

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2005 - Thèse n° 034

**TOXICITE DES CYANOBACTERIES
D'EAU DOUCE
VIS-A-VIS DES ANIMAUX
DOMESTIQUES ET SAUVAGES**

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON 1 (Médecine -
Pharmacie) et soutenue publiquement le 28 Février 2005 pour obtenir le grade
de Docteur Vétérinaire

par

SILVANO Jérémy
Né (e) le 30 Novembre 1976
à AVIGNON (84)



DEPARTEMENTS ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Directeur : *Professeur Stéphane MARTINOT*

01/01/05

DEPARTEMENT	PREX	PR1	PR2	MC	Contractuel, Associé & IPAC	AERC	Chargés de consultations et d'enseignement
DEPART. SANTE PUBLIQUE VETERINAIRE Microbiologie, Immunologie, Pathologie Générale	Y. RICHARD	G. BOURDOISEAU C. CHAUVE G. CHANTEGRELET	A. LACHERETZ M. ARTOIS P. DEMONT C. VERNOZY A. LACHERETZ	V. GUERIN-FAUBLEE 80 % A. KODJO D. GREZEL J. VIALARD MP CALLAIT-CARDINAL L. ZENNER A. GONTHIER P. SABATIER M.L. DELIGNETTE 80 % K. CHALVET-MONFRAY			
Pathologie infectieuse					S. COLARDELLE ISPV		
Parasitologie & Maladies parasitaires							
Qualité et Sécurité des Aliments							
Législation & Jurisprudence							
Bio-Mathématiques							
DEPART DES ANIMAUX DE COMPAGNIE							
Anatomie		E. CHATELAIN	T. ROGER	S. SAWAYA	R. DA ROCHA CARARO MCC		BENREDOUANE K. (50 %) G. CHANOT A. MUGNET F. GUILLEMIN I. GOUJON (50 %)
Chirurgie et Anesthésiologie	J.P. GENEVOIS	D. FAU E. VIEUIER D. REMY			S. JUNOT K. PORTIER C. DECOSNE-JUNOT MCC MCC MCC	C. CAROZZO	
Anatomie-pathologique/Dermatologie-Camérotologie Pathologie Clinique	J.P. MAGNOL C. FOURNEL			T. MARCHAL	D. WATRELOT-VIRIEUX P. BELLI D. PIN MCA MCA		
Médecine interne	J.L. CADORE (50 %)			L. CHABANNE	JL. BOULAY M. HUGONNARD PRA MCC	F. PONCE C. ESCRIOU	I. BUBLOT (60 %) F. DURIEUX (50 %)
Imagerie médicale				E. CAUVIN (50 %)	F. DURIEUX (50 %) MCC		
DEPART DES PRODUCTIONS ANIMALES							
Zootechnie, Ethologie & Economie rurale		M. FRANCK		LETERME P.		L. MOUNIER	
Nutrition et Alimentation				D. GRANCHER L. ALVES de OLIVEIRA G. EGROU-MORAND S. BUFF P. GUERIN S. MARTINOT			
Biol & Patho de la Reproduction	F. BADINAND	M. RACHAIL-BRETIN		R. FRIKHA M.A. ARCANGIOLI D. LE GRAND	D. LAURENT (50 %) MCA		N. GIRAUD P. DEBARNOT (66 %) D. LAURENT (16 %)
Patho Animaux de Production	P. BEZILLE	T. ALOGNINOUBA					
DEPART SCIENCES BIOLOGIQUES							
Physiologie /thérapeutique				J.J. THIEBAULT J.M. BONNET-GARIN 90 % T. BURONFOSSE V. LAMBERT			
Biophysique/Biochimie		F. GARNIER	E. BENOIT F. GRAIN P. JAUSSAUD P. BERNY				
Génétique et Biologie moléculaire							
Pharmacie / Toxicologie Législation du Médicament	G. KECK						
Langues							
DEPART HIPPIQUE							
Pathologie équine				A. LEBLOND A. BENAMOU-SMITH E. CAUVIN (50 %)	C. FARMER R. SULLIVAN IPAC IPAC		
Clinique équine							
Expertise Nécropsique			C. FLEURY				

A Monsieur le Professeur Jacques Descotes

De la Faculté de Médecine de Lyon

Qui nous a fait l'honneur d'être le président de notre jury de thèse.

A Monsieur le Professeur Gérard Keck, Professeur Première Classe

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Qui a accepté d'encadrer notre travail.

A Monsieur le Professeur Philippe Berny, Professeur Deuxième Classe

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Qui a accepté de faire partie de notre jury de thèse.

Remerciements

A mes parents, sans vous je n'en serais pas là aujourd'hui, c'est sûr. Je vous remercie pour votre amour sans faille, votre soutien moral (et financier aussi !!!) dans tous les moments de doute. Ce travail est aussi l'expression de votre réussite. Je vous aime très fort.

A mon frangin que j'adore et que j'admire pour ses capacités intellectuelles. Malgré mon prochain éloignement, j'espère pouvoir te mettre encore de nombreuses fois « la misère » à la G³ lors de nos futurs week-ends à Montfaucon.

Biche et Lulu, je vous aime aussi très fort et je vous remercie de vos éternelles félicitations (même si vous n'êtes pas très objectifs !), et du regard que vous avez toujours porté sur moi. J'en suis très fier.

A Manue, ma p'tite Auvergnate. Je te remercie pour l'amour que tu me donnes, j'espère que je te le rends suffisamment. Je t'admire pour ton sérieux et tes capacités de concentration au boulot. Ces lignes sont l'occasion pour moi de te dire que je t'aime aussi très fort. Je te remercie pour ta confiance en moi. Je mesure tout l'amour que tu as pour moi au nombre de kilomètres que tu vas faire pour me rejoindre dans mon futur projet, je sais qu'on va construire quelque chose de bien tous les deux.

Gilles et Elisabeth, je vous remercie pour votre accueil toujours chaleureux et pour votre grande disponibilité. Je vous apprécie pour la facilité de discussion que j'ai avec vous. J'ai toujours plaisir à venir à Marat, même si c'est au prix de nombreux virages...

A tous mes copains de prépa puis de promo, merci pour toutes ces années d'étudiant qui resteront inoubliables.

A Flèche, mon premier colloc', merci de m'avoir refile ta passion pour les poiscailles. Et désolé si aujourd'hui l'élève a dépassé le maître. Je me rappellerai toujours tes nouages de lacets à 8h05 dans la Supercinq et ta marque de dentifrice sur la joue.

Les P'tits Gros, merci de m'avoir hébergé si souvent chez vous, surtout les veilles d'exams. Cop, merci pour tes super balades à cheval. Sache que tu m'impressionnes par ton mental de compétiteur et pour ta veine du chant (surtout lors des 3^{èmes} mi-temps). Astic, chapeau pour tes imitations. Spffuuuiit, je t'admire pour ton sérieux, ta discrétion, tes quadriceps fémoraux, l'éducation de ton chien, mais surtout pour ta femme, que tu as choisi très belle.

A Bulot, dit Bubulle. Merci à mon partenaire de barque pour tes cours de pêche. Je te fournis les bons coins, tu me fournis la technique. Je trouve que c'est un bon équilibre. J'aime me souvenir de nos sorties de temps en temps, ce sont vraiment de bons moments de décompression et de rencontre avec la nature. J'espère qu'on aura l'occasion de remettre ça encore de nombreuses fois. Et je suis sûr que tu vas trouver de quoi t'épanouir professionnellement. Il suffit d'être patient.

A Tatonche, je suis content de bientôt me « rapprocher » à 200 km de toi, j'espère qu'on

pourra se voir souvent et que tu vas arrêter de déménager.

A Céline, je t'admire pour ta patience à l'égard de Xavier L. Moi j'ai jeté l'éponge, mais tu as des arguments héréditaires bleus auxquels on ne peut que dire oui. Je suis épaté par ta tolérance olfactive à mes chers amis Sweet, Nuus, Scrat (et les autres si j'en oublie).

A Audrey, ma mère de clinique. J'ai passé de super moments avec toi à l'Ecole, avec de bonnes rigolades. Ton sourire me fait tomber par terre. Garde-le toujours.

A mes premiers collègues de travail, que je vais avoir du mal à oublier, tellement il a été facile de travailler avec vous : LBO, ND, DR, AC, DAL, HER, ML, MC, EM et tous ceux que j'oublie.

A Marie, Annélie, Charlotte, mes colloc' de 2^{ème} et 3^{ème} année.

Au groupe 12, qui m'a laissé de très bons souvenirs. Joce le glabre, Toun et son épaule bionique, Faby et son chien qui s'épluche, Tyboon et ses blagues qui ne font pas rire, Emilie et ses humeurs, Anne-Laure, Chtib, Auré, Emma, Camille, Vovo...

A tous ceux que je ne vois pas assez souvent : Lison, Ictère, Isa, Hydro, Greg, Estelle, Stevee...

Et enfin, merci à Nouf Nouf, qui ne me contredit jamais quand je lui parle.

Merci à Monsieur Jean-François Humbert et à l'équipe d'hydrobiologistes de l'INRA, à Thonon Les Bains, qui m'ont orienté dans ma recherche bibliographique et mis sur les rails pour l'élaboration de ce travail.

Merci à Madame Geneviève Golazewski, du Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement pour ses informations sur le programme EFFLOCYA 99.

TOXICITE DES CYANOBACTERIES
D'EAU DOUCE
VIS-A-VIS DES ANIMAUX
DOMESTIQUES ET SAUVAGES.

TABLE DES MATIERES

Introduction

1. Les cyanobactéries toxiques : Présentation.

1.1. Habitat.

1.2. Morphologie et structure.

1.2.1. Structure.

1.2.2. Morphologie.

1.2.3. Taille des cellules.

1.3. Cytologie.

1.3.1. Protoplasme et inclusions.

1.3.2. Vacuoles gazeuses.

1.3.3. Paroi.

1.3.4. Gaine.

1.3.5. Fimbriae et pili.

1.4. Principales espèces toxiques rencontrées.

1.4.1. Chroococcales Welts 1924 .

1.4.2. Oscillatoriales Elenk 1934.

1.4.3. Nostocales (Borzi 1914) Geilt 1925.

1.4.4. Stigonematales Geitler 1925.

1.5. Conditions physicochimiques de développement.

1.5.1. Paramètres physiques.

a) Température.

b) Lumière.

c) Température et lumière.

1.5.2. Milieu de culture.

1.5.3. Age de la culture.

1.6. Ecologie des cyanobactéries d'eau douce.

1.6.1. Cycle de développement des espèces planctoniques.

a) Une phase de repos durant l'hiver.

b) Une phase de remontée.

c) Une phase de croissance active au printemps et au début de l'été.

d) Une phase d'accumulation en surface à la fin de l'été et au début de l'automne.

e) Une phase de disparition.

1.6.2. Cycle de vie des Microcystis.

a) La phase de repos ou phase benthique.

b) La phase de remontée vers la surface.

c) La phase planctonique.

d) La phase d'accumulation en surface.

- e) La phase de disparition.
- 1.6.3. Cyanobactéries et eutrophisation.
 - a) Cyanobactéries fixatrices d'azote.
 - b) Cyanobactéries non fixatrices d'azote.
- 1.6.4. Toxicité des efflorescences à cyanobactéries.

2. Toxicité des cyanobactéries.

2.1. Présentation des différentes toxines.

2.2. Peptides cycliques hépatotoxiques : microcystines et nodularines.

- 2.2.1. Propriétés et méthodes d'analyses.
- 2.2.2. Matériel biologique.
- 2.2.3. Symptomatologie.
 - a) Chez le rongeur de laboratoire.
 - b) Chez le mouton.
 - c) Chez les bovins.
- 2.2.4. Biologie clinique.
- 2.2.5. Histopathologie.
- 2.2.6. Causes de la mort.

2.3. Alcaloïdes : Cylindrospermopsines.

2.4. Alcaloïdes : anatoxine A.

- 2.4.1. Présentation.
- 2.4.2. Symptômes lors d'intoxication.
- 2.4.3. Dose létale.
- 2.4.4. Mode d'action de l'anatoxine A et de ses analogues structuraux.
 - * **Activité neurotoxique**
 - * **Activité neuromusculaire**
- 2.4.5. Diagnostic différentiel.
- 2.4.6. Traitement.

2.5. Alcaloïdes : Anatoxine-A (S)

- 2.5.1. Structure chimique.
- 2.5.2. Dose létale.
- 2.5.3. Mode d'action de l'anatoxine A (S).
- 2.5.4. Signes cliniques.
- 2.5.5. Traitement.
- 2.5.6. Conditions naturelles.

2.6. Les aphantoxines. (dont les saxitoxines).

- 2.6.1. Présentation.
- 2.6.2. Structure chimique.
- 2.6.3. Symptômes.
- 2.6.4. Mode d'action.

2.7. Alcaloïdes dermatotoxiques : aplysiatoxines et lyngbyatoxines.

3. Cyanotoxines et intoxications d'animaux.

3.1. Recueil de cas bibliographiques.

3.1.1. Dans le monde.

3.1.2. En Europe.

* Pays européens

* France

-Le cas de *Planktothrix rubescens* dans le lac du Bourget.

-Le cas des étangs du Forez.

-Le cas de la région Bretagne.

-Le cas de *Cylindrospermopsis raciborskii* (L'étang des Francs Pêcheurs).

3.2. Cas recueillis en France : accidents en Lozère, Gorges du Tarn, 2002 et 2003.

3.2.1. Rappel des faits.

3.2.2. Description des cas de 2003.

3.2.3. Synthèse des cas cliniques de 2003.

* Condition des intoxications

* Animaux concernés

* Lieux

* Signes cliniques

* Analyses

* Résultats

-Résultats d'autopsie.

-Résultats d'analyses de l'eau.

* Rôle des conditions climatiques

* Qualité de l'eau

* Mesures prises

-Prise en charge des animaux et lien avec les professionnels de santé.

-Prélèvements d'eau et analyse : surveillance sanitaire.

3.3. Cas recueillis en France : accidents dans le Jura, mortalité de chiens dans la rivière la Loue, été 2003.

3.3.1. Historique.

3.3.2. Description du site.

3.3.3. Description des cas cliniques.

3.3.4. Analyses d'échantillons d'eau.

3.3.5. Résultats.

3.3.6. Recherche de toxicité des prélèvements.

3.3.7. Qualité de l'eau.

3.4. Plan de vigilance et de prévention dans le cadre de la surveillance du lac du Parc de la Tête d'Or.

3.4.1. Présentation.

3.4.2. Origine de l'eau.

3.4.3. Faune du lac.

3.4.4. Evaluation des risques de pollution : localisation des activités.

3.4.5. Qualité de l'eau.

3.4.6. Mesures préventives.

3.4.7. Niveaux de vigilance.

3.4.7.1. Qualité sanitaire bonne

3.4.7.2. Niveau de vigilance

3.4.7.3. Alerte niveau 1

3.4.7.4. Alerte niveau 2

3.4.8. Conclusion sur la qualité des eaux du lac.

3.5. Prélèvements de matériel pour exploitation en laboratoire.

3.5.1 Intérêt des prélèvements multiples.

3.5.2. Lieux de prélèvement.

3.5.3. Technique de prélèvement.

Mesure du Phosphore.

Mesure des Nitrates.

3.5.4. Identification des espèces de cyanobactéries.

3.5.5. Identification de matériel cellulaire ou de toxines.

3.6. Analyses des prélèvements.

3.6.1. Diagnose.

3.6.2. Quantification.

3.6.3. Détermination de la biomasse.

3.6.4. Analyse des cyanotoxines.

Première étape : extraction des toxines.

Deuxième étape : purification des toxines.

3.7. Recherche de toxines de cyanobactéries.

3.7.1. Essais biologiques.

- Test souris.

- Test sur invertébrés.

- Test biochimique.

- Détection immunologique.

- Essais sur cellules de mammifères.

3.7.2 Analyses physico-chimiques.

- Technique HPLC : High Performance Liquid Chromatography.

- Technique LC/MS : Liquid Chromatography / Mass Spectrometry.

- Méthode TLC : Thin Layer Chromatography.

3.8. Laboratoires sondés pour des recherches de Cyanophycées dans l'eau.

3.8.1. Laboratoires vétérinaires départementaux. (LVD).

3.8.2. Instituts Pasteur et laboratoires spécialisés.

* Laboratoires effectuant les analyses de cyanobactéries.

* Laboratoires n'effectuant pas les analyses sur cyanobactéries en routine.

CONCLUSION

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Photos

Photo 1 : Efflorescence à cyanobactéries (*Microcystis*). CARMICHAEL, 1994 (12)

Photo 2 : Efflorescence à cyanobactéries du genre *Microcystis* sur les berges d'un étang. (Source MUR *et al.* 1999) (59)

Photo 3 : Berge des Gorges du Tarn (Lozère) en Août 2003. (MEROT, 2004) (22)

Photo 4 : forte concentration de l'eau en cyanobactéries du genre *Planktothrix* (Source : MUR *et al.* 1999) (59)

Photo 5 : Rive Ouest du Lac du Parc de la Tête d'Or (Photo personnelle)

Figures

Figure 1 : Structure coccoïde des Cyanobactéries. CODOMIER, 1993 (18)

Figure 2 : Morphologie des cyanobactéries potentiellement toxiques les plus fréquemment rencontrées. (source LAWTON *et al.* 1999) (49)

Figure 3 : Cycle de vie de *Microcystis aeruginosa* d'après REYNOLDS C.S. (68)

Figure 4 : Structure chimique de la microcystine L-R. D'après SCILLIER (74)

Figure 5 : Structure de l'anatoxine A. (18)

Figure 6 : Structure chimique de l'anatoxine A (S). (18)

Figure 7 : Structure chimique du diazinon (insecticide organophosphoré) (Cours de Toxicologie clinique, P. Berny, ENVL).

Figure 8 : Structure chimique des PSPs (Paralytic Shellfish Poisons), d'après LAWTON *et al.*, 1999 (49)

Figure 9 : principales toxines produites par les cyanobactéries (77).

Figure 10 : La plaine du Forez (source Jacquet *et coll.*, 2003) (44).

Figure 11 : contamination des eaux bretonnes par les cyanobactéries en été. (Source S. Jacquet INRA, 2003) (44).

Figure 12 : Description des cas de chiens accidentés après baignade sur les berges du Tarn. (Source DDSV de la Lozère, 2003).

Figure 12 bis : Description des cas de chiens accidentés après baignade sur les berges du Tarn. (Source DDSV de la Lozère, 2003).

Figure 13 : Plan des activités du Parc de la Tête d'Or. (Source : Site Internet de l'Association des Commerçants du Parc de la Tête d'Or).

Figure 14 : Niveaux de vigilance d'une eau de baignade ou de boisson. (Adapté de SIVONEN, JONES, 1999) (77).

Figure 14 bis : Niveaux de vigilance d'une eau de baignade ou de boisson. (Adapté de SIVONEN, JONES, 1999) (77).

Figure 15 : diverses localisations possibles de cyanobactéries potentiellement toxiques dans un lac ou un réservoir d'eau (52).

Figure 16 : Relation entre sensibilité et spécificité des méthodes d'analyse de microcystines. (source HARADA *et al.* 1999) (39).

Annexes

Annexe 1 : Circulaire DGS/VS 4 n°99-395 du 6 Juillet 1999.

Annexe 2 : Formulaire à remplir en cas de prolifération algale dans les eaux publiques.

Introduction :

La qualité des eaux de surface est un enjeu majeur pour l'avenir de notre planète. L'activité humaine dans les pays industrialisés entraîne depuis plusieurs années le rejet de phosphore et d'azote dans l'environnement : on assiste alors à l'eutrophisation de nombreux écosystèmes aquatiques et à la prolifération d'algues. Aujourd'hui, en Europe, en Asie et aux USA, plus de 40% des lacs sont eutrophisés et sujets à la prolifération d'algues (9).

Les proliférations d'algues, en particulier les cyanobactéries, peuvent avoir un impact majeur sur le fonctionnement des écosystèmes ainsi que sur la santé humaine et animale, autant lors de la consommation de l'eau que lors de loisirs aquatiques. L'intérêt pour les cyanobactéries s'est accru ces dernières années, avec l'augmentation des incidents domestiques sur tous les continents, en particulier dans des pays d'Europe du Nord, qui n'étaient pas autant touchés par les proliférations de cyanobactéries il y a quelques années (44).

Les autorités sanitaires prennent de plus en plus d'initiatives en vue de la détection de cyanobactéries dans les eaux publiques françaises lors de fortes chaleurs estivales (22). Malgré cela, les risques sanitaires dus à la prolifération de cyanobactéries pour les hommes, les animaux domestiques et sauvages semblent encore sous-estimés.

Le but de ce travail est de rassembler nos connaissances actuelles sur la biologie et l'écologie des cyanobactéries potentiellement toxiques. Nous étudierons les toxines qu'elles sont capables de synthétiser et leur impact sur la santé publique et plus particulièrement sur les animaux. A titre d'exemple, nous présenterons les premiers cas d'intoxications de chiens par des cyanobactéries décrits en France. Enfin, nous proposerons un plan de vigilance pour la surveillance d'eaux publiques en prenant l'exemple du Parc de la Tête d'Or à Lyon, et nous verrons les particularités du diagnostic de laboratoire des intoxications par les cyanobactéries.

1. Les cyanobactéries toxiques : Présentation.

Le terme « cyanobactéries », le plus utilisé actuellement, désigne les microorganismes procaryotes à pigmentation généralement de couleur 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.

Les caractéristiques communes des cyanobactéries et des bactéries sont l'absence de membranes nucléaire et plastidiale, de mitochondries, de réticulum endoplasmique et de dyciosome, et la présence d'une paroi cellulaire caractéristique des bactéries à coloration de Gram négative avec de la muréine (30) ; (83).

Ces diverses propriétés donnent lieu à des divergences dans la terminologie. Les botanistes les appellent algues bleues ou « Cyanophycées », les microbiologistes les appellent cyanobactéries.

Les deux appellations sont valides pour la systématique. Toutefois, les noms de genre et d'espèce utilisés actuellement pour l'identification et la systématique des cyanobactéries sont empruntés à la botanique.

Les cyanobactéries sont géologiquement les plus anciens organismes photosynthétiques connus. Des Chroococcales fossiles, âgées de deux milliards d'années, ont été découvertes dans le précambrien de l'Ontario (Canada).

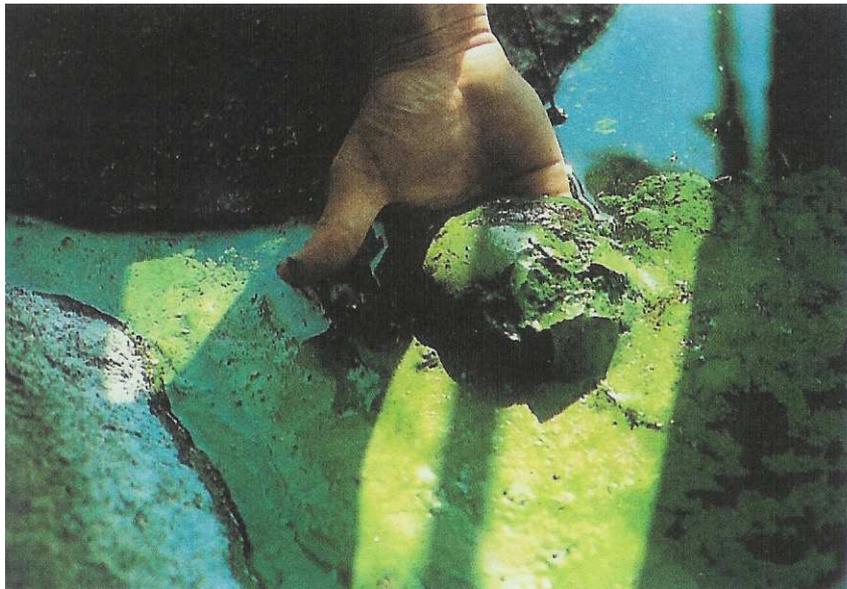


Photo 1 : Efflorescence à cyanobactéries du genre *Microcystis* sur les berges d'un lac (Ecosse).
Source CARMICHAEL, 1994 (12)

1.1. Habitat.

Les cyanobactéries sont répertoriées dans la plupart des habitats. BOURRELY en 1985 (7) et WHITTON en 1975 (87) ont fait une synthèse des connaissances actuelles sur l'écologie des cyanobactéries.

Elles sont présentes dans tous les pays du monde et en tous lieux, aussi bien dans les milieux aquatiques (des eaux douces aux eaux hypersalées) que dans les milieux désertiques.

Ce sont, avec les bactéries, les seuls organismes photosynthétiques susceptibles de vivre dans des eaux thermales dépassant la température de 56°C.

On les rencontre à tous les pH à l'exception des pH<4 car la chlorophylle est sensible à l'acidité de l'eau (aux ions H⁺). Seule l'algue rouge (eucaryote) *Cyanidium caldarium* se développe à un pH<4, la chlorophylle étant protégée dans ce cas par le chloroplaste intracellulaire.

Elles poussent également sur les rochers où elles vivent en symbiose avec les champignons tels les lichens. Elles peuvent être endolithes, perforant les roches pour s'y réfugier, ou bien endophytes dans les feuilles de fougères aquatiques du genre *Azolla*.

Certaines bactéries filamenteuses des genres *Beggiatoa* et *Thiothrix* vivant dans les eaux sulfurées (appelées sulfobactéries) sont considérées par certains auteurs comme des cyanobactéries ayant perdu leurs pigments.

Elles sont enfin lithogènes, construisant des tufs ou des stromatolithes.

1.2. Morphologie et structure.

Les cyanobactéries ont une organisation monostructurale très peu évoluée. Elle est de type « algue » (ni tige, ni racine, ni feuille). C'est un thalle, d'où le nom de thallophyte.

1.2.1. Structure.

Le thalle a une structure soit coccoïde, soit filamenteuse.

La structure coccoïde correspond à un thalle formé soit d'une cellule unique dite solitaire ou libre, en bâtonnet (exemple : *Synechococcus*, figure 1-C ci-dessous) ou sphérique (exemple : *Synechocystis*, figure 1-B), soit de plusieurs cellules agrégées dites coloniales (*Chroococcus*, figure 1-D).

La structure filamenteuse correspond à un thalle pluricellulaire formé soit d'un seul filament dit solitaire ou libre, soit de plusieurs filaments agrégés dits coloniaux.

Les structures coloniales coccoïdes ou filamenteuses ont respectivement leurs cellules ou leurs filaments liés entre eux par une matrice plus ou moins mucilagineuse de nature polysaccharidique.

Le filament, qui n'est autre qu'une file de cellules, est souvent entouré d'une gaine plus ou moins mucilagineuse. Dépourvu de cette gaine, il est appelé trichome.

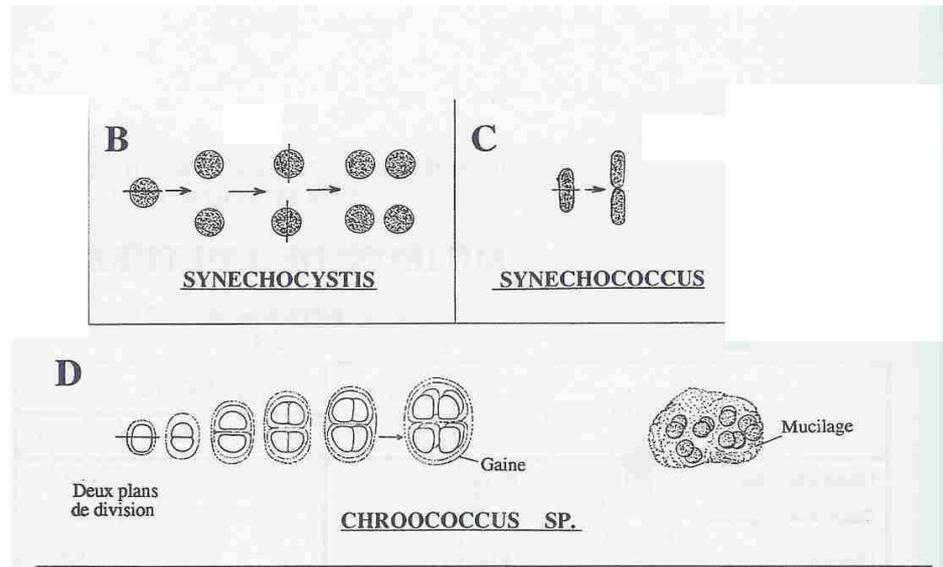


Figure 1 : Structure coccoïde des Cyanobactéries. (CODOMIER 1993) (18)

Si le trichome est seul dans sa gaine, le filament est unisérié. Si plusieurs filaments sont présents dans la même gaine, le filament est dit multisérié. Cette organisation filamenteuse peut évoluer au cours de la croissance en fonction de l'environnement ; le filament peut, par exemple, perdre sa gaine. Les filaments sont simples ou ramifiés. La ramification peut être soit une vraie ramification issue d'une cellule née à partir d'un cloisonnement parallèle à l'axe principal et développant un rameau latéral, soit une fausse ramification où la cellule régénératrice se sépare du filament axial et se cloisonne transversalement.

1.2.2. Morphologie.

La forme des structures coloniales coccoïdes est variée : plane, sphérique, irrégulière, etc...

Celle des structures coloniales filamenteuses peut être plus ou moins aplatie formant un tapis ou bien un gazon, une croûte hémisphérique, etc...

1.2.3. Taille des cellules.

La largeur des cellules peut varier entre 0,6 μm et 10 μm . Le diamètre moyen des cellules est compris entre celui des bactéries et celui des algues *sensu stricto*. La longueur des cellules des espèces filamenteuses est plus courte ou plus longue que leur largeur.

1.3. Cytologie.

L'étude d'une cyanobactérie au microscope électronique à transmission donne la structure cellulaire suivante :

Le cytoplasme contient :

- des ribosomes 70S
- des fibrilles d'ADN au centre de la cellule (centroplasma)
- des lamelles photosynthétiques (thylacoïdes) à la périphérie (chromatoplasme)
- des inclusions globulaires (glycogène, globules lipidiques), sphéroïdes (cyanophycine), polyédriques (polyphosphates) ou vésiculeuses (vacuoles gazeuses).

La cellule est entourée d'une paroi de peptidoglycane plus ou moins perforée, entourée dans certains cas d'une gaine supplémentaire.

Des expansions cytoplasmiques appelées pili peuvent exister.

1.3.1. Protoplasme et inclusions.

Beaucoup de structures protoplasmiques rencontrées chez les bactéries se retrouvent chez les cyanobactéries.

Le protoplasme central ou centroplasma contient des fibrilles d'ADN qui ne sont pas associées à des protéines basiques (les histones). Ce centroplasma est aussi appelé nucléoplasme.

La quantité d'ADN dans une cyanobactérie unicellulaire varie de $1,6 \times 10^9$ à $8,6 \times 10^9$ daltons, valeurs comparables à celles du génome des bactéries (1×10^9 à $3,6 \times 10^9$ daltons).

Le protoplasme périphérique ou chromatoplasme est composé de thylacoïdes (lamelles photosynthétiques) associés à des phycobilisomes (contenant les phycobiliprotéines) et à des granules de glycogène.

Les ribosomes 70S sont dispersés à travers la cellule mais sont surtout abondants dans la région centrale autour du nucléoplasme.

Les granules de cyanophycine sont des inclusions de grande taille composées de protéines stockées sous forme de polypeptides, contenant généralement de l'acide aspartique et de l'arginine sous forme de L-acide aspartique.

Les carboxysomes sont des corps polyédriques placés au centre de la cellule. Ils contiennent l'enzyme fixant le CO₂, c'est-à-dire la rubulose 1,5 diphosphate carboxylase/oxygénase. La photosynthèse des cyanobactéries est semblable à celle des plantes supérieures.

Les polyphosphates (granules de volutine) sont sphériques et semblables aux corps lipidiques des cellules eucaryotes en microscopie électronique. Ils stockent les phosphates et sont absents chez les cellules jeunes en pleine croissance ou chez les cellules croissant dans un milieu pauvre en phosphates. Par contre, ces granules de polyphosphates sont abondants dans les cellules âgées.

Les grains de glycogène (granules de polyglycane) sont placés entre les thylakoïdes dans les cellules en pleine activité photosynthétique puisqu'ils sont le résultat de la photosynthèse.

Les globules lipidiques sont des granules sphériques ou allongés à membrane simple dont le contenu est constitué d'acides gras, de stérols et d'alcools triterpéniques.

1.3.2. Vacuoles gazeuses.

Une vacuole gazeuse est composée de vésicules gazeuses ou de tubes cylindriques creux à bouts coniques. Elle permet à l'algue bleue de flotter et elle peut se rencontrer dans le cytoplasme de toutes les cyanobactéries à l'exception des espèces de la famille des Chamaesiphonacées, algues bleues exclusivement benthiques.

La membrane délimitant ces vacuoles gazeuses est assez rigide et n'est pas de nature lipoprotéique : elle n'est constituée que de protéines disposées en spirale autour de la vésicule. Elle est imperméable à l'eau et perméable aux gaz. Son contenu est gazeux à la pression d'une atmosphère et doit rester toujours en équilibre avec le milieu environnant.

1.3.3. Paroi.

* Structure générale

La paroi comprend quatre assises appelées L1, L2, L3, L4 de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule à partir de la membrane plasmique. L2 est une couche de muréine (peptidoglycane) et L4 est une membrane semblable à la membrane plasmique, similitude avec la paroi d'une bactérie Gram à coloration de Gram négative. Les deux assises les plus internes, L1 et L2, sont les mêmes chez toutes les algues bleues.

* Pores et perforations

La présence de pores ou de perforations dans la couche peptidoglycanique de la paroi des cyanobactéries filamenteuses fut mise en évidence en 1955 par METZNER (57). Leur rôle est de faciliter les échanges entre cellules du filament (perforations transversales) et avec le milieu extérieur (pores de jonction, pores intercalaires). D'autre part, la disposition et le nombre de ces pores ou perforations est un bon critère pour la détection systématique.

1.3.4. Gaine.

La gaine est située à l'extérieur de la paroi. Elle est fibrillaire. Son rôle est de protéger les cellules de la dessiccation mais aussi de favoriser la mobilité des trichomes par glissement à l'intérieur de la gaine.

1.3.5. Fimbriae et pili.

Les fimbriae ou pili traversent les parois des algues bleues. Les fimbriae sont probablement impliqués dans les interactions procaryotes-eucaryotes telles les symbioses.

1.4.Principales espèces toxiques rencontrées.

L'appartenance des cyanobactéries aux algues eucaryotes ou aux bactéries procaryotes est toujours discutée. Cependant, d'après CODOMIER (18), qui s'inspire lui-même de PRINGSHEIM (65), il est possible de combiner les observations faites par les botanistes sur le terrain avec celles faites par les microbiologistes en culture pure.

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. Ainsi, LAZAROFF (50) a constaté que *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.

Avec ces quelques réserves émises sur la variabilité des caractères en fonction du milieu naturel ou de culture, nous proposons la classification botanique d'ANAGOSTIDIS et de KOMAREK (1985 à 1989) (1) pour les trois ordres :

Chroococcales
Oscillatoriales
Nostocales.

et de DESIKACHARY (23) un peu améliorée pour les Stigonematales.

Les noms de cyanophycées, cyanobactéries, et algues bleues seront utilisés indifféremment.

1.4.1. 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 gazeuses (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 connus et répandus, et les algues du genre *Microcystis* sont réputées pour être potentiellement toxiques. L'espèce la plus connue est *M. aeruginosa*.

M. aeruginosa Kuetz 1846

M. wessenbergii Komarek

M. viridis Lemmerman

- *Gloeocapsa* Kuetz 1843

- *Synechococcus* Naeg 1849

- *Coleosphaerium* Naeg 1849

- *Gomphosphaeria* Kuetz 1833
G. aponica 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

- *Pleurocapsa* Thur. Ex Hauck 1885.

1.4.2. 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.

- Pseudanabeaceae (Anagn. et Korm. 1988).

- *Pseudanabaena* Lauter B. 1915.

- Schizotrichaceae (Elenk 1934).

- *Schizothrix* Kuetz ex. Gom. 1892.
S. calcicola. (Ag.) Gom. 1892.

- Phormidiaceae (Anagn. et Korm. 1988).

- *Phormidium* Kuetz ex. Gom. 1892.
- *Trichodesmium* Ehreimb. Ex. Gom. 1892.
T. erythraeum Ehreimb. Ex. Gom. 1830.
- *Microcoleus* Desm. Ex. Gom. 1892.
- *Spirulina* Turp. Ex. Gom. 1892.

- Oscillatoriaceae (S.F. GRAY) Harv. Ex. Kirchn. 1898.

- *Oscillatoria* Vauch. Ex. Gom. 1892.
O. redekei
O. nigroviridis Ex. Gom. in Harvey 1846-1851.
O. acutissima Kuff. 1914.
O. agardhii Gom. 1892.
O. rubescens D.C. ex Gom. 1892.
- *Lyngbya* C. Ag. Ex. Gom. 1892.
L. majuscula Harv. Ex. Gom. 1833.
- *Plectonema* Thur..ex. Gom. 1892.

Les cyanobactéries du genre *Oscillatoria* et *Lyngbya* sont régulièrement suspectées lors d'intoxications par des efflorescences à cyanobactéries. Les toxines des *Oscillatoria* ont un tropisme hépatique alors que les toxines produites par *Lyngbya* ont un tropisme nerveux et cutané.

- Homeotrichaceae (Elenk 1934).

- *Homeothrix* (Thur. Ex. Born et Flah.) Kirch 1898.

1.4.3. NOSTOCALES (Borzi 1914) Geilt 1925.

Elles possèdent des thalles filamenteux, ainsi que des trichomes typiques isopolaires ou hétéropolaires.

On note une absence de ramifications 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 1824 ex. Born. et Flah. 1886.

- *S. hofmanni* Ag. ex. Born. et Flah. 1887.

- *S. pseudohofmanni bharadwaja* 1934.

- Microchaetaceae (Lemm. 1910).

- *Tolypothrix* Kuetz 1843 ex. Born. et Flahaut 1896.

- *T. conglutinata* var. *colorata* Ghose 1924.

- *T. byssoidea* (Berk) Kirchner 1933.

- 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.

An. flos aquae (Lyng.) Breb. Ex. Born. et Flahaut, 1888.

An. circinalis

An. spiroides.

- *Aphanizomenon* Morr 1838 ex Born et Flah. 1896.

Aph. flos aquae (Linn.) Ralfs ex Born. et Flah. 1888.

- *Cylindrospermopsis* Seenaya et Skubba Raju 1972.

C. raciborskii (Woloszynska), 1972

- *Anabaenopsis* (Wolosz.) v. Mill. 1923.
- *Cylindrospermum* Kuetz 1843 ex Born. et Flah. 1886.
 C. licheniforme Kuetz ex Born et Flah. 1888.
- *Hormothamnion* Grun 1867.
 H. enteromorphoides Grun ex Born. et Flah. 1888.
- *Nodularia* Mert. Ex. Born et Flah. 1886.
 N. spumigena Mertens ex. Born et Flah. 1888.
- *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.
 G. echinulata (J. Smith) Richter 1894.

1.4.4. 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).

- *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.

- *H. fontinalis* (Ag.) Born. 1889

- *Geitleria* Friedmann 1955.

Récapitulatif des cyanobactéries fréquemment rencontrées :

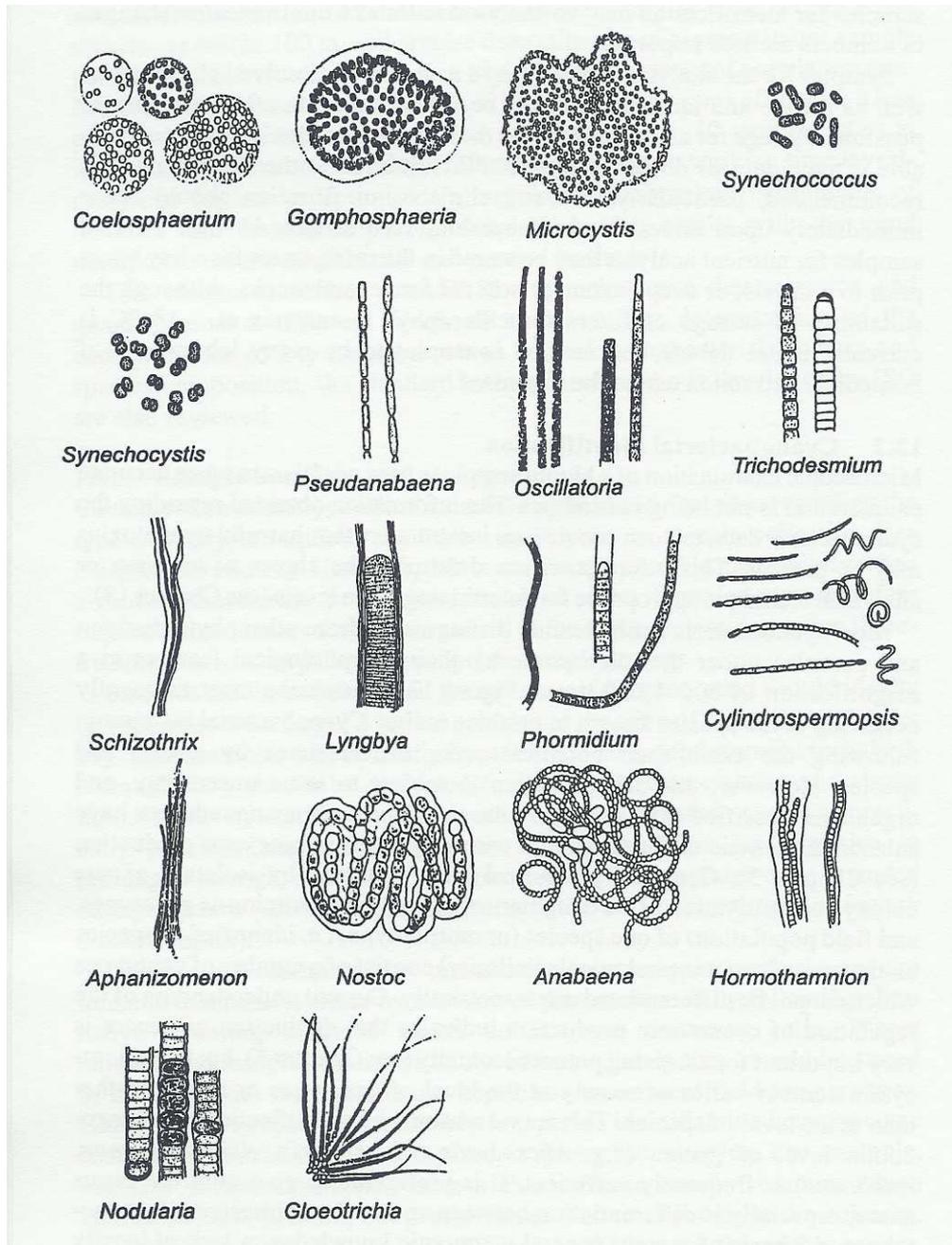


Figure 2 : Morphologie des cyanobactéries potentiellement toxiques les plus fréquemment rencontrées. (LAWTON *et al.*, 1999) (49)

1.5. Conditions physicochimiques de développement.

Microcystis aeruginosa est l'espèce toxique la plus répandue. C'est l'espèce qui a été la plus étudiée. C'est pourquoi nous avons choisi d'exploiter les résultats obtenus en culture sur cette espèce.

Dès 1958, une équipe canadienne a réalisé la première culture de *M. aeruginosa* à partir de prélèvements de fleurs d'eau récoltées dans le lac Ontario. Depuis cette date, des recherches ont été poursuivies afin d'améliorer les conditions de culture en vue d'obtenir une toxicité maximum.

Les conditions physico-chimiques nécessaires à un développement optimal ne sont pas tout à fait les mêmes pour les autres cyanobactéries toxiques. Par exemple, *Anabaena flos aquae* qui possède des hétérocystes capables de fixer l'azote se développe mieux en l'absence de nitrates que *Microcystis*. Elle est également toxique en fin de phase exponentielle, mais à une température de 22,5°C au lieu de 18°C.

Globalement, ces conditions diffèrent peu pour les cyanobactéries que nous étudions, certaines étant plus exigeantes que d'autres.

1.5.1. Paramètres physiques.

a) Température.

D'après GHORAM (34), la température la plus favorable est 25°C. Pour WATANABE (86), elle est plutôt de 18°C. Les fleurs d'eau toxiques se développent en effet l'été entre 15 et 30°C.

b) Lumière.

C'est à des intensités relativement basses, 30,1 à 75,3 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ qu'est atteint le maximum de toxicité. Au dessous de 7,5 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, la toxicité diminue. Dans la nature, ces fleurs d'eau, grâce à leurs vacuoles gazeuses, se déplacent dans la colonne d'eau en fonction de l'éclairement. Au petit matin, elles recouvrent la surface, et vers midi elles s'enfoncent légèrement en dessous de la surface.

c) Température et lumière.

Les travaux de VAN DER WESTHUIZEN *et al.* en 1986 (84) ont montré des variations de concentration de chaque peptide toxique en fonction de la lumière et de la température. Ces variations ont été étudiées sur la souche WR-88 (UV-006) réalisée à partir de fleurs d'eau à *Microcystis aeruginosa* d'Afrique du Sud. Ils ont mis en évidence trois peptides majeurs séparés par HPLC, qu'ils ont nommés A, B et C. Ces trois peptides correspondent à 90% des toxines présentes.

La composition en peptides de *Microcystis* se développant à 16°C diffère très nettement de celle se développant à 20°C, 28°C et 36°C. A 16°C, c'est le peptide C qui a la concentration la plus forte (c'est alors le composé majeur), alors qu'à 20°C, il est nettement

minoritaire, et qu'à 28°C, il a disparu. A toutes les températures, le peptide B est présent dans la même proportion que le peptide C à 18°C. Enfin, le peptide A est majoritaire à 28°C à égalité avec le peptide B.

Ils ont montré aussi que la lumière avait une influence sur la composition en peptides A et B. Pour un éclairage variant de 21 à 35 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, la concentration en peptides A diminue alors que celle du peptide B augmente.

1.5.2. Milieu de culture.

- ICHIMURA (41) a mis au point un milieu pour la culture de cette espèce, utilisé par WATANABE (86) pour déterminer l'influence de l'azote et du phosphore sur la toxicité.

- L'azote (2,5 mg de NaNO_3 par litre de culture) et surtout le phosphore (50 mg de B-glycérophosphate de sodium) sont nécessaires pour une bonne production de toxines. Ce besoin en phosphates et en nitrates est largement satisfait dans nos pays tempérés où les lacs s'enrichissent en engrais agricoles et pollutions diverses. On constate d'ailleurs en Europe une augmentation du nombre de lacs ou retenues d'eau dans lesquels se développent des fleurs d'eau toxiques. Dans les lacs, la proportion relative N/P joue un rôle dans le développement de telle ou telle espèce de microalgue. Les cyanobactéries tendent à prendre le pas sur les autres microalgues lorsque $\text{N/P} < 29$.

1.5.3. Age de la culture.

La toxicité dépend aussi de l'âge de la culture. WATANABE (86) a remarqué qu'elle débute au milieu de la phase exponentielle ($\text{DL}_{50} = 68,1 \text{ mg/kg}$) pour atteindre son maximum au commencement de la phase stationnaire ($\text{DL}_{50} = 11,7 \text{ mg/kg}$) après quoi la toxicité décroît progressivement. C'est à cette phase stationnaire que doit correspondre l'apparition d'écume (fleurs d'eau) à la surface de l'eau. C'est la phase d'eutrophisation maximale. C'est alors que commence la destruction des cellules et la libération des toxines. Cette écume poussée par le vent se rassemble près des bords du lac où les animaux ingèrent ce plancton à cyanobactéries qui va les empoisonner.

1.6. Ecologie des cyanobactéries d'eau douce.

1.6.1. Cycle de développement des espèces planctoniques.

Les algues bleues sont présentes toute l'année dans les lacs mais ne forment habituellement de véritables blooms qu'à la fin de l'été ou au début de l'automne, c'est pourquoi plusieurs auteurs ont étudié dans la nature et en laboratoire le cycle de vie de ces espèces, notamment celui de *Microcystis aeruginosa* (68, 69). C'est l'espèce la mieux connue et celle que nous allons détailler, mais toutes les espèces planctoniques se développent de la même façon au cours de l'année.

Le cycle de vie d'une espèce passe par les cinq phases suivantes :

- a) Une phase de repos durant l'hiver
- b) Une phase de remontée
- c) Une phase de croissance active au printemps et au début de l'été
- d) Une phase d'accumulation en surface à la fin de l'été et au début de l'automne
- e) Une phase de disparition

Les mouvements ascendants et descendants des colonies dans la colonne d'eau dépendent respectivement de l'augmentation ou de la diminution du nombre de vacuoles gazeuses dans les cellules.

Parfois la perte de flottabilité de ces colonies peut être due à des remontées de fer oxydé à la surface ; ce fer piège toutes les colonies dans un précipité colloïdal. Cela peut se produire chez *Microcystis*. (62)

D'autre part, cette augmentation ou diminution du nombre de vacuoles gazeuses est contrôlée par des mécanismes régulateurs très complexes liés aux conditions d'environnement, mécanismes dont certains sont propres à chaque espèce.

1.6.2. Cycle de vie des *Microcystis* (REYNOLDS C.S., 1981) (68).

C'est le cycle de vie journalier et saisonnier de *Microcystis* qui a été le plus étudié.

- a) La phase de repos ou phase benthique.

Pendant l'hiver, les colonies sphériques de *Microcystis* sont situées en majorité sur le fond du lac, au contact du sédiment. Elles sont alors privées d'oxygène et vivent au ralenti : leur photosynthèse est de type anoxygénique.

b) La phase de remontée vers la surface.

Au début du printemps, une intense activité cellulaire produit de jeunes colonies à partir des anciennes. Ces nouvelles colonies se forment quand les anciennes situées sur le fond sont proches de l'anoxie, et dès que la lumière plus intense du soleil au printemps les atteint.

c) La phase planctonique.

Pendant cette phase de développement des colonies, des mouvements journaliers de montée et de descente se produisent. Ils sont surtout fonction de la lumière et plus particulièrement de l'activité photosynthétique. Toutes les cellules sont alors en phase exponentielle de croissance. Lorsque les colonies de *Microcystis* montent dans la colonne d'eau, il y a augmentation de la photosynthèse, de la croissance, et de la pression osmotique. A cause de cette augmentation de pression osmotique, les vacuoles éclatent, leur nombre diminue et la colonie descend.

Dans le mouvement descendant, il y a en revanche diminution de la photosynthèse, de la croissance et de la pression osmotique, c'est alors que le nombre de vacuoles augmente à nouveau d'où une nouvelle ascension de la colonie. Ainsi la formation de nouvelles vacuoles excédentaires à de basses intensités lumineuses tend à garder les colonies de *Microcystis* à l'intérieur de la zone eutrophique. De même, une diminution des vacuoles gazeuses à haute intensité lumineuse empêche son accumulation à la surface de l'eau. Cette phase est planctonique et de forte croissance. Les fleurs d'eau sont alors temporaires et se forment en début de matinée pour disparaître dès que l'intensité lumineuse est trop importante.

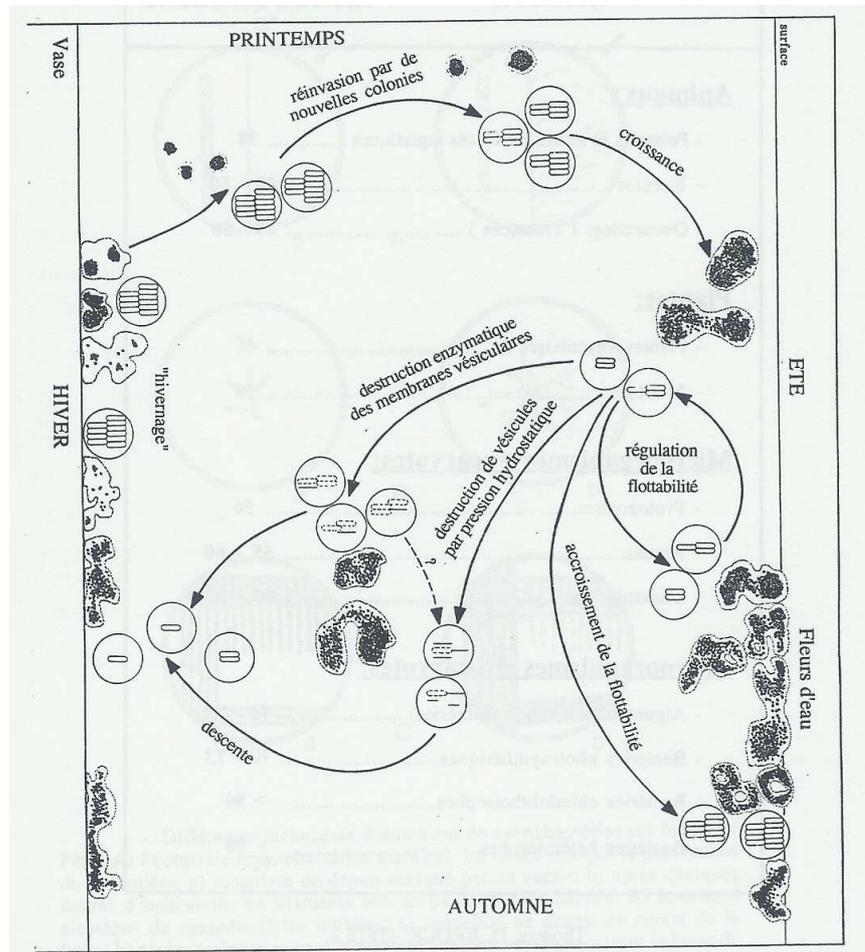
d) La phase d'accumulation en surface.

Durant la phase printanière, les colonies sont indépendantes les unes des autres et ne s'accumulent pas en surface. En revanche, à la fin de l'été et au début de l'automne, les colonies se réunissent et s'amassent en surface et deviennent de plus importantes. Elles forment alors les véritables fleurs d'eau permanentes. C'est la période où la majorité des cellules sont en phase stationnaire : la croissance a cessé et le nombre de vacuoles gazeuses augmente, entraînant leur flottabilité. L'apparition de fleurs d'eau en surface se produira si de nombreuses colonies arrivent à maturité en même temps et si elles ont la possibilité de s'accumuler. C'est pourquoi, sur le lac, une période de calme suffisamment longue est nécessaire pour que la formation de ces blooms se réalise.

e) La phase de disparition.

Les conditions de vie à la surface étant très défavorables à la survie du matériel végétatif, les colonies subissent alors une mort certaine par photooxydation (8). Les cellules se désintègrent et le bloom disparaît.

Figure 3 : Cycle de vie de *Microcystis aeruginosa* d'après REYNOLDS C.S. (68)



1.6.3. Cyanobactéries et eutrophisation.

Le processus d'eutrophisation des lacs est déclenché par un enrichissement en sels nutritifs tels nitrates et phosphates. Cet enrichissement est soit naturel par remontée en surface des sels nutritifs du fond, soit accidentel par lessivage, dû à la pluie, aux engrais agricoles. Cette augmentation de sels nutritifs entraîne un enrichissement des eaux du lac en organismes vivants. Au début de l'eutrophisation, les algues eucaryotes et les cyanobactéries se trouvent en concurrence. En fin d'eutrophisation, les cyanobactéries sont souvent dominantes et parfois l'une d'entre elles est présente à 90%, ayant ainsi éliminé tous les autres organismes. Les conditions physico-chimiques l'expliquent en partie : la température, la lumière et les sels nutritifs jouent un grand rôle dans la dominance de telle ou telle espèce, mais d'autres caractéristiques interviennent aussi, liées à leur structure cellulaire. En effet, les particularités morphologiques des cyanobactéries potentiellement toxiques les favorisent souvent vis à vis

des autres algues. De nombreuses cyanobactéries sont capables de se différencier en cellules spécialisées : les hétérocystes et akinètes. Les hétérocystes synthétisent une nitrogénase permettant de fixer l'azote atmosphérique, ils sont caractéristiques des cyanobactéries filamenteuses. Chez certaines espèces, des cellules spécialisées (akinètes) peuvent résister à la dessiccation puis se développer lorsque les conditions redeviennent favorables. De plus, les vacuoles gazeuses leur permettent de contrôler leur flottabilité, et donc leur exposition au soleil.

a) Cyanobactéries fixatrices d'azote.

Chez les cyanobactéries à hétérocystes (*Anabaena flos aquae*), la possibilité de capter l'azote atmosphérique a une grande importance ainsi que le rapport TN/TP (Total azote/Total phosphore). Pendant la phase de croissance, on a constaté que les cyanobactéries se développent particulièrement bien lorsque ce rapport $N/P < 29$. Dans le cas contraire, $N/P > 29$, ce sont les algues eucaryotes qui à leur tour se multiplient.

Pendant la phase d'accumulation en surface, les algues eucaryotes, par leur croissance rapide ont consommé tout le NH_4 dissout dans l'eau ainsi que le CO_2 . L'eau ne laisse passer qu'une faible quantité de lumière (moins de $10 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$), opacité due à la densité importante d'algues eucaryotes. Dans ces conditions, les algues fixatrices d'azote atmosphérique élaborent des vésicules gazeuses leur permettant de regagner la surface pour continuer ainsi à se développer. De telles cyanobactéries peuvent ainsi mettre hors compétition les algues eucaryotes grâce à leur grande capacité à fixer l'azote atmosphérique présent en petite quantité dans l'eau.

b) Cyanobactéries non fixatrices d'azote.

Cependant, chez les cyanobactéries non fixatrices d'azote comme *Microcystis*, le rapport $TN/TP < 29$ ne suffit pas à comprendre pourquoi ces espèces deviennent dominantes et éliminent les algues eucaryotes.

Plusieurs raisons peuvent apporter une solution :

* Les cyanobactéries se développent bien à de basses intensités lumineuses ($< 45 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) alors que de fortes intensités lumineuses sont nécessaires aux algues eucaryotes. Cette situation est favorable aux cyanobactéries à certains moments de la journée ou au début de l'automne. Nous allons étudier par la suite les incidents survenus dans les gorges du Tarn en Lozère lors des étés 2002 et 2003, où de fortes concentrations de cyanobactéries ont causé la mort de chiens lors de baignade. Cette caractéristique singulière nous amène à nous poser la question suivante : la topographie particulière des gorges, régions encaissées et donc moins exposées au soleil, a-t-elle joué un rôle dans la prolifération algale ? On ne peut que le supposer mais il semble que cet ensoleillement réduit puisse influencer l'apparition de cyanobactéries dans les gorges.

* Les cyanobactéries ont une très grande faculté d'adaptation : elles sont photohétérotrophes quand la matière organique l'emporte sur les sels nutritifs, elles peuvent photosynthétiser en l'absence d'oxygène, lorsque la biomasse des blooms est devenue importante.

* La dominance de ces cyanobactéries peut aussi être due à leur faculté d'excrétion de substances antibiotiques ou algostatiques. Elle peut enfin être due à leur pouvoir répulsif contre les prédateurs type zooplancton. On sait d'ailleurs que la plupart de ces cyanobactéries contiennent des substances toxiques intracytoplasmiques.

1.6.4. Toxicité des efflorescences à cyanobactéries.

La majorité des algues bleues forment à la surface des lacs des fleurs d'eau dont beaucoup sont toxiques.

a) L'algue bleue *Oscillatoria rubescens* est une espèce planctonique non toxique ayant cependant une sinistre réputation en tant que cyanobactérie eutrophisante. La première invasion de cette algue a été bien décrite dans plusieurs lacs suisses (87).

Oscillatoria rubescens, comme toutes les algues planctoniques, forme une couche au fond du lac pendant l'hiver, et ne vient former des fleurs d'eau en surface que lorsque les conditions physicochimiques lui sont favorables. Ces fleurs d'eau ont alors une couleur rouge-cramoisi due à la haute concentration cellulaire en phycoérythrine. Elles sont alors communément appelées « sang des Bourguignons ». C'est en 1825 que l'on observe pour la première fois le phénomène de « sang des Bourguignons », prolifération d'algues rouges dans le lac de Morat (Suisse).

b) Les cyanobactéries eutrophisantes toxiques sont nombreuses. Elles produisent des hépatotoxines (*Microcystis aeruginosa*, *Nostoc sp.*, *Oscillatoria agardhii*, etc), des neurotoxines (*Anabaena flos aquae* et *Aphanizomenon flos aquae*) ainsi que des dermatotoxines.

A présent, nous allons voir plus en détail les particularités individuelles des espèces de cyanobactéries à potentiel toxique, en fonction des toxines qu'elles produisent.

2. TOXICITE DES CYANOBACTERIES

Même si les propriétés toxiques de certaines cyanobactéries commencent à être bien connues, les récentes intoxications d'animaux domestiques en France (22) 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 qui boivent de l'eau contaminée. De plus, les toxines mises en cause sont diverses et leurs organes cibles sont différents (12).

Nous avons donc choisi de les présenter en fonction de leurs propriétés toxicologiques et chimiques.

2.1. Présentation des différentes toxines.

Les toxines de cyanobactéries sont responsables d'hépatotoxicité, neurotoxicité, ou encore dermatotoxicité. On peut les classer en trois grands groupes selon leur structure chimique : peptides cycliques, alcaloïdes et lipopolysaccharides (LPS) (9).

2.2. Peptides cycliques hépatotoxiques : microcystines et nodularines.

Les cyanobactéries des genres *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Nodularia* ... produisent plusieurs hépatotoxines que sont les microcystines et les nodularines. Les microcystines se différencient les unes des autres par la variation d'une paire d'acides aminés.

Si plusieurs microcystines sont présentes dans une souche, généralement, 90% de la toxicité est due à une ou deux microcystines, la plus répandue étant la microcystine L-R.

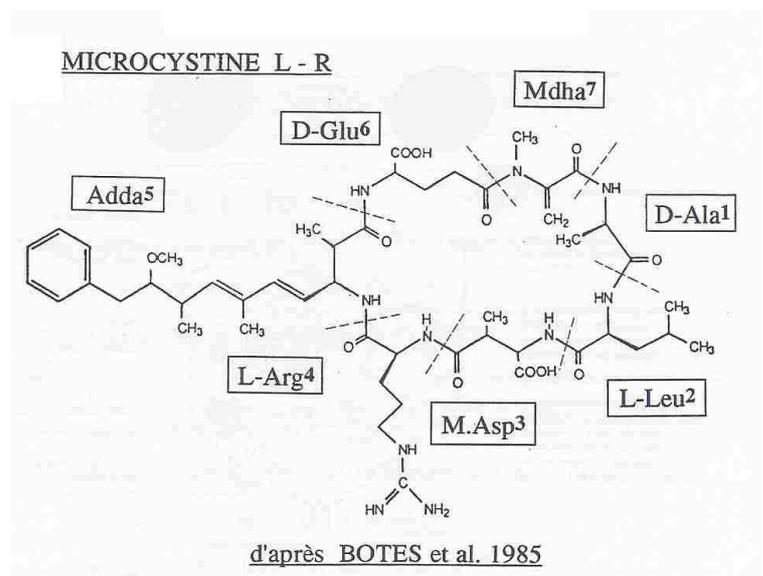


Figure 4 : Structure chimique de la microcystine L-R (74)



Photo 2 : Efflorescence à cyanobactéries du genre *Microcystis* sur les berges d'un étang. (Source MUR *et al.* 1999) (59)

2.2.1. Propriétés et méthodes d'analyses.

Les microcystines sont solubles dans les solvants polaires, elles sont thermostables à pH neutre. Les méthodes récentes mises au point par de nombreux chercheurs dont KRISHNAMURTHY *et al.* (47) permettent de détecter ces microcystines à des doses de l'ordre de la nanomole.

La détection des hépatotoxines peut se faire par différentes méthodes :

Biologiques : expérimentation sur la souris ou le rat de laboratoire.

L'établissement d'une DL 50 à partir de prélèvements effectués sur le terrain est délicat étant donnée la diversité des organismes prélevés. La méthode est peu spécifique. On peut effectuer des mesures à partir de toxines purifiées. La plupart des microcystines ont un puissant potentiel toxique. La DL 50 souris par injection péritonéale de microcystines et nodularines varie de 50 à 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de poids vif selon la molécule testée. Seuls quelques variants de microcystines non toxiques ont été identifiés.

Chimiques : Chromatographie H.P.L.C.

La méthode est performante mais requiert un investissement en personnel qualifié et matériel important.

Méthode immunologique : technique Elisa.

Selon HARADA *et al.* (39), la technique de référence date de 1990, où CHU *et al.* (16) ont fait produire par un lapin un anticorps anti-microcystine LR. La détection utilise un deuxième anticorps (antianticorps) auquel on a fixé un enzyme : la peroxydase. Elle permet de détecter les différentes variétés de microcystines en fonction des L acides aminés. La détection limite de la MCYST dans l'algue lyophilisée est de 0,25 à 0,5 µg/g soit 0,25 à 0,5 ppm. La méthode Elisa est 200 fois plus sensible que la méthode par HPLC où la limite de détection est de 100 µg/g. A partir d'algue séchée, on peut déceler une concentration de *Microcystis* jusqu'à 1 ppb.

2.2.2. Matériel biologique.

Matériel brut.

Pour déterminer la dose létale d'une efflorescence à cyanobactéries toxique, il est nécessaire de posséder plusieurs échantillons de matériel brut. En effet, la toxicité d'une efflorescence dépend de sa composition botanique. Bien que constitué parfois jusqu'à 95% de la même espèce botanique, on peut rencontrer dans un même échantillon des cyanobactéries hépatotoxiques et des cyanobactéries neurotoxiques. La toxicité peut aussi varier en intensité dans le temps et dépend du moment du prélèvement de l'échantillon. La toxicité d'un bloom est variable d'un endroit à l'autre : elle dépend aussi du lieu du prélèvement. Les fleurs d'eau issues d'endroits divers d'une étendue d'eau peuvent être temporairement rassemblées en un même point sous la poussée du vent.

A titre d'exemple, les efflorescences à *Microcystis aeruginosa* sont réputées très toxiques. La DL 100 (voie intra péritonéale, lyophilisat brut) est de 19 mg/Kg chez la souris. La durée de survie est de une à trois heures (45). Chez le mouton, la DL 100, avec le même matériel et dans les mêmes conditions qu'avec la souris, est de 1040 mg/Kg et le temps de survie est plus élevé (18 à 48 heures). Ces chiffres permettent de dire que 650 millilitres d'un bloom toxique épais (comme c'est souvent le cas) suffisent à empoisonner un agneau (43).

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.

2.2.3. 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...) (31). 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 DL 100 pour les grands animaux est quatre à cinq fois supérieure à celle des petits animaux (45).

a) Chez le rongeur de laboratoire.

Chez le 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 (80).

Symptômes observés : Pâleur des muqueuses

Prostration

Convulsions

Paralysie des membres postérieurs

Respiration difficile et irrégulière

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.

b) 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 (43).

Les symptômes relevés sont :

un animal abattu,

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 oedémateux et les autres organes semblent normaux.

c) 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.

Selon certains auteurs, ce syndrome hépatotoxique est souvent accompagné de diarrhées parfois hémorragiques chez les espèces animales sensibles (29).

Les études expérimentales du syndrome hépatotoxique montrent que le choix de la souris par rapport aux autres animaux est le plus avantageux : il faut une plus petite quantité de lyophilisat mais surtout l'expérience dure moins longtemps.

2.2.4. Biologie clinique.

Biochimie : Les concentrations plasmatiques d'acides biliaires augmentent proportionnellement à la diminution de l'écoulement biliaire.

La concentration plasmatique de certains enzymes augmente également : les phosphatases alcalines (PAL), les gamma glutamyl transférases (GGT). Ce sont aussi l'aspartate aminotransférase (ASAT) et la lactase déshydrogénase (LDH), traduisant un début de cytolyse. La créatine kinase (CK) est aussi en augmentation.

Après une hyperglycémie précoce, on observe une diminution progressive de la glycémie, jusqu'à atteindre des valeurs très faibles.

Hématologie : On note des troubles de l'hémostase liés à une thrombocytopénie.

Le temps de prothrombine augmente de quatre fois et demi, celui de thrombine de trois fois et celui de thromboplastine d'environ deux fois.

2.2.5. Histopathologie.

Le foie est la cible privilégiée des microcystines et des nodularines.

L'intoxication par les microcystines aboutit à une nécrose centrolobulaire rapide diffusant largement à travers l'organe. Elle est accompagnée de la disparition de son

architecture caractéristique. Les cellules endothéliales et les hépatocytes se dissocient par disjonction des cellules au niveau des desmosomes. Les tonofilaments ou filaments intermédiaires des desmosomes sont affectés par les microcystines (81).

Lors de la lyse des hépatocytes, les membranes se vésiculisent.

Enfin, les cellules endothéliales des canalicules biliaires se dilatent et perdent leur ancrage tubulaire.

Transformations intracellulaires : les hépatocytes avant la rupture de la membrane cellulaire présentent des transformations intracellulaires rapides. Elles débutent environ 10 minutes après l'injection. La réponse la plus courante aux injections létales, sublétales ou supralétales est la transformation du réticulum endoplasmique rugueux en vésicules, l'augmentation de volume des mitochondries qui deviennent sphériques et entrent en division, ainsi que la perte partielle ou totale des ribosomes du REG (Réticulum Endoplasmique Granuleux). La dégranulation ribosomale a pour conséquence un arrêt de certaines synthèses protéiques. Le fonctionnement de la chaîne des électrons est rompue. On constate aussi l'incorporation de composés cellulaires dans les lysosomes (20).

Chez le mouton, on constate sensiblement les mêmes lésions que chez la souris. Le mouton semble plus résistant à l'intoxication, résistance due à la taille de l'animal.

2.2.6. Causes de la mort.

La mort est due à un choc hypovolémique causé par une hémorragie interstitielle intrahépatique (80). 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.

2.3. Alcaloïdes : Cyindrospermopsines.

A ce jour, les seules cyanobactéries connues pour être capables de produire des cyindrospermopsines sont *Cyindrospermopsis raciborskii* (36), *Aphanizomenon ovalisporum* (2), *Umezakia natans* (37) et *Raphidiopsis curvata*. (51). Elles ont été découvertes dans des zones tropicales. Aujourd'hui on les trouve dans des régions d'Europe les plus au nord. (Autriche, Allemagne, France).

Caractéristiques : la cyindrospermopsine est un alcaloïde d'un poids moléculaire de 415 daltons. Cette molécule agit principalement comme un inhibiteur de la synthèse protéique, mais d'autres effets ont été décrits.

Toxicité : la DL50 de la cyindrospermopsine est de 2100 µg/kg par voie orale chez la souris en 24 heures. Elle est de 200 µg/kg en 5 à 6 jours par injection intrapéritonéale chez la souris (63).

Organes cibles : la cible principale de cette toxine est le foie, mais elle peut aussi affecter d'autres organes tels que les reins, le thymus ou le cœur. L'empoisonnement provoque la mort, probablement due à la déficience du cœur (75).

Anatomopathologie : à des concentrations toxiques, les lésions visibles à l'autopsie sont minimales par rapport à la vitesse d'apparition des signes cliniques. A faibles doses, la mort survient moins rapidement.

Histopathologie : le foie est de couleur foncée, les reins sont pâles, et la pâleur augmente avec l'augmentation des doses.

A faible dose, les lésions sur le foie, les reins, le thymus, la rate et le système immunitaire sont bien visibles. A l'autopsie, une nécrose des organes cibles est fréquemment observée (5).

2.4. Alcaloïdes : anatoxine A.

2.4.1. Présentation.

Anabaena flos aquae est toxique. Elle forme des masses spumeuses, gélatineuses, flottantes et bleuâtres lorsque les conditions le permettent.

Nos connaissances sur la production par les algues bleues d'anatoxine A viennent surtout du Canada et des Etats-Unis. Plusieurs cas d'intoxications d'animaux de rente ont été décrits dans les années 1980. Plus récemment, des blooms d'*Anabaena flos aquae* ont été décrits au Japon, en Norvège, en Finlande et au Brésil (14). Les premières descriptions d'intoxications de chiens par des neurotoxines en France datent de l'été 2003, dans le Jura, sur la rivière la Loue (35), et dans la Lozère, sur le Tarn (22).

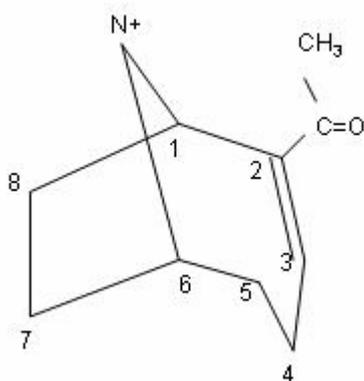


Figure 5 : Structure de l'anatoxine A. (18)

2.4.2. Symptômes lors d'intoxication.

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 (4).

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.

2.4.3. Dose létale.

La dose létale varie en fonction des animaux intoxiqués. La DL 100, avec un bloom lyophilisé injecté à des souris par voie intra péritonéale, est de 250 µg/kg. Pour les canards et les veaux, la DL 100 est le quart de celle des souris et des rats. Un veau de 60 kg meurt après avoir ingéré un à deux litres d'un bloom composé entièrement d'*Anabaena flos aquae*, soit 20 g de poids sec (24).

La DL 50 pour la toxine purifiée est de 200 µg/kg chez la souris, avec un temps de survie de 4 à 7 minutes.

2.4.4. Mode d'action de l'anatoxine A et de ses analogues structuraux.

*** Activité neurotoxique :**

Les expériences en laboratoire sur l'animal entier permettent de savoir s'il s'agit de troubles hépatotoxiques ou neurotoxiques. Dans le cas de troubles neurotoxiques, d'autres expériences plus ciblées sont nécessaires pour connaître les véritables effets de l'anatoxine A.

*** Activité neuromusculaire :**

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 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 (79).

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.

2.4.5. 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 frustes. 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.

2.4.6. Traitement :

A dose létale et supralétale, 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®).

2.5. Alcaloïdes : Anatoxine-A (S)

L'anatoxine-A (S) est différente de l'anatoxine-A.

Des intoxications dues à *Anabaena flos aquae* contenant des anatoxines A (S) ont été observées dans les conditions naturelles, sur des porcs (USA, Illinois), sur des canards (Illinois), et sur des chiens et des veaux (Dakota du Sud, Canada) (13,54). Les descriptions d'intoxications de chiens par des cyanobactéries en France (22,35) et les investigations de laboratoires qui ont suivi permettent de suspecter un analogue de l'anatoxine A (35).

Ce sont les signes cliniques qui expliquent le S de Anatoxine A (S), car on observe les mêmes symptômes nerveux qu'avec l'anatoxine A mais avec une intense salivation en plus.

La mort survient par arrêt respiratoire.

2.5.1. Structure chimique :

C'est un ester N-hydroxyguanidine méthyl phosphate, d'un poids moléculaire de 252 daltons.

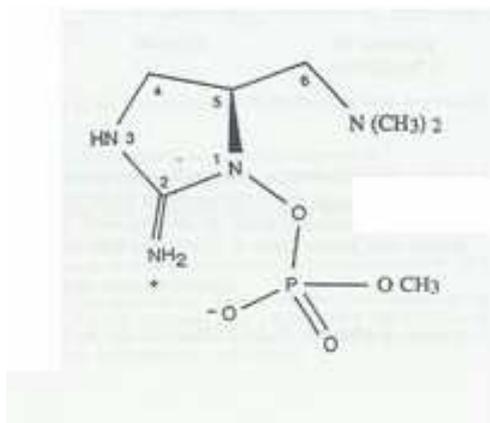


Figure 6 : Structure chimique de l'anatoxine A (S). (18)

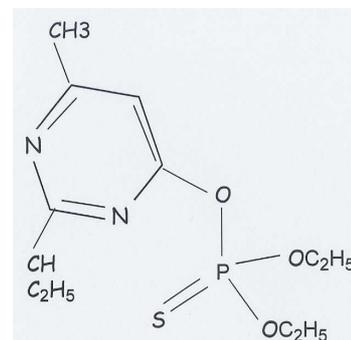


Figure 7 : Structure chimique du diazinon (insecticide organophosphoré) (Cours de Toxicologie clinique, P. Berny, ENVL).

A titre de remarque, nous avons trouvé intéressant de prendre un exemple d'organophosphoré, le diazinon et de comparer sa structure avec celle de l'anatoxine A (S).

Nous pouvons ainsi nous rendre compte de la parenté structurale de l'anatoxine A (S) avec les organophosphorés. Ceci nous permettra par la suite de mieux comprendre le mode d'action de l'anatoxine A (S).

2.5.2. Dose létale.

La DL 50 de l'anatoxine A (S) par voie intrapéritonéale chez la souris est de seulement 20 µg/kg. L'anatoxine A (S) est donc dix fois plus toxique que l'anatoxine A. A la DL 50, le temps de survie de la souris est de 10 à 30 minutes (27).

2.5.3. Mode d'action de 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 (19). Elle ne franchirait pas la barrière hémato-méningée du fait de sa polarité (4).

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 (76).

C'est un inhibiteur très puissant, plus puissant que de nombreux organophosphorés.

Les études menées pour évaluer l'interaction entre l'anatoxine-A (S) et l'acétylcholinestérase ont montré que la liaison du substrat et celle des inhibiteurs irréversibles impliquent l'attachement à deux sites de fixation sur la molécule d'acétylcholinestérase. Ces 2 sites sont distants de 5 Å et constituent le site actif de l'enzyme.

Le premier est le site anionique, qui lie la partie cationique du substrat ou de l'inhibiteur. Le second site de l'enzyme est le site d'hydrolyse.

Le mécanisme d'attachement de l'anatoxine-A (S) utilise les deux sites de fixation de l'acétylcholinestérase, mécanisme analogue à celui de l'acétylcholine, mais de façon irréversible (55).

2.5.4. Signes cliniques.

Ils 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) (19), 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.

Les rongeurs de laboratoire semblent mieux supporter les effets de l'intoxication, lorsque l'algue est administrée par voie orale. Par contre les symptômes sont aussi violents que chez les grandes espèces lorsque l'injection d'algues se fait par voie intrapéritonéale.

Les chiens intoxiqués en France (22,35) ont présenté des symptômes nerveux (salivation abondante, hyperesthésie, ataxie, coma) parfois seuls ou associés à des troubles digestifs (diarrhée, vomissements). Dans les cas d'intoxication suraiguë, les symptômes nerveux ont été suivis de la mort en moins d'une heure.

2.5.5. 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.

2.5.6. Conditions naturelles.

Des accidents récents ont eu lieu sur des animaux domestiques en France, en 2002 et 2003, lors de fortes chaleurs estivales. Ce sont les premiers cas rapportés en France. Ils feront l'objet d'une troisième partie, dans laquelle ils seront traités plus en détail.

Dans les gorges du Tarn (Lozère), en 2002, des intoxications de chiens (vingt-six), avec symptômes nerveux et mort rapide, ont été signalées aux services vétérinaires (22). Lors

des autopsies effectuées à l'Ecole Vétérinaire de Lyon, aucune lésion spécifique n'a été mise en évidence sur les organes, et aucun appât n'a été trouvé dans les contenus stomacaux. Seul un mélange d'eau, de vase et d'algues a été retrouvé dans l'estomac de plusieurs animaux. Des analyses toxicologiques menées au Laboratoire de Toxicologie de l'Ecole Vétérinaire de Lyon ont montré la présence d'inhibiteurs des cholinestérases dans ces prélèvements. Des échantillons d'eau prélevée sur le site des accidents ont été envoyés à l'Institut Pasteur à Paris, qui a isolé l'anatoxine A dans ces échantillons.

L'ensemble de ces éléments laisse à penser que ces accidents sont très probablement dus à la prolifération de cyanobactéries neurotoxiques productrices d'anatoxine A. Les cyanobactéries *Lyngbya*, *Limnothrix*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* ont été identifiées sur des échantillons d'eau prélevés sur les lieux des accidents.

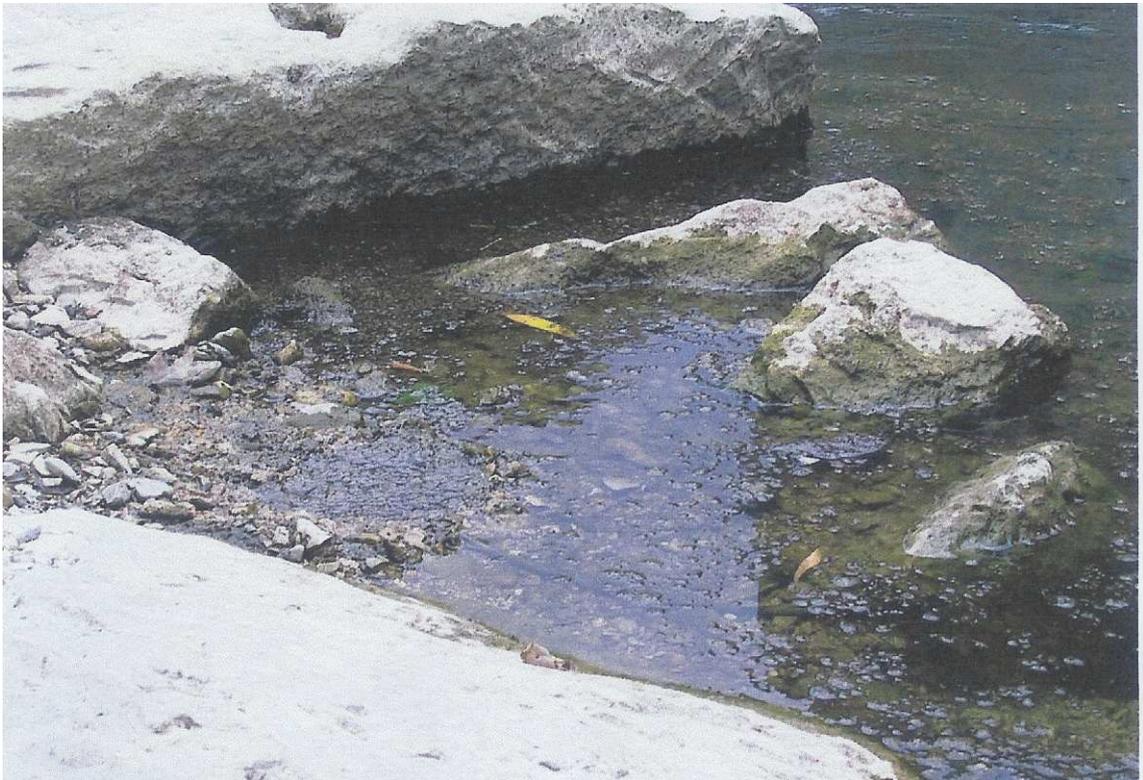


Photo 3: Berge des Gorges du Tarn (Lozère) en Août 2003. (MEROT, 2004) (22)

En 2003, dans la rivière La Loue (Jura), lors de fortes chaleurs les 11 et 14 Septembre, des accidents similaires ont eu lieu. Trois chiens ont montré des signes d'intoxications après s'être promenés au bord de l'eau. Deux des trois chiens sont morts. Les symptômes étaient essentiellement nerveux et digestifs. De la vase et des algues ont été retrouvées dans l'estomac des chiens autopsiés. Une identification du phytoplancton dans le contenu stomacal et sur le site a été entreprise. De nombreuses espèces appartenant aux cyanobactéries y ont été trouvées en grande quantité (35).

La recherche de toxines a aussi été effectuée. Les résultats ont montré qu'il y avait une absence d'hépatotoxines dans les échantillons (recherche de microcystine). Par contre, par méthode analytique HPLC/spectre UV, un analogue de l'anatoxine-A a été détecté. (chromatogramme très semblable). Pour identifier l'analogue de l'anatoxine-A, il est nécessaire de le caractériser par spectrométrie de masse. Le résultat n'est pas encore connu.

2.6. Les aphantoxines. (dont les saxitoxines).

2.6.1. Présentation.

Les aphantoxines ont été mises en évidence au début des années 70. Ce sont des toxines marines produites par des dinoflagellés, en particulier *Alexandrium spp.* et *Gymnodinium spp.* (85). Elles sont responsables d'intoxications alimentaires humaines car elles peuvent être concentrées dans les coquillages.

Plus récemment, elles ont été isolées à partir d'efflorescences à *Aphanizomenon flos aquae* et sont rencontrées moins fréquemment que les fleurs d'eaux à *Microcystis* et *Anabaena*.

De 1964 à 1988, elles ont été suspectées d'être à l'origine de morts de poissons, puces d'eau dans des lacs au USA et auraient été à l'origine d'apparition de dermatites et troubles gastro-intestinaux chez l'homme.

2.6.2. Structure chimique :

Les saxitoxines ou « paralytic shellfish poisons » forment une famille de plus de 20 molécules avec une structure tétrahydropurine. Leur poids moléculaire va de 241 à 491 Daltons.

Plusieurs aphantoxines I à V, en fonction de la substitution de 5 radicaux R1 à R5 (cf figure), ont été isolées à partir de cultures provenant d'échantillons prélevés dans les lacs du New Hampshire.

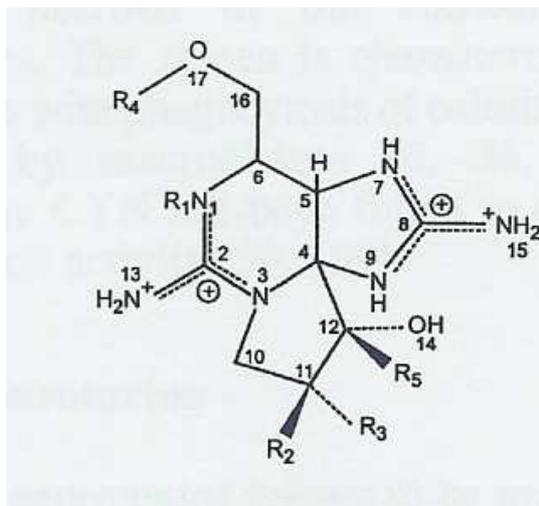


Figure 8 : Structure chimique des PSPs (Paralytic Shellfish Poisons), d'après LAWTON *et al.*, 1999 (49)

Par chromatographie sur couche mince et HPLC, on a montré que l'aphantoxine I était la néosaxitoxine (neoSTX), et l'aphantoxine II la saxitoxine (STX), cyanotoxines les mieux connues aujourd'hui. D'autres aphantoxines existent, mais sont plus difficilement identifiables.

2.6.3. Symptômes.

Les symptômes sont très voisins de ceux provoqués par les anatoxines, qui étaient connues au départ pour leurs capacités à paralyser les muscles des poissons, puces d'eau et souris, jusqu'à entraîner leur mort (72, 42) par paralysie des muscles respiratoires.

2.6.4. Mode d'action.

De nombreux variants existent, et selon la toxine inoculée, la toxicité chez la souris varie considérablement.

La saxitoxine STX est la toxine la plus puissante : la DL50 chez la souris est de 10 µg/kg lors d'une injection intrapéritonéale.

Certaines toxines isolées à partir de *Lyngbya wollei* (LWTX 1 à 6) LWTX 1, LWTX 4 et LWTX 6 peuvent être jusqu'à 165 fois moins toxiques que la STX (65).

Malgré cette variabilité, toutes ces toxines agissent de la même façon : la transmission nerveuse est bloquée lorsque la toxine se fixe sur le site 1 des canaux sodium, ce qui entraîne la paralysie des muscles (15).

2.7. Alcaloïdes dermatotoxiques : aplysiatoxines et lyngbyatoxines.

Elles sont rencontrées chez les cyanobactéries marines benthiques telles que *Lyngbya*, *Oscillatoria* et *Schizothrix*.

Les dermatotoxines lyngbyatoxines A et aplysiatoxines peuvent créer des dermatites sévères chez les baigneurs lorsqu'ils rentrent en contact avec des filaments bactériens (irritation cutanée, oculaire, respiratoire). Elles sont connues pour causer des dermatites, empoisonnements et morts d'animaux au Japon et à Hawaï (3) (64).

L'activité inflammatoire de *Lyngbya* est due aux aplysiatoxines et debromoaplysiatoxines qui sont potentiellement promotrices de tumeurs (60).

D'autres cyanobactéries du genre *Lyngbya* ont été à l'origine de dermatites et d'inflammations gastro-intestinales chez l'homme (11).

Récapitulatif des principales toxines produites par les cyanobactéries.

Groupes de toxines	Organe cible primaire (Mammifères)	Genres de Cyanobactéries
<i>Peptides cycliques</i>		
Microcystines	Foie	<i>Microcystis, Anabaena, Planktothrix, Nostoc, Hapalosiphon</i>
Nodularine	Foie	<i>Nodularia</i>
<i>Alcaloïdes</i>		
Anatoxine-A	Système nerveux (synapses)	<i>Anabaena, Planktothrix, Aphanizomenon</i>
Anatoxine-a (S)	Système nerveux (synapses)	<i>Anabaena</i>
Aplysiatoxines	Peau	<i>Lyngbya, Schizothrix, Planktothrix</i>
Cylindrospermopsines	Foie	<i>Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Umezakia</i>
Lyngbyatoxine-a	Peau, tractus gastro-intestinal	<i>Lyngbya</i>
Saxitoxines	Axones	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbya, Cylindrospermopsis</i>
<i>Lipopolysaccharides (LPS)</i>	Potentiel irritant, affecte tout tissu exposé	Toutes

Figure 9 : principales toxines produites par les cyanobactéries (77).

3. CYANOTOXINES ET INTOXICATIONS ANIMALES.

3.1. Recueil de quelques cas bibliographiques.

3.1.1. Dans le monde.

Les premiers empoisonnements d'animaux domestiques par des cyanobactéries ont été relatés en 1878 en Australie, sur le Lac Alexandrina (32). Plus récemment, une efflorescence à cyanobactéries formée d'une monoculture de *C. raciborkii* a été mise en cause en 1999 dans la mortalité de trois vaches et dix veaux dans le Queensland (Australie) (71). Des cylindrospermopsines ont été isolées à partir de prélèvement d'eau sur le site. C'est la première intoxication animale attribuée à *C. raciborkii* qui a été publiée. L'Australie est régulièrement touchée par la formation d'efflorescences à cyanobactéries toxiques (56).

En Amérique du Nord, de nombreux cas d'intoxication de bétail sont relatés, dans les conditions naturelles et expérimentales. En 1987, GALEY *et al.* (33) y décrivent des cas de mortalités de bétail et suspectent *M. aeruginosa* d'être responsables d'hépatotoxicoses chez des vaches laitières. Cette cyanobactérie avait contaminé l'eau de boisson des animaux.

La répartition des cyanobactéries d'eau douce à potentiel toxique s'étend à tous les continents, l'Afrique et l'Asie ne sont pas épargnées. Des cas d'intoxication de bétail par des cyanotoxines hépatotoxiques sont décrits en Afrique, ainsi qu'un cas d'intoxication d'un rhinocéros blanc par *M. aeruginosa* (78). L'Afrique du Sud est souvent citée dans les publications.

Des observations de terrain concernant des mortalités de bovins et ovins (53, 58) ont incriminé des cyanotoxines produites par *Microcystis aeruginosa* (microcystines), *Nodularia spumigena* (nodularines), *Anabaena circinalis* (saxitoxines) et *Cylindrospermopsis raciborskii* (cylindrospermopsines). Cette dernière est une cyanobactérie tropicale qui prolifère fréquemment en Australie. Tous les types de cyanotoxines peuvent y être rencontrés.

3.1.2. En Europe.

Même si de nombreuses efflorescences à cyanobactéries potentiellement toxiques sont décrites ces dernières années dans plusieurs pays, on trouve en Europe encore peu de cas confirmés d'intoxications d'animaux domestiques. Les cyanobactéries sont souvent suspectées mais le diagnostic de certitude reste délicat à établir.

Des morts de bétail et de chiens attribuées à *Microcystis aeruginosa* et *Nodularia spumigena* ont été décrits en Ecosse par EDWARDS *et al.* en 1992 (25). Six chiens sont morts de façon brutale après leur baignade dans un lac, et des cyanobactéries du genre *Oscillatoria* avaient été détectée dans l'eau. En Norvège, des cas similaires ont été décrits par

NEHRING en 1993 (61). Les signes cliniques décrits dans ces cas précis étaient des trémulations musculaires, une importante salivation, des convulsions associées une perte d'appétit dans les cas les moins graves. A l'autopsie, on observait une nécrose du foie avec dissociation des hépatocytes.

En France, une enquête nationale menée à l'aide d'un questionnaire (annexe 2) couvrant l'ensemble du territoire français a été menée en 1999 (70) et a récemment été mise à jour, en novembre 2003 (44). Ce questionnaire a été élaboré par les scientifiques de l'Institut Pasteur de Paris et a été diffusé à raison de 1000 exemplaires à divers organismes publics français (DDASS, DIREN, CSP, Parcs nationaux, IFREMER, EDF, ...). Ce programme de recherche nommé EFFLOCYA regroupe la compétence de divers scientifiques français et vise à évaluer le risque pour la santé publique de la prolifération de cyanobactéries en France. Les chercheurs de l'INRA, associés à l'UMR CARTEL (Centre Alpin de Recherche sur les Réseaux Trophiques des Ecosystèmes Limniques) et à l'Institut Pasteur sont les principaux acteurs de ce programme.

Environ 150 réponses ont été récoltées. Les résultats montrent que les cyanobactéries potentiellement toxiques peuvent affecter n'importe quel plan d'eau de l'Hexagone (70). Les genres responsables de la production de toxines, le plus souvent hépatiques, sont *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* et *Cylindrospermopsis*.

Les recherches de ces équipes sur le territoire français (44,70) permettent de faire un état des lieux sur les proliférations de cyanobactéries en France et leur impact sur l'environnement. Dans l'état actuel de nos connaissances, il est difficile d'affirmer si les incidents signalés ont provoqué des troubles de santé ou des mortalités chez les vertébrés, en particulier l'homme. Les incidents sur les animaux concernent 22% des cas et sont des mortalités de poissons et d'oiseaux. Les examens vétérinaires effectués ne permettent pas d'attribuer une cause évidente à ces mortalités (70). Les incidents humains signalés concernent des gastro-entérites et des dermatoses.

Nous allons exploiter quelques exemples intéressants ci-dessous.

* Le cas de *Planktothrix rubescens* dans le Lac du Bourget.

On observe une diminution constante de la quantité de phosphates depuis la fin des années 1980 dans le plus grand lac naturel français (54 km²). Les valeurs mesurées par les scientifiques de l'INRA de Thonon Les Bains depuis les années 80, en charge de la surveillance de la qualité des eaux du lac du Bourget, montrent que les valeurs sont passées de 120 à 30 µg/L en vingt ans (70).

Malgré l'amélioration de la qualité des eaux du lac, depuis les années 1996-1997, la cyanobactérie *Planktothrix rubescens* prolifère à toute période de l'année, à toutes les profondeurs.

Cette cyanobactérie s'adapte particulièrement bien aux nouvelles conditions climatiques et nutritionnelles du lac. En effet, les eaux de surface sont dépourvues de phosphates, les populations s'enfoncent dans les profondeurs et ne connaissent pas de prédateurs. Elles sont très compétitives dans ce nouvel environnement : faible présence de nutriments, faible luminosité, stabilité du milieu. Malgré cette prolifération algale, aucun accident domestique n'est documenté à ce jour, qu'il soit humain ou animal.

* Le cas des étangs du Forez.

Un triangle reliant approximativement les villes de Feurs, Montbrison, Saint Germain Laval est concerné par de fortes proliférations de fleurs d'eau à cyanobactéries. (Sur la figure ci-dessous sont entourées les zones étudiées par les hydrobiologistes de l'INRA de Thonon les Bains).

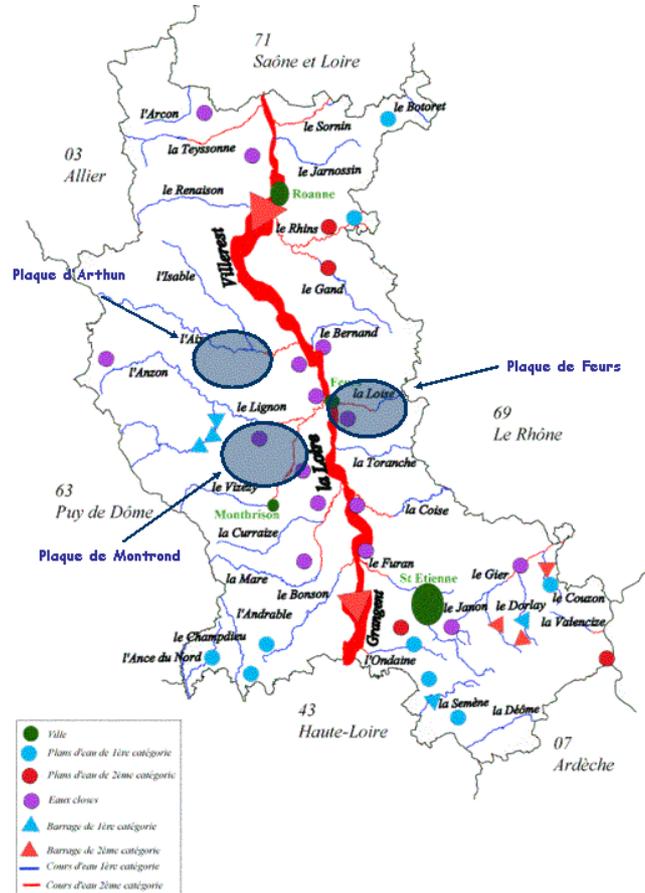


Figure 10 : La plaine du Forez (source Jacquet *et coll.*, 2003) (44).

Dans ces zones de retenues d'eau, les cyanobactéries prolifèrent en Juillet-Août, avec des biomasses souvent très importantes.

Elles causent souvent des mortalités piscicoles par désoxygénation ou libération de toxines.

Les espèces régulièrement rencontrées sont *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*.

Les conditions de milieu sont extrêmement favorables à la prolifération d'efflorescences à cyanobactéries en été. En effet, le milieu est peu colonisé par les algues vertes, les eaux sont « claires ». Elles sont riches en phosphates. (l'enrichissement est régulier depuis 1930). La température y est élevée à la saison chaude.

Les mesures et dénombrements de cyanobactéries comme *Microcystis* et *Anabaena* montrent qu'elles sont très abondantes lors de proliférations d'algues en été.

* Le cas de la région Bretagne.

La région Bretagne est particulièrement suivie par les hydrobiologistes ces dernières années. Elle est particulièrement exposée au risque de prolifération d'algues, d'où un suivi depuis 10 ans sur les cyanobactéries dans l'eau de loisir et l'eau potable.

En effet, l'agriculture est intensive dans la région, et il existe peu de réserves d'eaux souterraines. Les lacs et cours d'eau sont contaminés majoritairement par *Planktothrix* et *Microcystis*.

L'année 2003 a été exceptionnelle par son taux d'ensoleillement et sa chaleur estivale. L'été a été marqué en Bretagne par 8 interdictions de baignade dans la région, une prise d'eau fermée à la consommation publique, une interdiction de pêche (cette dernière étant due à la sécheresse).

Une grande majorité des sites échantillonnés est contaminée par les cyanobactéries (voir tableau ci-dessous).

Prélèvement de l'année 2000	Juillet	Août	Septembre
Nombre de sites échantillonnés	35	33	37
% de sites contaminés par les cyanobactéries	86%	94%	97%
% de sites avec cyanobactéries prioritaires	77%	87%	64%
% d'échantillons avec microcystines	79%	59%	83%

Figure 11 : contamination des eaux bretonnes par les cyanobactéries en été. (Source S. Jacquet INRA, 2003) (44).

* Le cas de *Cylindrospermopsis raciborskii* (L'étang des Francs Pêcheurs).

Cette espèce a été initialement décrite comme une espèce typiquement tropicale et subtropicale. Aujourd'hui, elle est présente sur tous les continents. En effet, depuis une cinquantaine d'années, elle est détectée dans des latitudes de plus en plus tempérées. Elle était présente en Asie du Sud-Est à la fin du 19^{ème} Siècle, en Grèce dans les années 30, en Asie centrale dans les années 50, en Hongrie dans les années 60, en Autriche, France, Allemagne dans les années 90. Elle est particulièrement représentée sur un des sites d'Ile de France recensés par le programme EFFLOCYA. Toutes les années, l'étang des Francs Pêcheurs (plan d'eau de pêche privé) est envahi par une efflorescence à *Cylindrospermopsis raciborskii* (00).

C. raciborskii est tolérante à une large gamme de lumière et de température (de 15 à 40°C) (44) avec une croissance optimale correspondant à des conditions tropicales (de 25 à 35°C).

Les études sur la diversité génétique de différentes souches de *C. raciborskii* sur quatre continents montrent que les souches présentes en Europe ne résultent pas d'une colonisation récente par des souches provenant d'Afrique ou d'Australie. Il apparaît plus probable que l'extension actuelle de l'aire de distribution de cette cyanobactérie en Europe s'effectue à partir de zones refuges chaudes qui ont permis la survie de l'espèce pendant les dernières périodes de glaciation. Ces dernières décennies, le réchauffement global de la planète a pu favoriser sa dissémination.

Nous pourrions citer des exemples supplémentaires, mais globalement, l'analyse des résultats de cette enquête montre que :

- De nombreuses régions sont touchées par la présence d'algues à potentiel toxique, et font aujourd'hui l'objet d'une surveillance sanitaire. Le gouvernement français a mis en place en juin 2002 un site internet sur les eaux de baignade, mis à jour quotidiennement par la DDASS et consultable par le public, en saison touristique (<http://baignades.sante.gouv.fr>). Alarmée par les publications scientifiques, la Direction Générale de la Santé a ordonné la multiplication des sites de prélèvements d'eau, ainsi que leur nombre. Elle a mis en garde ses partenaires scientifiques (DDASS, CSP, AFSSA...) afin de surveiller les proliférations de cyanobactéries sur les sites de baignade, et d'aider les services concernés à gérer des situations à risques.
- Les températures élevées ne semblent pas être un critère décisif dans la prolifération de cyanobactéries. La disponibilité en nutriments (azote et phosphore) semble être un critère plus sélectif, les efflorescences massives s'observant plus fréquemment dans les plans d'eau eutrophes.
- La production de toxines semble d'autant plus importante que la diversité spécifique des cyanobactéries est moindre.

Après cet aperçu de la prolifération de cyanobactéries sur le territoire français, nous allons maintenant nous pencher sur des cas de proliférations d'algues qui se sont accompagnés d'accidents domestiques en France. Ces cas ont été bien décrits par les scientifiques qui sont intervenus sur ces incidents, ils sont de ce fait facilement exploitables. Nous devons pour cela remercier le Centre d'Informations Toxicologiques Vétérinaires de Lyon (CNITV), le laboratoire de toxicologie de l'ENVL, le service d'anatomo-pathologie de l'ENVL, mais encore les Directions Départementales des Services Vétérinaires des départements impliqués, l'Institut Pasteur de Paris et l'Université de Rennes.

3.2. Accidents domestiques en France, dans les Gorges du Tarn (Lozère).

3.2.1. Rappel des faits.

Durant l'été 2002, dans les gorges du Tarn, 26 chiens ont été signalés comme intoxiqués aux services vétérinaires de la Lozère, 20 sont morts.

Ces accidents ont eu lieu entre le 4 Août et le 29 Septembre 2002, avec un pic de mortalité les 17 et 18 Août, où 10 chiens sont morts en 2 jours.

Les contenus stomacaux de 8 chiens ont été analysés à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, au laboratoire de toxicologie. Dans 7 cas, des inhibiteurs des cholinestérases ont été retrouvés, ce qui signe classiquement l'ingestion de toxiques, de type organophosphorés ou carbamates.

Les recherches se sont donc orientées vers des hypothèses d'empoisonnement, dues à une malveillance ou un incident d'origine agricole.

Alertés par les incidents, les chercheurs de l'Institut Pasteur et du Muséum d'Histoires Naturelles de Paris ont effectué des analyses de l'eau du Tarn sur les lieux de baignade des chiens, suspectant une implication des cyanobactéries dans les intoxications.

Lors de l'été 2003, de nouveaux incidents ont eu lieu dans la même région. Entre le 24 Juillet et le 26 Août 2003, 11 chiens ont été intoxiqués dans les mêmes conditions que l'année précédente, 6 animaux sont morts. Les chiens morts ont tous été autopsiés à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, et des analyses toxicologiques ont à nouveau été réalisées.

Les animaux ayant survécu ont été suivis par les services vétérinaires.

3.2.2. Description des cas de l'été 2003.

Les cas de l'été 2003 ont été mieux recensés que ceux de l'année 2002, car l'expérience de l'année précédente a permis le déroulement des actions de façon plus ordonnée que l'année 2002. C'est pourquoi nous présenterons les accidents de cette année-là, où les données sont assez complètes.

Race, âge	Type de jeux	Symptômes	Résultats de l'autopsie (ENVL)	Recherche de toxiques (IDC) ENVL	Analyse de l'eau (Rennes)	Analyse de l'eau (Pasteur Paris)
Terrier, 3 ans	Baignade au camping	Symptômes nerveux, salivation puis guérison	non applicable	négative	Cyanobactéries du genre Aphaniizomenon : entre 360 et 840 cellules par mL)	non réalisé
Labrador, 2 ans	A joué dans la rivière pendant 30 mn	Hypersalivation, diarrhée, vomissements. Puis ataxie, convulsions. Mort en une heure.	congestion généralisée	Inhibiteurs des cholinestérases	492 cyanobactéries par mL : 480 du genre Aphaniizomenon, 12 du genre <i>Lyngbya</i>	absence
Croisé Labrador, 7 ans	Longue promenade sur le Tarn, boisson, léchage de galets, ingestion de vase.	Hypersalivation, incoordination motrice. Mort dans la soirée.	lésions congestives	négative	négative	absence ou flacon non exploitable
Labrador, 5 mois	Baignade de courte durée.	Souffrait d'une gastroentérite auparavant. 15 mn après baignade : hyperesthésie, ptyalisme, diarrhée, vomissements. Guérison	non applicable	négative	Prélèvement 1 : <i>Lyngbya</i> . Prélèvement 2 : <i>Oscillatoria</i> et <i>Lyngbya</i> .	Prélèvement 1 : pas de cyanobactéries Prélèvement 2 : <i>Oscillatoria</i> .
Berger du Tibet, 5 mois	Baignade, boisson, ingestion de vase	Vomissements, diarrhée, tremblements, mort en 30 mn.	lésions congestives	négative	Prélèvement 1 : inexploitable. Prélèvement 2 : Aphaniizomenon, <i>Limnospira</i> , <i>Lyngbya</i> en grande quantité.	Prélèvement 1 : filaments bactériens. Prélèvement 2 : <i>Lyngbya</i> .
Braque, 4 ans	Baignade puis ingestion de vase.	Spasmes, vomissements. Mort en moins d'une heure.	lésions congestives	négative	Prélèvement 1 : inexploitable. Prélèvement 2 : Aphaniizomenon, <i>Limnospira</i> , <i>Lyngbya</i>	Prélèvement 1 : filaments bactériens. Prélèvement 2 : <i>Lyngbya</i> .

Figure 12 : Description des cas de chiens accidentés après baignade sur les berges du Tarn. (Source DDSV de la Lozère, 2003).

Race, âge	Type de jeux	Symptômes	Résultats de l'autopsie (ENVL)	Recherche de toxiques (IDC) ENVL	Analyse de l'eau (Rennes)	Analyse de l'eau (Pasteur Paris)
Labrador, 4 mois	Baignade seule	Symptômes nerveux, traitement symptomatique puis guérison	non applicable	non faite	Prélèvement 1 : 108000 <i>Oscillatoria</i> par mL, 0,5 µg par L microcystines. Prélèvement 2 : <i>Oscillatoria</i> et <i>Aphanizomenon</i> .	présence de cyanobactéries dans tous les échantillons
Berger allemand, 2 mois	Baignade seule	Symptômes nerveux 15 mn après baignade, traitement symptomatique puis guérison	non applicable	non faite	Détection de cyanobactéries du genre <i>Aphanizomenon</i> , <i>Limnolthrix</i> , <i>Lyngbya</i> . Cyanotoxines : 0,17 µg/L microcystines.	présence de cyanobactéries dans tous les échantillons
Jack Russel	Léchage de galets recouverts d'algues.	Mort très rapide (moins de 10 mn) après convulsions, tremblements, salivation abondante.	lésions congestives	présence d'inhibiteurs des cholinestérases	Détection de cyanobactéries du genre <i>Aphanizomenon</i> , <i>Lyngbya</i> .	traces de cyanobactéries dans les échantillons. Détection de neurotoxines sur un échantillon.
Rothweiler, 9 ans.	Baignade au niveau de la digue.	Evolution rapide (environ 30 mn). Symptômes nerveux puis mort.	lésions congestives	négative	Détection de cyanobactéries du genre <i>Aphanizomenon</i> , <i>Lyngbya</i> .	traces de cyanobactéries dans les échantillons. Détection de neurotoxines sur un échantillon.
Croisé Malinois, 5 mois.	Boisson de l'eau du Tarn.	Symptômes nerveux peu de temps après. Traitement symptomatique. Guérison.	non applicable	négative	Détection de peu de cyanobactéries (48 par mL)	Détection de cyanobactéries en faible quantité.

Figure 12 bis : Description des cas de chiens accidentés après baignade sur les berges du Tarn. (Source DDSV de la Lozère, 2003).

3.2.3. Synthèse des cas cliniques :

* Conditions des intoxications :

Les chiens qui ont présenté des signes d'intoxication aux abords des berges du Tarn s'étaient tous baignés plus ou moins longtemps, avec parfois des jeux dans l'eau. Quelques animaux ont bu de l'eau, parfois même mangé de la vase et léché des galets souillés d'algues. Les animaux s'étant simplement baigné sans avoir bu intentionnellement de l'eau de la rivière ont souvent été sauvés, suite à un traitement symptomatique.

* Animaux concernés :

Les animaux ayant présenté des signes d'intoxication étaient souvent jeunes, mais tous les âges sont représentés et sont d'une grande variété de races (et donc de poids d'animaux), même si la race Labrador est souvent citée. Cela est peut-être dû à la représentation plus importante d'animaux de cette race, et peut-être aussi au fait que c'est une race de chiens qui aime l'eau.

* Lieux :

La majorité des accidents ont eu lieu sur un même tronçon de rivière, au niveau de la commune de Sainte Enimie. D'après les photos prises sur le site lors des accidents, c'est un lieu de faible profondeur, et où le courant est lent. Mais outre ce lieu, les aménagements créés par les loueurs de canoës et les piscines aménagées pour la baignade sont à l'origine de surface stagnantes sur tout le cours d'eau.

* Signes cliniques :

Les signes d'intoxication des chiens atteints étaient des signes neurologiques pour la totalité des cas, de gravité plus ou moins prononcée. Les signes cliniques allaient des simples tremblements aux convulsions, coma puis mort dans la plupart des cas. Ils étaient parfois associés à d'autres signes cliniques, tels que ptialisme, vomissements, diarrhée.

* Analyses :

Dans le cadre de la recherche de toxiques dus à un acte de malveillance ou à un accident d'origine agricole, aucun laboratoire, vétérinaire ou de police, n'a pu mettre en évidence des molécules telles que métaldéhyde, strychnine, crimidine, chloralose, organochlorés, organophosphorés ou carbamates.

En parallèle, des chercheurs de l'Institut Pasteur et du Muséum d'Histoires Naturelles de Paris ayant évoqué la possibilité d'intoxication par des cyanobactéries, des analyses d'eau du Tarn ont été faites, sur les lieux des accidents.

D'autre part, des recherches ont été effectuées à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. Les animaux décédés ont été autopsiés à l'ENVL, et le contenu gastrique des animaux a été confié au laboratoire de toxicologie de l'ENVL, pour y effectuer des recherches d'Inhibiteurs des Cholinestérases.

* Résultats :

- Résultats d'autopsie :

Les autopsies réalisées sur les animaux décédés montrent toutes des lésions congestives, sans spécificité.

- Résultats d'analyses de l'eau :

Deux prélèvements d'eau ont été effectués, sur chaque lieu d'accident, peu après que les animaux aient présenté des signes cliniques. Les prélèvements ont été effectués par les techniciens du Conseil Supérieur de la Pêche, qui étaient immédiatement prévenus par les autorités, grâce au réseau de surveillance mis en place.

Les analyses faites ont permis la détection de cyanobactéries du genre *Aphanizomenon*, *Limnothrix*, *Lyngbya*, *Oscillatoria* par le laboratoire d'analyse de l'eau à Rennes. Le comptage cellulaire donne des résultats très variés, allant de 192 cellules par mL jusqu'à 80000 cellules par mL.

Dans deux cas, des microcystines ont été isolées.

Le laboratoire Pasteur à Paris a effectué les mêmes analyses de son côté, et a lui aussi détecté des cyanobactéries dans les échantillons d'eau, ainsi que des neurotoxines dans deux cas.

* Rôle des conditions climatiques :

Les conditions météorologiques exceptionnelles de l'été 2003 ont certainement joué un rôle prépondérant dans la prolifération exceptionnelle des cyanobactéries dans les Gorges du Tarn à cette période de l'année. Tous les accidents sont survenus lors de la période de canicule, entre le début du mois d'août et la fin du mois de septembre.

Les jeux d'eau et la boisson de l'eau de la rivière se sont aussi déroulés aux heures chaudes de la journée (entre 10h et 17h).

Les données recueillies par les intervenants sur ces accidents auprès de Météo France sont des mesures fiables et régulières, mais elles ne se situent pas forcément très près des sites intéressants. Les paramètres choisis comme étant d'éventuels facteurs aggravants de la prolifération algale sont les relevés quotidiens de pluie, les températures minimales et maximales sous abri, la moyenne des températures horaires sous abri, la durée d'insolation ainsi que la direction et la force du vent.

D'après les conclusions de l'étude interrégionale du Grand Ouest sur la prolifération des cyanobactéries en eau douce, l'analyse des données météorologiques recueillies a permis d'observer une corrélation significative entre les populations de cyanobactéries et la

température de l'air cumulée sur une période de 3 à 5 jours (corrélation non significative pour la température de l'air du jour même) (10).

* Qualité de l'eau :

Les observations du site montrent que ces zones de la rivière sont eutrophisées, avec un important développement d'algues sur les berges et dans les zones de faible profondeur.

C'est une rivière où les nutriments et la pollution sont relativement importants à l'approche de la saison estivale. En effet, la forte fréquentation des lieux en été occasionne de nombreux déchets, rejetés par les touristes et les campings.

En période estivale, le Tarn est sujet à une diminution de son niveau d'eau, qui occasionne des zones de stagnation et une profondeur inférieure à 3 mètres.

Ces différents facteurs réunis augmentent fortement le risque de prolifération anormale de cyanobactéries à potentiel toxique dans l'eau du Tarn.

* Mesures prises

Suite aux morts brutales des 20 chiens en 2002 dans les Gorges du Tarn, un réseau de surveillance avait été mis en place pour les années à venir. (Source : Rapport de la Sous-Préfecture de Florac, Lozère, 2003 : « Morts brutales de chiens dans les Gorges du Tarn »).

Il a d'ailleurs été bien utile, puisque lors de l'été 2003, des accidents du même type se sont reproduits et ont été gérés rapidement. Des mesures d'urgence avaient été prises et les recherches ont gagné en efficacité.

Depuis ces incidents, le groupement ECOBAG (Environnement, Ecologie, Economie du Bassin Adour-Garonne) a mis en place une surveillance des eaux du Tarn. C'est un groupement qui a pour mission principale l'interfaçage entre les acteurs de la recherche et de la demande de la société. Dans ce cas précis, c'est la DDASS qui est chargée de l'évaluation des risques sanitaires. Les indicateurs d'alertes comme la température de l'eau, l'eutrophisation, la prolifération algale sont suivis pendant les périodes à risque.

- Prise en charge des animaux et lien avec les professionnels de santé : vétérinaires, médecins, pharmaciens.

Un courrier d'information a été adressé aux vétérinaires, premier interlocuteur des personnes dont l'animal présente des problèmes de santé après une baignade. Une large campagne d'information sur la collecte de données (commémoratifs de l'accident, lieu de baignade) a été effectuée, un protocole de soins standard de première urgence a été établi avec les vétérinaires, et la conservation des cadavres pour autopsie a été préconisée.

La DDSV était tenue d'informer rapidement la gendarmerie en cas d'incident, en prévision de l'enquête de police (recherche d'intoxication criminelle ou pollution agricole).

- Prélèvements d'eaux et analyses : surveillance sanitaire de la qualité de l'eau.

Une formation du personnel du Conseil Supérieur de la Pêche (CSP) a été faite en vue d'effectuer les prélèvements d'eau pour les analyses en laboratoire, pour caractériser les toxiques.

Globalement, les informations partent du terrain (professionnels de santé) et sont communiquées aux autorités (Préfecture, Gendarmerie, CSP). Les prélèvements d'eau et les cadavres d'animaux sont acheminés vers les laboratoires compétents.

Les résultats, lorsqu'ils sont connus, sont communiqués aux autorités (DDASS, Préfecture) qui prennent les mesures nécessaires pour protéger la santé publique et font diffuser l'information aux professionnels de santé et en Mairie pour informer la population.

Ces cas de morts de chiens en 2002 et 2003 en Lozère ont été bien décrits (22), et laissent penser qu'un développement de cyanobactéries à potentiel neurotoxique est à l'origine de la mort de ces animaux.

En l'état actuel de nos connaissances, la relation entre la mort des chiens et la présence des cyanobactéries sur les lieux des accidents peut être établie de façon quasiment certaine.

3.3. Accidents domestiques en France, sur la rivière la Loue (Jura).

3.3.1. Historique.

Le 11 et le 14 Septembre 2003, trois chiens ont montré des signes d'intoxications après s'être promenés sur les bords de la rivière la Loue. Deux de ces chiens sont morts.

3.3.2. Description du site.

Elle a été effectuée par un agent de la Direction Départementale des Services Vétérinaires du Jura.

Le temps était chaud (température de l'air 28°C sous abri) et ensoleillé. La rivière avait une faible profondeur et le courant était inexistant. L'eau paraissait claire, et ne présentait ni couleur ni odeur anormale. Une large bande de galets ronds est recouverte d'algues sur toute la longueur de la berge. Le niveau de l'eau a baissé récemment, car on peut voir de nombreux cailloux recouverts d'algues vertes en cours de dessiccation sur les berges.

3.3.3. Description des cas cliniques.

Cas clinique n°1 : Dogue de Bordeaux de 20-25 kg.

Pendant la promenade, le chien joue dans l'eau. Peu de temps après, il est abattu, présente de l'ataxie et des signes digestifs, en particulier des vomissements de vase. Il arrive mort à la clinique vétérinaire du Dr Foulquié à Dole. L'autopsie révèle la présence de vase dans l'estomac et le duodénum.

Le corps du chien est conservé au congélateur.

Cas clinique n°2 : Yorkshire adulte de 2,5 kg.

Après la promenade et la baignade, le chien présente des signes neurologiques (tremblements, difficultés respiratoires), suivis d'un arrêt respiratoire. Il est ventilé par son propriétaire mais meurt rapidement.

Le corps de l'animal est enterré.

Le contenu stomacal des deux animaux est récolté pour analyse en laboratoire, en particulier en vue de la recherche de cyanobactéries toxiques.

3.3.4. Analyses d'échantillons d'eau.

Suite à ces accidents, des récoltes de matériel (eau et algues) ont été effectués sur les berges de la Loue.

Deux équipes de chercheurs se sont partagés la tâche : une équipe de chercheurs de l'INRA basée à Thonon les Bains a été dépêchée sur place pour effectuer des récoltes de sédiments, de vase et d'eau dans la zone concernée, et des prélèvements ont été acheminés par envoi postal réfrigéré à une équipe de chercheurs du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris.

3.3.5. Résultats.

Identification des espèces de cyanobactéries à partir du contenu gastrique des deux chiens :

Cas du Dogue de Bordeaux :

De nombreuses Diatomées et Chlorophycées sont dénombrées.

Les cyanobactéries sont elles aussi bien représentées : on retrouve les genres *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium* et *Tolypothrix*.

Cas du Yorkshire :

Outre les Diatomées et Chlorophycées, on retrouve les cyanobactéries du genre *Oscillatoria* et *Phormidium*.

Les cyanobactéries du genre *Pseudanabaena* sont elles aussi représentées, mais en minorité.

3.3.6. Recherche de toxicité des prélèvements.

La recherche d'hépatotoxines du type microcystines s'est révélée infructueuse, de même que la recherche de saxitoxines.

Par contre, la recherche de neurotoxines de type anatoxines par méthode HPLC couplée à une détection UV s'est avérée positive.

En effet, un pic a été obtenu dans les deux chromatogrammes. A l'instar du standard d'anatoxine-A, ces pics ont un spectre caractéristique à 227 nm. Mais les temps de rétention sont différents entre les pics de ces extraits de la Loue et ceux obtenus pour le standard de l'anatoxine-A. Ces pics correspondent à un analogue de l'anatoxine-A.

Cet analogue de l'anatoxine-a détecté dans les échantillons prélevés sur les berges de la Loue est très probablement à l'origine des effets cliniques ayant causé la mort des chiens qui se sont baignés dans la rivière et ont bu de l'eau contenant des cyanobactéries à potentiel toxique.

3.3.7. Qualité de l'eau.

La Loue fait l'objet depuis quelques années d'un projet d'amélioration de la qualité de ses eaux. Elle fait partie des cours d'eau prioritaires dans le plan d'action du SDAGE (Schéma Directeur d'Aménagement et de Gestion des Eaux). Ce projet réunit les compétences de l'Agence de l'Eau de Rhône Méditerranée Corse et de la DIREN (Direction Régionale de l'Environnement) de Rhône Alpes.

La Loue est une rivière moyennement eutrophisée, bien qu'elle ne soit pas considérée comme en danger écologique aujourd'hui. Toutefois, la lutte contre l'eutrophisation de ce cours d'eau est considérée comme un enjeu tout particulier en terme de sauvegarde patrimoniale et de potentiel économique.

L'apport des nutriments provient en grande partie de l'élevage agricole, plus rarement de l'industrie et des déchets domestiques.

Une étude menée par l'Agence de l'Eau de 1995 à 1998 a montré que les apports d'azote provenaient en grande partie des cultures, prairies et forêts. L'apport de phosphore est en majorité dû à l'élevage (6).

Pour s'assurer de la qualité de l'eau sur les sites de baignade, des contrôles sanitaires sont effectués chaque été par la DDASS. Ils portent sur des relevés de température de l'air et

de l'eau, la coloration de l'eau, sa turbidité, la présence d'algues, de substances tensio-actives, et d'éventuelles odeurs anormales. Ces observations de terrain sont couplées à des analyses bactériologiques, qui portent sur les recherches classiques de bactéries comme les coliformes totaux, *Escherichia coli*, les streptocoques fécaux, mais aussi sur le comptage et la diagnose d'algues telles que les cyanobactéries.

Les mesures sont effectuées de la fin du printemps à la fin de l'été, et les résultats montrent que lors des fortes chaleurs en Juillet-Août, la qualité de l'eau est médiocre.

(Source : Communauté de communes du Val d'Amour, Jura Tourisme France, site Internet <http://www.valdamour.com/index.php3/page/eaux>).

Après analyse de ces cas dans des rivières françaises, plusieurs faits sont à noter :

Les aménagements des cours d'eau, leur pollution par l'activité humaine et les températures estivales sont autant de facteurs écologiques et climatiques qui semblent primordiaux dans l'apparition d'efflorescences à cyanobactéries toxiques.

Malgré les accidents survenus sur de nombreux animaux domestiques lors de leur baignade, aucun accident humain n'a été recensé, malgré la forte fréquentation des lieux pendant l'été. L'explication peut simplement venir du fait que les gens évitent de se baigner dans les lieux où l'eau semble polluée et ne boivent pas l'eau stagnante. Cette remarque permet de mettre en garde les parents, car les enfants, déjà plus fragiles que les adultes, ont plus de facilités pour jouer dans les eaux de faible profondeur, parfois souillées. Les enfants en bas âge pourraient même jouer avec des galets recouverts d'algues et les porter à la bouche. Le risque paraît à ce moment-là plus important. Les adultes semblent peu exposés, mais il convient de rester vigilant et de veiller sur les enfants qui jouent à proximité d'eaux peu profondes et stagnantes.

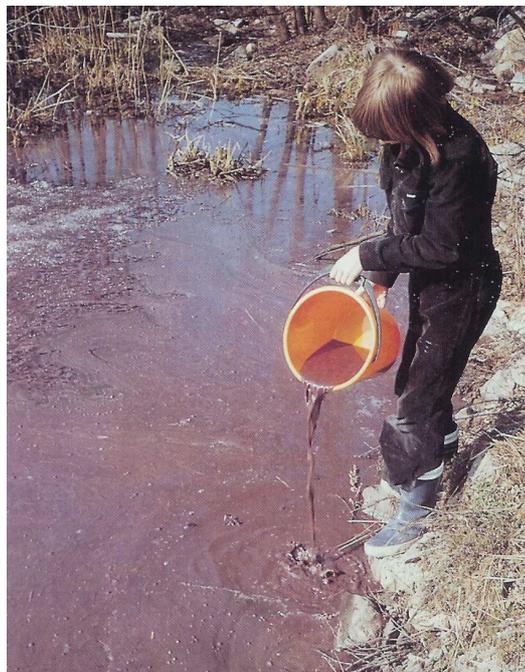


Photo 4 : forte concentration de l'eau en cyanobactéries du genre *Planktothrix*
(Source : MUR *et al.* 1999) (59)

La majorité des articles qui mettent en cause la toxicité des cyanobactéries décrit des cas d'intoxication d'animaux domestiques. C'est leur valeur affective (chiens) et économique (animaux de rente) qui font que des recherches sont menées pour élucider leur mort. Les investigations ne sont généralement pas menées lors de morts suspectes d'animaux sauvages, aux abords d'étendues d'eaux. De ce fait, il semble très probable que l'implication des cyanobactéries toxique dans la mortalité et la morbidité d'animaux sauvages soit sous-estimée.

Si la détection des toxines de cyanobactéries est maintenant bien maîtrisée pour la plupart d'entre elles, les différentes publications qui mettent en cause ces toxines dans la mortalité d'animaux aux abords de lacs ou de rivières montrent qu'il n'est jamais évident d'incriminer à coup sûr les cyanobactéries. Les signes cliniques des animaux intoxiqués sont fugaces et classiquement rencontrés lors d'intoxications par des inhibiteurs des cholinestérases. De même, les autopsies montrent des lésions qui sont peu spécifiques.

Nous allons découvrir dans la troisième partie comment détecter les cyanotoxines dans les efflorescences à cyanobactéries et les mesures à prendre pour prévenir et si possible éviter d'éventuels accidents. Nous prendrons comme exemple les eaux du Lac du Parc de la Tête d'Or, à Lyon.

3.4. Plan de vigilance et de prévention dans le cadre de la surveillance du lac du Parc de la Tête d'Or.

3.4.1. Présentation du parc.

Le Parc de la Tête d'Or a été créé pour les lyonnais à la fin du 19^{ème} Siècle, et un lac artificiel y a été creusé à partir d'un bras du Rhône. Il accueille chaque jour un grand nombre de visiteurs et la faune et la flore représentent une de ses grandes richesses.

Situé sur les bords du Rhône, il couvre une superficie de 105 hectares. On y pénètre par 7 entrées, dont la plus remarquable est la Porte des Enfants du Rhône, qui ouvre sur la perspective du lac. Ce dernier a une superficie de 16 hectares, il est au centre de la composition paysagère.

Il est profond de quelques mètres seulement.

La baignade y est formellement interdite.

C'est un des rares parcs urbains à demeurer gratuit tout au long de l'année.



Photo 5 : Rive Ouest du Lac du Parc de la Tête d'Or (Photo personnelle)

3.4.2. Origine de l'eau du lac.

L'essentiel de son irrigation est assuré par l'infiltration souterraine des eaux du Rhône, mais il est aussi alimenté par un petit ruisseau situé au nord du Parc, qui reste de faible débit.

Il ne reçoit pas les eaux usées des restaurants qui sont situés aux alentours, ni les effluents qui contiennent les déjections des animaux du zoo lors du lavage des cages.

3.4.3. Faune du lac.

Outre une grande quantité de volatiles (canards, cygnes) qui trouvent refuge et se reproduisent sur les îles du Lac (Ile aux Cygnes, Ile des Tamaris), et qui sont pour la plupart sauvages, le lac renferme une population piscicole non négligeable. Il est d'ailleurs ouvert à la pêche. L'espèce piscicole la plus représentée est la carpe. On y rencontre aussi une population importante de tanches et poissons blancs (gardons, rotengles, ablettes). Quelques rares carnassiers (brochets) ont été vus par des promeneurs et des pêcheurs.

Un fléau commence à poser de réels problèmes à la municipalité : la prolifération des poissons-chats crée une réelle compétition alimentaire avec les espèces plus fragiles que sont les poissons blancs. Ils ne sont pas consommés par les oiseaux, car ils possèdent des nageoires dorsales et pectorales épineuses. De plus, à l'âge adulte ils mangent les alevins des autres espèces piscicoles.

Cela fait quelques mois que la Direction de l'Ecologie Urbaine de Lyon, autorité responsable des eaux du lac, cherche à résoudre ce problème.

3.4.4. Evaluation des risques de pollution : localisation des activités.



Figure 13 : Plan des activités du Parc de la Tête d'Or. (Source : Site Internet de l'Association des Commerçants du Parc de la Tête d'Or).

Les eaux d'évacuation des commerces ainsi que les eaux de ruissellement chargées en déjections animales ne passent pas dans la nappe phréatique en temps normal et ne sont pas déversées dans le lac. Malgré le souci permanent de respect de l'environnement de la part des professionnels du Parc de la Tête d'Or, il convient d'envisager, dans le cadre de la santé publique, l'éventualité d'un incident humain ou climatique qui mettrait en danger l'équilibre écologique du lac du parc. En effet, le restaurant « Le pavillon » (6) ainsi que la buvette des cygnes (7) sont situés à proximité des berges du lac. Le stand des poneys (2) et les cages des fauves (triangle de couleur marron sur le schéma) sont situés de part et d'autre du bras mort du lac.

La proximité de ces activités avec le lac nous encourage à envisager un rejet accidentel d'eaux usées des commerces proches dans le lac, ou l'évacuation accidentelle des eaux de lavage des cages des animaux dans le lac.

3.4.5. Qualité de l'eau :

* Intervenants

La surveillance des eaux du lac est sous la responsabilité de la Direction de l'Ecologie Urbaine de Lyon. Pendant la belle saison, elle effectue chaque semaine des prélèvements de l'eau du lac.

L'analyse de l'eau permet en particulier de rechercher les paramètres microbiologiques en relation avec la survenue éventuelle d'épizooties aviaires, notamment chez les anatidés. Des cas de botulisme aviaire sont ponctuellement rencontrés à la belle saison.

Récemment, suite aux accidents survenus en France dans les rivières la Loue (Jura) et le Tarn (Lozère), avec la mort suspecte de chiens de promeneurs, la Direction de l'Ecologie Urbaine s'est préparée à la recherche de cyanobactéries à potentiel toxique dans l'eau, bien que la baignade soit interdite dans le lac.

* Analyses effectuées :

Vent :

Le lac est relativement bien abrité du vent, de ce fait la surface de l'eau est calme la plupart du temps.

Courant :

Il peut être considéré comme nul, l'arrivée d'eau par le ruisseau étant d'un très faible débit. Le lac peut être considéré comme une étendue d'eau stagnante.

Mesures de température :

Elles sont prises sur le lac, aux abords des berges et au milieu de l'eau. Les températures y sont tout à fait semblables à celles rencontrées en étang. Elles s'échelonnent de quelques degrés au dessus de zéro en hiver et arrivent à avoisiner les 30°C lors de fortes chaleurs sur les berges.

Analyses physico-chimiques :

Elles sont effectuées sur divers prélèvements, avec recherche d'azote et de phosphore, à une fréquence soutenue lors de l'arrivée des beaux jours.

Résultats :

Ils sont la propriété de l'Ecologie Urbaine de Lyon et ne sont pas rendus publics, mais les quantités d'ammoniac et de phosphates relevées sont basses, très inférieures à des valeurs rencontrées sur des eaux eutrophisées. Ces valeurs sont stables sur toute la durée de la belle saison.

Les résultats des prélèvements permettent de se rassurer quant à l'éventualité d'une prolifération anormale de cyanobactéries, l'eutrophisation étant la base du développement des algues.

Facteurs de risque :

Toutefois, il convient de rester prudent et de continuer à surveiller le lac du parc, la prévention des risques pour la santé humaine et animale est un rôle important de la municipalité.

Il ne faut pas oublier que le lac est en partie alimenté par des eaux superficielles qui passent à proximité d'entreprises de restauration, et qui peuvent recueillir accidentellement d'importantes quantités de déjections animales. L'étendue d'eau est stagnante une grande partie de l'année (sauf lors de jours de vent important), le courant y est très faible. Le plan d'eau est peu étendu, il recouvre une superficie de moins de cent hectares. C'est un lac vieux de plus de 30 ans, et où la profondeur est fréquemment inférieure à trois mètres.

Toutes ces caractéristiques peuvent être considérées comme des facteurs de risques à ne pas négliger dans le cadre de l'éventualité d'une prolifération de cyanobactéries à potentiel toxique sur les berges du lac.

3.4.6. Mesures préventives.

On peut décrire des niveaux d'alerte pour la surveillance de l'étendue d'eau du lac du Parc de la Tête d'Or. Ces niveaux d'alertes peuvent être étendus à toute réserve d'eau faisant l'objet d'une surveillance.

L'observation de l'aspect de l'eau et les prélèvements doivent se faire à une faible profondeur, où la température de l'eau est assez élevée. Les zones de choix des prélèvements doivent tenir compte du courant et du vent. Pour une éventuelle accumulation d'algues sur

une zone précise, il faut un courant faible et/ou un vent léger, qui permettent d'accumuler les colonies sur une berge ou dans un renforcement du lac.

3.4.7. Niveaux de vigilance.

Les niveaux de vigilance décrits dans la figure 2 (ci-dessous double page) sont extraits du travail de SIVONEN et JONES (77), qui servent pour le suivi sanitaire de l'eau de boisson humaine.

Dans le cas du lac du Parc de la Tête d'Or, l'eau n'est pas potable et la baignade y est interdite, mais dans le cadre de la santé publique et du risque encouru en cas d'ingestion accidentelle d'eau, il faut rester vigilant quant à la qualité de son eau.

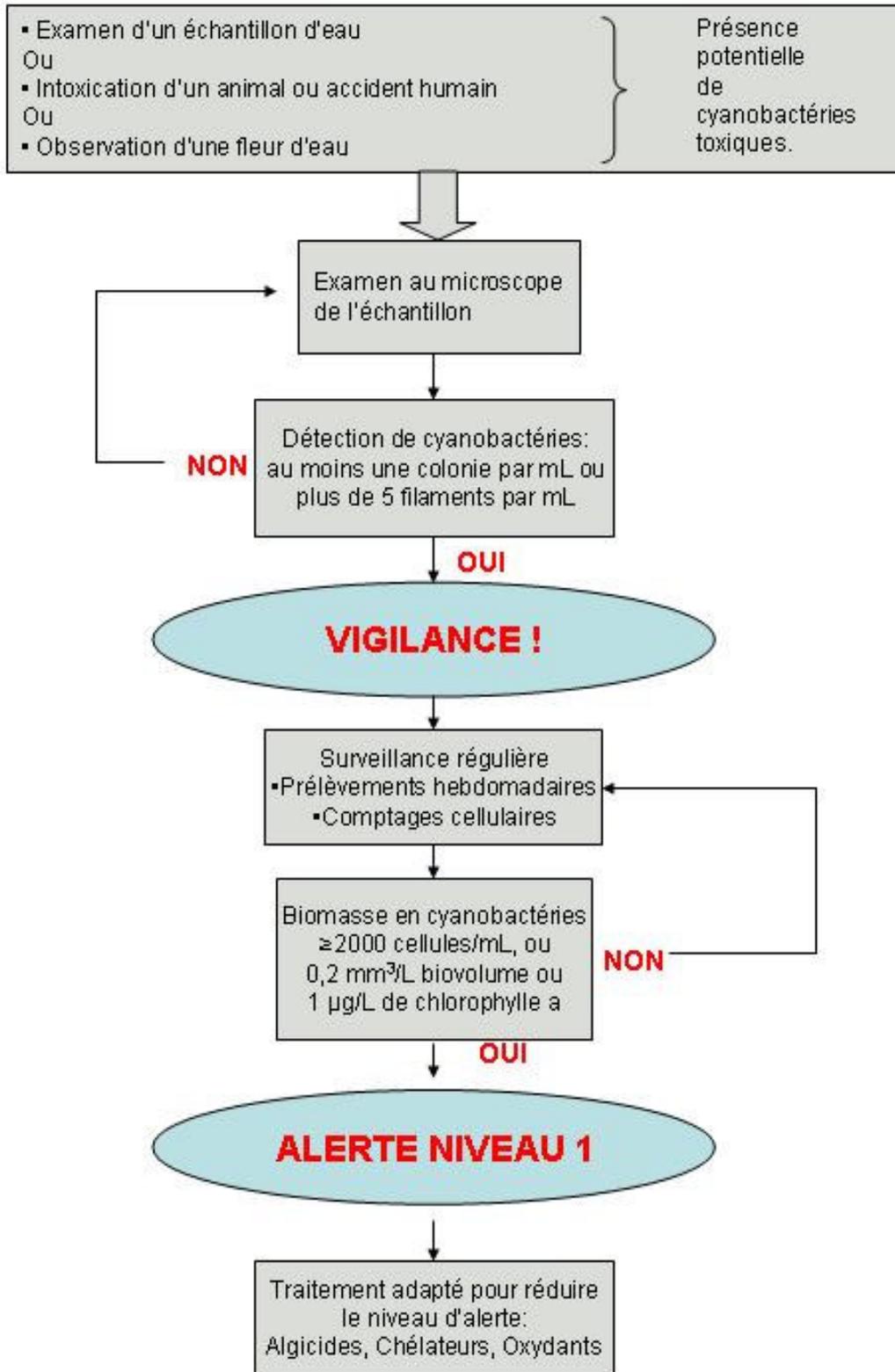


Figure 14 : Niveaux de vigilance d'une eau de baignade ou de boisson. (Adapté de SIVONEN, JONES, 1999) (77).

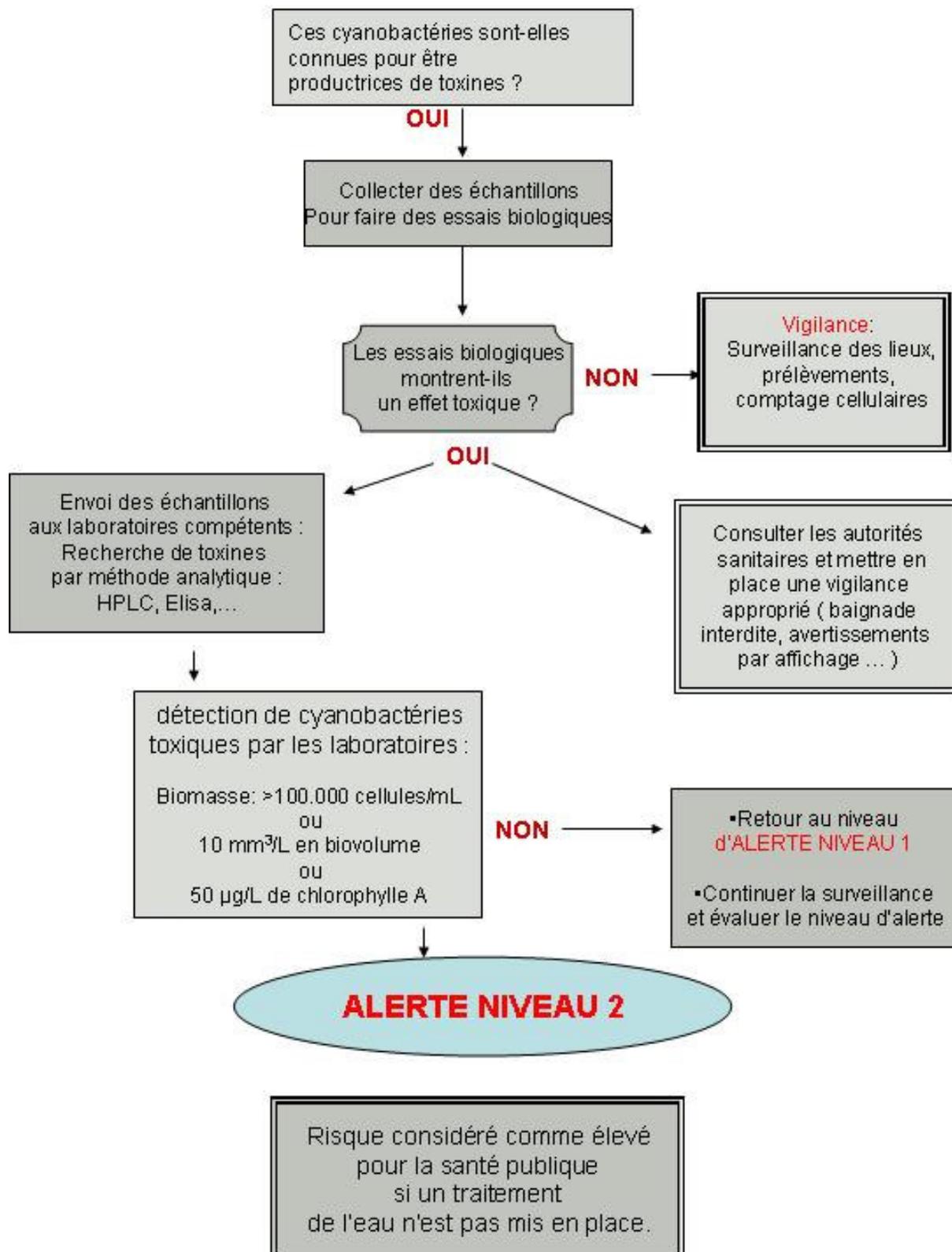


Figure 14 bis : Niveaux de vigilance d'une eau de baignade ou de boisson. (Adapté de SIVONEN, JONES, 1999) (77).

Pour résumer, les prélèvements effectués doivent répondre à certaines conditions pour que l'eau soit considérée comme saine. Ils seront faits près de la surface de l'eau (à moins d'un mètre de profondeur), où la biomasse de cyanobactéries potentiellement toxiques risque d'être la plus importante.

3.4.7.1. Qualité sanitaire bonne.

On se trouve dans les conditions normales, l'eau ne paraît pas polluée ni chargée d'algues.

Au niveau des prélèvements (observation au microscope optique seule), on ne trouve pas de colonie de cyanobactéries dans un mL d'eau, ou moins de cinq filaments de cyanobactéries dans un mL.

Toutefois, une surveillance des odeurs qui émanent des eaux du lac peut s'avérer utile car certaines cyanobactéries dégagent une odeur particulière de terre ou de vase. L'absence d'odeur ne signifie pas une absence de cyanobactéries.

3.4.7.2. Niveau de vigilance.

Surveillance effectuée dans le cadre d'un aspect de l'eau anormal (couleur anormale, odeur anormale par exemple).

Après prélèvement et comptage cellulaire, on observe au moins une colonie bactérienne ou 5 filaments bactériens dans un mL d'eau. Il est alors prudent et nécessaire d'approfondir les recherches.

Il convient de surveiller de près l'état de l'eau par des prélèvements réguliers.

3.4.7.3. Alerte niveau 1.

Elle est déclarée lorsque l'on dénombre plus de 2000 cellules de cyanobactéries par mL, ou 0,2 mm³/L de biovolume ou 1 µg/L de chlorophylle A (extrait de la ligne directrice de l'OMS sur la surveillance de l'eau).

Il est à ce niveau-là nécessaire de mettre en place un traitement adapté pour réduire la prolifération d'algues dans l'eau (traitements chimiques) et rechercher les propriétés des cyanobactéries détectées. Cela signifie la mise en place de tests biologiques ainsi qu'analytiques, et le cas échéant, des mesures plus drastiques devront être prises par les autorités compétentes.

3.4.7.4. Alerte niveau 2.

Elle est déclarée lorsque les laboratoires détectent plus de 100.000 cellules de cyanobactéries par mL d'eau prélevée ou 10 mm³/L de biovolume, ou encore 50 µg/L de chlorophylle a.

Dans ce cas-là le risque peut être considéré comme élevé pour la santé publique, si des mesures ne sont pas prises immédiatement, et si un traitement efficace de l'eau n'est pas mis en place.

3.4.8. Conclusion sur la qualité des eaux du lac du Parc de la Tête d'Or.

Le lac du Parc de la Tête d'Or n'est à priori pas exposé à une prolifération de cyanobactéries. En effet, d'après les mesures relevées sur le terrain, les conditions physico-chimiques n'ont jusqu'à aujourd'hui pas été réunies pour faciliter la formation d'efflorescences à cyanobactéries à potentiel toxique.

Pour autant, il convient de rester vigilant sur l'observation de ces eaux, car une pollution occasionnelle peut parfois remplir les conditions physico-chimiques requises pour la formation de fleurs d'eau à cyanobactéries potentiellement toxiques.

3.5. Prélèvements d'échantillons pour exploitation en laboratoire.

3.5.1 Intérêt des prélèvements multiples.

Dans le cadre de la surveillance d'une eau à priori saine, il est important de faire des prélèvements en plusieurs points pour améliorer la représentativité du lieu de prélèvement des échantillons et permettre d'avoir plusieurs prélèvements à exploiter au laboratoire.

Une description du site doit accompagner les prélèvements, car les données récoltées durant l'inspection permettent parfois d'aider à l'interprétation des résultats au laboratoire.

On prélève pour effectuer plusieurs recherches :

- Analyses des nutriments (phosphates et nitrates).
- Identification et quantification des espèces de cyanobactéries.
- Analyse des cyanotoxines.

3.5.2. Lieux de prélèvement :

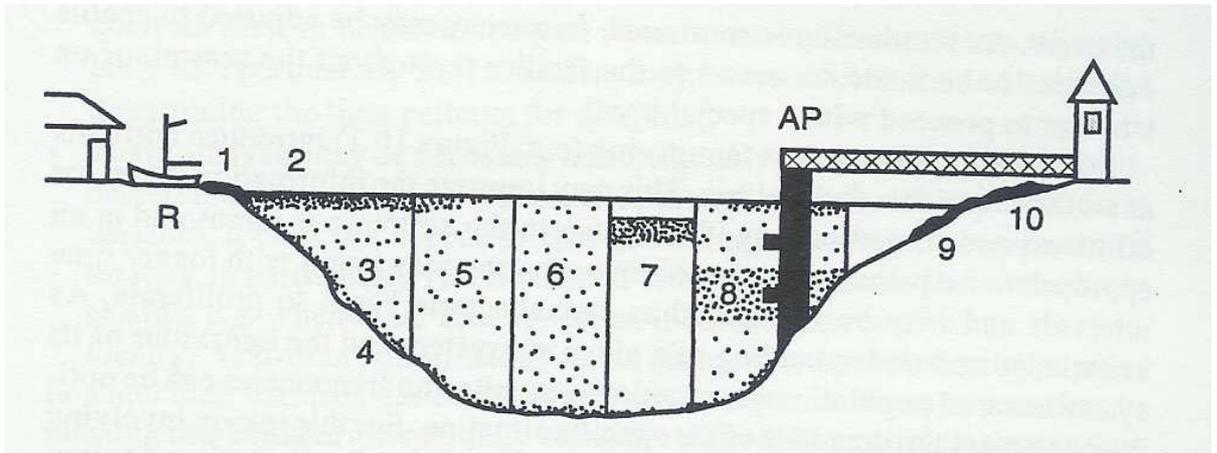


Figure 15 : diverses localisations possibles de cyanobactéries potentiellement toxiques dans un lac ou un réservoir d'eau (52).

R = Zone de jeu ; AP = Ponton.

Conditions estivales : 1 = dépôt d'écume de cyanobactéries sur la berge ; 2 = conditions météorologiques calmes, accumulation de cyanobactéries en surface ; 3 = cyanobactéries dispersées par le vent ; 4 = cyanobactéries planctoniques fixées au sédiment.

Conditions printemps/automne : 5 = rafraîchissement de l'eau et dégradation des conditions météorologiques à l'automne ; 6 = conditions venteuses au printemps et à l'automne.

Conditions hivernales : 7 = accumulation de cyanobactéries sous la glace.

8 = accumulation de cyanobactéries en eau calme au niveau de la thermocline.

9, 10 = tapis de cyanobactéries en eaux calmes sur le sédiment et sur la plage.

Plusieurs lieux de prélèvements de cyanobactéries peuvent être choisis selon le cas de figure qui se présente.

Dans le cadre d'une accumulation de cyanobactéries sur les berges en été, il conviendra de les prélever près des bordures, à faible profondeur (de quelques cm à 1 m sous la surface).

Dans le cadre de la surveillance d'une eau de baignade sans accumulation d'algues sur les berges, les prélèvements seront effectués en barque, à quelques mètres du bord, en eaux calmes, de 50 cm à quelques mètres sous la surface.

3.5.3. Technique de prélèvement.

Idéalement, les prélèvements devraient être effectués par le laboratoire qui va effectuer les analyses. Cela permet d'être sûr que les prélèvements sont faits dans de bonnes conditions et dans des volumes suffisants.

Les techniques de prélèvement (volume d'eau prélevée, récipient) dépendent des molécules recherchées.

Mesure du phosphore :

Pour les analyses de phosphore, on utilise des bouteilles en verre de 100 mL prélavées et conservées avec de l'acide sulfurique à dose de 4.5 mol/L ou de l'acide chlorhydrique à l'intérieur jusqu'à leur usage.

Lors du prélèvement, on les vide de leur contenu, sans rinçage à l'eau et on les remplit complètement avec l'eau à analyser.

En effet la moindre contamination extérieure peut fausser les résultats, en effet il faut parfois peu de phosphore pour une croissance de cyanobactéries. Le phosphore peut être absorbé par les parois de verre et être relargué par la suite lorsque la bouteille est remplie d'un prélèvement.

Mesure des nitrates :

Pour les analyses de nitrates, on utilise des bouteilles de 100 mL en verre ou en polyéthylène, que l'on remplit complètement.

3.5.4. Identification des espèces de cyanobactéries.

Pour l'identification et la quantification microscopique de cyanobactéries, on utilise des bouteilles en verre de couleur marron pour éviter la luminosité dans le prélèvement, d'une contenance de 100 mL. Elles peuvent contenir environ un mL de Lugol déposé au préalable au fond de la bouteille, ou bien une solution de formaldéhyde. Si des bouteilles de verre

transparent sont utilisées, elles doivent être conservées dans l'obscurité car la lumière détruit l'iode (Lugol), ce qui compromet la conservation du prélèvement.

A ces prélèvements conservés dans le Lugol, on peut ajouter quelques prélèvements de cyanobactéries sans conservateur, car la couleur des cyanobactéries peut parfois aider à la diagnose d'espèce.

3.5.5. Identification de matériel cellulaire ou de toxines.

Pour l'identification de matériel cellulaire ou de toxines, on utilise des containers d'au moins un litre (prélèvement minimum), de préférence en verre, même si des containers en plastique ont donné de bons résultats. Les containers doivent être nettoyés avant utilisation.

Si les prélèvements doivent être congelés, on peut utiliser des flacons en plastique à large ouverture pour faciliter les manipulations par le laboratoire, les flacons à prélèvements d'urine (100mL de contenance) conviennent aussi. On les place dans des blocs de glace pour une conservation au froid.

* Pour l'analyse de la chlorophylle a :

Les bouteilles de verre marron de capacité de un litre peuvent être utilisées, la chlorophylle étant dégradée par la lumière solaire. Si l'on peut garantir que le transport s'effectue dans l'obscurité, des bouteilles en verre transparent peuvent suffire. La chlorophylle a se dégradant très rapidement, il est fortement conseillé de conserver les prélèvements le moins longtemps possible et de les acheminer rapidement vers le laboratoire (de préférence moins de 4 heures).

La filtration de l'eau sur le site même de prélèvement peut être effectuée et le filtre peut être conservé dans une glacière en cas de climat chaud.

Préparation du Lugol : dissoudre 20 grammes de iodure de potassium dans 200 mL d'eau distillée, mélanger et ajouter 10 grammes d'iode sublimé. Il ne doit pas y avoir formation de cristaux, sinon il faut rajouter 5 grammes d'iodure de potassium dans le mélange.

Un mL de Lugol sert à préserver 100 mL d'un échantillon. L'échantillon doit alors être de couleur brun clair translucide (les auteurs UTLIKEN *et al.* en 1999 (82) la décrivent comme la couleur du Whisky).

Les commémoratifs doivent accompagner les prélèvements : on y note la date, l'heure du prélèvement, la profondeur du prélèvement. La description du site peut être utile, ainsi que les précisions concernant des personnes ou animaux accidentés.

La conservation au froid est primordiale pour limiter l'activité cellulaire, surtout si le transport

dure plus de 2-3 heures. Ceci est valable pour les prélèvements où l'on recherchera les nutriments, la chlorophylle A, les toxines.

Des prélèvements non traités au Lugol pourront être joints pour l'identification des espèces cyanobactériennes, ainsi que des prélèvements fixés pour dénombrement cellulaire et biomasse. Ceux-ci peuvent être conservés à température ambiante, mais à l'abri de la lumière.

3.6. Analyses des prélèvements.

3.6.1. Diagnose

La diagnose d'espèce est difficile et délicate. Seuls quelques spécialistes peuvent les identifier avec certitude. Elle est d'autant plus délicate que certaines espèces de cyanobactéries productrices de toxines se confondent facilement avec des diatomées, qui sont non toxiques.



Figure 2 : Morphologie des cyanobactéries toxiques les plus fréquemment rencontrées.
(source LAWTON *et al.* 1999) (49).

3.6.2. Quantification

C'est fréquemment la chlorophylle A qui sert à la quantification de cyanobactéries. Mais il faut rester prudent : c'est une méthode simple, à la portée de nombreux laboratoires, mais qui est sujette à des interférences quand les cyanobactéries ne sont pas les populations majoritaires. La chlorophylle A peut alors provenir du phytoplancton présent dans le prélèvement. Cela peut alors porter à confusion.

L'énumération peut aussi se faire par sédimentation ou centrifugation.

3.6.3. Détermination de la biomasse.

On peut faire appel à la chlorophylle A pour déterminer la biomasse, étant donné que ce pigment participe à 0.5 à 1% de la matière sèche des organismes du phytoplancton. Des formules de correction existent pour affiner les résultats et approcher la réalité de la biomasse.

3.6.4. Analyse des cyanotoxines.

Les prélèvements doivent être conservés moins de 24 heures pour l'obtention de résultats fiables.

Première étape : extraction des toxines.

Lorsque l'on a identifié les populations de cyanobactéries par diagnose au microscope, on peut se faire une idée plus précise de quelles toxines extraire, ainsi que la méthode à employer pour les extraire.

Deuxième étape : purification des toxines.

Elle n'est pas indispensable si les cyanobactéries sont majoritaires dans le prélèvement, et si on désire une analyse toxicologique simple (confirmation d'une intoxication par exemple) plutôt que l'identification précise d'une toxine.

Par contre, la purification est intéressante si les échantillons sont pauvres en cyanobactéries, ou si l'identification et la quantification des toxines sont importantes.

3.7. Recherche de toxines de cyanobactéries

Différentes méthodes de détection existent, selon le type de recherche que l'on souhaite effectuer.

Ci-dessous, nous montrons un exemple des tests disponibles pour la recherche de cyanotoxines (ici les microcystines), selon leur sensibilité et leur spécificité.

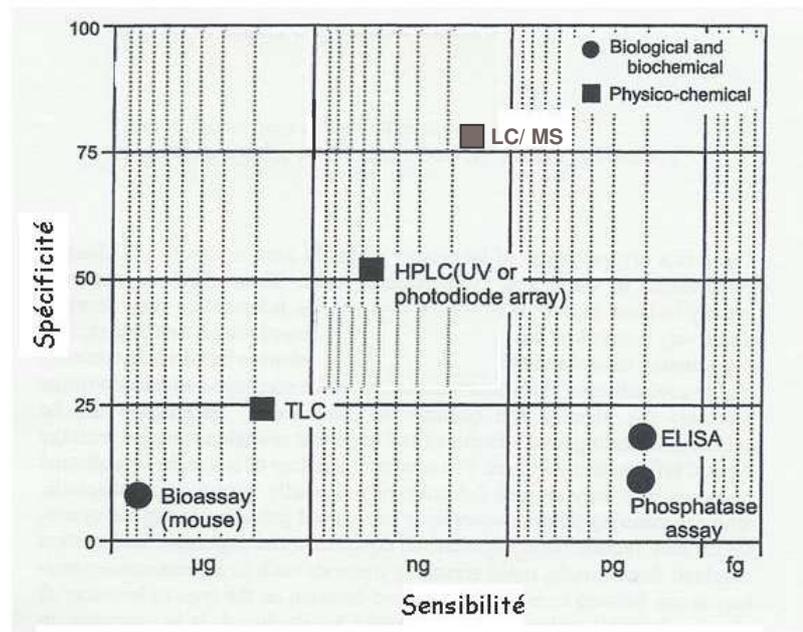


Figure 16 : Relation entre sensibilité et spécificité des méthodes d'analyse de microcystines. (source HARADA *et al.* 1999) (39).

La sensibilité et la spécificité sont des critères importants pour le choix de la méthode de détection. Nous allons détailler les trois méthodes biologiques (test souris, ELISA, inhibition des phosphatases), puis les trois méthodes physico-chimiques (TLC, HPLC, LC/MS) décrites dans le tableau ci-dessus.

3.7.1. Essais biologiques.

- Test souris :

il est peu sensible et peu spécifique, mais il est très simple à mettre en oeuvre et est peu onéreux. On utilise classiquement des souris albinos de laboratoire.

Le test se fait par injection intrapéritonéale de lyophilisat de cyanobactéries, stérilisé au préalable par ultra-filtration sur membrane. Les prélèvements à injecter peuvent être mis en suspension avec 0.5 mL de sérum physiologique.

Les animaux sont observés pendant les 24 heures qui suivent l'injection. La période d'observation peut être étendue à une semaine si on suspecte l'action de cylindrospermines (28).

La DL50 est exprimée en mg de poids sec cellulaire par kg de poids vif d'animal.

DL 50 \geq 1000	l'échantillon est considéré comme	non toxique.
Entre 500 et 1000		faiblement toxique.
Entre 100 et 500		moyennement toxique.
DL 50 \leq 100		hautement toxique.

Variantes du test souris qui peuvent être effectuées à plus grande échelle :

- Test sur vertébrés aquatiques :

Test sur les poissons :

Les danios (*Brachydanio rerio*) sont couramment utilisés pour estimer la toxicité de molécules chimiques sur les vertébrés aquatiques. Même s'il ne semble pas y avoir de méthode standard établie pour la détection de cyanotoxines, ces tests sont largement utilisés pour la recherche de toxicité de nombreux inhibiteurs des cholinestérases. Depuis quelques années, les embryons de *Brachydanio rerio* sont à leur tour utilisés pour les tests de toxicité et d'écotoxicité et montrent que les résultats sont aussi fiables qu'avec les adultes (73).

- Test sur invertébrés aquatiques :

Test sur daphnies :

Daphnia pulex peut être utilisée dans des bio-essais, ce sont des petits crustacés qui détectent efficacement les toxines telles que les microcystines. Il existe des kits dans le commerce (46), qui utilisent l'invertébré *Thamnocephalus platyurus*, qui montrent une bonne efficacité de détection de microcystines, mais les kits sont relativement chers et ne se conservent que six mois.

Par contre, la standardisation de telles études paraît difficile car il existe une grande variabilité de résultats entre les différents laboratoires.

Test sur artémias :

Artemia salina peut être utilisée pour la détection de cyanotoxines en routine. C'est l'invertébré le plus utilisé pour les essais biologiques en toxicologie, car il ne nécessite pas d'équipement spécialisé pour son utilisation. Des kits pour tests standards sont disponibles

dans le commerce, même si leur utilisation augmente le prix des essais. Les œufs d'*Artemia* se trouvent facilement dans le commerce et peuvent se conserver plusieurs années à -20°C, sans altération.

Les CL 50 varient selon les invertébrés, qui ne sont pas tous sensibles aux cyanotoxines de la même façon.

- Test biochimique :

L'inhibition des phosphatases (Phosphatase assay) est une méthode très sensible pour détecter les microcystines et nodularines. Elle utilise l'activité biochimique des toxines. Une des versions du test consiste à doser le phosphate radioactif (^{32}P), utilisé par l'activité de la phosphatase, enzyme des microcystines. Des quantités extrêmement faibles de toxines peuvent alors être mises en évidence (40).

La méthode a été utilisée par LAMBERT *et al.* en 1994 (48) pour détecter des microcystines dans de l'eau de boisson. La concentration en microcystines trouvée avait alors été de 0.09 µg/L d'eau.

Par cette technique, l'activité biochimique de l'anatoxine A (S) peut être mesurée par inhibition des cholinestérases. C'est une méthode très sensible mais pas du tout spécifique, étant donné que l'on détecte tous les inhibiteurs de cholinestérase présents (54).

- Détection immunologique :

La technique ELISA est la méthode la plus prometteuse pour la détection des microcystines. Elle est sensible, spécifique et facile à mettre en œuvre.

Des kits ELISA sont disponibles dans le commerce, mais restent très chers. C'est certainement la méthode qui pourra être mise en place en routine le plus facilement dans le futur.

- Essais sur cellules de mammifères :

Ils visent à remplacer les tests souris. On effectue des essais sur hépatocytes isolés de rats, ou encore sur des fibroblastes isolés de hamster (17).

C'est une technique prometteuse mais où l'on obtient encore beaucoup de faux positifs et de faux négatifs. Elle semble plus sûre pour la détection des saxitoxines que des microcystines (21).

3.7.2 Analyses physico-chimiques :

- Technique HPLC : High Performance Liquid Chromatography.

C'est la technique la plus répandue aujourd'hui, elle donne de bons résultats dans la reconnaissance des toxines des cyanobactéries. Pour la rendre plus spécifique, on peut la combiner avec une détection UV. Le matériel est assez coûteux.

Elle est sensible et spécifique, bien standardisée. Elle est par exemple utilisée en routine pour identifier et quantifier les microcystines. Par contre, il est impossible de différencier la plupart des variants structuraux des microcystines (38).

Les nodularines possèdent des propriétés physico-chimiques proches des microcystines, et sont analysables par les mêmes méthodes.

L'anatoxine A et l'anatoxine A (S) sont aussi détectables par HPLC couplée à la détection UV. En effet elles possèdent un spectre UV caractéristique. Mais cette méthode peut être suppléée par la méthode LC/MS, qui est plus sensible et plus spécifique.

- Technique LC/MS : Liquid Chromatography / Mass Spectrometry.

Elle consiste à coupler les techniques de chromatographie liquide et la spectrométrie de masse. Elle est plus chère que la méthode HPLC (matériel plus coûteux, personnel spécialisé).

Elle est plus sensible et plus spécifique que la méthode HPLC. Elle peut être utilisée pour confirmer un résultat obtenu par méthode HPLC. C'est une méthode prometteuse. Elle permet d'effectuer simultanément la séparation et l'identification de microcystines dans un mélange (26).

C'est la meilleure méthode pour la détection de nombreux variants des saxitoxines (67), mais l'équipement qu'elle nécessite est souvent prohibitif.

- Méthode TLC : Thin Layer Chromatography.

C'est la chromatographie sur couche mince.

C'est une méthode peu spécifique et peu sensible, mais elle a l'avantage d'être peu onéreuse en matériel.

Elle peut être utilisée pour la détection qualitative des microcystines et nodularines, mais les résultats obtenus nécessitent d'être confirmés par des méthodes plus précises telles que HPLC ou encore LC/MS (38).

3.8. Laboratoires sondés pour la recherche de Cyanophycées dans l'eau :

3.8.1. Laboratoires vétérinaires départementaux. (LVD)

Les LVD des départements limitrophes du Rhône ont été sondés.

Département	Ville	Analyses cyanobactéries
Rhône (69)	Marcy l'Etoile	Pas de recherche sur l'eau
Loire (42)	Montbrison	Pas de structure adaptée
Isère (38)	Grenoble	Non
Drôme (26)	Valence	Non
Ardèche (07)	Privas	Non

Tous les LVD interrogés n'effectuent pas de recherches de cyanobactéries dans l'eau.

3.8.2. Instituts Pasteur et laboratoires spécialisés.

* Laboratoires qui effectuent les analyses de cyanobactéries.

1. Le laboratoire de Toxicologie Vétérinaire de Lyon à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon a effectué ces deux dernières années des analyses de prélèvements sur le contenu gastrique de chiens suspects d'intoxication dans le Jura et la Lozère.

Il recherche les inhibiteurs des cholinestérases, comme l'activité de l'anatoxine A (S). C'est une méthode sensible mais peu spécifique.

Cependant, c'est un laboratoire plus proche de la moitié sud de la France que les laboratoires basés à Paris, et qui peut effectuer des analyses rapidement (en une quinzaine de jours).

Il peut effectuer les tests à partir de prélèvements d'eau ou de contenu gastrique.

Il ne réalise pas d'analyses physico-chimiques telles que la technique HPLC pour la recherche de cyanotoxines.

2. L'INRA (Institut National de Recherche Agronomique), dont le laboratoire d'hydrobiologie est basé à Thonon les Bains, en Savoie (74) (Directeur de recherche : Jean-François HUMBERT, équipe de recherche et d'identification bactérienne, Professeur J.C. DRUART). Il est capable de faire les analyses nécessaires à l'identification bactérienne ainsi qu'à la détection de toxines hépatotoxiques et neurotoxiques, et effectue ce genre de recherche en routine sur l'eau de boisson dans le cadre de la santé publique. Il reçoit régulièrement des prélèvements de toute la France.

Cette équipe de scientifiques a participé à l'identification des cyanobactéries lors de l'épisode de mortalité de chiens dans la rivière La Loue, dans le Jura en Septembre 2003. Ils ont effectué eux-mêmes les prélèvements sur le terrain.

Les études avaient été menées conjointement avec l'équipe de recherche du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris. L'équipe du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris s'était alors occupée de l'identification des toxines.

3. L'Institut Pasteur de Paris, en collaboration avec le Muséum d'Histoire Naturelle de Paris, est lui aussi capable de faire des recherches de cyanobactéries, identification d'espèces et recherche de cyanotoxines. Il avait participé à l'identification des espèces bactériennes lors de l'épisode de mortalité de chiens dans les gorges du Tarn en Lozère en 2002 et 2003. Les toxines n'avaient alors pas été recherchées, seul le laboratoire de Toxicologie Vétérinaire de Lyon avait effectué une recherche d'inhibiteurs des cholinestérases.

Le laboratoire de Cryptogamie du Muséum d'Histoire Naturelle, 12 rue Buffon, 75231 PARIS Cedex 05 :

La Direction Générale de la Santé (DGS) et la sous-direction de la Veille Sanitaire (VS) ont mis en place une circulaire nationale (circulaire DGS/VS 4 n° 99-395 du 6 Juillet 1999, jointe en annexe 2). Elle vise à recenser les efflorescences à cyanobactéries sur le territoire français, et se réfère au programme EFFLOCYA.

Pour mener à bien cette mission, un questionnaire avait été mis en place en 1999 pour faire une enquête épidémiologique sur tout le territoire français pour évaluer les risques d'apparition de populations de cyanobactéries dans les eaux françaises.

L'Institut Pasteur était chargé de collecter ces données, sous la direction du Docteur Nicole Tandreau de Marsac. Le questionnaire est joint en annexe 2 et peut être utile pour la collecte de données sur le terrain en cas d'épisode de prolifération algale. C'est aussi une aide au diagnostic de la prolifération de cyanobactérie.

Le laboratoire de Cryptogamie du Muséum d'Histoire Naturelle était responsable de la récolte et de l'analyse du matériel prélevé sur le terrain. Cette action a été dirigée par l'équipe du Professeur Alain Couté et de Madame Cécile Bernard.

A la question « à quel laboratoire de recherche le plus proche nous pouvions envoyer des prélèvements des eaux du lac du Parc de La Tête d'Or ? », le Professeur Couté nous a

répondu que c'était au Muséum d'Histoire Naturelle qu'il fallait adresser les échantillons pour obtenir des résultats fiables et précis.

Conditions de transport préconisée par le Muséum d'Histoire Naturelle :

Les conditions optimales sont un transport rapide des prélèvements (moins de 12 heures de préférence), sous couvert du froid et à l'abri de la lumière (pour plus de précisions, voir les conditions de transport expliquées dans le chapitre précédent).

Cependant, dans l'impossibilité de mettre en place un transport rapide, on peut aussi faire parvenir au Muséum les échantillons prélevés, accompagnés d'un échantillon fixé à l'aide de formol à 10% (un volume d'algues pour un volume de formol), par simple Colissimo. Le matériel sera plus difficilement exploitable, mais la procédure est plus facile à mettre en place, et le coût du transport est moins élevé.

Un prélèvement mal acheminé risque de rendre caduque l'identification des toxines, par contre on pourra toujours identifier les espèces d'algues mises en cause.

* Laboratoires qui n'effectuent pas les analyses sur cyanobactéries en routine.

Le laboratoire d'analyse des eaux du département du Rhône n'effectue pas d'analyses pour la recherche de toxicité de cyanobactéries.

Le laboratoire Marcel Mérieux à Lyon dans le 7^{ème} Arrondissement, Avenue Tony Garnier ne fait que les recherches classiques de bactéries telles que *E. coli* et n'est pas encore équipé pour faire des analyses de recherche de cyanobactéries.

Le laboratoire de Santé, Hygiène et Environnement de Lyon à Gerland aurait la capacité d'effectuer des recherches de cyanobactéries et toxines cyanobactériennes, mais n'a pas encore mis en place de protocole de recherche de cyanobactéries et n'effectue pas ces analyses en routine. C'est un protocole lourd à mettre en place pour sa structure, mais il pourrait le faire à l'avenir, en fonction de la demande.

Autres laboratoires cités par la circulaire DGS/VS 4 n°99-395 du 6 Juillet :

- ✓ le Laboratoire de chimie de l'environnement de l'Ecole supérieure de physique et chimie industrielle de la ville de Paris (ESPCI) : analyse des toxines et des xénobiotiques
- ✓ le Laboratoire de géochimie des eaux (LGE) de l'université Denis-Diderot - Paris 7: géochimie des métaux trace et leurs interactions avec le phytoplancton ;
- ✓ le Laboratoire d'hydrobiologie de l'université Paul-Sabatier (Toulouse) (J. Capblanc, professeur) ;
- ✓ le Laboratoire de zoologie et protistologie de l'université de Clermont 2 (C. Amblard, DR, CNRS).

CONCLUSION

Même si l'impact des cyanobactéries sur les animaux domestiques et sauvages paraît à ce jour mineur au vu des épisodes de fortes chaleurs en 2002 et 2003 (22), il convient de rester vigilant sur la prolifération des cyanobactéries en France.

Outre leur potentiel toxique en cas de contact avec les muqueuses ou par ingestion, les proliférations de cyanobactéries ont un impact négatif sur la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques (44).

Les efflorescences à cyanobactéries peuvent apparaître sur tout le territoire français, et les risques pour la santé publique sont encore mal connus par les scientifiques, de même que les nombreuses toxines qu'elles sont capables de synthétiser.

Pour prévenir de nouveaux accidents dus aux cyanotoxines, des moyens de surveillance adéquats doivent être mis en place par les autorités sanitaires, en collaboration avec les laboratoires compétents.

Le Professeur responsable
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Le Président de la thèse

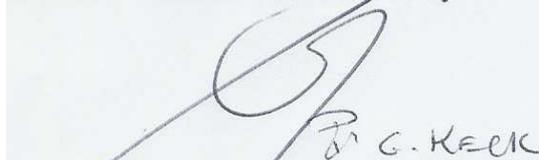
Vu: Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

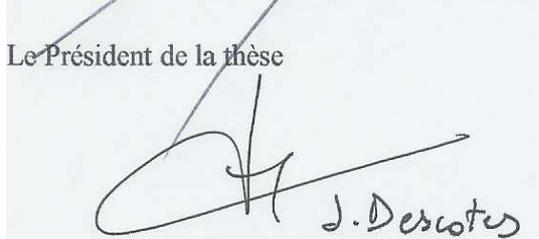
Vu et permis d'imprimer

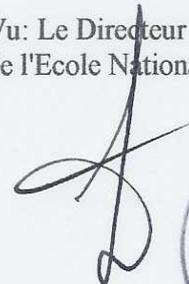
Lyon, le

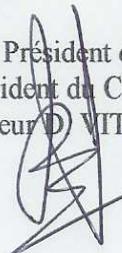
31 JAN. 2005

Pour le Président de l'Université,
Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales,
Professeur D. VITAL-DURAND


P. C. KEECK


J. Descotes




ANNEXES

Annexe 1 : Circulaire DGS/VS 4 n°99-395 du 6 Juillet 1999.

Direction générale de la santé
Sous-direction de la veille sanitaire
Bureau de l'eau
DGS/VS 4

Circulaire DGS/VS 4 n° 99-395 du 6 juillet 1999 relative à la participation des services santé-environnement au programme EFFLOCYA relatif au recensement des efflorescences d'algues

SP 4 439
2279

NOR : MESP9930360C

(Texte non paru au *Journal officiel*)

La ministre de l'emploi et de la solidarité à Madame et Messieurs les préfets de région (direction régionale des affaires sanitaires et sociales [pour attribution]) ; Mesdames et Messieurs les préfets de département (direction départementale des affaires sanitaires et sociales [pour attribution]) Des proliférations de micro-algues dans des plans d'eau utilisés en tant que réserves d'eau potable, pour l'irrigation, la gestion hydraulique ou l'usage récréatif se produisent périodiquement notamment en période chaude. Ces proliférations procurent à l'eau une coloration verdâtre ou rougeâtre. Divers organismes sont la cause de ces « blooms » algaux encore appelés fleurs d'eau, parmi eux les cyanobactéries (cyanophycées, cyanoproaryotes ou algues bleues) sont souvent citées car ces dernières sont susceptibles de produire différentes toxines, hépatotoxines, neurotoxines, dermatotoxines pouvant conduire à des incidents sanitaires chez les utilisateurs (1).

Un intérêt croissant s'affirme en Europe sur ce sujet. Un programme financé par la Commission européenne (CYANOTOX) doit débuter en 1999 pour mieux évaluer le risque toxique, aigu ou chronique, provoqué soit par l'absorption, soit par le contact corporel avec une eau contaminée.

Afin d'évaluer sur des bases les plus objectives possibles, la réalité de ces événements, le ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement en liaison avec le ministère chargé de la santé engage une recherche visant à dresser le bilan de la situation en France des efflorescences algales à partir de l'analyse chimique et biochimique de l'eau de plusieurs sites, en s'appuyant sur une enquête nationale réalisée auprès des services de l'Etat, des établissements publics et de sociétés privées.

La première étape de ce projet dénommé « EFFLOCYA » consiste donc à :

- établir un inventaire, pour la métropole, des plans d'eau qui sont sujets à proliférations algales ;
- recenser, pour la métropole, des phénomènes d'intoxication (dermatose ou autres affections chez l'homme ; mort inexplicée d'animaux : bétail, oiseaux, poissons...) ;
- suivre quelques plans d'eau déjà connus pour être sujets à des efflorescences algales, afin d'y rechercher la présence éventuelle de toxines ;
- analyser les toxines détectées et mesurer leur rôle probable sur le cas déclaré.

La deuxième étape vise à définir une qualité des sites et à prévenir les risques d'intoxication. Elle devrait aboutir à la mise au point d'exigences de qualité des milieux puis servir de propositions pour la Commission européenne dans le cadre de la modification en cours de la directive relative aux eaux de baignades.

Sans être exhaustif, les principaux laboratoires susceptibles d'intervenir dans ce projet sont :

- le Laboratoire de chimie de l'environnement (directrice : M.-C. Hennion, professeur) de l'Ecole supérieure de physique et chimie industrielle de la ville de Paris (ESPCI) : analyse des toxines et des xénobiotiques ;
- le Laboratoire de cryptogamie du Muséum national d'histoire naturelle (directeur : A. Couté, professeur) : biosystématique et tests de toxicité ;
- le Laboratoire de géochimie des eaux (LGE) de l'université Denis-Diderot - Paris 7 (directeur : G. Sarazin, professeur) : géochimie des métaux trace et leurs interactions avec le phytoplancton ;
- l'Institut Pasteur de Paris, responsable de la collection des souches de cyanoprocarotes (N. Tandeau de Marsac et R. Rypka) ;
- le Laboratoire d'hydrobiologie de l'université Paul-Sabatier (Toulouse) (J. Capblanc, professeur) ;
- le Laboratoire de zoologie et protistologie de l'université de Clermont 2 (C. Amblard, DR, CNRS).

La coordination scientifique de l'étude a été confiée au professeur G. Sarazin de l'université Paris 7.

Vous trouverez ci-joint le bilan des éléments recueillis en 1998 avec votre collaboration par le professeur Couté du Muséum d'histoire naturelle.

Compte tenu des risques liés aux efflorescences de cyanobactéries (cf. fiche ci-jointe) établie par le docteur Nicole Tandeau de Marsac de l'Institut Pasteur, il apparaît opportun de procéder à l'évaluation du risque toxique lié à la présence de certaines algues, notamment dans les eaux de baignades. Dans ce but, il vous a été demandé en 1998, et il vous est redemandé en 1999, de collaborer à cette étude en recensant les phénomènes de prolifération d'algues et éventuellement d'intoxication, dans le cadre de votre mission de contrôle sanitaire. Votre contribution est essentielle pour évaluer l'impact réel de ce phénomène.

Pour 1999, vous voudrez bien collecter les renseignements suivants lors d'efflorescences algales :

- le lieu ;
- la date ;
- la couleur de l'eau ;
- le nom du récoltant ;

et si possible :

- la température de l'air ;
- la température de l'eau ;
- un prélèvement d'algues par écrémage (1 volume) + formol à 10 % (1 volume).

Dans le cas où le phénomène s'avère très important et afin de pouvoir envisager une récolte de matériel algal vivant, il conviendrait de prévenir au plus tôt possible, par téléphone, l'une des personnes mentionnées ci-dessous, qui vous communiquera les coordonnées du laboratoire le plus adapté et disponible pour la réalisation des analyses.

Laboratoire de cryptogamie, 12, rue Buffon, 75231 Paris Cedex 05, fax : 01-40-79-35-94, professeur Alain Couté, tél. : 01-40-79-31-95 et 01-40-79-31-96, e-mail : acoute@mnhn.fr ; Mme Cécile Bernard, tél. : 01-40-79-31-91, e-mail : cbernard@mnhn.fr.

En parallèle, l'Institut Pasteur est chargé de recueillir différentes informations qui font l'objet du questionnaire joint (une version électronique est également disponible). Il vous est demandé de le renvoyer à l'adresse suivante sous un mois pour les phénomènes enregistrés entre les années 1995 à 1998 et avant le 17 septembre pour les incidents survenus en 1999 : Docteur Tandeau de Marsac, Institut Pasteur, unité de physiologie microbienne, 28, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex 15, tél. : 01-45-68-84-14, fax : 01-45-68-30-42.

Vous serez bien entendu informés des suites données à cette enquête nationale.

Je vous demande de porter ces instructions à la connaissance des laboratoires agréés au titre du contrôle sanitaire des eaux de votre région et de votre département et de me faire part des observations éventuelles qu'appelle de votre part le présent document.

Pour la ministre et par délégation :

Pour le directeur général de la santé :

Le sous-directeur de la veille sanitaire,
Y. Coquin
MINISTÈRE DE L'AMÉNAGEMENT
DU TERRITOIRE
ET DE L'ENVIRONNEMENT
Direction générale
de l'administration
et du développement
Direction de l'eau
MINISTÈRE DE L'EMPLOI
ET DE LA SOLIDARITÉ
Direction générale de la santé

Juin 1999

Annexe 2 : Formulaire à remplir en cas de prolifération algale dans les eaux publiques.

QUESTIONNAIRE SUR LES PROLIFÉRATIONS ALGALES
EN EAUX DOUCES

(microalgues et cyanobactéries) (1)

Etablir une fiche par incident

Confidentiel : OUI - NON (2)

Nom de la personne :

Organisme d'appartenance :

Service :

Adresse :

Téléphone : Fax :

e-mail :

Lieu de l'incident :

Nom de la pièce d'eau :

Département :

Commune :

Date de l'incident :

Type d'eau : préciser si possible la fonction (réservoir d'eau potable, baignade, pêche, chasse...)

PLAN D'EAU

RIVIÈRE

LAC

ZONE

d'abreuvement

pour animaux

AUTRES

(1) Aussi appelées : cyanophycées, algues bleues, cyano-procaryotes.

(2) Barrer la mention inutile.

Conditions climatiques (au moment de l'apparition des proliférations) :

TEMPÉRATURE °C

air/eau

VENT

SOLEIL

ORAGE

PLUIE

AUTRES

Phénomènes observés :

COULEUR
de l'eau
TRANSPARENCE
ACCUMULATION
en surface
ODEUR
AUTRES

Conséquences de l'incident : OUI - NON - Si oui :
chez quels animaux, précisez l'effectif :

POISSONS
OISEAUX
OVINS
BOVINS
AUTRES

La cause a-t-elle été confirmée par un examen vétérinaire ? OUI - NON
Décès : OUI - NON Perturbations : OUI - NON, si oui lesquelles :
chez l'homme :

DERMATOSES
GASTRO-
entérites
CONJONCTIVITES
PROBLÈMES
respiratoires
AUTRES

La cause a-t-elle été confirmée par un examen médical ? OUI - NON
Microorganismes identifiés : OUI - NON par quelle institution :
Lesquels :
Mesures de toxicité : OUI - NON, par quelle institution :

Méthodes
Types de toxine

Concentration

en toxine

Essais de traitement (chimiques, mécaniques ou autres) pour éliminer la prolifération :
OUI - NON : par quelle institution :

MÉTHODES UTILISÉES
DOSAGES
NOMBRE D'INTERVENTIONS

RÉSULTATS OBTENUS

Essais de traitement (chimiques, mécaniques ou autres) pour prévenir la prolifération :
OUI - NON : par quelle institution :

MÉTHODES UTILISÉES DOSES NOMBRE D'INTERVENTIONS RÉSULTATS OBTENUS
--

Rapport(s) d'étude(s) disponible(s) : OUI - NON.

S'il existe des analyses de la qualité de l'eau pour cette période (contrôle sanitaire des eaux de baignade, contrôle sanitaire pour l'eau potable...), merci de les joindre si possible.

Autres remarques :

Réponse à envoyer à :

Dr. Nicole Tandreau de Marsac

Institut Pasteur

Unité de physiologie microbienne

28, rue du Docteur-Roux,

75724 Paris Cedex 15

Tél. : 01-45-68-84-14, fax : 01-45-68-30-42

e-mail : ntmarsac@pasteur.fr

BIBLIOGRAPHIE

- 1-ANAGNOSTIDIS K., KOMAREK J. (1985-1989). "Modern approach to the classification system of cyanophytes." Archives Hydrobiol. 1985, 1-Introduction, suppl.71, Algol. Stud. 38/39: 291-302; 1986, 2-Chroococcales, suppl.73, Algol. Stud. 43: 157-226; 1988, 3-Oscillatoriales, Suppl.80, Algol. Stud. 50/53: 327-472; 1989, 4-Nostocales, suppl. 82, Algol. Stud. 56: 247-345.
- 2-BANKER R., TELSCH B., SUKENIK A., CARMELI S. (2000) 7-Epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from lake Kinneret, Israel. J. Nat. Prod. 63. 387-389.
- 3-BANNER A.H. (1959). A dermatitis-producing alga in Hawaiï. Hawaiï Med. J. 19 : 35-36.
- 4-BEASLEY V.R., COOK W.O., DAHLEM A.M., HOOSER S.B., LOWELL R.L., VALENTINE W.M. (1989). Algae intoxication in livestock and waterfowl. Vet. Clin. North Am. 5 : 345-361.
- 5-BERNARD C., HARVEY M., BRIAND J-F., BIRE R., FONTAINE J.J., KRYS S. (2003) Liver damage caused by a french *Cylindrospermopsis raciborskii* strain : comparison with diverse *C. raciborskii* toxic strains. Environ. Toxicol. 18 : 176-186.
- 6-BOUCHESEICHE C., BOSC N. (2000). Les rivières eutrophisées prioritaires du SDAGE : Stratégies d'action. Note technique SDAGE n°3. Agence de l'eau RMC, DIREN Rhône-Alpes. 2000. 52 p. (Source Internet).
- 7-BOURRELY, P. (1985). Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome III. Les algues bleues et rouges. Les Eugléniens, Péridiniens et Cryptomonadines. Coll. Faunes et Flores actuelles. Paris : 1-603.
- 8-BOYD C.E., PRATHER E.E. and PARKS R.W. (1975). Sudden mortality of a massive phytoplankton bloom. Weed Science 23.: 61-67.
- 9-BRIAND J-F., JACQUET S., BERNARD C., HUMBERT J-F. (2003). Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. Vet. Res. 34 : 361-377.
- 10-BRIENT L., LEGEAS M., LEITAO M., PEIGNER P. (2004). Etude interrégionale Grand Ouest sur les cyanobactéries en eau douce. Université de Rennes 1. Avril 2004. 79 p. (source internet).
- 11-CARDELLINA J.H., MARNER F.J., MOORE R.E. (1979). Seaweed dermatitis, structure of lyngbyatoxin A. Science, 204 : 193-195.
- 12-CARMICHAEL W.W. (1994). « Les toxines des cyanobactéries ». Pour la Science n°197, 44-51.
- 13-CARMICHAEL W.W., GORHAM P.R.. (1978). Anatoxins from clones of *Anabaena flos aquae* isolated from lakes of Western Canada. Mitt. Int. Verein. Limnol. 21 : 285-295.

- 14-CARMICHAEL W.W., MAHMOOD N.A., HYDE E.G. (1990). "Natural toxins from cyanobacteria (blue green algae)." *Marine toxins : origin, structure and molecular pharmacology* Am. Chem. Soc. Washington : 87-106.
- 15-CATTERALL W.A. (1980). Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20 : 15-43.
- 16-CHU F.S., HUANG X., WEI R.D. (1990). Enzyme linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms. *J. Assoc. Analyt. Chem.* 73 (3) : 451-456.
- 17-CODD G.A., BROOKS W.P., PRIESTLEY I.M., POON G.K., BELL S.G. (1989). Production, detection, and quantification of cyanobacterial toxins. *Tox. Assess.* 4 : 499-511.
- 18-CODOMIER, L. (1993). Cyanobactéries toxiques: les hépatotoxines. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Toulouse : 192.
- 19-COOK W.O., BEASLEY V.R., LOVELL R.A., DAHLEM A.M., HOOSER S.B., MAHMOOD N.A., CARMICHAEL W.W. (1989). Consistent inhibition of peripheral cholinesterases by neurotoxins from the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos aquae* : studies of duck, swine, mice and a steer. *Environ. Toxicol. Chem.* 8 : 915-922.
- 20-DABHOLKAR A.S., CARMICHAEL W.W. (1987). Ultrastructural changes in the mouse liver induced by hepatotoxin from the freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, strain 7820. *Toxicon* 25 : 285-292.
- 21-DAVIO S.R., FONTELO P.A. (1984). A competitive displacement assay to detect saxitoxin and tetrodotoxin. *Analyt. Biochem.* 141 : 199-204.
- 22-DELRIEU G., MEROT P. (2004). Intoxications de chiens dans les gorges du Tarn, le rôle des cyanobactéries. Journées Nationales GTV, Tours. 709-714.
- 23-DESIKACHARY T.V. (1972). "Taxonomy and biology of blue-green algae." Univ. Madras Center for advanced Study in Botany.: 1-591.
- 24-DEVLIN J.P., EDWARDS O.E., GORHAM P.R., HUNTER N.R., PIKE R.K., STAVRIC B. (1977). Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos aquae* NRC-44. *Can. J. Chem.* 55 : 1367-1371.
- 25-EDWARDS C., BEATTIE K.A., SCRIMGEOUR C.M., CODD G.A. (1992). Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Inch, Scotland. *Toxicon* 30 : 1165-1175.
- 26-EDWARDS C., LAWTON L.A., BEATTIE K.A., CODD G.A., PLEASANCE S., DEAR G.J. (1993). Analysis of microcystins from cyanobacteria by liquid chromatography with mass spectrometry using atmospheric-pressure ionization. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 7 : 714-721.

27-FALCONER I.R. (1998). Algal toxins and human health, in : The Handbook of environmental chemistry, J. HRUBEC, Berlin Heidelberg, SpringerVerlag, 5 Part C Quality and treatment of drinking water II. Berlin : 53-82.

28-FALCONER I.R. (1993). Measurement of toxins from blue-green alga in water and foodstuffs. In : I.R. FALCONER (Ed.) Algal toxins in Seafood and Drinking Water. Academic Press, London : 165-175.

29-FALCONER I.R., JACKSON A.R.B., LANGLEY J., RUNNEGAR M.T.C. (1981). Liver pathology in mice in poisoning by the blue-green alga in *Microcystis aeruginosa*. Aust. J. Biol. Sci. 34. 179-187.

30-FAY P., VAN BAALEN C. [Eds](1987). The cyanobacteria. Elsevier, Amsterdam : 534 p.

31-FOXALL T.L., SASNER J.J.Jr (1981). "Effects of a hepatic toxin from the cyanophyte *Microcystis aeruginosa*." The water environment. Algal toxins and Health, Carmichael, W.W. New York, Plenum Press : 365-387.

32-FRANCIS G. (1878). Poisonous Australian lake, Nature 18 : 11-12.

33-GALEY F.G., BEASLEY V.R., CARMICHAEL W.W. *et al.* (1987). Blue green algae (*M. aeruginosa*) : hepatotoxicosis in dairy cows. Am. J. Vet. Res. 9 : 1415-1419.

34-GHORAM P.R. (1964). Toxic algae. Algae and Man. New York. Jackson, D.F., ed. Plenum Press.: 307-336.

35-GUGGER M. (2003). Recherche de la causalité de la mort de chiens dans le phytoplancton et la vase de la rivière La Loue : cyanobactéries benthiques à potentiel toxique. Rapport intermédiaire non publié, Museum d'Histoire Naturelle, PARIS & Institut National de Recherche Agronomique, THONON LES BAINS : 1-10.

36-HAWKINS P.R., CHANDRASENA N.R., JONES G.J., HUMPAGE A.R., FALCONER I. (1997). Isolation of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. Toxicon 35. 341-346.

37-HARADA K.I., OTHANI I., IWAMOTO K., SUZUKI M., WATANABE M.F., WATANABE M., TERAO K. (1994). Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. Toxicon 32 : 73-84.

38-HARADA K.-I. (1996). Chemistry and detection of microcystins. In : M.F. WATANABE, K.-I. HARADA, W.W. CARMICHAEL, H. FUJIKI (Eds.). Toxic *Microcystis*. Chemical Rubber Company (CRC) Press. Boca Raton, Florida 103-148.

39-HARADA K.I., KONDO F., LAWTON L. (1999). Laboratory analysis of cyanotoxins. In: Toxic cyanobacteria in water, a guide to their public health consequences, monitoring and management. CHORUS I. & BARTRAM J. (Ed.) SPON Press : 370-399.

- 40-HOLMES C.F.B. (1991). Liquid chromatography-linked protein phosphatase bioassay ; a highly sensitive marine bioscreen for okadaic acid and related diarrhetic shellfish toxins. *Toxicon*, 29 (4/5) : 469-477.
- 41-ICHIMURA T. (1979). Media for blue-green algae. *Methods in Algological studies*. Nishizawa K. and Chihara M. Tokyo. Ed. Kyoritsu : 294-305.
- 42-JACKIM E., GENTILE J.H. (1968). Toxins of a blue-green alga : similarity to saxitoxin. *Science*, New York, 162 : 915-916.
- 43-JACKSON A.R.B., Mc INNES A., FALCONNER I.R. and RUNNEGAR M.T.C. (1984). Clinical and pathologic changes in sheep experimentally poisoned by the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Vet. Pathol.* 24 : 102-113.
- 44-JACQUET S., DUFOUR P., LATOUR D., BERNARD C., BRIAND J-F., HUMBERT J-F., ROBIN J., WILLAME R., SARAZIN G., BRIENT L. (2003). Changements globaux et efflorescences à cyanobactéries en France. GRISCYA 26/11/2003. UMR CARTEL, INRA Thonon les Bains. 28 p.
- 45-KONST H., McKERNER P.D., GORHAM P.R., ROBERTSON A. and HOWELL J. (1965). "Symptoms and pathology produced by toxic *Microcystis aeruginosa* NRC-1 in laboratory and domestic animals." *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 29 : 221-228.
- 46-KOZMA A. (1997). Interlaboratory trial using Thamnotox kit for detecting cyanobacterial toxins. Abstract, VIII International Conference on Harmful Algae, Vigo. Spain : p. 114.
- 47-KRISHNAMURTHY T., SZAFRANIEC L., HUNT D.F., SHABANOWITZ J., YATES J.R., HAUER C.R., CARMICHAEL W.W., SKULBERG O.M., CODD G.A. and MISSLER S. (1989). "Structural characterization of toxic cyclid peptides from blue-green algae by tandem mass spectrometry." *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 86 : 770-774.
- 48-LAMBERT T.W., BOLAND M.P., HOLMES C.F.B., HRUDEY S.E. (1994). Quantitation of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with the protein phosphatase bioassay. *Environ. Sci. Technol.* 28(4) : 753-755.
- 49-LAWTON L., MARSALEK B., PADISAK J., CHORUS I. (1999). Determination of cyanobacteria in the laboratory. In: *Toxic cyanobacteria in water, a guide to their public health consequences, monitoring and management*. CHORUS I. & BARTRAM J. (Ed.) SPON Press : 347-367.
- 50-LAZAROFF N., VISHNIAK W. (1961). "The effect of light on the development cycle of *Nostoc muscorum*, a filamentous blue-green alga." *J. gen. Microbiol.* 25 : 365-374.
- 51-LI R., CARMICHAEL W.W., BRITAIN S., EAGLESHAM G.K., SHAW G.R., LIU Y., WATANABE M.M. (2001). First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (cyanobacteria). *J. Phycol.* 37. 1121-1126.

52-LINDHOLM T., MERILUOTO J.A.O. (1991). Recurrent depth maxima of the hepatotoxic cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 48 : 1629-1634.

53-MacBARRON E.J., MAY V. (1966). Poisoning of sheep in New South Wales by the blue-green alga *Anacystis cyanea* (Kuetz.). Dr and Dail, Aust. Vet. J. 42 : 449-453.

54-MAHMOOD N.A., CARMICHAEL W.W., PFAHLER D. (1988). Anticholinesterase poisonings in dogs from a cyanobacteria (Blue green algae) bloom dominated by *Anabaena flos aquae*. Am. J. Vet. Res. 49. 500-503.

55-MAIN A.R. (1980). Cholinesterase inhibitors. In : Introduction to biochemical toxicology, HODGSON E., GUTHRIE F., Ed. New-York. 194-223.

56-MAIN D.C., BERRY P.H., PEET R.L., ROBERTSON J.P. (1977) Sheep mortalities associated with the blue-green alga *Nodularia spumigena*. Aust. Vet. J. 53 : 578-581.

57-METZNER, I. (1955). "Zur chemie und zum submikroskopischen Aufbau der Zellwände, Scheiden und Gallerte von Cyanophyceen." Arch. Mikrobiol. Vol.22 : 45-77.

58-MULHEARN C.J. (1959). Beware algae ! They can poison livestock. J. Agricult. 62 : 406-408.

59-MUR L.R., SKULBERG O.M., UTLIKEN H. (1999). Cyanobacteria in the environment. In: Toxic cyanobacteria in water, a guide to their public health consequences, monitoring and management. CHORUS I. & BARTRAM J. (Ed.) SPON Press : 15-40.

60-MYNDERSE J.S, M. R. E., KASHIWAGI M., NORTON T.R. (1977). "Antileukemia activity in the Oscillatoriaceae, isolation of debromoaplysiatoxin from *Lyngbya*." Science 196 : 538-540.

61-NEHRING S. (1993). Mortality of dogs associated with a mass development of *Nodularia spumigena* (Cyanophyceae) in a brackish lake at the German North Sea coast. J. Plankton Res. 15 : 867-872.

62-OLIVER R.L., T. R. H., REYNOLDS C.S. and WALSBY A.E. (1985). The sedimentation of buoyant *Microcystis* colonies caused by precipitation with an iron-containing colloid. Proc. R. Soc. Lond. 223. London : 511-552.

63-OHTANI I., MOORE R.E., RUNNEGAR M.T.C. (1992) Cylindrospermopsin : a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. J. Am. Chem. Soc. 114. 7941-7942.

64-OSBORNE N.J., WEBB P.M., SHAW G.R. (2001). The toxins of *Lyngbya majuscula* and their human and ecological health effects. Environ. Int. 27 : 381-392.

65-OSHIMA Y. (1995). Postcolumn derivatization liquid chromatography method for paralytic shellfish toxins. J. AOAC Int. 78 : 528-352.

- 66-PRINGSHEIM, E. G. (1964). Pure cultures of algae, their preparation and maintenance. Cambridge, Cambridge University Press : 119.
- 67-QUILLIAM M.A., THOMSON B.A., SCOTT G.J., SIU K.W.M. (1989). Ion-spray mass spectrometry of marine neurotoxins. Rapid Commun. Mass Spectrom. 3 : 145.
- 68-REYNOLDS C.S., J. J. M. H., CMIECH H.A. and LEEDALE G.F. (1981). On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. London : 419-477.
- 69-REYNOLDS C.S., W. A. E. (1975). Waterblooms. Biol. Rev. 50 : 437-481.
- 70-SARAZIN G., QUIBLIER-LLOBERAS C., BERTRU G., BRIENT L., VEZIE C., BERNARD C., COUTE A., HENNION M.C., ROBILLOT C., TANDEAU DE MARSAC N. (2002). Première évaluation du risque toxique lié aux cyanobactéries d'eau douce en France : le programme « EFFLOCYA ». Rev. Sci. Eau 15/1 (2002) : 315-326.
- 71-SAKER M.L., THOMAS A.D., NORTON J.H. (1999). Cattle mortality attributed to the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an outback region of North Queensland. Environ. Toxicol. 14 : 179-182.
- 72-SAWYER P.J., GENTILE J.H., SASNER J.J.Jr. (1968). Demonstration of a toxin from *Aphanizomenon flos aquae* (L). Ralfs, Can. J. Microbiol. 14 : 1199-1204.
- 73-SCHULTE C., NAGEL R. (1994). Testing acute toxicity in the embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio*, as an alternative to the acute fish test : preliminary results. ATLA 22 : 12-19.
- 74-SCILLIER D.(1993). Cyanobactéries toxiques : les neurotoxines. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Toulouse : p. 35-38.
- 75-SEAWRIGHT A.A., NOLAN C.C., SHAW G.R., CHISWELL R.K., NORRIS R.L., MOORE M.R., SMITH M.J. (1999). The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). Environ. Toxicol. 14. : 135-142.
- 76-SEGEL T.H. (1975). Enzyme Kinetis. In : John Wiley and Sons, New York : 127.
- 77-SIVONEN K., JONES G. (1999). Cyanobacterial toxins. In : Toxic cyanobacteria in water, a guide to their public health consequences, monitoring and management. CHORUS I. & BARTRAM J. (Ed.) SPON Press : 41-198.
- 78-SOLL M.D., WILLIAMS M.C. (1985). Mortality of white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) suspected to be associated with the blue-green alga *M. aeruginosa*. J. S. Afr. Vet. Assoc. 56 : 49-51.
- 79-SWANSON K.L, R. H., ARONSTAM R.S., ALBUQUERQUE E.X. (1990). "Nicotinic Acetylcholine Receptor Function studied with synthetic (+) Anatoxin A and derivatives marine toxins: origin, structure and molecular pharmacology." ACS, Symposium series Vol. 418: 106-118.

80-THEISS W.C., CARMICHAEL W. W., WYMAN J. and BRUNER R.H. (1988). "Blood pressure and hepatocellular effects of the cyclic heptapeptide toxin produced by the freshwater cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* strain PPC." 7820. *Toxicon*. 26 : 603-613.

81-TOIVOLA D.M., GOLDMAN R.D., GARROD D.R., ERIKSSON J.E. (1997). Protein phosphatase maintain the organization and structural interactions of hepatic keratin intermediate filaments. *J. Cell Sci.* 110 : 23-33.

82-UTLIKEN H., FASTNER J., BARTRAM J. (1999). Fieldwork: site inspection and samplig. In : Toxic cyanobacteria in water, a guide to their public health consequences, monitoring and management. CHORUS I. & BARTRAM J. (Ed.) SPON Press : 329-345.

83-VAN DEN HOEK C., M. D. G., JAHNS H.M. (1995). Algae. An introduction to phycology. Cambridge, Cambridge University Press : 623 p.

84-VAN DER WESTHUIZEN A.J., ELOFF, J.N., and KRUGER, G.H.J. (1986). "Effect of the température and light (fluence rate) on the composition of the toxin of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UV-006)." *Archives Hydrobiol.* 108 : 145-154.

85-VAN DOLAH F.M. (2000). Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence, *Environ. Health Perspect.* 108 : 133-141.

86-WATANABE M.F., OISHI S. (1985). "Effect of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under conditions." *Appl. Environn. Microbiol.* 49 : 1342-1344.

87-WHITTON B.A., SINCLAIR C. (1975). Ecology of blue-green algae. *Sci. Prog. Oxford.* 62 : 429-446.

NOM PRENOM : SILVANO JEREMY

TITRE : TOXICITE DES CYANOBACTERIES D'EAU DOUCE VIS A VIS DES ANIMAUX DOMESTIQUES ET SAUVAGES.

Thèse Vétérinaire : Lyon, 28/02/05

RESUME :

Les cyanobactéries toxiques sont des organismes procaryotes photosynthétiques qui sont capables de proliférer sous forme d'efflorescences ou « fleurs d'eau » lorsque les conditions environnementales sont favorables à leur croissance. Elles synthétisent des toxines appelées cyanotoxines, les plus dangereuses et les mieux connues sont les neurotoxines et les hépatotoxines, qui peuvent être à l'origine d'intoxications animales ou humaines dans toutes les régions du globe. Le diagnostic de ces intoxications reste assez délicat à établir.

Il est urgent de mettre en place des mesures de prévention et de surveillance de l'apparition d'efflorescences à cyanobactéries dans l'eau, car elles représentent un réel danger pour la santé publique.

MOTS CLES :

- Intoxication
- Cyanobactéries
- Hépatotoxines
- Neurotoxines

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur Jacques Descotes
1 ^{er} Assesseur :	Monsieur le Professeur Gérard Keck
2 ^{ème} Assesseur :	Monsieur le Professeur Philippe Berny

DATE DE SOUTENANCE : 28 Février 2005

ADRESSE DE L'AUTEUR :

7, rue du Maréchal ferrant
30150 MONTFAUCON