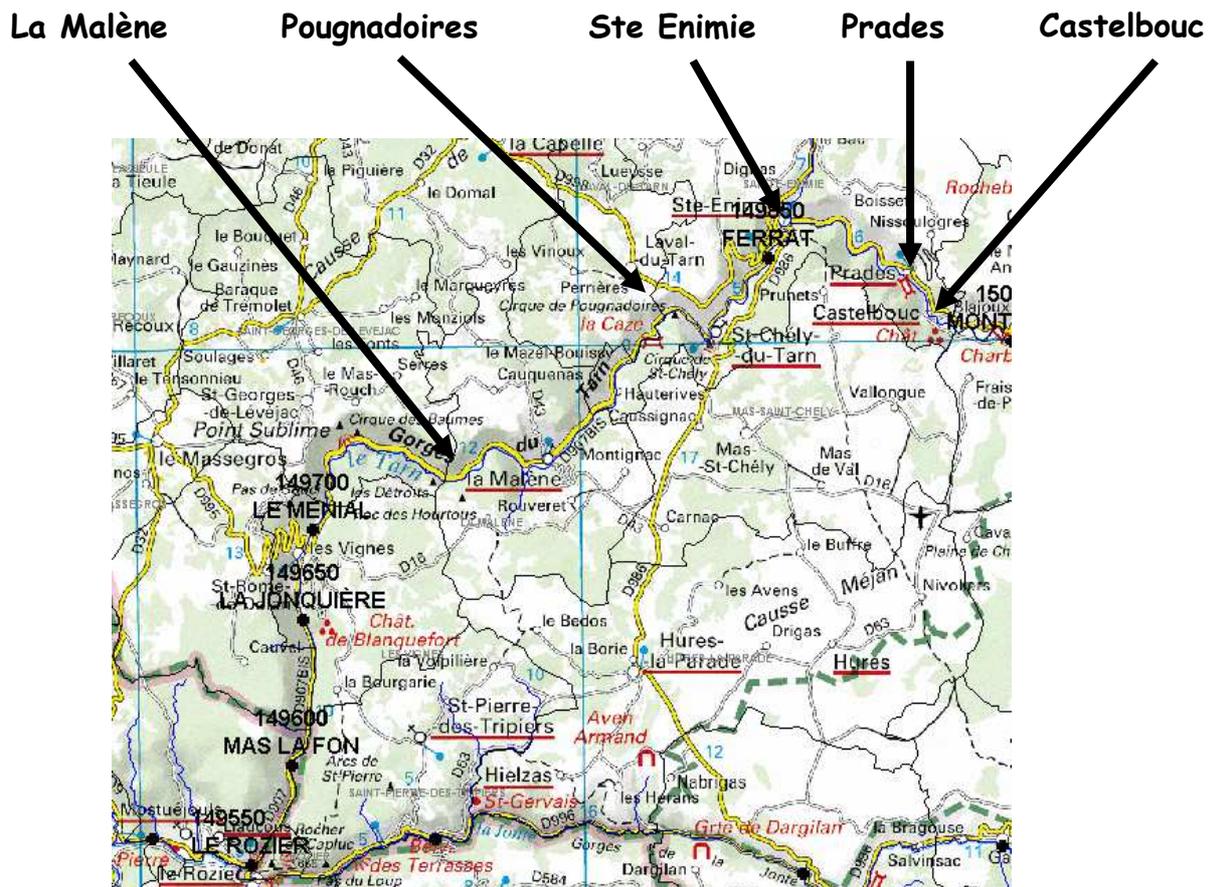


Figure 8 : Localisation des 5 sites de prélèvements des campagnes de « routine »

Les prélèvements d'eau, de biofilms et de floccs, les mesures des paramètres physico-chimiques ainsi que les identifications et comptages des cyanobactéries ont été effectués par le LDA 48.

L'acheminement des échantillons du LDA 48 au CRITT Bio-Industries a été effectué par un chauffeur du Conseil Général de la Lozère.

Les analyses d'anatoxine a(s) ont été réalisées par la société Protein BioSensor. Elle est dosée par inhibition enzymatique d'acétylcholinestérase, suivant une méthode qui permet de distinguer l'origine de l'inhibition (anatoxine a(s) ou pesticides).

Les déterminations de matières sèches et matières sèches sans cendre ainsi que les analyses d'anatoxine a, de microcystines RR et LR par HPLC – barette de diode, ont été faites au CRT/CRITT Bio-Industries.

III. 2. 1. PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES

III. 2. 1. 1. Température

La température de l'eau joue un rôle dans la solubilité des gaz, dans la dissociation des sels dissous donc sur la conductivité électrique ainsi que dans la détermination du pH. D'une façon générale, la température des eaux superficielles est influencée par la température de l'air et ceci d'autant plus

que leur origine est moins profonde. La température d'effluents urbains rejetés dans la rivière peut également avoir un effet.

Le **Tableau 1** synthétise l'ensemble des mesures de température de l'eau du Tarn relevées sur les 5 sites retenus au cours des étés 2004 et 2005.

	P1 Castelbouc	P2 Prades	P3 Sainte Enimie	P4 Pougnadoires	P5 La Malène
14 / 06 / 2005	19,8	19,8	17,5	18,5	18,4
28 / 06 / 2004	22,0	21,5	18,4	19,3	19,5
27 / 06 / 2005	25,5	25,5	23,0	22,1	22,9
12 / 07 / 2004	18,8	18,2	17,3	17,0	16,2
11 / 07 / 2005	16,2	23,0	18,0	21,6	17,1
21 / 07 / 2004	21,4	23,0	20,4	20,1	19,4
26 / 07 / 2005	20,3	23,1	20,5	21,8	19,8
02 / 08 / 2004	23,0	23,0	22,5	22,0	20,4
09 / 08 / 2005	18,0	20,6	18,4	19,3	17,5
16 / 08 / 2004	21,4	21,5	19,9	19,0	19,1
23 / 08 / 2005	17,9	20,6	17,8	19,8	16,9
30 / 08 / 2004	18,8	20,0	15,2	15,7	18,0
05 / 09 / 2005	20,4	19,4	19,6	18,8	19,4
16 / 09 / 2004	16,9	20,3	ND	14,0	14,0
20 / 09 / 2005	13,3	14,3	14,2	14,9	13,2

ND : Non Déterminé

Tableau 1 : Mesures des températures en °C de l'eau du Tarn relevées au cours des étés 2004 et 2005

La **Figure 9** retrace l'évolution de la température de l'eau du Tarn aux différents sites retenus au cours des étés 2004 et 2005.

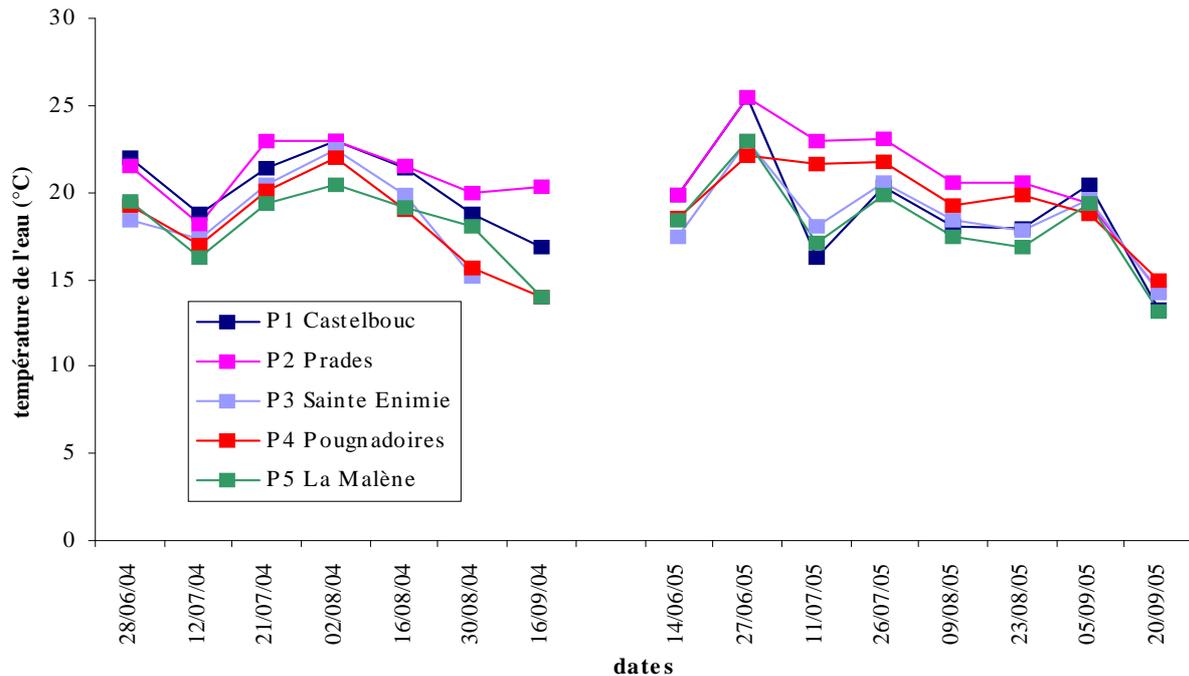


Figure 9 : Evolution de la température en °C de l'eau du Tarn au cours des étés 2004 et 2005

La température moyenne de l'eau aux différents points de mesure au cours de l'été 2005 est sensiblement la même 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-Pognadoires se distinguent des 3 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.

III. 2. 1. 2. pH

Le pH d'une eau représente son acidité ou son alcalinité. Dans un cours d'eau le pH est notamment lié à la nature des terrains traversés et peut être influencé par les rejets des effluents urbains ou industriels. Un pH élevé pendant la journée peut aussi attester d'une activité photosynthétique élevée.

Le **Tableau 2** synthétise l'ensemble des mesures de pH de l'eau du Tarn relevées sur les 5 sites retenus au cours des étés 2004 et 2005.

	P1 Castelbouc	P2 Prades	P3 Sainte Enimie	P4 Pougnadoires	P5 La Malène
14 / 06 / 2005	8,2	8,5	8,1	8,2	7,9
28 / 06 / 2004	8,1	8,2	7,85	7,8	7,8
27 / 06 / 2005	8,5	8,6	8,3	7,7	8,1
12 / 07 / 2004	8,2	8,0	8,0	7,9	8,0
11 / 07 / 2005	7,8	8,5	8,1	7,8	7,9
21 / 07 / 2004	7,5	8,2	7,7	7,7	7,2
26 / 07 / 2005	7,8	8,3	7,9	7,6	7,8
02 / 08 / 2004	8,1	8,8	7,9	8,0	7,8
09 / 08 / 2005	7,7	8,1	8,0	7,5	7,8
16 / 08 / 2004	8,4	8,6	7,8	7,7	7,9
23 / 08 / 2005	8,1	8,8	8,3	8,2	ND
30 / 08 / 2004	8,2	7,9	7,6	7,6	8,1
05 / 09 / 2005	8,0	8,0	8,1	7,8	8,0
16 / 09 / 2004	8,05	8,0	ND	7,8	7,9
20 / 09 / 2005	8,1	8,2	8,1	7,9	8,0

ND : Non Déterminé

Tableau 2 : Mesures du pH de l'eau du Tarn relevées au cours des étés 2004 et 2005

La **Figure 10** retrace l'évolution du pH de l'eau du Tarn aux différents sites retenus au cours des étés 2004 et 2005.

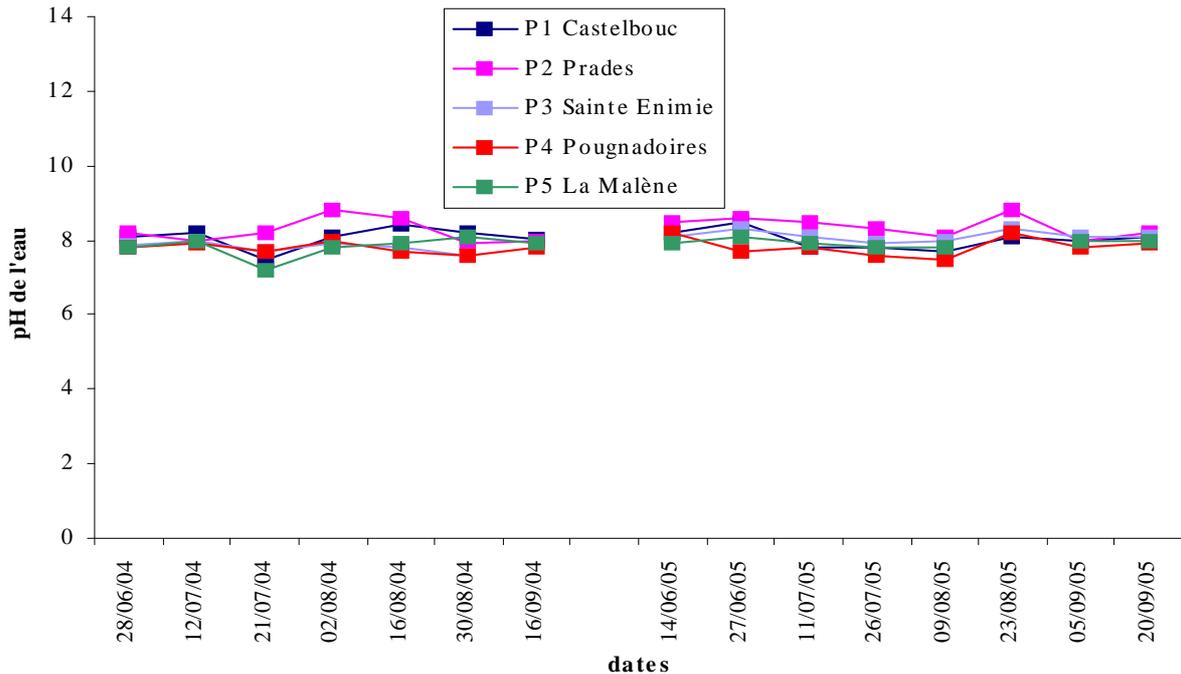


Figure 10 : Evolution du pH de l'eau du Tarn au cours des étés 2004 et 2005

Le pH de l'eau aux différents points de mesure représentés est globalement basique et n'a pas varié significativement entre 2004 et 2005.

III. 2. 1. 3. Conductivité

La conductivité, qui varie en fonction de la température, est étroitement liée à la concentration des substances dissoutes et à leur nature. Or, si les sels minéraux sont, dans l'ensemble, de bons conducteurs, les matières organiques et colloïdales n'ont que peu de conductivité.

La mesure de la conductivité permet d'évaluer rapidement mais très approximativement la minéralisation globale de l'eau et d'en suivre l'évolution. D'une façon générale, la conductivité s'élève progressivement de l'amont vers l'aval des cours d'eau, les écarts sont d'autant plus importants que la minéralisation initiale est faible. Dans les eaux de surface et les rejets d'eaux usées, des modifications importantes de la conductivité peuvent intervenir rapidement au cours de la journée.

On peut admettre que la situation est particulière ou anormale au-delà de 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Le **Tableau 3** synthétise l'ensemble des mesures de conductivité de l'eau du Tarn relevées sur les 5 sites retenus au cours des étés 2004 et 2005.

	P1 Castelbouc	P2 Prades	P3 Sainte Enimie	P4 Pougnadoires	P5 La Malène
14 / 06 / 2005	185	224	227	242	254
28 / 06 / 2004	225	220	279	292	303
27 / 06 / 2005	185	196	216	233	229
12 / 07 / 2004	199	214	229	236	246
11 / 07 / 2005	233	223	254	274	278
21 / 07 / 2004	222	228	254	258	266
26 / 07 / 2005	ND	ND	ND	ND	ND
02 / 08 / 2004	271	232	297	305	310
09 / 08 / 2005	286	282	292	307	312
16 / 08 / 2004	273	283	294	300	312
23 / 08 / 2005	288	208	297	313	309
30 / 08 / 2004	251	261	288	303	301
05 / 09 / 2005	280	340	301	320	315
16 / 09 / 2004	214	239	ND	269	285
20 / 09 / 2005	163	192	202	233	221

ND : Non Déterminé

Tableau 3 : Mesures de conductivité en $\mu\text{S}/\text{cm}$ de l'eau du Tarn relevées au cours des étés 2004 et 2005

La **Figure 11** retrace l'évolution de la conductivité de l'eau du Tarn aux différents sites retenus au cours des étés 2004 et 2005.

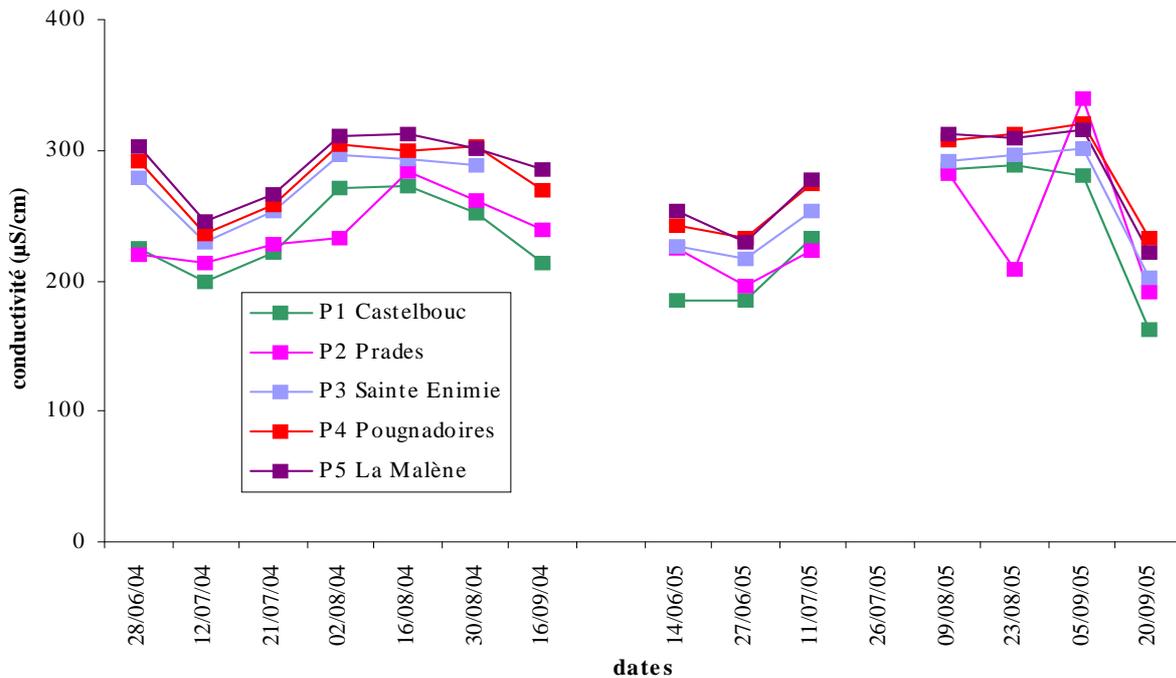


Figure 11 : Evolution de la conductivité en $\mu\text{S}/\text{cm}$ de l'eau du Tarn au cours des étés 2004 et 2005

Au cours des étés 2004 et 2005, quelle que soit la station considérée, la conductivité mesurée a toujours été inférieure à $400 \mu\text{S}/\text{cm}$. Ce paramètre n'apporte donc pas d'information pertinente.

III. 2. 1. 4. O_2 dissous

L'oxygène, toujours présent dans l'eau, n'est pas un élément constitutif. Sa solubilité est fonction de la température, de la pression partielle dans l'atmosphère et de la salinité. Des variations importantes peuvent être notées au cours de la journée entre la période diurne et la période nocturne. La teneur en oxygène de l'eau est également fonction de l'origine de l'eau : les eaux superficielles peuvent en contenir des quantités relativement importantes proches de la saturation. Des taux de saturation supérieurs à 100 % peuvent traduire une prolifération algale.

Le **Tableau 4** synthétise l'ensemble des mesures d'oxygène dissous dans l'eau du Tarn relevées sur les 5 sites retenus au cours des étés 2004 et 2005.

	P1 Castelbouc	P2 Prades	P3 Sainte Enimie	P4 Pougnadoires	P5 La Malène
14 / 06 / 2005	ND	ND	ND	ND	ND
28 / 06 / 2004	ND	10,5	9,0	7,3	9,2
27 / 06 / 2005	ND	ND	ND	ND	ND
12 / 07 / 2004	7,9	12,1	10,7	9,3	10,8
11 / 07 / 2005	8,2	14,4	10,4	7,0	9,8
21 / 07 / 2004	9,3	12,6	9,3	6,1	7,9
26 / 07 / 2005	8,7	11,4	9,2	7,6	8,5
02 / 08 / 2004	9,5	12,5	9,0	7,7	8,1
09 / 08 / 2005	8,8	11,9	10,8	3,2	7,9
16 / 08 / 2004	11,4	12,3	8,7	7,1	7,4
23 / 08 / 2005	9,3	21,5	10,8	6,2	10,3
30 / 08 / 2004	10,2	8,45	6,9	6,0	10,9
05 / 09 / 2005	9,1	9,2	9,5	2,5	7,9
16 / 09 / 2004	14,1	14,6	ND	11,3	11,6
20 / 09 / 2005	10,4	9,8	10,8	7,1	9,1

ND : Non Déterminé

Tableau 4 : Mesures de l'oxygène dissous en mg/L dans l'eau du Tarn relevées au cours des étés 2004 et 2005

La **Figure 12** retrace l'évolution de l'oxygène dissous dans l'eau du Tarn aux différents sites retenus au cours des étés 2004 et 2005.

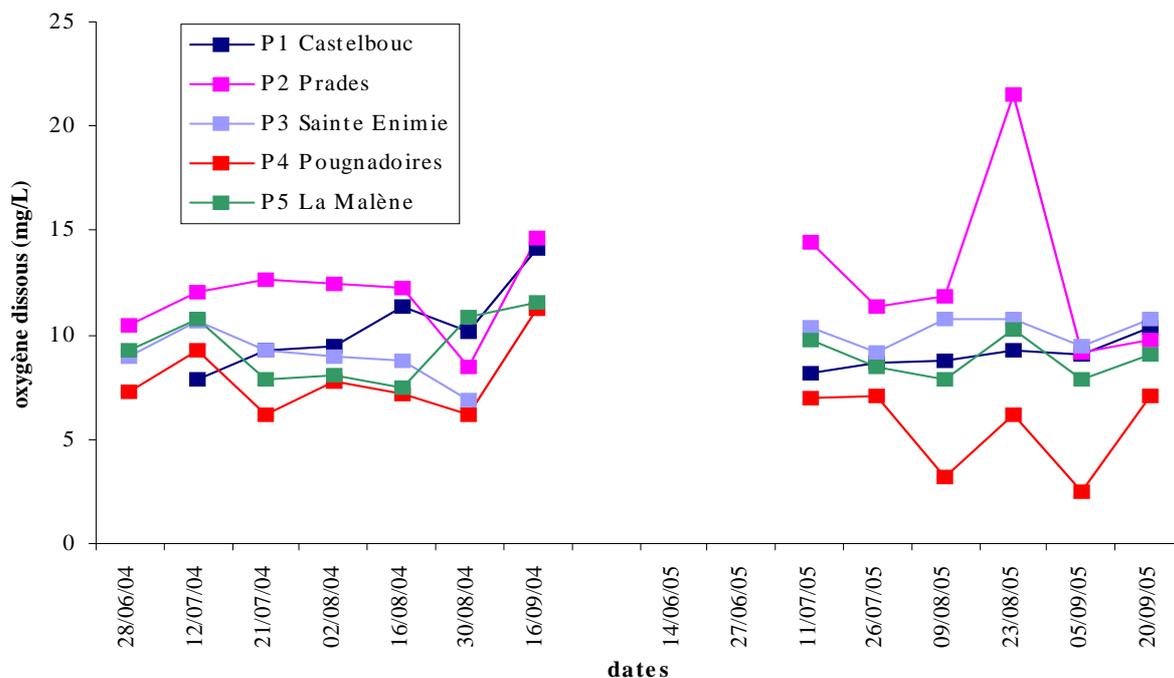


Figure 12 : Evolution de l'oxygène dissous en mg/L de l'eau du Tarn au cours des étés 2004 et 2005

En 2004 les fluctuations de l'oxygène dissous dans l'eau du Tarn aux points de mesure étaient mineures. Des fluctuations plus importantes ont pu être notées en 2005 sur les sites de P2-Prades et P4-Pognadoires.

III. 2. 2. ANALYSE DE L'EAU

III. 2. 2. 1. Dénombrement des cyanobactéries présentes dans l'eau

Le **Tableau 5** synthétise l'ensemble des résultats de dénombrement de cyanobactéries dans l'eau du Tarn prélevée sur les 5 sites retenus au cours de l'été 2005.

	P1 Castelbouc	P2 Prades	P3 Sainte Enimie	P4 Pougnadoires	P5 La Malène
14 / 06 / 2005	0	0	0	0	0
27 / 06 / 2005	15	183	6	6	6
11 / 07 / 2005	6	85	16	126	8
26 / 07 / 2005	12	693	112	1 111	46
09 / 08 / 2005	181	144	25	33	36
23 / 08 / 2005	25	67	24	5	7 139
05 / 09 / 2005	8	11	4	6	7
20 / 09 / 2005	1	1	1	2	2

Tableau 5 : Dénombrement des cyanobactéries en nombre de cellules / mL dans l'eau du Tarn au cours de l'été 2005

La **Figure 13** retrace l'évolution de la concentration en cyanobactéries dans l'eau du Tarn aux différents sites retenus au cours de l'été 2005.

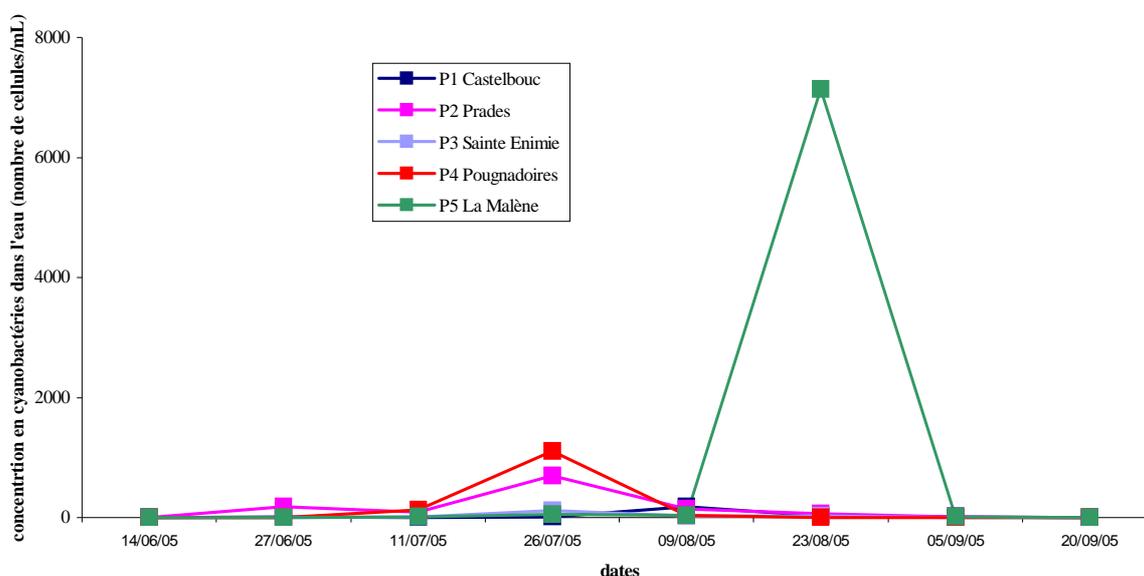


Figure 13 : Evolution de la concentration en cyanobactéries en nombre de cellules / mL dans l'eau du Tarn au cours de l'été 2005

Mis à part le site P5-La Malène pour lequel une concentration en cyanobactéries supérieure au seuil d'alerte 1 a été détectée le 23/08/05, les deux sites pour lesquels les plus fortes teneurs, en moyenne, en cyanobactéries dans l'eau ont été reportées sont les points P2-Prades et P4-Pougnadoires. Compte-tenu du caractère exceptionnel d'une telle concentration par rapport aux autres valeurs, nous pouvons supposer qu'il a eu avant le prélèvement une remise en suspension accidentelle de cellules de biofilm.

Du fait de ces faibles concentrations, les analyses de toxines n'ont pas été réalisées sur ce compartiment.

III. 2. 2. 2. Identification des cyanobactéries présentes dans l'eau

Le **Tableau 6** récapitule les différents genres de cyanobactéries qui ont été identifiées dans l'eau du Tarn au cours de l'été 2005 pour les 5 sites de prélèvements.

La présence de genres de cyanobactéries potentiellement productrices de toxines (hépatotoxines et neurotoxines) est signalée par un fond rouge, celle de genres a priori non producteurs en vert.

	<i>Anabaena</i>	<i>Limnothrix</i>	<i>Lyngbya</i>	<i>Merismopedia</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Phormidium</i>	<i>Planktolyngbia</i>	<i>Planktothrix</i>	<i>Pseudanabaena</i>	<i>Synechococcus</i>	<i>Tychonema</i>
P1											
14/06/05											
27/06/05											
11/07/05											
26/07/05											
09/08/05											
23/08/05											
05/09/05											
20/09/05											
P2											
14/06/05											
27/06/05											
11/07/05											
26/07/05											
09/08/05											
23/08/05											
05/09/05											
20/09/05											
P3											
14/06/05											
27/06/05											
11/07/05											
26/07/05											
09/08/05											
23/08/05											
05/09/05											
20/09/05											

Tableau 6 : Genres de cyanobactéries présents dans l'eau du Tarn au cours de l'été 2005

	<i>Anabaena</i>	<i>Limnothrix</i>	<i>Lyngbya</i>	<i>Merismopedia</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Phormidium</i>	<i>Planktolyngbia</i>	<i>Planktothrix</i>	<i>Pseudanabaena</i>	<i>Synechococcus</i>	<i>Tychonema</i>
P4											
14/06/05											
27/06/05											
11/07/05											
26/07/05											
09/08/05											
23/08/05											
05/09/05											
20/09/05											
P5											
14/06/05											
27/06/05											
11/07/05											
26/07/05											
09/08/05											
23/08/05											
05/09/05											
20/09/05											

Tableau 6 (suite) : Genres de cyanobactéries présents dans l'eau du Tarn au cours de l'été 2005

Il s'avère que 3 genres de cyanobactéries présentes dans l'eau sont potentiellement producteurs d'hépatotoxines ou de neurotoxines :

- *Lyngbya* susceptible de produire des saxitoxines et gonyautoxines,
- *Oscillatoria* susceptible de produire de l'anatoxine a et des microcystines,
- *Pseudanabaena* susceptible de produire de l'anatoxine ainsi que des saxitoxines et gonyautoxines.

Cependant il faut rappeler que les concentrations dans ce compartiment qu'est l'eau étaient très faibles.

III. 2. 2. 3. Toxines dans l'eau

Compte-tenu des faibles concentrations cellulaires de cyanobactéries dans l'eau, concentrations en cyanobactéries inférieures au seuil d'alerte 1 sauf dans un cas isolé, et 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. Des prélèvements ont néanmoins été réalisés et conservés dans l'objectif éventuel de ces analyses.

III. 2. 3. ANALYSE DES BIOFILMS DES GALETS

III. 2. 3. 1. Dénombrement des cyanobactéries dans les biofilms des galets

Le **Tableau 7** synthétise l'ensemble des résultats de dénombrement de cyanobactéries dans les biofilms de galets du Tarn prélevés sur les 5 sites retenus au cours de l'été 2005.

Bien que ce type de mesure ne soit pas utilisé habituellement, il nous permet de voir l'évolution de la population sur une surface donnée.