

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE



Année 2007

Thèse N° ~~356~~
3309 4

**LES CYANOBACTERIES ET LEURS TOXINES
RISQUES POUR LA SANTE ET L'ENVIRONNEMENT
ASPECTS ANALYTIQUES**



THESE

POUR LE

DIPLOME D'ETAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 2 avril 2007

par

Pierre CHARDONNET

né le 25 novembre 1981 à Issoudun (36)

JURY

M. le Professeur Christian MOESCH
Mme le Docteur Marie-Françoise DREYFUSS
Mme Michèle SELVE (Directeur de thèse)

Président
Juge
Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Gérard HABRIOUX
ASSESEUR : Madame le Professeur Dominique CHULIA
ASSESEUR : Monsieur Francis COMBY

PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DREYFUSS Gilles	PARASITOLOGIE-MYCOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

ALLAIS Daovy	PHARMACOGNOSIE
BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES, INFORMATIQUE
CARDI Patrice	PHYSIOLOGIE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DELEBASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LAGORCE Jean-François	CHIMIE ORGANIQUE (en disponibilité)
LARTIGUE Martine	PHARMACODYNAMIE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
PARTOUCHE Christian	NEUROLOGIE, ENDOCRINOLOGIE
POUGET Christelle	PHARMACIE GALENIQUE
ROUSSEAU Annick	BIOMATHEMATIQUES
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE PHARMACEUTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE
VIGNOLES Philippe	BIOMATHEMATIQUES

PROFESSEUR CERTIFIE :

MARBOUTY Jean-Michel

ANGLAIS

ATER A MI-TEMPS :

BEGAUD-GRIMAUD Gaëlle

Scé M. le Prof. BOTINEAU

COURTIOUX Bertrand

Scé M. le Prof. DREYFUSS

LE JEUNE Anne-Hélène

Scé M. le Prof. BOTINEAU

MOUSSEAU Yoanne

Scé M. les Prof. DREYFUSS et MOESCH

SAMARA Maha

Scé Mme. le Prof. OUDART

YAHIAOUI Samir

Scé M. le Prof. BUXERAUD

A Monsieur Christian MOESCH,

Professeur des Universités,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse.

Nous vous remercions de l'aide et du soutien que vous nous avez témoignés au cours de la rédaction ainsi que de l'ensemble des enseignements que vous nous avez prodigués lors de notre formation. Votre attachement aux différentes facettes du métier de pharmacien est, pour nous, un exemple à suivre.

**A Madame Marie-Françoise DREYFUSS,
Maître de Conférences des Universités,**

Nous vous remercions sincèrement d'avoir consenti à être membre du jury de cette thèse, d'y avoir apporté un regard d'expert et de nous avoir transmis des méthodes de travail rigoureuses.

A Madame Michèle SELVE,

Directeur-adjoint du Laboratoire Départemental d'Analyses de la Corrèze,

C'est avec plaisir que nous vous avons confié la direction de cette thèse. Nous vous sommes extrêmement reconnaissants pour l'aide et la disponibilité que vous nous avez consacrées, tant lors de la rédaction de la thèse que lors des travaux effectués pendant le stage.

**A Monsieur Jean-Marc TOULLIEU, Directeur du Laboratoire
Départemental d'Analyses de la Corrèze,**

Nous vous remercions de nous avoir accueilli lors du stage de sixième année de pharmacie, et de nous avoir confié la responsabilité du suivi des analyses de microcystines.

**A Monsieur Jean-Marc LAMBERT, ingénieur, et à l'ensemble du
personnel du secteur hydrologie du Laboratoire Départemental d'Analyses
de la Corrèze,**

Un grand merci pour le soutien, la disponibilité et la bonne humeur qui ont régné tout au long du stage.

A l'ensemble du personnel du Laboratoire,

Pour l'accueil chaleureux et la sympathie que vous nous avez témoignés.

**A Madame Jacqueline FUGUET, technicien sanitaire à la Direction
Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales de la Corrèze,**

Nous vous remercions pour les données sur les cyanobactéries et la qualité des eaux que vous nous avez confiées et qui ont constitué un support de rédaction de la thèse.

Je remercie Monsieur Eric VANDERVLLET, pharmacien à Chezal-Benoît, pour avoir suscité, lors de mon premier contact avec le milieu officinal, ma curiosité et mon intérêt pour cette discipline.

Je remercie également Monsieur et Madame LALECHERE, pharmaciens à Lignières, de m'avoir accueilli lors du stage officinal de fin de première année et de m'avoir transmis leur expérience.

Ma gratitude va également à Monsieur et Madame MILHET pour leur accueil, leur soutien et leurs précieux conseils.

A

mes parents,

mes grand-mères,

ma famille,

vous qui, par votre présence et votre affection, m'avez assuré de votre confiance, de votre disponibilité, de votre aide et de vos encouragements. Je vous en suis reconnaissant.

A Laure,

pour ta présence, ton aide et ton réconfort.

A mes amis,

pour votre bonne humeur, les bons moments passés ensemble et votre soutien.

Sommaire

Introduction

Les cyanobactéries et leurs toxines

- 1.1. Les cyanobactéries
- 1.2. Les conditions de prolifération des cyanobactéries
- 1.3. Les toxines : structure et caractéristiques physico-chimiques

Les dangers liés aux cyanobactéries

- 2.1. Aspects toxicologiques
- 2.2. Aspects épidémiologiques
- 2.3. La réglementation sur les cyanobactéries et leurs toxines

Les méthodes d'identification et de quantification des cyanobactéries et des toxines

- 3.1. Prélèvement
- 3.2. Détection et dénombrement des cyanobactéries
- 3.3. Détection et quantification des cyanotoxines
- 3.4. Applications au dosage des microcystines au Laboratoire Départemental d'Analyses de la Corrèze

Situation sur le département de la Corrèze en 2006

- 4.1. Les analyses de toxines au laboratoire
- 4.2. Le rôle de la Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales
- 4.3. L'information du public par les médias

Conclusion

Bibliographie

Table des matières

Table des figures

Table des tableaux

Revue de presse

Annexes

- Annexe n°1 : Structure des microcystines –LR, –YR et –RR.
- Annexe n°2 : Résultats pour la microcystine-YR
- Annexe n°3 : Résultats pour la microcystine-RR
- Annexe n°4 : Validation de méthode (1)
- Annexe n°5 : Validation de méthode (2)
- Annexe n°6 : Exemples de cartes de contrôle pour la microcystine-LR
- Annexe n°7 : Baignades surveillées en Corrèze en 2006

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AFNOR : Agence Française de NORmalisation
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AFSSE : Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement
AFSSET : Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail
AGLAE : Association Générale des Laboratoires d'Analyses de l'Environnement
ARN : Acide RiboNucléique
CEN : Comité Européen de Normalisation
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
COFRAC : COmité FRançais d'ACcréditation
CSHPF : Conseil Supérieur d'Hygiène Public de France
CSP : Code de la Santé Publique
Da : Dalton
DAD : Diode Array Detector
DDASS : Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales
DGS : Direction Générale de la Santé
DL50 : Dose Létale 50%
DMENO : Dose Minimale avec un Effet Nocif Observable
DMSO : DiMéthylSulfOxyde
DO : Densité Optique
DSENO : Dose Sans Effets Nocifs Observés
EIL : Essai Inter-Laboratoires
ELISA : Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay
ICBN : International Code of Botanical Nomenclature
IPFM : Intoxication paralysante par les fruits de mer
ISO : International Organisation for Standardization
LDA : Laboratoire Départemental d'Analyses
LPS : LipoPolySaccharide
LQ : Limite de Quantification
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
PP2A : Protéine Phosphatase de type 2A
PSP : Paralytic Shellfish Poisonning
SM : Spectrométrie de Masse
SPE : Solid Phase Extraction
TFA : Acide TrifluoroAcétique
UV : Ultra-Violet

Introduction

Il apparaît depuis quelques temps une prise de conscience de la richesse mais aussi de la vulnérabilité des ressources en eau. La notion de réchauffement climatique, qui semble conduire nos régions vers des saisons plus chaudes, a forcément un impact sur la quantité mais aussi sur la qualité des ressources aquifères. La qualité de l'eau que nous utilisons régulièrement dans la vie quotidienne est sous surveillance constante. De la même façon, l'eau que nous utilisons pour des activités de loisirs au sein des milieux naturels est également surveillée. Parmi les nombreux paramètres étudiés, il en est un relativement récent et peu connu du grand public, relatif à la présence de cyanobactéries ou de toxines.

Aussi, la problématique liée à la prolifération des cyanobactéries et à la libération de toxines dans les milieux aquatiques ne cesse d'être prise en compte par les scientifiques et les pouvoirs publics. En effet, ces toxines concernent l'homme soit en tant que menace par les intoxications alimentaires, soit parce que leur présence peut être influencée par les activités humaines. Les récents cas d'intoxications, comme par exemple celles de chiens en Lozère, et le nombre de baignades fermées en raison de la prolifération algale sont de plus en plus importants. Il paraît alors nécessaire de développer les connaissances sur ce sujet, et de mettre en place les outils techniques, scientifiques et d'informations indispensables à une maîtrise du risque.

Ainsi, le présent document va reprendre dans une première partie les principales connaissances sur la biologie et sur les conditions de prolifération des cyanobactéries. Ce chapitre présente également les différents types de toxines identifiées à l'heure actuelle, selon une classification basée sur leur mode d'action. Leurs structures et caractéristiques physico-chimiques y sont développées également de façon à disposer des données nécessaires pour la partie analytique. Cette partie se termine par des éléments de connaissances encore embryonnaires dans ce domaine, à savoir comment sont libérées les toxines dans l'environnement et quelle est leur répartition géographique.

La description des caractéristiques toxicologiques des différents types de toxines, en fonction de leurs modes d'action et valeurs de toxicité, intervient dans la deuxième partie. A la suite de ces données, relativement hétérogènes selon les toxines, sont présentés les

principaux résultats des études épidémiologiques menées sur ce thème. Sur le plan sanitaire développé dans un premier temps avec notamment les différents cas de contamination humaine répertoriés dans le monde, cette partie se poursuit dans un second temps par des exemples d'études d'impacts sur les milieux naturels et les animaux. En effet, les nombreux cas d'intoxications ont obligé les pouvoirs publics à mettre en œuvre une réglementation et des mesures précises de surveillance. Parmi les nombreuses toxines existantes, seule l'une d'entre elles, appelée microcystine, est inscrite dans la législation française pour la surveillance des eaux destinées à la consommation humaine.

Afin d'assurer ce suivi, les scientifiques ont cherché à développer des méthodes de recherche et de dosage des toxines dans les eaux, de même que de dénombrement et d'identification des algues. Plusieurs méthodes analytiques existent actuellement avec de grandes inégalités selon les toxines puisqu'il n'existe qu'une seule norme internationale de dosage des microcystines-LR, -YR et -RR par chromatographie liquide haute performance. En France, ces techniques sont relativement peu mises en œuvre, et peu de laboratoires sont qualifiés dans ce domaine. En raison de l'avance du département de la Corrèze dans le suivi des baignades, le Laboratoire Départemental a développé depuis plusieurs années une méthode d'analyse. Engagé dans un système d'assurance qualité, le Laboratoire a décidé de présenter cette méthode lors de l'audit d'accréditation par le Comité Français d'Accréditation. L'ensemble de ces données, ainsi que les étapes conduisant à la préparation du dossier d'accréditation, sont également décrites dans la troisième partie de cette thèse.

Enfin, en s'appuyant justement sur l'expérience des services départementaux dans ce domaine, la dernière partie s'articule autour d'exemples de recherche de toxines au laboratoire et d'une synthèse des résultats obtenus au cours de la saison estivale 2006 sur les plans d'eau du département. Ces données ont été centralisées par le service santé-environnement de la Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales de la Corrèze et constituent une base essentielle pour la bonne connaissance du risque lié à la prolifération des cyanobactéries. Afin de faire prendre conscience de ce risque aux usagers de ces zones de loisirs, quelques exemples d'articles de presse sont reproduits. Ils illustrent avec précision la problématique liée aux cyanobactéries et à leurs toxines.

Partie 1

Les cyanobactéries et leurs toxines

Cette première partie va permettre de présenter les cyanobactéries d'un point de vue morphologique, biologique et leur organisation dans le milieu de vie. Il s'agira de voir quelles sont les espèces potentiellement dangereuses pour l'homme ou l'environnement, sous quelles conditions elles présentent ce danger et quels en sont les vecteurs responsables. Les toxines des cyanobactéries seront alors décrites selon une classification non pas chimique mais basée sur le type d'organe atteint. Enfin, les conditions de libération des toxines par les cyanobactéries seront abordées.

1.1. Les cyanobactéries

Les cyanobactéries sont des organismes ayant à la fois certaines caractéristiques des bactéries mais également des plantes. En effet, ce sont des procaryotes de structure cellulaire proche de celle des bactéries et qui possèdent des pigments photosynthétiques analogues à ceux que l'on peut rencontrer dans le monde végétal. Elles sont donc capables de photosynthèse avec dégagement d'oxygène. Cette double appartenance les a longtemps fait appeler algues bleues, cyanophycées ou encore cyanoprocaryotes. Aujourd'hui le terme d'oxyphotobactérie permet également de les caractériser [1]. L'originalité de ces organismes, ainsi que la grande diversité de leurs modes de vie, ont justifié la création d'un embranchement distinct des autres végétaux.

1.1.1. Systématique

Toutes ces caractéristiques chimiques et morphologiques font qu'il est difficile d'établir une classification précise des cyanobactéries. L'Institut Pasteur possède à l'heure actuelle une collection de 750 souches pures représentant au moins 50 genres. En 1995, la classification botanique ICBN (International Code of Botanical Nomenclature) comptait 150 genres et 2000 espèces dans la classe des Cyanophycées. Les noms de genres et d'espèces de cyanobactéries sont ceux empruntés à la botanique. Les apports de la biologie moléculaire pourront certainement permettre d'ici quelques années de clarifier la taxonomie des Cyanophycées.

1.1.2. Morphologie

D'un point de vue morphologique, on distingue :

- des espèces unicellulaires, parfois solitaires mais souvent groupées en colonies. Elles peuvent être de forme sphérique ou ovoïde. Cet ensemble constitue l'ordre des Chroococcales. Le genre *Microcystis* appartient à cet ensemble.
- des espèces unicellulaires mais généralement groupées en amas, c'est-à-dire organisées en trichome. Cet ensemble constitue l'ordre des Chamaesiphonales.
- des espèces filamenteuses, dont le thalle est composé d'une série de cellules enveloppées d'une gaine. *Oscillatoria*, *Cylindrospermum* ou *Anabaena* sont des exemples de genres appartenant à ce groupe, appelé également ordre des Hormogonales. Certaines cellules de souches filamenteuses vont se différencier en hétérocystes et deviennent ainsi capables de fixer l'azote atmosphérique. D'autres cellules vont se différencier en akinètes qui sont des cellules de stockage assurant la survie en milieu difficile [1,27].

1.1.3. Biodiversité écologique et nutritionnelle

L'apparition des cyanobactéries sur la Terre remonte à environ trois milliards d'années : elles sont ainsi à l'origine de l'oxygène atmosphérique et elles ont colonisé depuis la plupart des milieux terrestres (sols, roches, glace, cendres volcaniques,...) et aquatiques (eaux douces, eaux saumâtres et eaux de mer). Certaines peuvent vivre en symbiose avec d'autres organismes et notamment des algues, des mousses,...

Pour croître, elles nécessitent peu de nutriments : eau, dioxyde de carbone, substances inorganiques et de la lumière. Certaines espèces peuvent s'affranchir de la présence de lumière pour croître, ce qui explique leur installation dans des zones défavorables. D'autres vont utiliser du sulfure d'hydrogène et ainsi proliférer en milieu volcanique. Des conditions extrêmes de pH, température ou salinité n'empêchent pas quelques espèces de se développer. Elles peuvent aussi résister aux rayonnements ultraviolets. Le milieu préférentiel des cyanobactéries reste toutefois le milieu aquatique qu'il soit salé ou non [1,2,3].

Certaines espèces aquatiques vont vivre fixées à des supports tels que des galets ou des rochers, on parle alors de cyanobactéries benthiques et d'autres vont vivre en suspension dans la colonne d'eau, on parle alors de cyanobactéries planctoniques.

1.1.4. Multiplication

Les cyanobactéries subissent une multiplication végétative, c'est-à-dire asexuée. Cette multiplication s'effectue par division binaire à partir d'une cellule mère. Dans le cas des Chroococcales, la multiplication se fait par bipartition et sans spores. Chez les Chamaesiphonales, il a été observé une formation de spores soit à l'extrémité des filaments cellulaires, soit à l'intérieur de la cellule. Enfin la multiplication chez les Hormogonales se fait par séparation des filaments en segments appelés hormogonies (mini filaments mobiles). La colonisation est possible quand ces hormogonies se séparent du filament principal [1,3].

1.1.5. Les cyanobactéries toxiques

Les cyanobactéries peuvent produire plusieurs types de toxines agissant sur différents organes cibles (foie, système nerveux). Ces toxines intracellulaires sont synthétisées par les cellules et peuvent être libérées dans le milieu selon des déterminismes qui sont encore peu connus. Une même toxine peut être produite par des espèces différentes. Ainsi, les microcystines ont déjà été observées chez des espèces du genre *Microcystis*, mais également chez des espèces des genres *Anabaena*, *Planktothrix* ou encore *Nostoc*. Une même espèce peut produire différentes toxines. C'est ainsi qu'*Anabaena spiroïdes* peut produire de l'anatoxine-a mais également des microcystines.

1.2. Les conditions de prolifération des cyanobactéries

La connaissance du développement des cyanobactéries dans le milieu aquatique est importante. En effet, l'apparition d'une prolifération algale représente une gêne dans les activités humaines telles que le traitement de l'eau, la pêche ou l'utilisation des plans d'eau pour les loisirs. De plus, certaines espèces peuvent libérer des substances possédant une activité biologique dans le milieu et pouvant éventuellement être toxiques pour les mammifères et l'homme en particulier.

La prolifération se définit comme une augmentation rapide de la biomasse d'une ou deux espèces d'algues au détriment des autres. On appelle cela une efflorescence ou un bloom. Ces efflorescences peuvent se manifester par :

- des eaux colorées non nuisibles,
- des eaux colorées toxiques pour l'écosystème,
- des eaux colorées toxiques pour l'homme,
- des eaux non colorées mais à toxicité rémanente.

Ces différentes manifestations auront des impacts variables sur l'environnement, sur les organismes présents dans le milieu et enfin sur les usages anthropiques de ces milieux. Ces effets seront décrits ultérieurement dans la deuxième partie.

Dans le cas général, la masse d'eau va présenter une grande diversité d'espèces phytoplanctoniques : cyanobactéries, chlorophycées, etc.... Celles-ci vont se développer préférentiellement dans les premiers mètres sous la surface, là où la lumière est la plus importante. Il leur faut également des conditions de température, nutritionnelles et hydrologiques adaptées. Cependant, le passage d'une situation où plusieurs espèces cohabitent à une situation où une ou deux espèces prolifèrent reste mal connu [1,2,3]. Il semble que ces situations résultent d'un phénomène de compétition entre les différentes espèces qui est généré par de nombreux facteurs, et notamment une concentration élevée en nutriments (azote et phosphore principalement). C'est l'espèce capable d'assimiler le plus rapidement ces fortes concentrations qui va proliférer au détriment des autres. Les conditions hydrologiques sont importantes : en cas de stabilité de la masse d'eau (zone de faible courant, faiblement ventée,...), c'est l'espèce la plus apte à coloniser le milieu qui va l'occuper entièrement. Inversement dans les rivières à fort débit, les cas de blooms sont plus rares. Enfin,

une forte luminosité et une température élevée, de l'ordre de 25°C, peuvent constituer des facteurs de déclenchements d'efflorescences. Tous ces éléments surviennent principalement en été, ce qui explique la saisonnalité de survenue des proliférations algales [2].

Toutefois, il existe encore peu d'explications au fait que ce sont les cyanobactéries qui vont proliférer au détriment des autres espèces phytoplanctoniques. Plusieurs pistes sont avancées pour expliquer ce phénomène [1,3]. Les cyanobactéries et les micro-algues du phytoplancton sont à la base de la chaîne alimentaire de l'écosystème aquatique : elles peuvent subir des phénomènes de prédation, de broutage et de parasitisme. Il s'agit alors pour les cyanobactéries de trouver les moyens de résister et ces moyens sont :

- une organisation en filaments ou en colonies : sous ces formes, les cyanobactéries sont moins sensibles au broutage que sous forme unicellulaire isolée.
- une production de toxines : comme certaines plantes ou bactéries, les cyanobactéries peuvent sécréter des toxines afin d'assurer leur protection contre la prédation.

Une autre clé de la supériorité des cyanobactéries est leur capacité à capter et à stocker les sources d'énergies. Ainsi, la différenciation de cellules végétatives en hétérocystes permet de fixer l'azote atmosphérique, et la différenciation en akinètes permet de stocker de grandes quantités de nutriments. La formation d'hétérocystes pourrait expliquer que le choix de réduire les concentrations en nitrates pour la prévention des proliférations des cyanobactéries dans le milieu n'est pas forcément judicieux. Les akinètes vont permettre à la cyanobactérie de résister à des conditions extrêmement difficiles, notamment à des froids ou des chaleurs intenses. Il semblerait que, une fois les conditions climatiques redevenues plus clémentes, ces akinètes servent de point de départ à la genèse de nouvelles cellules, ce qui constitue un atout important dans la colonisation rapide du milieu.

Outre l'azote, les cyanobactéries sont également capables de stocker le phosphore en grande quantité [11]. Cette donnée est importante compte tenue du rôle de l'eutrophisation des milieux aquatiques. En effet, la décomposition des organismes aquatiques va entraîner une augmentation de la concentration en phosphore dans la couche de sédiments. Sous certaines conditions (dragage, conditions météorologiques, ...) ces sédiments sont remis en suspension ce qui d'une part entraîne une nette diminution de la transparence et d'autre part une augmentation de la concentration disponible en phosphore dans l'eau. Des organismes

ayant des besoins en phosphore élevés vont alors pouvoir se développer et permettre une prolifération de cyanobactéries.

Certaines espèces sont capables de mettre en place un système de régulation de la flottaison et donc de contrôler à quelle hauteur elles vont se situer dans la colonne d'eau grâce à des vésicules à gaz. D'autres se placeront en surface et capteront toute la lumière en empêchant les espèces situées en dessous de se développer, ou vont, dans des milieux où la richesse en nutriments est en profondeur, se placer dans le fond de la colonne d'eau et profiter de la richesse nutritionnelle au dépend des autres espèces situées dans la partie supérieure de la colonne d'eau [1,3].

Enfin, d'autres espèces vont sécréter des pigments accessoires qui permettent d'assurer les fonctions photosynthétiques à plusieurs mètres de profondeur. L'intérêt de pouvoir coloniser ces eaux profondes est qu'elles sont généralement très riches en nutriments [1,3].

Ainsi, compte tenu de l'état actuel des connaissances, il est difficile de prévoir la formation d'un bloom de cyanobactéries dans un milieu, même si la plupart du temps cela survient dans un milieu eutrophe, c'est-à-dire peu profond et riche en nutriments. Il est juste possible de déterminer les milieux où la probabilité de voir survenir un bloom est la plus grande.

1.3. Les toxines : structure et caractéristiques physico-chimiques

De même qu'il est difficile d'établir un classement des espèces de cyanobactéries, le classement selon des critères chimiques des toxines sécrétées par ces organismes est délicat. Les structures les plus fréquemment rencontrées sont des peptides cycliques ou des alcaloïdes. Le plus simple reste de les classer selon le mode d'action et on distingue alors :

- les hépatotoxines : les plus fréquentes et les mieux connues,
- les neurotoxines : moins connues,
- les dermatotoxines.

1.3.1 Les hépatotoxines

1.3.1.1. Microcystines et nodularines

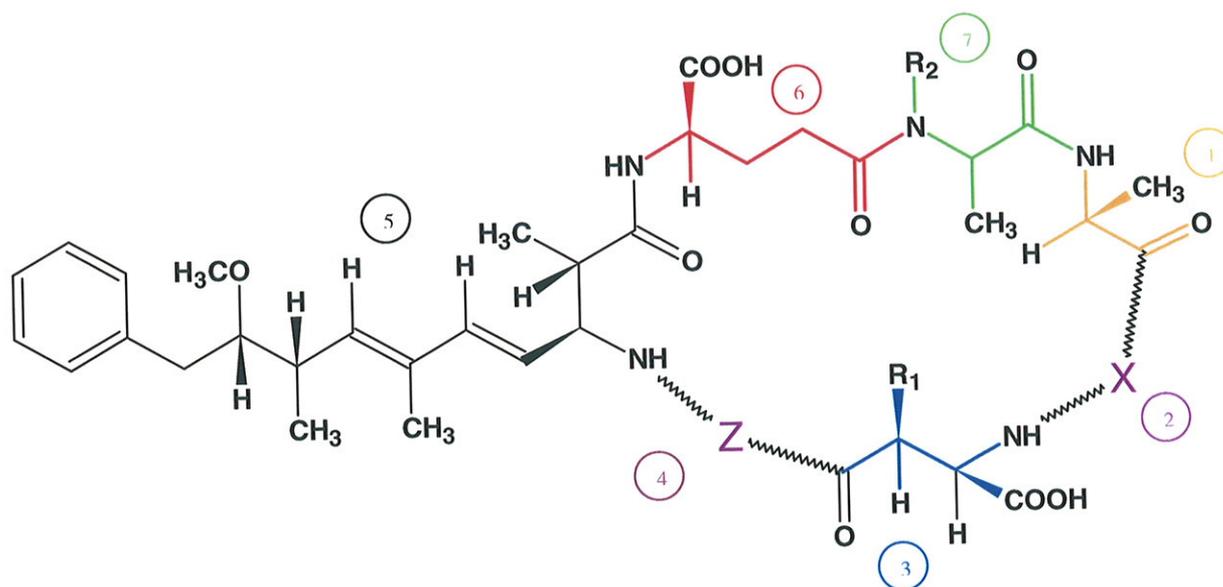
La structure chimique de ces molécules est celle d'un peptide cyclique de poids moléculaire compris entre 800 et 1100 Da.

Les microcystines sont composées de sept acides aminés avec de nombreuses variations dans la composition en acides aminés, d'où l'existence de plusieurs variants de microcystines. La formule générale des microcystines est la suivante : cyclo-[D-alanine1-X2-D-MeAsp3-Z4-Adda5-D-glutamate6-Mdha7] (figure 1). Il en existerait environ une soixantaine actuellement, identifiées principalement par des méthodes de spectrométrie de masse [38,46].

L'observation de la structure générale des microcystines indique la présence de groupements acides (souvent deux fonctions acides carboxyliques -COOH) et de groupements basiques sur des acides aminés variables (groupement guanidino). L'état d'ionisation des microcystines sera donc fonction du pH du milieu dans lequel elles se trouvent. Une étude portant sur les propriétés physico-chimiques des microcystines [44] a montré qu'à pH acide, les groupements étaient protonés (-COOH et -NH₂⁺) d'où une charge générale positive pour les microcystines-LR et -YR et deux charges positives pour la microcystine-RR. Quand le pH augmente, la fonction -COOH va s'ioniser en -COO⁻ d'où une charge générale neutre ou anionique pour les microcystines-LR et -YR et une charge générale cationique ou neutre pour la microcystine-RR. En milieu basique, le groupement guanidino redevient neutre (=NH) et les groupements carboxyliques restent sous forme anionique. Il en résulte donc des charges générales négatives pour les microcystines.

D'un point de vue de la polarité, les microcystines sont considérées généralement comme des molécules hydrophobes, bien qu'elles possèdent des groupements carboxyliques, amines et amides relativement polaires. Cette caractéristique révèle toute son importance dans le choix des phases mobiles et stationnaires en vue d'une séparation par chromatographie liquide haute performance. Les microcystines sont solubles dans le méthanol, l'éthanol, le DMSO (DiMéthylSulfOxyde) et semblent solubles dans l'eau.

Figure 1 : Structure générale des microcystines.



X et Z représentent les deux acides aminés variables.

Dans le cas de la microcystine-LR, l'acide aminé X est la leucine (L) et l'acide aminé Z est l'arginine (R). Pour la microcystine-RR, X et Z sont des arginines et pour la microcystine-YR, X est la tyrosine (Y) et Z l'arginine.

Les chiffres 1 à 7 sur la molécule correspondent aux acides aminés suivants :

1 : D-Alanine

2 : L- X

3 : D-acide aspartique

4 : L-Z

5 : Adda (acide 3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényl-4,6-diénoïque)

6 : D-acide glutamique

7 : Mdha (N-méthyldehydroalanine)

Les formules complètes des trois principales microcystines sont placées en annexe n°1.

La nodularine est un peptide composé de cinq acides aminés, dont certains sont caractéristiques des microcystines. La formule générale est la suivante : cyclo-[D-MeAsp1-L-arginine2-Adda3-D-glutamate4-Mdha5]

Plusieurs variants de nodularines ont également été identifiés. Leurs propriétés physico-chimiques sont proches de celles des microcystines [46]. Le mode d'action toxique de la nodularine est identique à celui des microcystines [1,3].

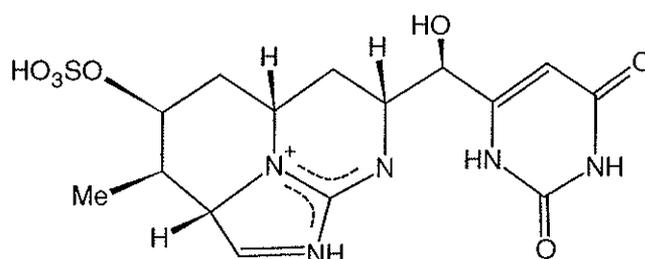
Ces toxines sont très stables : 90 % de dégradation en 2 à 6 semaines à la lumière. Les toxines de ces deux familles restent stables et résistantes à l'hydrolyse chimique ou à l'oxydation à pH neutre (≥ 7). Les microcystines et les nodularines restent actives après ébullition. Dans les échantillons naturels et à l'obscurité, les microcystines peuvent persister plusieurs mois voire des années. Les microcystines peuvent être oxydées par ozonation ou par des agents oxydants forts, ou dégradées par d'intenses radiations ultraviolettes (UV) [3].

1.3.1.2. Cyindrospermopsine

La cyindrospermopsine, toxine synthétisée par *Cyindrospermopsis*, possède également une activité hépatotoxique mais sa structure chimique est très différente des microcystines et nodularines puisqu'il s'agit d'un alcaloïde de 415 Da. Elle contient entre autre un cycle guanidique.

Il s'agit d'une toxine plus polaire et plus soluble dans l'eau que la microcystine. Elle serait peu stable dans un extrait algal (90% de dégradation en 2-3 jours à la lumière) mais seule en solution, sa demi-vie est supérieure à 10 jours [14]. Responsable de nombreux cas d'intoxications en Australie (1979, eau potable), elle provoque des hépatites et des lésions rénales et inhibe la synthèse de nombreuses protéines [1].

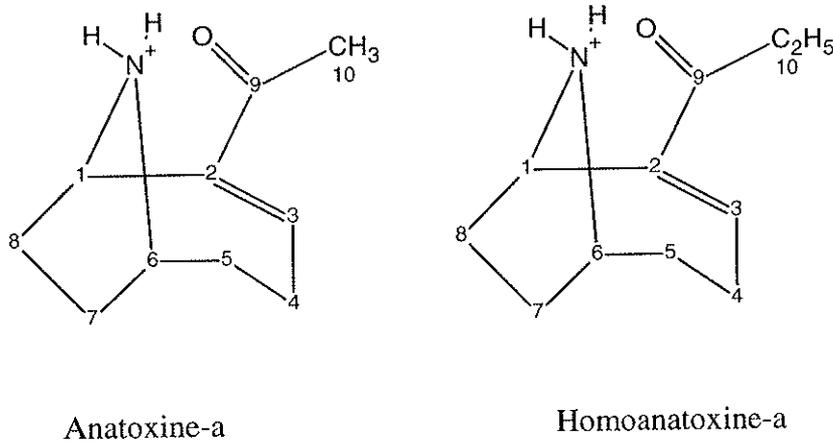
Figure 2 : Structure de la cyindrospermopsine.



1.3.2. Les neurotoxines

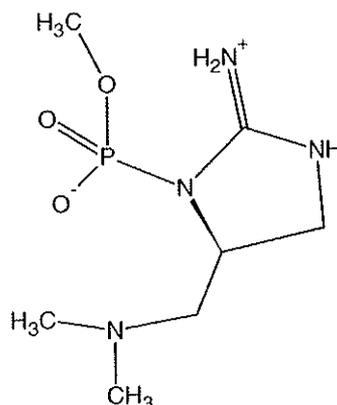
Les anatoxines sont des alcaloïdes spécifiques des cyanobactéries. L'anatoxine-a (165 Da) et son homologue méthylé l'homoanatoxine-a (175 Da) possèdent une fonction amine dont l'état d'ionisation dépend du pH. A pH acide ou neutre, la molécule sera sous forme ionisée car sa constante d'acidité pKa est égale à 9,4. Ce sont deux molécules très solubles dans l'eau et polaires. Elles sont très stables dans le milieu extérieur, excepté à pH élevé où elles seront dégradées en composés non toxiques sous l'effet de la lumière [46].

Figure 3 : Structure des anatoxines.



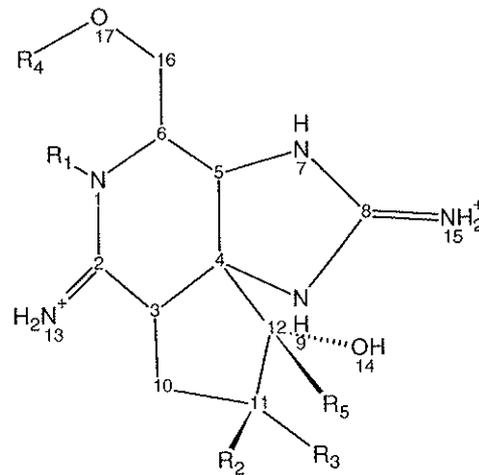
Il existe une forme légèrement différente de l'anatoxine-a appelée anatoxine-a(S), ester-phosphate d'une N-hydroxyguanidine cyclique de 252 Da. Cette molécule est instable aux pH alcalins et à la chaleur [12].

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



Les saxitoxines ont une structure proche de celle des alcaloïdes carbamates. Il en existe également plusieurs formes (environ 25 variants) en fonction de la présence ou non de certains groupements (en particulier sulfates). Des études ont montré une grande stabilité des saxitoxines en laboratoire, allant jusqu'à plusieurs mois dans l'eau [1,3].

Figure 5 : Structure générale des saxitoxines.



Les anatoxines et saxitoxines sont synthétisées par les genres *Anabaena*, *Aphanizomenon* et *Planktothrix*. On trouve des saxitoxines également chez certaines espèces de dinoflagellés marins qui sont responsables d'intoxications neurologiques parfois mortelles connues sous le nom d'intoxication paralysante par les fruits de mer (IPFM) ou de « paralytic shellfish poisoning » (PSP).

1.3.3. Les dermatotoxines

Des molécules à effets irritants, secrétées ou libérées par les cyanobactéries ont été identifiées dans les eaux de mer. Il s'agit de l'aplysiatoxine, la debromoaplysiatoxine et la lyngbyatoxine-a [3].

En revanche, dans les eaux douces, leur présence n'a pas été démontrée : la lyngbyatoxine à ce jour n'a pas été détectée et l'aplysiatoxine et la débromoaplysiatoxine n'ont pas fait l'objet de recherche ni d'une quantification.

Par ailleurs, les lipopolysaccharides (LPS) constitutifs de la paroi cellulaire de cyanobactéries ou d'autres bactéries Gram négatives sont suspectés d'être à l'origine d'effets irritants. Dans leur structure moléculaire on discerne un noyau polysaccharidique, une partie lipidique (lipide A) et une protéine antigénique de type antigène O.

1.3.4. Conditions de libération des toxines

L'étude de la libération des toxines par les cyanobactéries dans le milieu aquatique est encore plus difficile à mener que celle du déterminisme des proliférations. Plusieurs hypothèses sont toutefois à l'étude :

- la première hypothèse soulevée par les scientifiques est que la production des toxines est consécutive à un stress. Il convient alors d'étudier le comportement et la production de toxines en fonction de variations de facteurs environnementaux tels que la lumière, la température, les concentrations en nutriments,...
- une seconde hypothèse, plus récente, tend à montrer que les toxines sont des métabolites primaires, et non pas secondaires comme dans le cas précédent. Le taux de production de microcystines par cellule dépendrait du taux de croissance des cellules et serait donc indirectement lié aux facteurs environnementaux. La proportion relative de clones possédant ou non les gènes de synthèse des toxines déterminerait le niveau global de toxicité de la population qui prolifère [9].

Il semblerait que cette deuxième hypothèse soit actuellement la plus probable. Toutefois d'autres études n'ont pas confirmé ces résultats [4]. Cette problématique reste donc d'actualité.

1.3.5. Répartition géographique des toxines

Parmi les cyanotoxines citées précédemment, les microcystines sont les plus fréquemment rencontrées lors des épisodes de prolifération algale conduisant à la libération de toxines et à des cas d'intoxications humaines ou animales. Cela explique notamment qu'il s'agit de la seule toxine dont il existe, à l'heure actuelle, une norme internationale ISO permettant le dosage qui sera expliqué au paragraphe 3.4.1.

Les microcystines sont synthétisées principalement par le genre *Microcystis*, mais aussi par les genres *Planktothrix*, *Nostoc*, *Anabaena*,... D'un point de vue géographique, ces microcystines ont été détectées en France mais également dans de nombreux pays du monde : Afrique du Sud, Australie, Chine, Japon, Canada, États-Unis d'Amérique, Allemagne, Danemark, Finlande, Portugal, Républiques Tchèque et Slovaque, Royaume-Uni... Elles sont donc retrouvées des régions les plus froides aux régions les plus chaudes, signe que les espèces libérant les microcystines sont capables de s'adapter à tous ces milieux. Les variants de microcystines produits par les cyanobactéries sont extrêmement divers selon la souche impliquée, le site, les paramètres environnementaux (composition physico-chimique de l'eau, intensité lumineuse, température...), la période de l'année ou tout autre facteur influant sur la croissance cellulaire. L'espèce *Planktothrix agardhii*, connue comme étant la plus toxique du genre, a une répartition géographique plus septentrionale. Elle produit dans la plupart des cas des microcystines. Les premiers travaux rapportent une hépatotoxicité provoquée chez la souris par des efflorescences à *P.agardhii* provenant de certains pays européens. Les microcystines ont ensuite été identifiées comme responsables de cette toxicité. En Allemagne, certains travaux [20] ont montré que de très nombreuses efflorescences à *P. agardhii* synthétisent des microcystines.

La nodularine et ses variants sont produits par le genre *Nodularia*. Des efflorescences ont été localisées en mer Baltique ou dans les eaux saumâtres d'estuaires et de lacs côtiers en Australie, ainsi qu'en Nouvelle-Zélande.

La cylindrospermopsine est synthétisée par différentes espèces appartenant au genre *Cylindrospermopsis*. Sa présence a été détectée principalement en Australie, et plus récemment en Floride, Thaïlande, Allemagne, Italie,... La souche de *Cylindrospermopsis* a été identifiée dans de nombreux pays partout dans le monde.

En ce qui concerne les neurotoxines, les anatoxines sont produites par des cyanobactéries planctoniques appartenant aux genres *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon*... L'anatoxine-a a été détectée dans plusieurs pays européens ainsi qu'au Japon [4]. L'homoanatoxine-a, identifiée chez une souche d'*Oscillatoria*, est beaucoup plus rarement rencontrée. Enfin l'anatoxine-a(s) a été détectée dans plusieurs souches isolées d'*Anabaena* aux États-Unis, en Écosse et au Danemark.

Quant aux saxitoxines, elles seraient produites essentiellement par des espèces des genres *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya* et *Planktothrix*. Bien que ces espèces puissent être retrouvées à différents endroits dans le monde, la production de toxines semble se limiter aux régions tropicales et subtropicales : notamment Etats-Unis, Australie et Brésil. Récemment des saxitoxines produites par *Aphanizomenon* ou *Planktothrix* ont été identifiées au Portugal [39] et en Italie [41].

Enfin, les toxines irritantes ont été détectées dans le milieu marin et aucune à l'heure actuelle dans l'eau douce. Les lipopolysaccharides (LPS) des parois des cyanobactéries sont suspectés être à l'origine d'effets irritants ou allergisants. Ces effets seraient donc susceptibles d'être observés lors de toute prolifération de cyanobactéries dans les eaux douces.

Les toxines des cyanobactéries vont présenter une grande variabilité de structures chimiques. Les conditions de libération des toxines dans le milieu sont encore mal connues, de même que la répartition au sein des espèces qui est variable et non prévisible. Les cyanotoxines sont présentes sur tous les continents mais le pourcentage de non-identification est certainement important en raison de la difficulté liée à l'analyse. Nous avons vu que le classement des cyanotoxines était fonction de leurs modes d'action : hépatique, neurologique et dermatologique. La partie suivante présentera donc plus précisément les aspects toxicologiques liés à l'activité des toxines puis leurs impacts sanitaires et environnementaux.

Partie 2

Les dangers liés aux cyanobactéries

Disposant d'encore peu de données à l'heure actuelle, la toxicologie des cyanotoxines reste difficile à appréhender. Les toxines les mieux connues et les mieux étudiées sont les hépatotoxines. La plupart des modes d'action sont connus mais l'étude de la toxicité en tant que telle, c'est-à-dire en tenant compte du temps d'exposition, de la voie d'administration, etc.... est peu comparable d'un résultat à l'autre. Nous verrons ensuite quelles sont les conséquences d'une prolifération algale pour l'homme grâce aux études épidémiologiques qui ont été réalisées dans différents pays du monde, puis les impacts sur l'environnement.

2.1. Aspects toxicologiques

2.1.1. Les hépatotoxines

2.1.1.1. Les microcystines

Nous avons vu précédemment qu'il existait près de 70 variants de microcystines, avec des structures légèrement différentes d'un variant à l'autre. Cette complexité explique que les études toxicologiques menées sur les microcystines sont difficiles à réaliser en raison notamment des variations de solubilité dans l'eau et donc dans les organes qui seront concernés [22]. La microcystine la plus fréquemment retrouvée dans les prélèvements d'eau est la microcystine-LR ; elle est également la mieux connue sur le plan toxicologique. Les autres formes, moins détectées, sont moins étudiées et donc moins connues.

Les microcystines ont une activité inhibitrice sur les protéines phosphatases à sérine/thréonine de type 1 et 2A. La liaison à ces protéines se fait par l'acide aminé Mdha (N-méthyl-dihydroalanine) qui, nous l'avons vu en étudiant la structure générale des microcystines, est un acide aminé constant chez tous les variants [5,48]. Cette liaison est de nature covalente. Les phosphatases ont un rôle de déphosphorylation des protéines du cytosquelette de l'hépatocyte. En présence de microcystines, ces protéines de structure seront phosphorylées, ce qui entraîne une modification du cytosquelette : les cellules vont rétrécir, s'éloigner les unes des autres. Le sang va alors occuper l'espace laissé vacant entraînant une hémorragie hépatique. Une nécrose du foie peut en découler et les symptômes accompagnateurs sont une pâleur et des diarrhées. Cette atteinte des hépatocytes peut parfois être mortelle [17]. Ce pouvoir inhibiteur des protéines phosphatases est mis à contribution pour la mise en place d'un test enzymatique qui sera décrit plus loin [45].

Après administration orale, les microcystines passent dans le sang au niveau de l'iléon grâce à des transporteurs et gagnent essentiellement le foie où elles vont attaquer les hépatocytes. D'autres études portant sur des modes d'administration différents (intratrachéale, intrapéritonéale et intraveineuse) ont montré que le foie est le principal organe atteint.

La principale voie de métabolisation connue est la conjugaison par le glutathion. Les conjugués obtenus sont plus polaires et moins toxiques. Ils ne possèderaient pas l'activité inhibitrice sur les protéines phosphatases.

Compte tenu de la fixation aux hépatocytes, l'élimination urinaire est plus limitée que l'élimination fécale.

La toxicité aiguë d'une molécule s'exprime par sa dose létale 50% ou DL50. Des études menées sur la souris ont cherché à quantifier cette DL50 avec les différents variants de microcystines et selon les voies d'administration. La voie intrapéritonéale est la plus étudiée, et la DL50 pour les microcystines est comprise entre 50 et 300 µg/kg. Pour la microcystine-LR, cette valeur est comprise entre 25 et 150 µg/kg. Les toxicités par les voies intranasales ou intratrachéales sont aussi élevées que par voie intrapéritonéale.

Par voie orale, la DL50 de la microcystine-LR varie entre 5 et 10,9 mg/kg à 24 heures [3].

Des études de toxicité sub-chronique ont également été réalisées. Ces études consistent en l'administration de doses répétées pendant une durée d'au moins treize semaines. Ces expériences permettent alors de définir des doses sans effets nocifs observés (DSENO) et des doses minimales avec un effet nocif observable (DMENO). Ainsi une étude conduite [21] avec de la microcystine-LR pure administrée par gavage à des souris pendant 13 semaines a permis de déterminer une DSENO de 40 µg/kg/j.

Les études sur la toxicité chronique des microcystines sont peu nombreuses. Cependant, l'une d'elle [30] a récemment montré l'apparition d'atteintes rénales chez le rat après 8 mois de traitement tous les 2 jours, par voie intrapéritonéale, avec de la microcystine-LR ou de la microcystine-YR à la concentration de 10 µg/kg. Les effets ont été plus importants avec la forme -LR qu'avec la -YR.

Des études de génotoxicité ont été menées mais ne permettent pas de conclure quant au rôle mutagène des microcystines. Des études de cancérogénèse ont également été réalisées, tant *in vitro* que *in vivo* et ont montré que la microcystine-LR est un promoteur de tumeurs, principalement hépatiques.

2.1.1.2. Les nodularines

La toxicité des nodularines est relativement proche de celle des microcystines. Cela s'explique par les analogies structurales entre les deux familles de toxines.

En effet, la nodularine agit par inhibition des protéines phosphatases à sérine/thréonine, mais la liaison entre la toxine et la protéine n'est pas de nature covalente [5].

Quelques études de toxicocinétiques, peu nombreuses, montreraient que la nodularine, après injection péritonéale, gagnerait le foie par la veine porte et le cycle entérohépatique [53].

La nodularine, comme les microcystines, est responsable de nécrose hépatique pouvant se compliquer d'une hémorragie. Les DL50 en intrapéritonéale varient entre 50 et 150 µg/kg chez la souris, sachant qu'une valeur de 60 µg/kg est généralement mentionnée. Cette valeur est proche de celle de la microcystine-LR : les deux toxines sont assez proches même si le temps de survie en présence de nodularine est plus long. Par voie orale, la toxicité est beaucoup moins importante.

Par contre, la nodularine semble être un promoteur tumoral plus puissant que la microcystine-LR. Elle est capable d'activer de nombreux proto-oncogènes et d'induire des foyers pré-néoplasiques sans traitement préalable avec un initiateur.

2.1.1.3. La cylindrospermopsine

Dernière toxine de la famille des hépatotoxines, la cylindrospermopsine va provoquer une inhibition de la synthèse des protéines par action au niveau des ARN de transfert.

De par son faible poids moléculaire, 415 Da, la cylindrospermopsine va pénétrer dans la cellule par simple diffusion [15]. Le métabolisme est essentiellement lié aux enzymes du cytochrome P450 [49]. L'excrétion est majoritairement urinaire.

Une intoxication humaine survenue en Australie a permis de définir les symptômes suivants : malaises, vomissements, maux de tête, perte d'appétit, troubles du transit intestinal, déshydratation et hépatomégalie.

Tant en intrapéritonéale qu'en voie orale, le foie est le principal organe atteint chez la souris. D'autres organes sont également touchés tels que le rein, le poumon, etc... [6, 50]

La DL50 en intrapéritonéale à 24h est estimée à 2100 µg/kg chez la souris. Par voie orale chez la souris, la DL50 obtenue avec des extraits de culture est comprise entre 4,4 et 6,9 mg/kg en équivalent cylindrospermopsine [50,51].

Les études de toxicité chronique et sub-chronique sont peu nombreuses. Une étude réalisée sur 11 semaines par administration orale à des souris de cylindrospermopsine purifiée permet de fixer une dose sans effet nocif observé (DSENO) de 30 µg/kg/j [25].

2.1.2. Les neurotoxines

2.1.2.1. Les anatoxines

Les anatoxines vont agir au niveau de la jonction neuromusculaire : c'est la zone entre les cellules nerveuses et les cellules musculaires effectrices. A l'extrémité du neurone il y a libération d'un neuromédiateur, l'acétylcholine qui, traversant la jonction neuromusculaire, va se fixer sur un récepteur se trouvant sur la cellule musculaire. Cette fixation entraîne alors des modifications au niveau des échanges ioniques et ainsi une contraction du muscle. Afin de permettre au muscle de revenir à son état de repos, il existe dans l'espace entre le neurone et la cellule musculaire une enzyme appelée acétylcholinestérase qui va dégrader l'acétylcholine. Les anatoxines sont des agonistes des récepteurs à l'acétylcholine : elles vont se fixer à la place de l'acétylcholine et les cellules vont entrer en contraction. Le problème vient du fait que l'acétylcholinestérase ne reconnaît pas les anatoxines qui ne seront donc pas dégradées. Les cellules musculaires seront donc contractées en continu [1,2].

L'anatoxine-a(S) possède un mode d'action légèrement différent : elle va inhiber l'acétylcholinestérase de manière irréversible ce qui provoque une accumulation d'acétylcholine dans la fente synaptique et donc une hyperstimulation musculaire. Elle entraîne également une hypersalivation, symptôme observé lors d'intoxications animales.

La DL50 en intrapéritonéale chez la souris est beaucoup plus faible que celles pour les voies orales et intranasales soit respectivement 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$, >5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. L'anatoxine-a(S) est beaucoup plus toxique : sa DL50 en intrapéritonéale est de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Les études toxicologiques en chronique et sub-chronique ne sont pas assez nombreuses pour permettre de déterminer des valeurs pertinentes. Les études de cancérogénèse sont également insuffisantes [3].

2.1.2.2. Les saxitoxines

Les saxitoxines sont mieux étudiées car fréquemment rencontrées dans le milieu marin et connues sous le nom de « Paralytic Shellfish Poisons ». Les données de toxicité aiguë sont assez nombreuses mais elles ne seront pas rapportées ici en raison de l'origine marine de ces toxines.

Le mode d'action toxinique est différent puisqu'il va inhiber les canaux sodiques voltage dépendant qui servent au passage des ions sodium du milieu extracellulaire vers l'intérieur de la cellule. Cet afflux d'ions permet la propagation de l'influx nerveux vers l'extrémité de la cellule. En présence de saxitoxines, la transmission nerveuse sera donc bloquée par ralentissement ou disparition de la propagation du potentiel d'action [1,2].

D'un point de vue toxicocinétique, la saxitoxine se distribue rapidement dans le compartiment vasculaire puis dans l'ensemble du corps. L'élimination des toxines n'est possible par voie urinaire que lorsqu'elles sont libres dans le compartiment vasculaire.

Une DL50 en intrapéritonéale est fixée entre 9 et 11,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ chez la souris, contre environ 260 $\mu\text{g}/\text{kg}$ par voie orale. Les autres aspects toxicologiques ne sont pas assez documentés [3].

Tableau 1 : Toxicité comparée des cyanotoxines.

[1,46]

Type de molécules	Dose létale (DL50) en µg de toxine purifiée par kg. (souris, voie intrapéritonéale)
Anatoxine	200 à 250
Microcystine et Nodularine	50 à 70
Anatoxine-a(S)	20
Saxitoxine	10

2.1.3. Les dermatotoxines

De même que les études structurales, les études de toxicologie des molécules à effets irritants synthétisées par les cyanobactéries sont peu nombreuses. Peu de toxines ont été jusqu'à maintenant détectées en eau douce. Toutefois, certaines études épidémiologiques ont pu montrer une corrélation entre la survenue de symptômes d'irritations lors de pratique d'activités nautiques en eau douce contaminée par des cyanobactéries et la quantité de cyanobactéries ainsi que le temps passé dans l'eau [40].

Plusieurs études ont été menées mais n'ont pas pu identifier l'origine des irritations avec certitude. Trois hypothèses semblent toutefois se dégager :

- présence de cyanotoxines non identifiées,
- irritation due au LPS de cyanobactéries,
- présence d'autres molécules irritantes ou allergisantes associées aux cyanobactéries.

D'autres études doivent donc être mises en place afin de vérifier la plausibilité de l'une ou l'autre de ces hypothèses.

2.1.4. Conclusion

De manière générale, les cyanotoxines vont posséder trois grands types de toxicité : une toxicité hépatique, une toxicité neurologique et une toxicité dermatologique. Cette

toxicité est variable d'une famille à l'autre : les microcystines sont hépatotoxiques tandis que les anatoxines sont neurotoxiques.

Plusieurs études ont été menées afin d'étudier cette toxicité : ainsi il apparaît que la toxicité par voie orale est généralement plus faible que par voie intrapéritonéale. Toutefois, ces études sont encore trop peu nombreuses pour déterminer avec certitude les effets de toutes les toxines et de leurs variants : la toxicité aiguë est relativement bien connue mais les effets chroniques et sub-chroniques sont beaucoup moins bien identifiés. La détermination de valeurs toxicologiques de référence pour de nombreuses toxines reste une activité de recherche importante. Les dermatotoxines sont les moins bien étudiées.

2.2. Aspects épidémiologiques

Une fois le rôle toxicologique des cyanotoxines établi, il convient de reprendre quels sont les impacts d'un point de vue sanitaire tout d'abord, c'est-à-dire les cas observés d'intoxications chez l'homme liés à une exposition orale, parentérale ou liés à la baignade et aux activités nautiques, puis d'un point de vue environnemental, avec les effets sur la faune aquatique, les animaux sauvages et d'élevage.

2.2.1. Impacts sanitaires

- Intoxications liées à l'eau de boisson [3]

Le premier signalement d'intoxications humaines par des cyanobactéries remonte à 1931 aux Etats-Unis. Elles ont été repérées en raison du caractère épidémique de gastro-entérites ou d'affections hépatiques, maladies pour lesquelles aucun autre agent pathogène n'avait été signalé. Le quartier concerné était alimenté par un même réservoir d'eau, tandis que le quartier voisin, qui ne comptait aucun cas d'intoxication, était approvisionné par une autre station. Le réservoir incriminé présentait une efflorescence de cyanobactéries.

D'autres cas de contamination de l'eau de distribution ont ainsi été recensés : Etats-Unis (1968, 1985), Australie (1979, 1981), Brésil (1988), Chine (1993), Suède (1994). Dans

ce dernier cas, 121 habitants d'un village alimenté temporairement par une eau contaminée par la cyanobactérie *Planktothrix agardhii* ont présenté des signes d'intoxication : vomissements, diarrhées, crampes musculaires, nausées,...

Les principaux symptômes observés sont principalement les gastro-entérites et les troubles hépatiques. Les cyanobactéries identifiées comme responsables de ces effets appartiennent à des familles différentes. Les toxines n'ont été que rarement identifiées.

Ainsi, dans le cas de l'épidémie de gastro-entérite attribuée à la consommation d'une eau de barrage dans la région de Bahia au Brésil, des cyanobactéries *Microcystis* et *Anabaena* ont été détectées aux alentours de 100 à 900 000 cellules/mL mais les toxines n'ont pas été identifiées [52].

En Australie, l'épidémie la plus grave répertoriée est apparue en 1979 à Palm Island. A la suite de plaintes des consommateurs face à la mauvaise qualité de l'eau de consommation, les autorités ont alors décidé d'instituer un traitement des ressources en eau au sulfate de cuivre. Or une semaine après le traitement, de nombreux cas de gastro-entérites sévères, nécessitant des hospitalisations et touchant surtout les enfants, sont apparus. Des études sur le terrain ont permis d'attribuer ces intoxications à la cylindrospermopsine produite par *Cylindrospermopsis raciborskii*. Le traitement au sulfate de cuivre avait permis de détruire les algues mais cette lyse avait entraîné la libération dans le milieu des toxines [24].

A l'heure actuelle, aucun cas humain de contamination n'a été répertorié en France.

- Intoxications liées à l'eau de dialyse [3]

Le cas le mieux documenté est celui de l'hôpital de Caruaru au Brésil en 1996. Le centre de dialyse de l'établissement était alimenté par une eau ayant subi comme unique traitement une chloration. De nombreux cas d'intoxications ont alors été observés, avec une symptomatologie neurologique précoce. La majeure partie des personnes contaminées a par la suite présenté des lésions hépatiques et près de la moitié de ces personnes sont décédées. Les signes neurologiques observés étaient les suivants : malaises, troubles auditifs et visuels, convulsions. Ces signes étaient accompagnés de désordres hématologiques, biochimiques et cardiovasculaires [26,42]. Les algues mises en cause dans cet épisode d'intoxications étaient

Aphanizomenon et *Oscillatoria* et les toxines ont été identifiées dans les prélèvements de foie et de sang sur les personnes contaminées. Ces toxines étaient les microcystines -LR, -YR et -AR. Leur concentration dans l'eau de boisson a été estimée à près de 19,5 µg/L, soit près de 20 fois la limite fixée dans l'eau de consommation.

- Intoxications liées à la baignade et aux activités nautiques [3]

D'autres intoxications concernent les eaux récréatives, c'est-à-dire liées à la baignade, aux loisirs nautiques, etc.... En Angleterre (1989), un bloom de *Microcystis aeruginosa* a entraîné la survenue de pneumonies chez des soldats [54]. En Australie, une étude prospective menée en 1995 sur 852 personnes a permis de déceler une augmentation de l'incidence des diarrhées, vomissements, fièvres, irritations des yeux et des oreilles entre 2 à 7 jours après exposition à l'eau contaminée [40].

La principale voie concernée ici est la voie cutanée. Comme cela a été vu dans la partie sur la toxicologie des cyanotoxines, les toxines cutanées sont encore très peu connues à l'heure actuelle. Certaines cyanobactéries semblent avoir une activité allergisante, mais l'origine de cette activité reste à déterminer. Les lipopolysaccharides constitutifs de la paroi des bactéries Gram négatif et des cyanobactéries sont suspectés d'être responsables de ces irritations cutanées.

Les autres voies, inhalation et ingestion accidentelle d'eau, sont faiblement documentées.

Il convient de préciser qu'il a été identifié dans le milieu marin des molécules irritantes telles que les aplysiatoxines et la lyngbyatoxine.

2.2.2. Impacts environnementaux

Les impacts environnementaux sont liés à la fois aux efflorescences algales et à la libération des toxines dans le milieu naturel [1,3]. Ainsi, les blooms de cyanobactéries vont souvent donner des eaux colorées ce qui engendre une gêne visuelle et peut avoir des conséquences sur l'activité humaine du milieu : interdiction de la baignade, des activités

nautiques ou de la pêche sur le site concerné,... Outre ce problème visuel, une conséquence beaucoup plus grave des blooms sur la faune aquatique est le risque d'anoxie du milieu. En effet, lors des épisodes d'efflorescences de cyanobactéries, on assiste à une augmentation de la synthèse de la matière organique. Cette augmentation va entraîner un développement des bactéries qui utilisent cette matière organique pour se multiplier et relarguent de nombreux nutriments minéraux, notamment azote et phosphore. Ces nutriments seront autant de sources potentielles d'énergie pour les cyanobactéries de l'efflorescence [10].

L'augmentation de la flore bactérienne du milieu aura une conséquence sur l'oxygénation du milieu aquatique. Plus il y aura de bactéries aérobies et plus la consommation d'oxygène sera importante : la concentration en oxygène du milieu va chuter fortement et la zone concernée sera en état d'anoxie. Cette anoxie va induire auprès des autres espèces de la macrofaune une mortalité importante.

Enfin, la libération des toxines dans le milieu peut potentiellement entraîner la contamination d'animaux de rente tels que bovins ou ovins, sauvages (oiseaux, animaux sauvages,...) et domestiques.

Les intoxications répertoriées sont de type principalement hépatique. Les toxines mises en cause sont les microcystines, nodularines et cylindrospermopsines. Des cas d'intoxications de type neurologique ont également été signalés. Ce sont des intoxications aiguës conduisant à une paralysie respiratoire. Les toxines concernées sont les anatoxines et les saxitoxines.

En Europe, les cyanobactéries responsables des différents cas d'intoxications sont les *Oscillatoria* et les *Microcystis*. Les animaux touchés sont des animaux domestiques (chiens) ou d'élevage (bovins et ovins). Deux exemples documentés peuvent être cités : en Suisse, au cours des vingt dernières années, une centaine de bovins ont été retrouvés morts dans les alpages. Ces décès sont survenus sur la période mi-août, mi-septembre, après un temps chaud et sec, et sont consécutifs à une nécrose aiguë du foie. Des signes neurologiques ont été observés sur les animaux en vie et des signes cardiovasculaires ont été observés lors des autopsies. Les bovins s'abreuvaient dans des lacs de haute montagne. Or des tapis de cyanobactéries se sont formés dans ces points d'eau et se sont accumulés sur les bords. Ces cyanobactéries appartiennent au genre *Oscillatoria*, productrices de microcystines [29].

En juillet 1990 et 1991, plusieurs chiens ont été retrouvés morts en Ecosse après s'être baignés ou avoir bu près de la berge d'un lac. La mort s'est produite dans les 30 minutes suivant l'apparition des symptômes qui évoquaient une neuro-intoxication. La présence de cyanobactéries benthiques sur les berges du lac a alors été mise en évidence. Ces cyanobactéries, du genre *Oscillatoria*, ont également été retrouvées dans les contenus stomacaux des chiens. Cette souche, responsable de neurotoxicité, était productrice d'anatoxine-a. La souche isolée du lac a été mise en culture et elle a produit également de l'anatoxine-a [18].

Des cas d'intoxications de chiens en 2002 – 2003 dans la Lozère sur la rivière Tarn ont entraîné une prise de conscience des pouvoirs publics français sur le risque lié aux cyanobactéries et à leurs toxines dans le milieu. En 2002, 26 chiens ont présenté des signes d'intoxications neurologiques. Les services vétérinaires ont constaté que la plupart des animaux souffraient de convulsions et d'épilepsie. 20 animaux sur les 26 sont morts. Des recherches menées ont permis de mettre en évidence des inhibiteurs des cholinestérases dans l'estomac de plusieurs chiens. Des cyanobactéries potentiellement toxiques ont également été identifiées, parfois en grande quantité, sur les sites où les chiens se sont baignés. L'identification des toxines n'a pu être effectuée [27].

Un autre épisode d'intoxications a eu lieu en 2003 dans le Jura : trois chiens ont présenté des troubles nerveux après s'être baignés et deux sont morts. Les prélèvements stomacaux ont permis d'identifier des cyanobactéries potentiellement toxiques et les prélèvements environnementaux ont révélé la présence de cyanobactéries benthiques. La recherche de toxines a montré la présence d'anatoxine-a. Cette toxine a également été retrouvée dans le foie de l'un des chiens.

Ainsi, et tant d'un point de vue sanitaire qu'environnemental, le rôle joué par les cyanobactéries et leurs toxines est à prendre en compte afin de mieux prévoir les phénomènes et prendre les mesures nécessaires pour limiter les impacts. C'est ainsi que le risque lié aux cyanobactéries a été inscrit dans la réglementation.

2.3. La réglementation sur les cyanobactéries et leurs toxines

2.3.1. Eaux de baignades

La réglementation concernant les toxines de cyanobactéries est en évolution constante depuis ces dernières années afin de tenir compte des nouvelles connaissances sur le comportement des algues et des toxines dans le milieu aquatique. En ce qui concerne les baignades, la circulaire DGS/SD7 A 2003-270 du 4 juin 2003 [33] a donné aux autorités compétentes les moyens de mise en œuvre de la surveillance des efflorescences de cyanobactéries. Le tableau 2 indique, en s'appuyant sur les conclusions d'un avis du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF), quels sont les seuils, les conséquences sanitaires et les actions recommandées face au risque cyanobactérie.

Tableau 2 : Recommandations pour la gestion des situations de contamination d'eaux de baignades et de zones de loisirs nautiques par prolifération de cyanobactéries.

Dénombrements de cellules (cellules/mL)	Niveau de risque	Conséquences sanitaires	Actions recommandées
20 000	1	A court terme : conjonctivites, irritations de la peau, gastro-entérites	- surveiller l'apparition d'efflorescence en surface de l'eau - limiter les baignades et estimer les risques
100 000	2	A court terme : identique au niveau 1 A long terme : développement de maladies hépatiques ou neurologiques	- mettre des panneaux pour avertir des risques - informer les autorités compétentes en matière de santé
Couche mousseuse colorée = prolifération de cyanobactéries à la surface des plans d'eau et/ou forte coloration de l'eau	3	A court terme : - empoisonnement aigu, voire mortalité. - irritations de la peau, gastro-entérites A long terme : développement de maladies hépatiques ou neurologiques	- éviter tout contact avec l'eau polluée, éventuellement interdire baignades et autres activités conduisant à un contact avec l'eau du site - informer les autorités compétentes en matière de santé et mettre en place une surveillance du site.

Source : CSHPF, avis du 6 mai 2003.

Outre la mise en place de cet arbre décisionnel, l'avis du CSHPF précise également d'autres points. Il demande notamment :

- « que soient validées et normalisées les stratégies et les méthodes de prélèvements et d'analyses relatives à la détermination d'une contamination des eaux de baignades et de zones de loisirs nautiques par des cyanobactéries et leurs toxines pour lesquelles des méthodes existent ». Le CSHPF pose ici le problème de l'échantillonnage et de la représentativité du prélèvement. Il soulève également l'absence de méthode normalisée, absence à l'heure actuelle en partie comblée puisqu'il existe depuis 2005 une norme ISO sur le dosage des microcystines.

- « que soit réalisée une étude sur les contaminations des eaux de loisirs nautiques [...] dans le but d'estimer les expositions à prendre en compte pour évaluer l'impact sanitaire sur les pratiquants ». Les services de chaque département doivent établir un suivi de leurs baignades.
- « qu'une veille épidémiologique soit organisée pour identifier des cas de pathologies associées à des proliférations de cyanobactéries ». En effet, nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, il existe peu de données épidémiologiques françaises permettant de relier des cas de démangeaisons ou de gastro-entérites à une exposition à des cyanobactéries.

Enfin, le CSHPF établit des recommandations sur l'utilisation d'algicide en cas de prolifération (utilisation à limiter pour éviter une libération massive de toxines dans le milieu), sur l'information du public et sur la mise en place d'un programme de surveillance.

D'autres circulaires (DGS/SD7 A 2004-364 du 28 juillet 2004 [34] et DGS/SD7 A 2005-304 du 5 juillet 2005 [36]) ont depuis complété les informations et les démarches à suivre pour la gestion du risque lié aux toxines des cyanobactéries.

S'appuyant sur un nouvel avis du CSHPF, daté du 4 juillet 2004, la Direction Générale de la Santé (DGS) demande aux services concernés de « poursuivre la surveillance des épisodes de prolifération algale [...], en assurant une recherche de toxines plus large que la seule microcystine-LR ». En effet, et prenant acte des informations recueillies par les DDASS au cours de l'année 2003, le CSHPF a noté que la majorité des régions ayant fait l'objet d'un suivi est concernée par ce problème, et que les valeurs de microcystine-LR détectées en 2003 sont généralement inférieures à 25 µg/L (valeur établie selon les recommandations de l'OMS). Toutefois, les difficultés liées au manque de moyens pour la mise de œuvre de cette surveillance, ainsi que les difficultés concernant la représentativité des méthodes de prélèvements et d'analyses sont soulevées. Enfin, l'avis remarque que « seule la recherche de microcystine-LR soit préconisée dans les eaux de baignades » alors que l'existence d'autres toxines est connue.

La circulaire du 5 juillet 2005 revient sur les textes précédents. Elle apporte quelques éléments nouveaux comme le transfert des données recueillies auprès des DDASS aux experts de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement (AFSSE, rebaptisée Agence

Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail AFSSET), pour mener une étude sur l'évaluation des risques. Enfin, et pour tenter de trouver une solution à l'absence de méthodes normalisées, cette circulaire ajoute en annexe une liste de laboratoires participant à un projet de normalisation pour le dosage en microcystines et une autre liste de laboratoires réalisant un comptage cellulaire, l'identification d'espèces de cyanobactéries, et éventuellement le dosage de microcystines.

L'adoption par le Parlement européen le 18 janvier 2006 et le Conseil européen le 15 février 2006 d'une nouvelle directive européenne, 2006/7/EEC, sur la qualité des eaux de baignades montre la prise de conscience des risques. Il est prévu que les recherches scientifiques sur plusieurs paramètres dont les cyanobactéries soient poursuivies pour améliorer la protection de la santé des baigneurs. L'essentiel des nouvelles dispositions de la directive est intégré à la nouvelle loi sur l'eau et les milieux aquatiques adoptée par l'Assemblée Nationale le 20 décembre et promulguée au journal officiel le 30 décembre 2006 [31].

2.3.2. Eaux destinées à la consommation

De même, en ce qui concerne les eaux destinées à la consommation humaine, la valeur limite concernant la microcystine-LR a été fixée par le décret n°1220 du 20 décembre 2001 repris dans le Code de la Santé Publique [16,55]. Cette valeur est de 1µg/L dans les eaux brutes et les eaux traitées.

La circulaire DGS/SD7A n° 633 du 30 décembre 2003 indique que la recherche de cyanobactéries dans les eaux de consommation est une recherche complémentaire, « pouvant être imposée par le préfet lorsque les eaux sont susceptibles d'être affectées par des développements biologiques (algues) notamment de cyanobactéries » [34].

Toutefois, et compte tenu du nombre de variants de microcystines ainsi que du risque lié aux autres toxines, il est légitime de se poser la question quant au choix du paramètre « microcystine-LR » dans la réglementation. Il est en effet quasiment sûr qu'une partie de l'information n'est pas donnée car d'autres toxines sont potentiellement dangereuses pour l'homme et tous les blooms observés ne vont pas forcément contenir de la microcystine-LR.

Pour cette raison, l'arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine inscrit le paramètre « microcystine total » à la place du paramètre « microcystine – LR », en conservant la valeur limite à 1 µg/L [32]. C'est encore une fois le manque de connaissances scientifiques sur le déterminisme de libération des toxines dans le milieu, ainsi que le manque de standards commerciaux de toxines disponibles sur le marché à des tarifs raisonnables qui constituent des freins à la prévention du risque.

Partie 3

Les méthodes d'identification et de quantification des cyanobactéries et des toxines

Les méthodes de prélèvement, d'échantillonnage, d'identification des cyanobactéries et d'identification des toxines sont encore peu encadrées. Comme pour tout paramètres, il faudrait pouvoir disposer de protocoles standardisés et éprouvés : les données récoltées seraient alors plus fiables et plus précises qu'elles ne le sont actuellement. Les choses évoluent peu à peu et il n'est pas impossible de voir apparaître dans les toutes prochaines années de telles méthodes, à l'instar de la publication en octobre 2005 d'une norme internationale pour le dosage des microcystines. Dans cette troisième partie seront présentées successivement les méthodes de prélèvement, les méthodes de dénombrement et d'identification des cyanobactéries puis les méthodes d'identification et de quantification des toxines dans les eaux. Certaines d'entre elles ont été expérimentées au cours du stage que nous avons effectué au Laboratoire d'Analyse de la Corrèze.

3.1. Prélèvement

Quelque soit l'analyse envisagée, qu'elle soit à but sanitaire ou médical, le prélèvement constitue l'acte premier et essentiel de la recherche. En effet, il va conditionner en grande partie le résultat car l'interprétation de ces résultats est fonction du mode du type et du lieu prélèvement [3].

- Mode de prélèvement

En ce qui concerne la recherche des cyanobactéries et des cyanotoxines, tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif, il existe différents instruments de prélèvement :

- robinet sur une installation de traitement de l'eau,
- tube échantillonneur,
- bouteille de prélèvement,
- pompe,
- prélèvement par filet à plancton.

Les quatre premiers vont permettre de réaliser des analyses qualitatives et/ou quantitatives à partir d'échantillons d'eau dans un but d'identification et de numération des cyanobactéries, et de dosage des toxines intra et extracellulaires.

Le filet à plancton va permettre d'obtenir un échantillon de biomasse sur lequel seront réalisées des analyses qualitatives. Le résultat sera alors donné en fonction de la masse d'échantillon récolté. Si l'on souhaite se ramener à un volume d'eau, il convient d'associer à ce prélèvement un échantillon d'eau sur lequel on déterminera la matière sèche et/ou on dosera la chlorophylle. De même, le prélèvement par filet à plancton ne donnera que des informations sur les toxines intracellulaires. Pour connaître la concentration en toxines extracellulaires, il conviendra là aussi d'associer un prélèvement d'eau. La connaissance de ce paramètre est importante car, comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, les toxines peuvent être libérées sous certaines conditions.

- Profondeur de prélèvement

Ce paramètre peut paraître difficile à maîtriser lorsqu'on connaît avec quelle variabilité les cyanobactéries vont se distribuer dans l'eau, tant en profondeur qu'en surface. Nous avons déjà vu que les cyanobactéries peuvent se mouvoir sous certaines conditions (lumière, température, compétition, rythme circadien, ...) au sein de la colonne d'eau. C'est en fonction du danger et de la connaissance du milieu que le préleveur déterminera alors la profondeur du prélèvement.

Ainsi, les prélèvements effectués par la bouteille de prélèvement, la pompe et le filet à plancton sont assez représentatifs car ils concernent une hauteur d'eau importante : ils permettent de s'affranchir des risques d'une forte hétérogénéité de la colonne d'eau. Ceci n'est pas le cas du prélèvement au robinet d'une installation de traitement de l'eau, ou du tube échantillonneur, car le prélèvement se fait à la zone de captage pour le premier et à 1 mètre de la surface pour le second.

Là encore, c'est la réponse à la question essentielle « pourquoi je fais cette analyse et donc ce prélèvement » qui va permettre de faire un choix. Par exemple, si on souhaite étudier les dangers liés à la baignade ou aux activités nautiques, le choix du tube échantillonneur est judicieux car sa zone de prélèvement située à 1 mètre de la surface correspond à cette situation.

- Lieu de prélèvement

Le choix du lieu de prélèvement constitue lui aussi un paramètre important. En effet, le vent peut conduire à un déplacement des couches de cyanobactéries. Seule une bonne connaissance du terrain, une reconnaissance visuelle du lieu, et la mise en place d'une stratégie d'échantillonnage si la répartition spatiale est trop importante, pourront permettre au préleveur de réaliser son geste dans les meilleures conditions possibles et de garantir un résultat le plus juste par rapport au risque étudié.

- Conditionnement de l'échantillon

Dans le cas général, l'échantillon d'eau prélevé est placé dans un flacon en verre. En effet, il apparaît que, dans le cas de recherche de toxines, les flacons en plastique sont inadaptés en raison de la possible adsorption des toxines sur ce matériau. Comme de nombreux échantillons, ils sont transportés dans une glacière à l'obscurité.

Les échantillons servant à l'identification et au dénombrement des cyanobactéries peuvent être fixés au lugol ou au formaldéhyde et ainsi être conservés à température ambiante à l'abri de la lumière. L'utilisation du formaldéhyde est toutefois rendue délicate de part sa toxicité, mais le lugol présente l'inconvénient majeur de colorer toutes les algues et donc de rendre ainsi l'identification délicate.

Pour les prélèvements d'eau destinée à la consommation, généralement chlorée, l'ajout de thiosulfate de sodium dans l'échantillon permet de neutraliser le chlore résiduel. Cet ajout est d'ailleurs inscrit dans la norme ISO 20179 sur le dosage des microcystines et qui sera décrite plus loin. Le chlore peut en effet entraîner la lyse des cyanobactéries, ce qui peut modifier les teneurs intra et extracellulaire.

3.2. Détection et dénombrement des cyanobactéries

Une fois le prélèvement effectué, et bien avant une recherche de toxines, la détermination d'une prolifération algale et l'identification des espèces en cause sont des étapes qui seront étudiées grâce à de nombreux paramètres. Nous verrons donc tout d'abord quels sont les moyens de détecter un bloom de cyanobactéries, puis de les identifier et de les quantifier dans un échantillon d'eau [3].

3.2.1. Les méthodes de détection

Comme pour le choix du lieu de prélèvement l'observation visuelle est le moyen le plus simple de détecter une prolifération algale : la présence de mousse ou d'écume, la couleur de l'eau en rouge ou en vert-bleu sont relativement spécifiques de la présence de cyanobactéries. Toutefois, certaines proliférations se situant en profondeur ou pouvant être dépourvues de signes visibles, il convient alors de se tourner vers d'autres paramètres.

- La transparence

La transparence de la colonne d'eau peut être modifiée en cas de prolifération algale. Ce paramètre est mesuré grâce au « disque de Secchi », divisé en secteurs blancs et noirs et que l'on immerge. Ce disque est immergé et la transparence est exprimée par la profondeur à laquelle il n'est plus possible de discerner les secteurs blancs des secteurs noirs. Bien qu'elle ne soit pas normalisée, cette méthode simple et peu coûteuse permet un suivi régulier de la transparence. Elle permet aussi d'évaluer la zone dans laquelle évolue le phytoplancton et donc la zone dans laquelle le prélèvement devra s'effectuer.

- La turbidité

Trivialement, une eau turbide se définit comme une eau trouble, contenant beaucoup de matières en suspension. En fait, la turbidité est basée sur la mesure de la lumière réfléchiée par ces particules en suspension : sa valeur est donc proportionnelle à la quantité de particules. La mesure de la turbidité est normalisée selon la norme NF EN ISO 7027 et elle s'exprime en NFU (Nephelometric Formazine Unit). Compte tenu des interférences avec les nombreuses

particules minérales qui peuvent se trouver dans l'échantillon à la suite de fortes pluies ou de draguages remettant les sédiments en suspension, cette technique n'est pas très fiable.

- Oxygène et pH

Ces paramètres sont intimement liés au métabolisme du phytoplancton. Il convient alors d'étudier les variations entre le jour, période de photosynthèse, et la nuit, période de respiration.

Pour l'oxygène, une grande amplitude entre le jour et nuit est signe de la présence d'une biomasse importante qui va produire beaucoup d'oxygène la journée et le consommer la nuit. La grandeur mesurée est la concentration en oxygène ou le pourcentage de saturation en oxygène à l'aide d'une sonde à oxygène dissous sur le terrain. La principale limite à cette mesure est que les cyanobactéries ne sont pas les seules espèces du phytoplancton à se comporter ainsi.

De même que l'oxygène, le pH va également évoluer entre le jour et la nuit, en fonction de l'activité photosynthétique et respiratoire de la biomasse.

- Dosage de la chlorophylle a

La quantité de chlorophylle a est fonction de la biomasse des algues et cyanobactéries. Deux méthodes normalisées existent : la première méthode, par spectrophotométrie après extraction à l'acétone à 90 % peut se pratiquer sur le terrain à condition d'avoir le matériel nécessaire. La deuxième, par chromatographie liquide haute performance se déroule automatiquement au laboratoire. Toutefois, la chlorophylle a n'étant pas spécifique des cyanobactéries et leur teneur moyenne étant souvent inférieure aux algues, une diminution de la concentration de l'eau en chlorophylle a peut masquer le remplacement d'une communauté algale par une prolifération de cyanobactéries.

La méthode pratiquée au Laboratoire de la Corrèze s'appuie sur la norme NF T 90-117 (décembre 1999) intitulée « Dosage de la chlorophylle a et d'un indice phéopigments. Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire ». Son principe est le suivant :

- filtration de l'échantillon d'eau sur membrane afin d'isoler et de concentrer le plancton végétal,
 - extraction par l'acétone à 90 % de la chlorophylle a et des phéopigments,
 - mesure de l'absorbance de l'extrait à des longueurs d'ondes spécifiques (750, 663, 645 et 630 nm).
- Mesure de la fluorescence

Cette mesure s'appuie sur les différences existant dans la composition pigmentaire des différents microorganismes photosynthétiques. Il est alors possible de qualifier et quantifier les cyanobactéries par analyse de la fluorescence émise par les cellules excitées par stimulation lumineuse.

La mesure se fait par l'intermédiaire de sondes fluorimétriques qui vont donner des résultats exprimés en chlorophylle a ou en phycocyanine. Ces sondes sont actuellement en cours de validation mais elles présentent l'intérêt d'obtenir un résultat rapide et donc la possibilité de réaliser plusieurs mesures sur un même site afin de pallier au problème d'hétérogénéité de répartition.

3.2.2. Les méthodes d'identification et de quantification

Comme cela a été vu dans les paragraphes précédents, toutes les cyanobactéries et algues ne vont pas présenter les mêmes dangers d'une espèce à l'autre. Il convient alors de mettre en place des méthodes afin de les identifier le plus précisément possible, ainsi que de les quantifier.

- Les méthodes d'identification

L'observation microscopique reste de loin la méthode la plus utilisée. Elle permet de distinguer la plupart des cyanobactéries à un grossissement compris entre 200 et 1000 x. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode normalisée pour l'identification des cyanobactéries par microscopie. La détermination des genres est relativement simple mais celle des espèces, qui repose sur de nombreux critères morphologiques est beaucoup plus

délicate à mettre en œuvre. C'est pourtant la connaissance de l'espèce qui est la plus importante car d'une souche à une autre, la toxicité et donc la dangerosité peuvent varier.

Afin de pallier à ce problème d'identification, d'autres méthodes basées sur la biologie moléculaire sont actuellement en développement : hybridation *in situ* directement dans la cellule bactérienne, amplification par PCR, utilisation de puces à ADN,...

- Les méthodes de dénombrement

Le dénombrement est effectué à partir d'une observation microscopique et concerne les cellules isolées ou en colonies. Le résultat sera alors donné en nombre de colonies par mL ou nombre de cellules par mL.

Un protocole de dénombrement est actuellement en cours de normalisation par le CEN : il s'agit d'un comptage par la technique de Utermöhl réalisé avec un microscope inversé et des cuves de sédimentation à fond transparent. Ce type de comptage présente l'avantage de pouvoir observer les espèces minoritaires et d'étudier les échantillons présentant un faible nombre d'individu.

CEN TC 230/WG 2/TG 3/N73 « Water quality – Guidance standard for the routine analysis of phytoplankton abundance and composition using inverted microscopy (Utermöhl technique) »

D'autres protocoles de comptage existent, notamment par microscopie directe sur des cellules de numération de Malassez. Ces méthodes évitent le temps d'attente lié à la sédimentation de l'échantillon.

La cytométrie en flux peut également être utilisée pour les cyanobactéries, mais en se limitant uniquement aux cellules isolées : les colonies ne sont donc pas concernées. Les cellules sont traitées par un colorant fluorescent et alignées les unes derrière les autres dans un flux liquide. Elles sont excitées par une source lumineuse, le plus souvent un laser, et émettent alors des signaux de fluorescence captés par un détecteur.

3.3. Détection et quantification des cyanotoxines

Il existe de nombreuses méthodes pour détecter et quantifier les toxines dans l'eau. On peut les regrouper en méthodes immunoenzymatiques et en méthodes physico-chimiques [19]. Outre les eaux, certaines équipes scientifiques tentent de mettre au point des méthodes permettant de rechercher les toxines dans les sédiments [13].

3.3.1. Les méthodes immunoenzymatiques

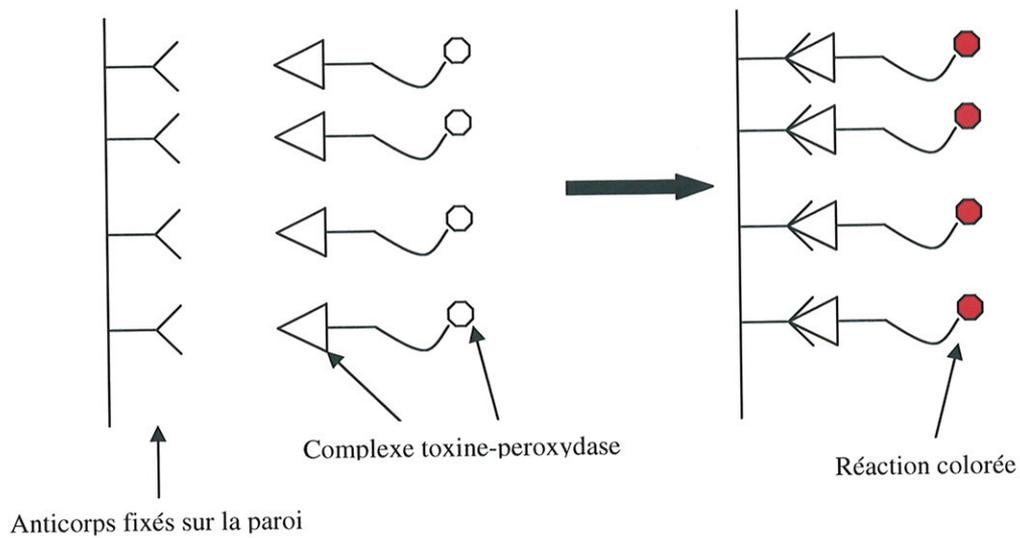
- Principe du test ELISA pour la détection des microcystines

Le test ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay), pour la détection de la microcystine dans les eaux, existe en kit commercial. Ce kit se présente sous la forme de tubes « coatés » ou de plaques de puits « coatés » et permet une détection semi-quantitative avec une gamme de calibration allant de 0,5 à 3 $\mu\text{g/L}$ pour les tubes et de 0,16 à 2,5 $\mu\text{g/L}$ pour les puits.

Il s'agit d'un test par compétition : la toxine de l'échantillon entre en compétition avec le complexe toxine-peroxydase du test pour se fixer aux anticorps présents à la surface des tubes.

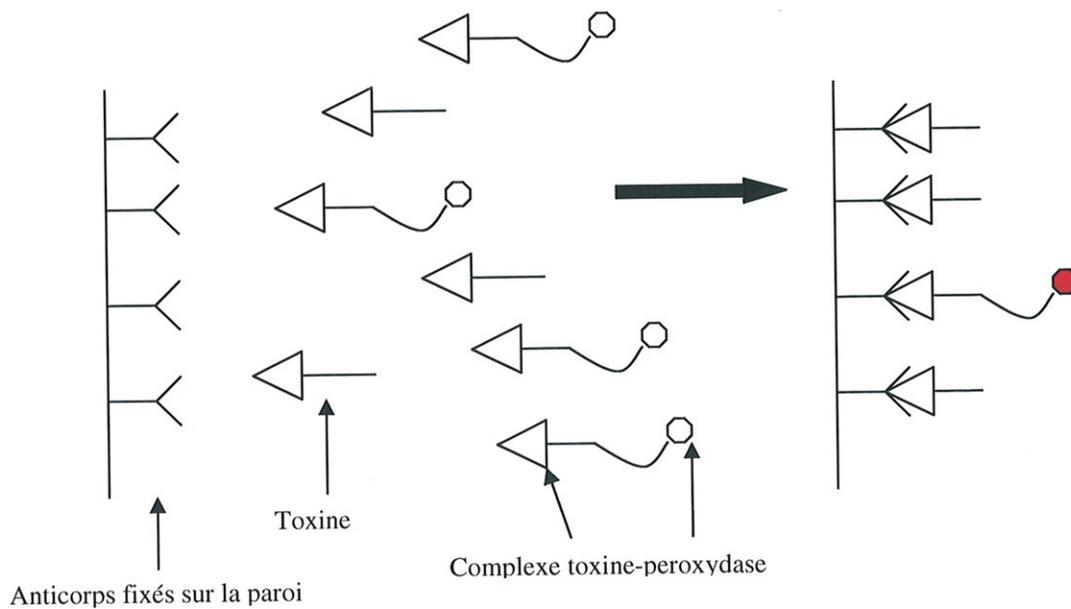
Le résultat de la compétition s'observe par colorimétrie : la peroxydase fixée à l'anticorps va entraîner une coloration du milieu. Ainsi, en cas d'absence de toxine dans l'échantillon, le complexe toxine-peroxydase du kit va se fixer aux anticorps à la place de la toxine libre et entraîner la coloration du milieu.

Figure 6 : Test ELISA en absence de microcystine.



Par contre, si l'échantillon contient des toxines en quantité suffisante pour se fixer sur les anticorps, le complexe restera en solution et il n'y aura donc pas ou peu de coloration du milieu.

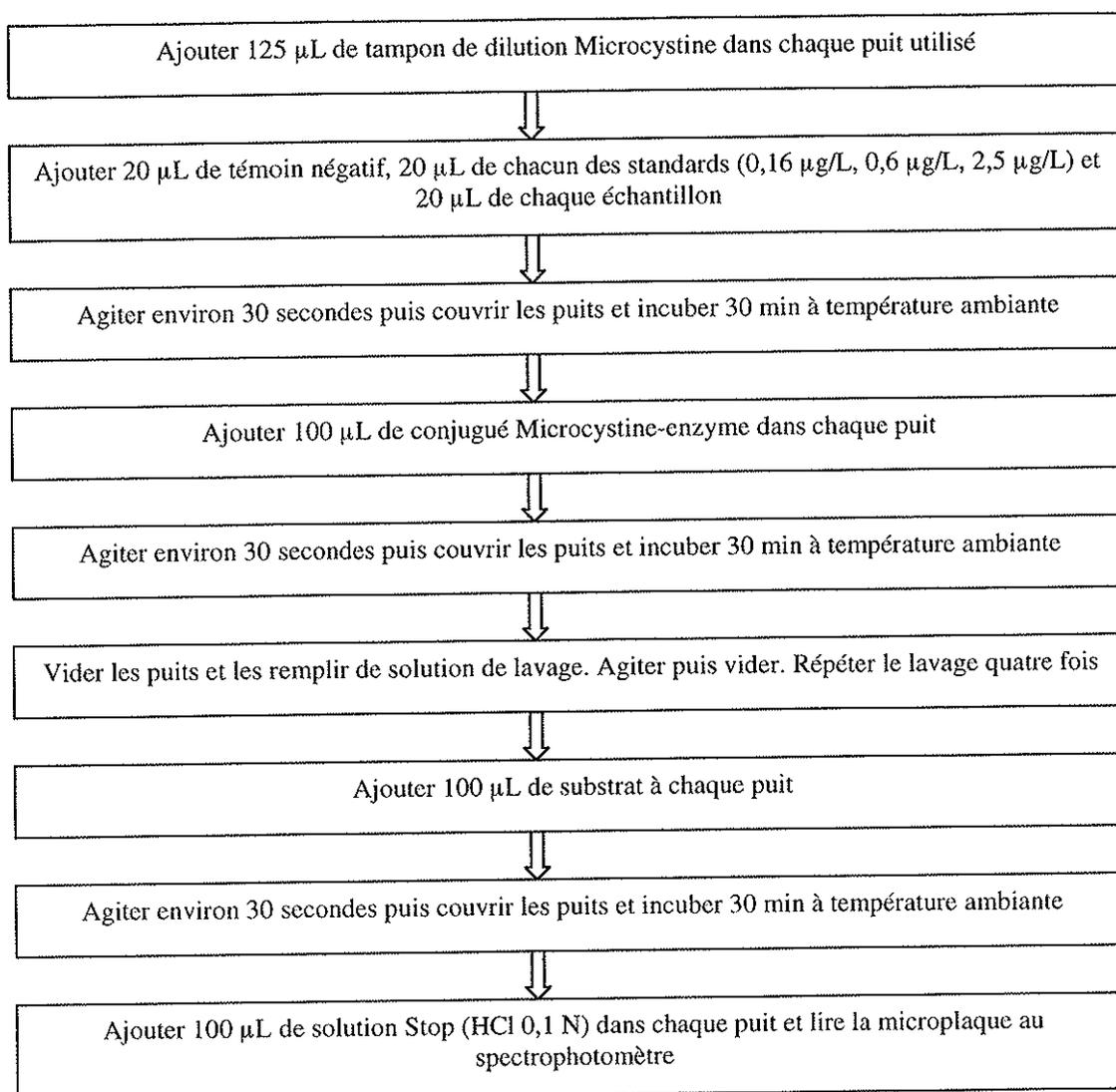
Figure 7 : Test ELISA en présence de microcystine.



Ce kit ELISA ne va pas différencier les variants de microcystine mais il va détecter leur présence. Les réactions croisées vont concerner :

- la microcystine-LR,
- la microcystine-LA,
- la microcystine-RR,
- la microcystine-YR,
- la nodularine.

- Réalisation du test ELISA en plaque



L'appareil va mesurer la densité optique (DO) de chaque puit à une longueur d'onde de 450 nm. A partir de cette DO, le paramètre %Bo est calculé comme suit :

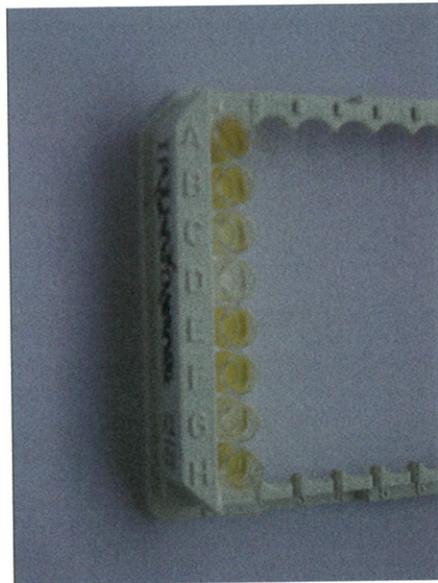
$$\%Bo = \frac{\text{DO moyenne du Standard ou de l'échantillon}}{\text{DO moyenne du témoin négatif}} \times 100$$

Le calcul du %Bo permet de s'affranchir des variations de mesure de DO d'une manipulation à une autre. Le rapport doit rester constant et il doit pour chaque standard être compris dans un intervalle précis fourni par le document technique du kit.

Une fois le %Bo de chaque standard calculé, celui-ci est reporté en fonction de la concentration en microcystine sur une échelle semi-logarithmique. La valeur de la concentration en microcystine dans l'échantillon est obtenue en reportant la valeur de %Bo calculée sur le graphique.

Figure 8 : Schéma d'une plaque 96 puits pour la recherche de microcystine.

	1
A	Témoin négatif
B	0,16 µg/L
C	0,6 µg/L
D	2,5 µg/L
E	Ech (Intra+Extra)
F	Ech (Intra+Extra)
G	Ech (Extra)
H	Ech (Extra)



Source : personnelle

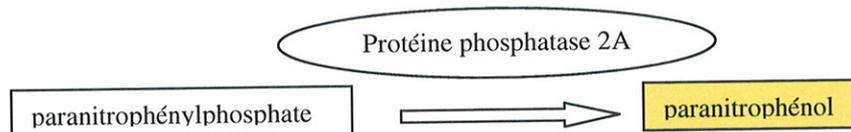
Le puit G présente une coloration faible, proche de celle du puit C : le test ELISA est positif pour cet échantillon en extracellulaire. La valeur exacte pourra être déterminée grâce à la droite d'étalonnage calculée par le logiciel.

- Principe du test d'inhibition des protéines phosphatases

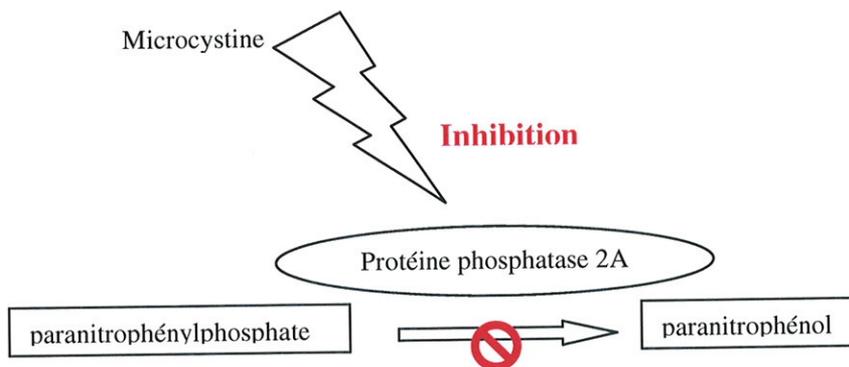
Ce test est basé sur les propriétés inhibitrices de la microcystine envers la protéine phosphatase 2A (PP2A). Il a été développé par une équipe de recherche française [45]. Cette enzyme va dégrader le para-nitrophénylphosphate (incolore) en paranitrophénol (jaune). En présence de microcystine, la protéine phosphatase sera inhibée et le paranitrophénylphosphate ne sera pas dégradé : le milieu restera incolore.

Figure 9 : Principe général du test PP2A en absence puis en présence de microcystine.

Absence de microcystine dans l'échantillon



Présence de microcystine dans l'échantillon



Ce test n'a pas été expérimenté au cours du stage mais il utilise des plaques 96 puits comme le test ELISA.

3.3.2. Les méthodes chromatographiques

Il est possible de rechercher la microcystine par des méthodes chromatographiques. Compte tenu des caractéristiques physico-chimiques de la microcystine et de sa polarité assez importante, c'est une séparation par chromatographie liquide qui sera choisie. En effet, l'utilisation de la chromatographie gazeuse n'est possible qu'avec des molécules volatiles ce qui n'est pas le cas ici. Le choix du détecteur est également primordial : historiquement, le détecteur à barrettes de diodes a été le premier utilisé. L'utilisation du spectromètre de masse, en tandem ou non, est beaucoup plus récente et reste marginale. Par contre, cette technique a permis l'identification des nombreux variants de microcystine.

- CLHP UV/DAD

La technique de chromatographie liquide haute performance avec détection UV est la méthode de référence citée par la norme ISO 17025 parue en octobre 2005. La molécule de microcystine étant polaire, la phase mobile sera polaire, tandis que la phase stationnaire sera apolaire. La colonne utilisée sera classiquement une colonne de silice greffée C₁₈ : grâce au greffage des chaînes aliphatiques sur la silice, la phase stationnaire est apolaire. Par contre, le choix de la phase mobile est plus délicat : il faut un solvant dans lequel la microcystine sera soluble, mais aussi légèrement apolaire pour que la molécule puisse être séparée. De plus il faut également tenir compte du pH de la phase mobile car nous avons vu précédemment que la molécule de microcystine comportait des groupements -COOH et =NH potentiellement ionisables [44]. De plus, une phase mobile acidifiée avec 0,03 % de TFA (acide trifluoroacétique) par exemple, permet de limiter les effets de traînée de pics due à l'ionisation des groupements silanols résiduels de la silice greffée qui interagissent à des pH supérieurs avec les groupements aminés des microcystines [46].

La détection UV est la plus courante car la majeure partie des microcystines a un spectre similaire avec un maximum d'absorption à 238 nm qui s'explique par le chromophore de l'acide aminé Adda. Seuls les variants contenant les acides aminés tyrosine et tryptophane vont présenter deux maximum d'absorption à 223 et 232 nm.

- CLHP SM

Utilisant les mêmes conditions chromatographiques que la CLHP-UV, la détection par spectrométrie de masse commence à se démocratiser dans les laboratoires et de nombreuses études y sont consacrées [23,28,43]. Cette technique permet non seulement de diminuer les limites de détection mais aussi de fournir des indications structurales importantes. La spectrométrie de masse en tandem consiste à fragmenter les molécules et à déterminer la masse des ions fragments. La norme ISO 20179 donne à titre d'information la masse des fragments des nombreux variants de microcystines. Il existe actuellement un projet de norme ISO pour le dosage des cyanotoxines par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse.

Bien que les microcystines soient les toxines les mieux connues et les mieux étudiées, les méthodes chromatographiques peuvent s'appliquer également à d'autres toxines. Contrairement aux microcystines, les anatoxines, cylindrospermopsines et saxitoxines sont beaucoup plus polaires : elles seront donc très peu retenues par la silice greffée C₁₈. Au niveau de l'extraction en phase solide, des cartouches à base de copolymères de divinylbenzène et de N-vinylpyrrolidone peuvent être utilisées.

Pour la cylindrospermopsine, la séparation peut se faire par chromatographie de partage en phase inverse, avec détection UV ou SM. Pour les anatoxines, la séparation est réalisée en CLHP en phase inverse sur une colonne de silice greffée C₁₈. La détection dans l'UV est possible, de même que la fluorimétrie ou la masse après dérivation [47]. Enfin, en ce qui concerne les saxitoxines, la séparation des différents variants est réalisée par CLHP avec appariement d'ions et la détection est principalement par fluorescence.

3.4. Applications au dosage des microcystines au Laboratoire Départemental d'Analyses de la Corrèze

Le département de la Corrèze suit depuis de nombreuses années l'évolution des proliférations algales lors des saisons estivales. La DDASS organise le planning des prélèvements et le laboratoire est chargé de la recherche des microcystines. Disposant depuis longtemps du kit commercial ELISA, le laboratoire a également entamé le développement d'une méthode chromatographique pour le dosage de la microcystine-LR. Le souhait des autorités sanitaires d'étudier également deux autres variants, ainsi que la publication d'une norme ISO, ont conduit la direction du laboratoire à mettre au point une méthode de dosage des microcystines-LR, -YR et -RR. Comme pour tous laboratoires d'essais, le laboratoire départemental d'analyses de la Corrèze s'est engagé dans une démarche qualité. A ce titre, cette nouvelle méthode devait être accréditée par le COFRAC et pour ce faire, devait être validée. Les paragraphes suivants détailleront le principe du dosage des microcystines selon la norme ISO 20179 [38], puis les étapes nécessaires permettant de valider une méthode d'analyse en vue de l'accréditation.

3.4.1. Présentation de la norme ISO 20179

- Objectif

La norme ISO 20179:2005 intitulée « Qualité de l'eau – Dosage des microcystines – Méthode utilisant l'extraction en phase solide (SPE) et la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) avec détection dans l'ultraviolet (UV) » est parue en octobre 2005. Son objectif est le dosage et la quantification des microcystines dans les eaux brutes et les eaux traitées. Cette méthode est validée pour les microcystines-RR, -YR et -LR et elle peut aussi s'appliquer pour déterminer plusieurs variants de microcystines même si le manque de standards commerciaux disponibles et le risque de co-élution peuvent donner des résultats ambigus.

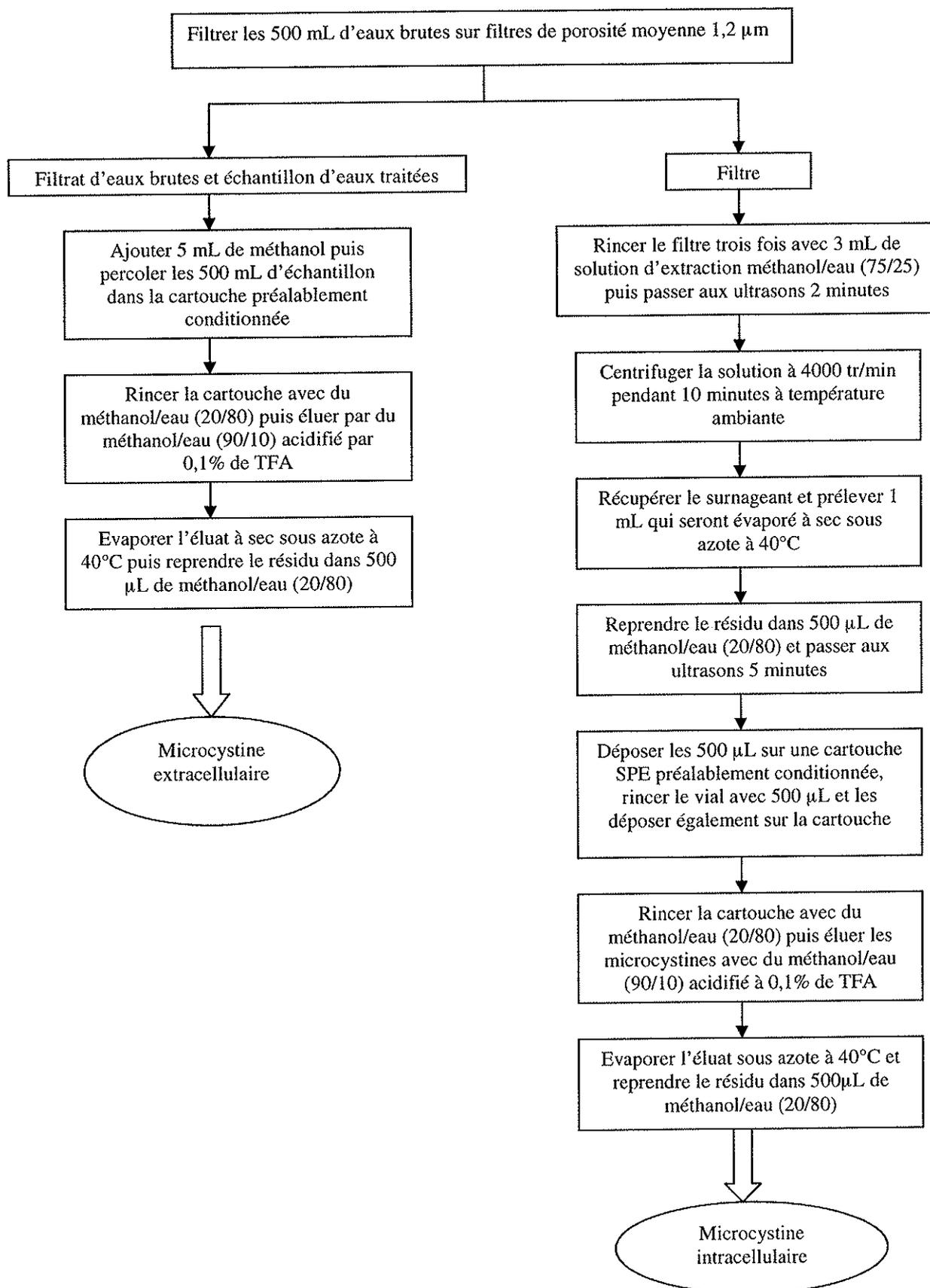
- Principe général

Les échantillons d'eaux brutes sont dans un premier temps filtrés afin de séparer la biomasse particulaire. Cette biomasse est extraite séparément par un mélange méthanol/eau. L'extrait est filtré puis dilué avant rinçage par extraction en phase solide. Le filtrat d'eaux brutes et les échantillons d'eaux traitées vont subir une étape d'extraction en phase solide. L'élution des microcystines de la cartouche se fait par un solvant méthanol/eau (90/10) acidifié avec 0,1 % de TFA. Les microcystines sont ensuite quantifiées par CLHP en phase inverse avec un détecteur dans l'ultraviolet à 238 nm.

- Procédure d'extraction des microcystines

Le protocole permettant l'extraction des microcystines au Laboratoire est décrite dans le diagramme suivant.

Figure 10 : Schéma d'extraction de la microcystine extra et intracellulaire selon la norme ISO 20179.



- Analyse chromatographique

Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- colonne de silice greffée C18, de longueur 250 mm et diamètre interne compris entre 2 et 4,6 mm. La température de la colonne est de 35°C,
- volume d'injection compris entre 5 et 20 µL,
- débit de phase mobile compris entre 0,3 et 1 mL/min,
- détection UV à 238 nm,
- phase mobile composée d'acétonitrile acidifié à 0,05% et d'eau acidifiée à 0,05% par le TFA.

Tableau 3 : Gradient de phase mobile selon la norme ISO 20179.

Temps (minutes)	% d'acétonitrile acidifié	% d'eau acidifiée
0	30	70
10	35	65
40	70	30
42	100	0
44	100	0
46	30	70
55	30	70

3.4.2. Validation de la méthode

Dans le cadre de la démarche qualité entreprise par le laboratoire, il a été décidé de valider la méthode d'analyse des microcystines en vue d'un audit réalisé pour l'accréditation par le COFRAC. La direction du laboratoire nous a donc chargé, au cours du stage professionnel de sixième année de pharmacie et du master « eau-santé-environnement », de mettre en place la caractérisation de cette méthode. Il existe dans ce domaine une norme française publiée par l'AFNOR et intitulée « Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence ». Cette norme, codée XP T 90-210 [37], se propose de guider le laboratoire pour l'évaluation d'une méthode alternative quantitative par rapport à une méthode de référence [23].

3.4.2.1. Définitions

Afin de mieux comprendre l'ensemble de la démarche d'évaluation de la méthode, il convient de donner quelques définitions :

Linéarité : capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir une valeur d'information ou des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans l'échantillon pour laboratoire. Cette proportionnalité s'exprime au travers d'une expression mathématique définie a priori.

Spécificité : propriété d'une méthode d'analyse de convenir exclusivement à la détermination de la grandeur de l'analyte considéré, avec la garantie que le signal mesuré provient seulement de l'analyte.

Justesse : étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essai et une valeur de référence acceptée.

Fidélité : étroitesse de l'accord entre des résultats d'essai indépendants obtenus sous des conditions stipulées. La fidélité est un terme global qui varie entre deux valeurs extrêmes :

- l'une minimale, appelée répétabilité : les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps,

- l'autre maximale, appelée reproductibilité : les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents.

Limite de détection : plus petite quantité d'un analyte à examiner dans un échantillon, pouvant être détectée et considérée comme différente de la valeur du blanc mais non nécessairement quantifiée. En fait, il faut prendre en compte deux risques :

- celui de considérer la substance présente dans l'échantillon alors que sa grandeur est nulle,

- celui de considérer absente une substance alors que sa grandeur n'est pas nulle.

Limite de quantification : plus petite grandeur d'un analyte à examiner dans un échantillon pouvant être déterminée quantitativement dans des conditions expérimentales décrites dans la méthode avec une variabilité définie.

3.4.2.2. Protocole d'évaluation

La norme XP T 90-210 sépare la caractérisation d'une méthode en plusieurs parties. Bien que l'étude puisse être menée librement, il a été choisi de respecter l'ordre préconisé pour garantir une certaine rigueur dans le suivi et le déroulement des étapes.

Les résultats présentés ci-après concernent la microcystine-LR, toxine reconnue comme étant la plus fréquemment trouvée lors des épisodes de blooms. Les résultats pour la microcystine-YR et pour la microcystine-RR sont placés respectivement en annexe n°2 et n°3. Les formules détaillées de calcul, issues de la norme, sont également placées en annexe n°4.

Il faut préciser également que seule l'étude de la partie extracellulaire est concernée par la validation de méthode. En effet, il faudrait pour étudier l'intracellulaire disposer de standards commerciaux de cellules contenant une quantité définie et précise en toxine, ce qui n'est pas le cas actuellement.

Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- colonne de silice greffée C18 5 μ , de longueur 250 mm et diamètre interne 4,6 mm RESTEK. La température de la colonne est de 35°C,
- volume d'injection 20 μ L,
- débit de phase mobile 1 mL/min,
- détection UV à 238 nm sur WATERS 2696,
- Module de séparation : WATERS 2695,
- Acétonitrile pour HPLC : Carlo Erba – SDS,
- Acide trifluoroacétique : Fluka,
- Eau ultra-pure obtenue par une centrale ELGA Maxima fonctionnant par osmose inverse,
- Standards de microcystine-LR, de microcystine-RR et de microcystine-YR : Coger/Alexis Corporation.

- Première étape : linéarité, limites de détection et de quantification

Cette étape permet de vérifier la validité du modèle de régression, de vérifier le domaine d'étalonnage et d'en déduire les caractéristiques de l'étalonnage. La régression est jugée acceptable si le modèle mathématique explique bien les variations des valeurs d'information. Le domaine d'étalonnage est jugé acceptable s'il n'existe pas une erreur de modèle significative.

Pour réaliser cette étude, il faut préparer cinq gammes d'étalonnages avec les valeurs données dans le tableau ci-après et relever les valeurs d'informations.

La première partie de la vérification de la linéarité consiste à établir la fonction d'étalonnage linéaire et à représenter graphiquement le modèle.

Tableau 4 : Valeurs d'informations obtenues pour l'étude de linéarité de la microcystine-LR.

	niv1	niv2	niv3	niv4	niv5	coefficient de	CV
répétitions	0,2 ppm	0,5 ppm	0,75 ppm	1 ppm	2 ppm	corrélation	résiduel
J1		19292	30895	41041	84011	0,99992	22,91%
J2	8654	20344	31522	39443	84332	0,99914	3,76%
J3	8577	20020	30658	40500	84473	0,99964	2,46%
J4	8405	21755	30950	41294	86453	0,99950	2,87%
J5		20103	31690	40629	83797	0,99970	22,48%
CV	1,49%	4,44%	1,41%	1,75%	1,25%		
Ecart-type	127,5	901,7	440,7	711,3	1062,1		

Valeur d'information
= Aire Sous la Courbe

Pour le premier niveau à 0,2 ppm, les valeurs des répétitions J1 et J5 sont aberrantes et ont donc été éliminées. Ces valeurs auraient introduit un biais trop important.

Figure 11 : Représentation graphique de la fonction d'étalonnage.

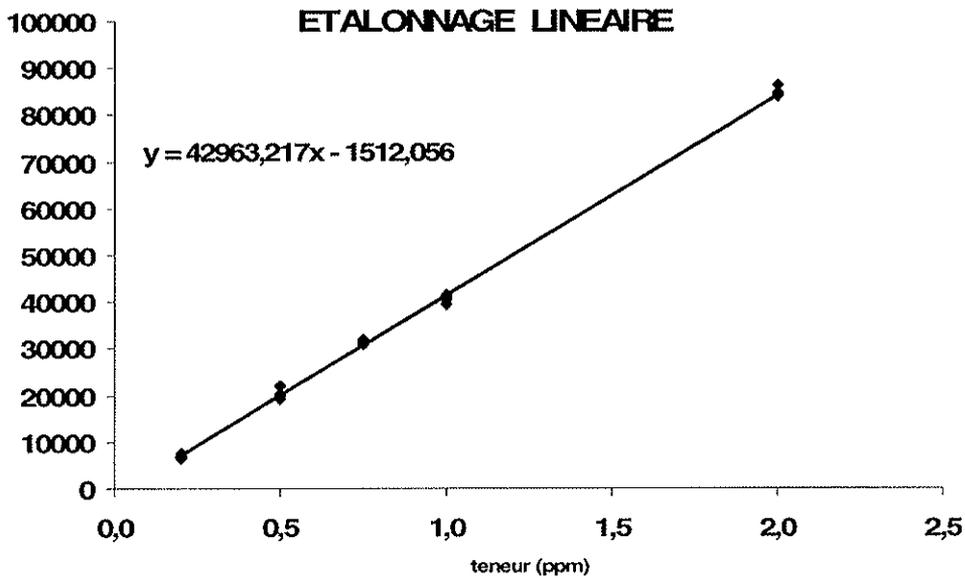


Tableau 5 : Valeur des caractéristiques de la droite de régression.

droite : $y = b_0 + b_1 u$	ordonnée à l'origine (b_0)	pende (b_1)
coefficients de la droite	- 888,5901	42 529,7745
écart-type sur les coefs	377,6951	335,3080
Intervalle de confiance :		
limite inf à : 99%	- 1 957,9806	41 580,3969
limite sup à : 99%	180,8004	43 479,1521

Les valeurs de b_0 et b_1 s'obtiennent mathématiquement de la façon suivante :

$$b_1 = \frac{SPE(u, y)}{SCE(u)}$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{u}$$

Avec :

$SPE(u, y)$ = Somme des Produits des Ecart

$SCE(u)$ = Somme des Carrés des Etalons

\bar{y} et \bar{u} sont les moyennes générales des valeurs d'information y et des niveaux u .

La norme XP T 90-210 donne les formules de calcul des différents paramètres, ainsi que les formules de calcul de la variance résiduelle, de l'écart-type du blanc $s(b_0)$ et de l'écart-type de la pente $s(b_1)$. Ces formules sont placées en annexe du rapport. Les intervalles de confiance pour le blanc et la pente sont calculés à partir de la variable de Student au risque $\alpha = 1\%$ à $25-2 = 23$ degrés de liberté.

Il faut ensuite vérifier l'adéquation avec le modèle linéaire : on cherche à vérifier que la part de la variance due à une erreur de modèle n'est pas supérieure à la variance de l'erreur expérimentale. Pour cela, il faut décomposer la somme des carrés des écarts entre chaque valeur d'information mesurée et la moyenne générale en une somme de carrés des écarts. Cette égalité est donnée par la norme :

$$SCE(y) = SCE_l(y) + SCE_{nl}(y) + SCE_e(y)$$

Avec :

$SCE(y)$: Somme des carrés des écarts à la moyenne

$SCE_l(y)$: Somme des carrés des écarts due à la régression linéaire

$SCE_{nl}(y)$: Somme des carrés des écarts due à une erreur de modèle (non-linéarité)

$SCE_e(y)$: Somme des carrés des écarts due à une erreur expérimentale

Tableau 6 : Test d'adéquation du modèle linéaire.

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Variance estimée	F calculé	Valeur critique au risque $\alpha = 5\%$
Régression	$SCE_l = 1,52E+10$	1	$s^2_l(y) = SCE_l = 1,52E+10$	$F_l = \frac{s_l^2(y)}{s_e^2(y)} = 21569$	$VC_l = 4,54$
Erreur de modèle	$SCE_{nl} = 9,29E+06$	$p-2 = 6$	$s^2_{nl}(y) = \frac{SCE_{nl}}{p-2} = 1,55E+06$	$F_{nl} = \frac{s_{nl}^2(y)}{s_e^2(y)} = 2,19$	$VC_{nl} = 2,79$
Erreur aléatoire	$SCE_e = 1,06E+07$	$p(n-1) = 15$	$s^2_e(y) = \frac{SCE_e}{p(n-1)} = 7,07E+05$		
Totale	$SCE = 1,53E+10$	$np-1 = 22$			

n : nombre de niveaux

p : nombre de répétitions

Dans ce tableau, la valeur critique VC correspond à une variable de Fischer au risque d'erreur $\alpha = 5\%$.

Le rapport F_1 est supérieur à la valeur critique VC_1 : le modèle de régression peut être considéré comme acceptable.

Le rapport F_{nl} est inférieur ou égal à la valeur critique VC_{nl} : le domaine d'étalonnage choisi peut alors être validé, l'erreur de modèle est négligeable.

Tableau 7 : Test de Cochran - Homogénéité des variances.

nombre de groupes	8	conclusion la plus grande dispersion est acceptable
répétitions par groupe	3	
C observée	0,424	
limite à 1%	0,615	
limite à 5%	0,516	

Pour étudier les limites de détection et quantification, la méthode utilisée par le laboratoire est celle de la vérification d'une limite de quantification choisie. L'objectif est de vérifier qu'une limite de quantification choisie est acceptable. Dix prises d'essais de 500 mL d'eau ultra-pure chacune sont dopées à la limite de quantification choisie : 0,2 $\mu\text{g/L}$. Ces prises d'essais vont subir une analyse complète dans des conditions de répétabilité.

Afin de se placer dans une situation la plus proche possible de la réalité, une étude de vérification de la limite de quantification a également été menée sur des eaux brutes.

A partir des valeurs d'informations obtenues, il faut calculer, selon la norme, la grandeur moyenne notée \bar{u}_{LQ} et son écart-type noté s_{LQ} .

Deux conditions doivent être remplies :

- s'assurer que la grandeur moyenne mesurée \bar{u}_{LQ} n'est pas différente de la limite de quantification choisie LQ,
- s'assurer que la valeur 0 n'est pas acceptable comme limite de quantification : si $5 s_{LQ} < LQ$ alors la valeur 0 n'est pas acceptable comme limite de quantification. Cela revient à vérifier que $s_{LQ} / \bar{u}_{LQ} < 20\%$.

La norme précise également que, en utilisant un examen graphique ou un test statistique de Shapiro-Wilk, les points aberrants doivent être éliminés.

Tableau 8 : Vérification de la limite de quantification.

	Valeur obtenue		Valeur critique	Conclusion
Critère de justesse	$\frac{LQ - \bar{u}_{LQ}}{\frac{s_{LQ}}{\sqrt{n}}}$	0,197	10	<i>LQ juste</i>
Critère de fidélité	$CV = s_{LQ} / LQ$	18,7%	20%	<i>LQ > 0</i>
Limite de quantification choisie	LQ	0,2 µg/L		<i>LQ acceptable</i>
Moyenne des grandeurs	\bar{u}_{LQ}	0,2025		

La limite de détection est obtenue en divisant la limite de quantification par 3, soit 0,067 µg/L.

- Deuxième étape : spécificité (contrôle des effets de matrice)

L'étude de la spécificité permet de vérifier que l'on retrouve les grandeurs ajoutées sur des échantillons avant et après les ajouts. Pour cela, on effectue des ajouts, au moins au nombre de dix, choisis de façon à couvrir le domaine d'application de la méthode, donc en général le long de la gamme d'étalonnage.

Les eaux utilisées dans la vérification de la spécificité sont issues d'échantillons d'eaux de baignade.

Une fois les résultats obtenus, la norme préconise de construire le tableau suivant :

Tableau 9 : Récapitulatif des résultats

	Teneur initiale	Teneur ajoutée (v)	Teneur mesurée (w)	Teneur retrouvée (r) (mesurée - initiale)
1	0,000	0,2	0,176	0,176
2	0,000	0,3	0,244	0,244
3	0,000	0,4	0,383	0,383
4	0,000	0,5	0,371	0,371
5	0,000	0,6	0,596	0,596
6	0,000	0,75	0,769	0,769
7	0,000	1	0,821	0,821
8	0,000	1,4	1,219	1,219
9	0,000	1,6	1,768	1,768
10	0,000	2		

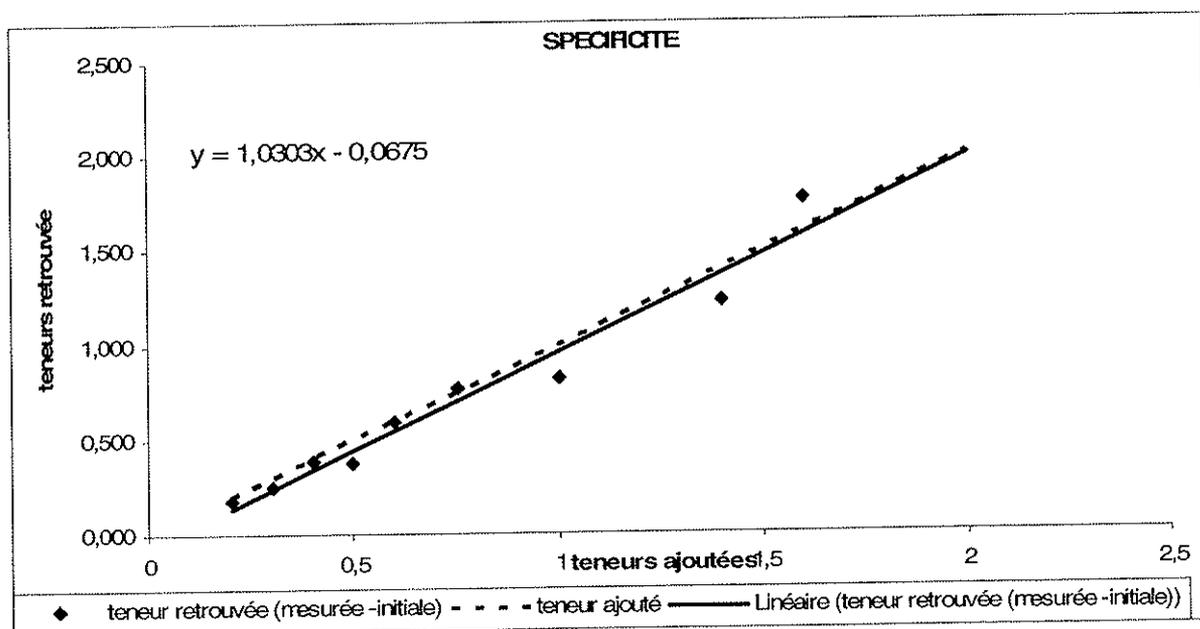
Afin de vérifier la spécificité, et donc les effets de matrice, on cherche à calculer la droite de recouvrement, c'est-à-dire la droite obtenue entre les valeurs d'ajouts et les valeurs retrouvées et d'équation $r = c_0 + c_1v$. Il s'agit de comparer les valeurs de la pente c_1 et de l'ordonnée à l'origine c_0 avec les valeurs d'une droite idéale d'équation $r = v$.

La norme demande de calculer en plus de c_1 et c_0 la variance résiduelle $s^2(\text{res})$ pour pouvoir en déduire les variances de c_1 et de c_0 . Les intervalles de confiance de deux coefficients avec un risque de 1% sont aussi calculés. Les formules de calcul sont données en annexe n°5.

Tableau 10 : Résultats statistiques de l'étude de la spécificité.

$r = c_0 + c_1v$	Valeur		Valeur critique pour $\alpha = 1\%$	Conclusion
Pente de la droite de régression	c_1	1.158	1,000	
Ecart-type de la pente	$s(c_1)$	0,080		
Limite inférieure de la pente à 1%		0,891		
Limite supérieure de la pente à 1%		1,426		
Ordonnée à l'origine de la droite	c_0	-0,142	0,000	
Ecart-type de l'ordonnée à l'origine	$s(c_0)$	0,084		
Limite inférieure de l'ordonnée à l'origine à 1%		-0,422		
Limite supérieure de l'ordonnée à l'origine à 1%		0,139		
Nombre de mesures	p	10		
Test de signification de la pente	t_{obs}	1.988	$t(p-2, 1-\alpha/2) = 3,355$	$t_{obs} < t$ donc pente acceptable
Test de signification de l'ordonnée à l'origine	t'_{obs}	1.697		$T_{obs} < t'$ donc ordonnée à l'origine acceptable
Spécificité de la méthode				Spécificité acceptable

Figure 12 : Représentation graphique de la droite de recouvrement.



- Troisième étape : répétabilité et justesse

Il s'agit ici de comparer la répétabilité et la justesse de la méthode alternative à la méthode de référence à travers des échantillons analysés plusieurs fois par les deux méthodes. Dans le cas de la recherche de microcystine, la seule possibilité qui nous est offerte est d'envoyer à un laboratoire de référence des échantillons pour qu'il puisse les analyser, pendant que nous analysons ces mêmes échantillons au sein du LDA.

De plus, le LDA s'est également inscrit aux essais interlaboratoires (EIL) de l'AGLAE. Le principe de ces essais est le suivant : les laboratoires qui s'inscrivent reçoivent des échantillons dopés à une concentration inconnue qu'ils doivent analyser. Une fois tous les résultats centralisés, le laboratoire va, au moyen d'un code confidentiel qu'il lui est attribué, pouvoir se situer par rapport aux autres laboratoires ayant participé aux tests. Déjà inscrit à de nombreux EIL, le laboratoire a pris la décision en 2006 de s'inscrire pour la recherche de toxines de cyanobactéries sur eaux naturelles, sur le paramètre microcystine-LR. Nous avons donc reçu en juillet 2006 deux flacons scellés sur lesquels nous devions rechercher la microcystine-LR en double réplique. Une fois les échantillons analysés, nous avons transmis par courrier électronique les résultats, ainsi que les caractéristiques de l'analyse : procédé d'extraction, technique de dosage, référence normative, mode d'expression des résultats, ... Ainsi, toutes ces informations permettront à l'AGLAE de rendre des résultats qui tiendront compte des variations de techniques entre les laboratoires.

A l'heure actuelle, les résultats de l'enquête ne sont que partiels. Nous avons trouvé les valeurs suivantes :

Flacon A : - 1,28 µg/L
- 1,24 µg/L

Flacon B : - 1,35 µg/L
- 1,34 µg/L

Le Z-score partiel, défini par la relation (moyenne labo – moyenne Laboratoires participants) / écart-type Laboratoire participants), obtenu par le laboratoire est compris entre

-1 et +1. Il constitue une bonne compatibilité entre les résultats obtenus et la valeur de référence de l'EIL située provisoirement à 1,016 µg/L.

- Autres études

En vue de l'audit d'accréditation, d'autres plans de surveillance doivent être menés : il faut citer par exemple la création de carte de contrôle sur les rendements, les contrôles qualité et les temps de rétention des trois molécules. Une étude des incertitudes est également développée : elle comprend les incertitudes liées à l'étalonnage, celles liées à la verrerie et aux instruments tels que les pipettes et prend en compte les cartes de contrôles citées ci-dessus ainsi que, dans le cas général, les résultats des essais inter-laboratoires.

3.4.3. Bilan

La technique de dosage des microcystines s'appuie sur la norme internationale ISO 20179 parue en octobre 2005. Cette technique est relativement simple à mettre en œuvre en routine, bien que nécessitant beaucoup de temps, notamment lors de l'étape de purification.

Toutefois, quelques points restent à améliorer : il faut citer par exemple l'absence de matériel de référence pour l'étude de la microcystine intracellulaire. Cette absence ne permet pas de réaliser des rendements sur cette fraction, et donc de vérifier que la méthode proposée par la norme soit la plus efficace. Pourtant le suivi des toxines intracellulaires est important quand on sait que ces toxines sont potentiellement libérables dans le milieu aquatique, mais sous des conditions encore mal connues à l'heure actuelle. Enfin, les laboratoires qui fournissent des standards commerciaux sont encore peu nombreux et ces standards ne sont pas forcément d'une qualité analytique précise. La mise à disposition de standards validés et certifiés permettrait d'apporter une garantie supplémentaire lors du dosage des toxines.

La méthode de dosage de trois formes de microcystine a été caractérisée selon la norme AFNOR XP T 90-210. D'après les résultats obtenus pour l'étude de la linéarité, le modèle de régression linéaire est acceptable pour les microcystines-LR, -YR et -RR et le domaine d'étalonnage, 0,2 à 2 µg/L, est validé. La limite de quantification choisie : 0,2 µg/L, est juste et supérieure à 0 ; elle est vérifiée sur deux matrices différentes, l'eau ultra-pure et

l'eau brute. La limite de détection est de 0,067 $\mu\text{g/L}$. La norme ISO 20179 recommande une limite de détection inférieure ou égale à 0,1 $\mu\text{g/L}$ et une limite de quantification inférieure ou égale à 0,2 $\mu\text{g/L}$. La limite de détection établie pour la méthode est donc inférieure à celle recommandée par la norme. La spécificité de la méthode est testée sur une matrice complexe mais représentative de la majorité des échantillons traités au laboratoire : les eaux de baignade. D'après les tests statistiques, la pente de chaque droite de recouvrement est équivalente à 1 et chaque ordonnée à l'origine est équivalente à 0. L'étude de la répétabilité et de la justesse a été abandonnée en raison de problèmes rencontrés par le second laboratoire. Enfin, l'ensemble des données permettant la conception des cartes de contrôles et des études des incertitudes a été rassemblé pour constituer le dossier en vue de l'accréditation.

Partie 4

Situation sur le département de la Corrèze en 2006

Une fois la méthode caractérisée, elle a pu être appliquée au traitement d'échantillons réels, issus d'eaux de baignade ou d'eaux destinées à la consommation (eaux brutes et eaux traitées). Au cours de la saison estivale 2006, plus de 80 échantillons, prélevés dans le département ou non, ont été traités et analysés par CLHP-UV. Outre l'activité du laboratoire, cette partie va présenter le rôle de la DDASS de la Corrèze en ce qui concerne le suivi des baignades. Assurant les prélèvements, le suivi et l'information du public, ce service de l'Etat constitue le maillon essentiel dans la gestion du risque lié aux cyanobactéries. La DDASS assure ainsi depuis plusieurs années une surveillance régulière des sites dont les résultats récents sont résumés. Elle centralise aussi les données concernant les genres de cyanobactéries identifiés lors des prélèvements. Enfin, des copies d'articles de presse sont reproduits : ils permettent de voir comment ce risque est expliqué à la population et surtout ils font prendre conscience des dangers qui y sont liés.

4.1. Les analyses de toxines au laboratoire

4.1.1. Généralités

La recherche de microcystines dans les eaux par ELISA ou par CLHP-UV se fait depuis plusieurs années au laboratoire de la Corrèze. Le principal client du laboratoire est la DDASS de la Corrèze. Pour ce qui est des prélèvements d'eaux de baignade, la DDASS a choisi de faire tout d'abord un dénombrement et une identification des cyanobactéries. Si cette recherche indique la présence d'espèces caractéristiques pouvant présenter un risque pour la santé ou l'environnement, la DDASS demande alors une confirmation par un test ELISA. Si ce test s'avère positif, une recherche des microcystines-LR, -YR et -RR par CLHP-UV est déclenchée. D'autres clients peuvent demander une analyse directe par CLHP-UV après dénombrement. Dans le cas des eaux destinées à la consommation humaine, la recherche de microcystines par CLHP-UV se fait directement après dénombrement, tout d'abord sur l'échantillon d'eau brute, puis sur l'échantillon d'eau traitée en cas de résultats positifs. Le flacon d'échantillon d'eau traitée sera conservé en chambre froide à 4°C. Lors de leur arrivée au laboratoire, les échantillons sont identifiés et numérotés au niveau du secrétariat d'hydrologie. Une feuille de paillasse comportant le nom et le numéro d'échantillon, le lieu et l'heure de prélèvement ainsi que les paramètres à analyser est alors

éditée. Les échantillons sont ensuite placés en chambre froide puis traités. Une fois l'analyse terminée, ce qui reste de l'échantillon est alors remis en chambre froide dans le cas où une confirmation serait nécessaire. Les feuilles de paillasse sont remplies et transmises au secrétariat pour enregistrement, facturation et rédaction du bordereau de résultats pour le client. L'envoi des résultats n'est effectif qu'après validation par la direction du laboratoire.

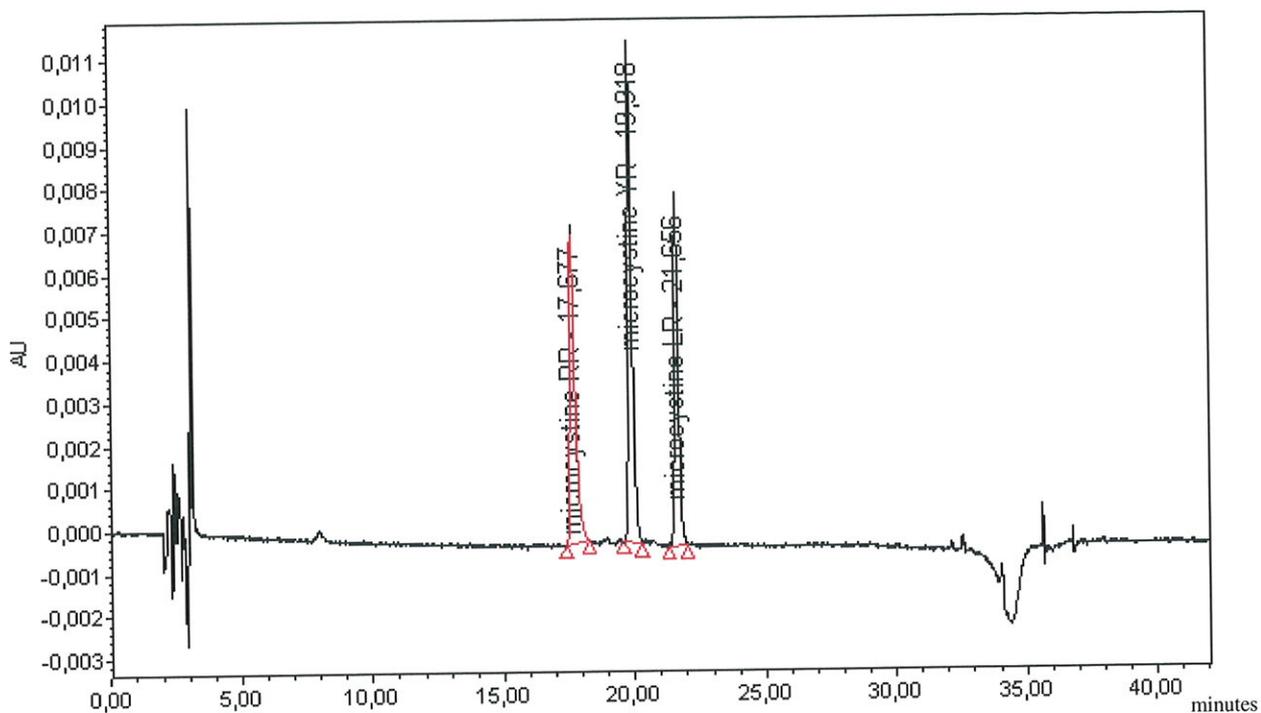
4.1.2. Exemples

Les échantillons sont analysés selon le protocole établi lors de la validation de la méthode. Sachant que la chaîne de CLHP Waters 2695 est également utilisée pour traiter d'autres échantillons, il m'était possible de travailler sur une chaîne CLHP 1100 d'Agilent Technologies. Les résultats présentés ci-après sont toutefois issus du logiciel Empower fourni avec la chaîne Waters.

A partir de 500 mL d'échantillon d'eau, nous obtenons après extraction-purification du filtrat et du filtre un vial de 500 μ L pour la microcystine extracellulaire et un vial de 500 μ L pour la microcystine intracellulaire. Ce volume dans un vial standard étant trop faible pour que l'aiguille puisse prélever, 100 μ L de chaque vial sont transvasés dans un autre vial muni d'un réducteur.

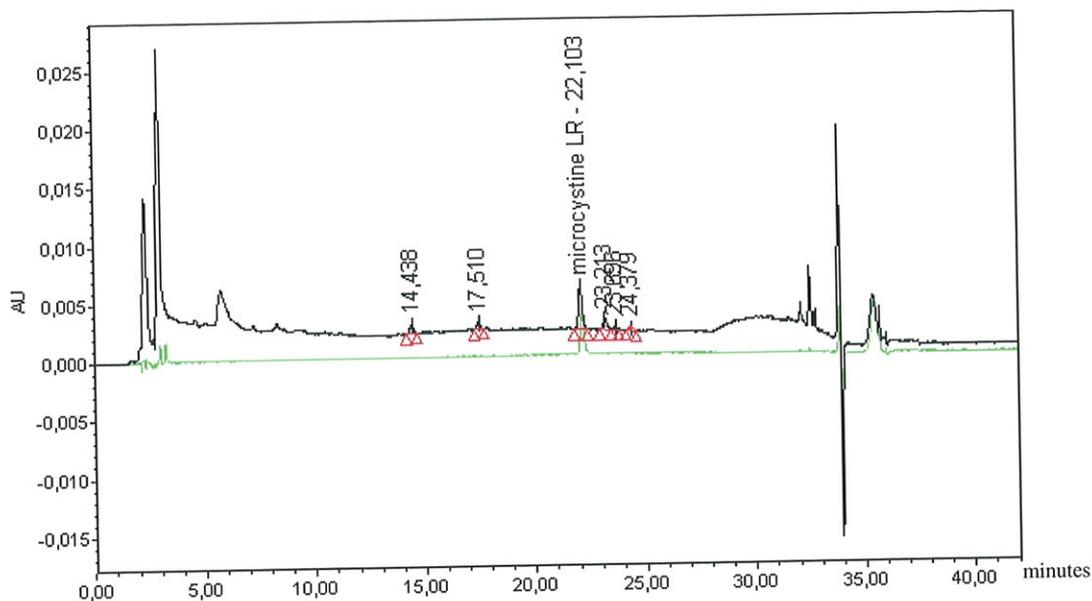
Chaque séquence d'analyse en CLHP se compose tout d'abord de la gamme, de 0,2 à 2 ppm, puis d'un blanc et d'un rendement sur l'extracellulaire à 0,5 ppm et enfin des échantillons. Les vials correspondants à l'intracellulaire sont placés en fin de séquence afin de limiter les effets de matrice. La séquence se termine par une méthode de rinçage de la colonne.

Figure 13 : Chromatogramme du point de gamme à 2 ppm.



En CLHP sur colonne C_{18} greffée, les microcystines sortent toujours dans l'ordre microcystine-RR, microcystine-YR et microcystine-LR, ce qui confirme les données de la norme ISO 20179. Bien que les trois molécules ne varient que d'un seul acide aminé, la séparation des pics est satisfaisante avec notamment un retour à la ligne de base entre chaque pic.

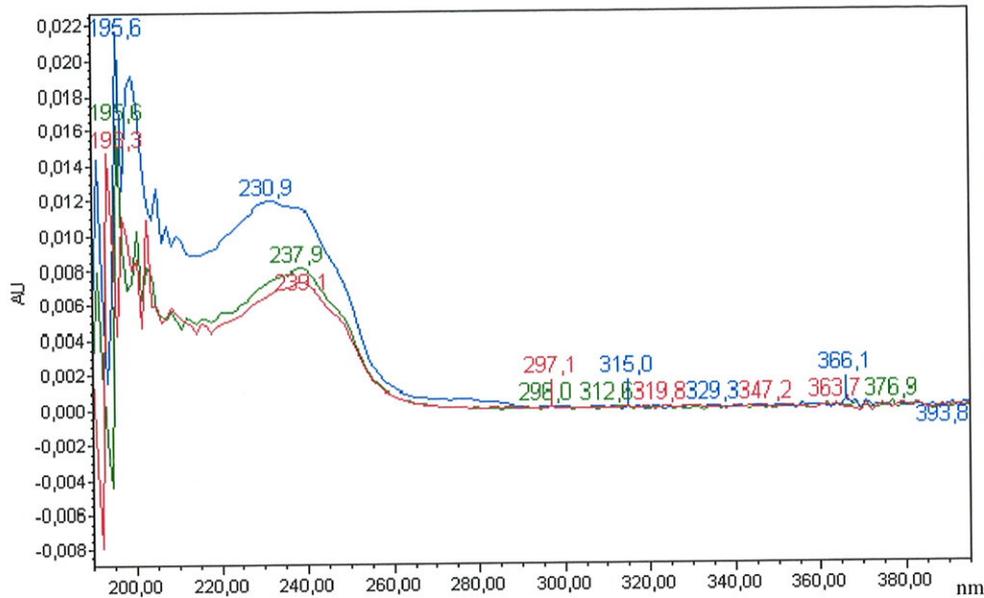
Figure 14 : Chromatogramme d'un échantillon positif et d'un point de gamme.



L'interprétation des résultats se fait toujours en superposant l'échantillon avec un point de gamme. Cela permet de vérifier principalement les temps de rétention. Sur la figure ci-dessus, le chromatogramme vert correspond au point de gamme à 1 ppm et le chromatogramme noir à l'échantillon extracellulaire.

La vérification se fait en comparant le spectre UV de la microcystine du point de gamme avec le spectre UV du pic de l'échantillon. Les microcystines vont présenter un maximum d'absorption à 238 nm.

Figure 15 : Spectre UV des microcystines-LR, -YR et -RR.



Microcystine-LR Microcystine-YR Microcystine-RR

La quantification se fait après construction de la droite d'étalonnage. Le logiciel donne alors une valeur calculée à partir de l'aire sous la courbe du pic considéré et des coefficients de la droite d'étalonnage. Le résultat réel est différent et doit tenir compte de plusieurs paramètres et notamment du volume initial d'échantillon filtré : sur certains échantillons très « chargés » (présence de sable, d'algues microscopiques,...) il peut être difficile de filtrer 500 mL. Si on filtre un volume inférieur, il faut en tenir compte dans le calcul final. Le calcul s'effectue de la façon suivante :

$$[C_{extra} (\mu g / L)] = \frac{[C_{mesurée} (ppm) \times 500]}{V_{filtré} (mL)}$$

Dans le cas où le volume filtré est de 500 mL, on peut directement passer du résultat brut exprimé en ppm au résultat définitif exprimé en $\mu g/L$ d'eau. Le calcul pour les microcystines intracellulaires est identique.

Le résultat pour les microcystines extracellulaires peut être modifié par le rendement :

$$[C_{\text{corrigée}}] = \frac{[C_{\text{extra}}] \times 100\%}{R\%}$$

Le résultat est enfin rendu sous trois formes pour chaque variant :

- la microcystine extracellulaire,
- la microcystine intracellulaire,
- la microcystine totale (intra + extra).

Nous avons vu précédemment quels étaient les risques liés à la présence de cyanobactéries ou de leur toxines dans des eaux destinées à la consommation humaine ou dans des eaux de baignades ou d'activités nautiques. Ces risques ont conduit les pouvoirs publics à mettre en place une réglementation spécifique. Il reste toutefois à développer le volet « prévention » du risque liée à la présence de cyanobactéries. En effet, la population semble le plus souvent mal connaître ce risque ou le limiter essentiellement aux toxines présentes dans l'eau de mer qui peuvent contaminer les coquillages. Les nombreuses interdictions de vente de coquillages en raison d'une contamination, qu'elle soit d'origine cyanobactérienne ou non, ont permis de sensibiliser la population à ce type de risque sur le littoral. Pour ce qui est des eaux douces ou des eaux de consommation, il est nécessaire de mettre en place les moyens d'informations adéquats.

4.2. Le rôle de la Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales

En organisant une surveillance systématique des étangs, lacs ou plans d'eaux liés à une activité de loisirs ou destinés à alimenter les usines de traitement de l'eau, la Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales va permettre d'établir un suivi régulier et de construire une base de données qui permettra de connaître les évolutions d'une année à l'autre.

La surveillance régulière des eaux de baignades est inscrite dans la réglementation (Code de la Santé Publique, art. L1332 et suivants). Celle-ci repose sur des analyses microbiologiques et physico-chimiques comportant notamment une recherche des coliformes totaux, *Escherichia coli* et entérocoques pour la partie bactériologique et une analyse du pH, de la transparence, de la coloration, de la présence de tensio-actifs,... pour la partie physico-chimique.

Le tableau ci-après présente les normes en vigueur concernant les paramètres microbiologiques à suivre régulièrement au cours de la saison.

Tableau 11 : Normes bactériologiques des baignades aménagées.

	Valeur impérative	Valeur guide
Coliformes totaux	10 000 /100mL	500 /100mL
Coliformes fécaux	2000 /100mL	100 /100mL
Entérocoques		100 /100 mL

Ces suivis se font à raison de deux prélèvements par mois au cours de la saison, plus un prélèvement réalisé 15 jours avant l'ouverture de la baignade au public. Des prélèvements supplémentaires peuvent avoir lieu si la qualité de l'eau s'éloigne des valeurs guides fixées par la réglementation.

A partir de ces prélèvements, les résultats bactériologiques permettent de classer les zones de baignades en quatre catégories :

- les eaux de bonne qualité (A):

Pour ces eaux :

- au moins 80 % des résultats en coliformes totaux et *Escherichia coli* sont inférieurs ou égaux aux nombres guides (500 et 100/100 mL),
- au moins 95 % des résultats en coliformes totaux et *Escherichia coli* sont inférieurs ou égaux aux nombres impératifs (10 000 et 2000/100 mL),
- au moins 90 % des résultats en entérocoques sont inférieurs ou égaux aux nombres guides (100/100 mL),
- pour au moins 67 % des contrôles il n'est pas constaté de film visible à la surface de l'eau ou d'odeur caractéristique de présence d'huiles minérales, ni de mousse persistante (tensio-actifs), ni d'odeur spécifique de phénols.

- les eaux de qualité moyenne (B):

L'eau des lieux surveillés est de qualité moyenne lorsque le nombre impératif fixé par la Directive pour les coliformes totaux et les *Escherichia coli* est respecté dans au moins 95 % des prélèvements (10 000 et 2000/100 mL), les conditions relatives aux nombres guides n'étant pas, en tout ou partie, respectées.

- les eaux pouvant être polluées momentanément (C):

- la fréquence de dépassement du nombre impératif pour les coliformes totaux et les *Escherichia coli* ou,
- la fréquence d'indices de présence d'huiles minérales, de mousses ou de phénols, est comprise entre 5 et 33 %.

- les eaux de mauvaise qualité (D):

Dans tous les autres cas, ces eaux doivent être interdites à la baignade.

Comme cela a été dit précédemment, la recherche de cyanobactéries ou de toxines dans les eaux de baignades n'est pas inscrite dans la réglementation. Depuis 2003, des circulaires sont venues préciser les modalités de gestion du suivi du risque lié aux cyanobactéries. A titre d'exemple, l'ensemble des baignades corréziennes est suivi de la même façon qu'il s'agisse des cyanobactéries ou des autres paramètres microbiologiques. Au

minimum cinq prélèvements par saison sont donc effectués en vue d'une recherche des cyanobactéries.

Tableau 12 : dénombrements cellulaires pour la gestion du risque lié aux cyanobactéries.

Dénombrements cellulaires (cellules/mL)	Niveau de risque
20 000	1
100 000	2
Couche mousseuse colorée = prolifération et/ou forte coloration	3

D'un point de vue pratique, les préleveurs de la DDASS de la Corrèze vont pratiquer un échantillonnage moyen de la zone de baignade. Le prélèvement s'effectue après agitation de la colonne d'eau. Au total, un flacon en verre ambré d'1 L de contenance sera prélevé en vue d'une recherche de toxine, et un flacon en verre ambré de 20 mL sera prélevé en vue de l'identification et du dénombrement des cyanobactéries.

En 2006, 37 sites de baignades ont été suivis dans le département de la Corrèze par les agents de la DDASS. La liste de ces sites de baignades est placée en annexe n°6.

Parmi ces sites, deux ont été interdits toute la saison. Pour le premier, cette interdiction s'explique en raison de deux déclassements successifs en 2004 et 2005. Les normes bactériologiques n'ont pas été respectées ces deux années et le niveau de 20 000 cellules de cyanobactéries par mL a été atteint en 2005. La fermeture du second est intervenue pour raison de sécurité, dans la mesure où ce plan d'eau a été vidangé et n'a pas récupéré son niveau normal de remplissage, ce qui constituait un risque.

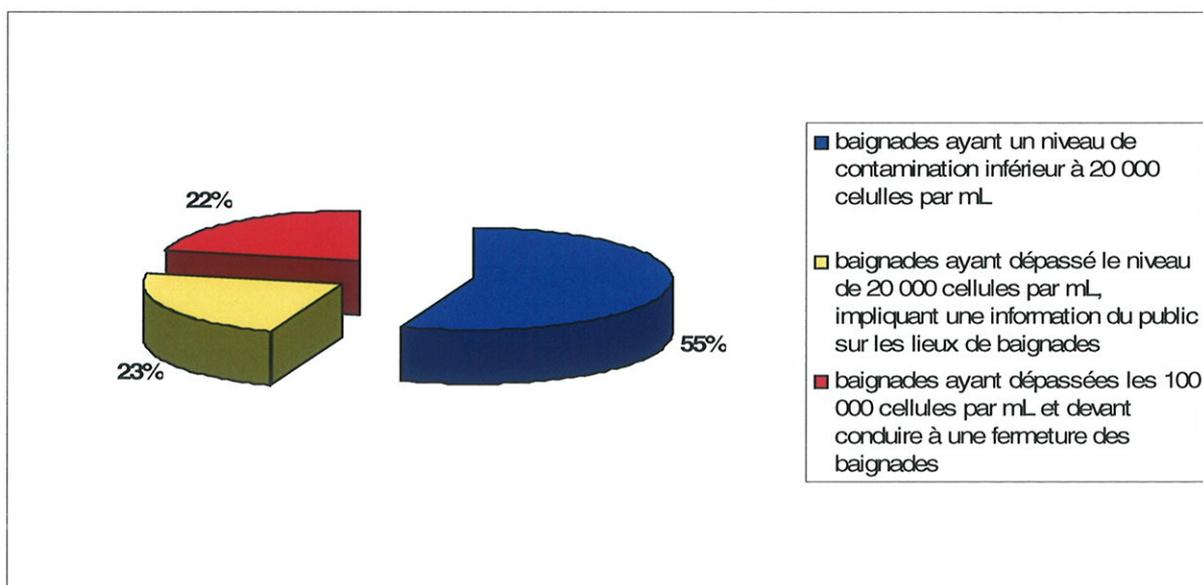
Plus de la moitié des baignades suivies en 2006 a un niveau de contamination par les cyanobactéries inférieur à 20 000 cellules par mL et n'a donc posé aucun problème sur ce plan. Toutefois, il faut signaler que parmi ces plans d'eau deux ont été contrôlés en catégorie C pour les normes bactériologiques. Ces deux sites ont été momentanément pollués au cours de la saison et ont donc subi un prélèvement de confirmation supplémentaire, ce qui amène au total à six prélèvements sur la saison.

D'autre part, deux autres de ces plans d'eau, à Aubazine et Chamboulive, sont concernés par un traitement préventif par des algicides, à base de sulfate de cuivre. Les traitements ont été mis en place pour éviter une fermeture de site très touristique. Le plan d'eau de Chamboulive avait atteint le niveau de 20 000 cellules par mL l'année précédente. Le site d'Aubazine avait été fermé en 2004 en raison de proliférations très importantes de cyanobactéries.

Huit baignades ont dépassé le seuil de 20 000 cellules par mL. Comme prévu par les diverses circulaires administratives, une information du public est mise en place par affichage des conseils et des risques liés à la présence de cyanobactéries dans le plan d'eau. Deux de ces sites, l'étang de Miel à Beynat et l'étang de Meyrignac à Marçillac la Croisille n'ont toutefois été concernés que ponctuellement par ces dépassements.

Enfin, 7 baignades ont dépassé le niveau de 100 000 cellules par mL devant conduire à la fermeture de la baignade. Plusieurs points importants sont à préciser et permettent d'affiner cette donnée. Tout d'abord, aucune de ces baignades n'a été concernée par un problème bactériologique au cours de la saison estivale 2006. Ensuite, aucune de ces baignades n'a été interdite l'année précédente en raison d'un bloom de cyanobactéries. Seuls deux sites avaient dépassé le seuil de 20 000 cellules par mL.

Figure 16 : Contamination des baignades par les cyanobactéries en 2006.

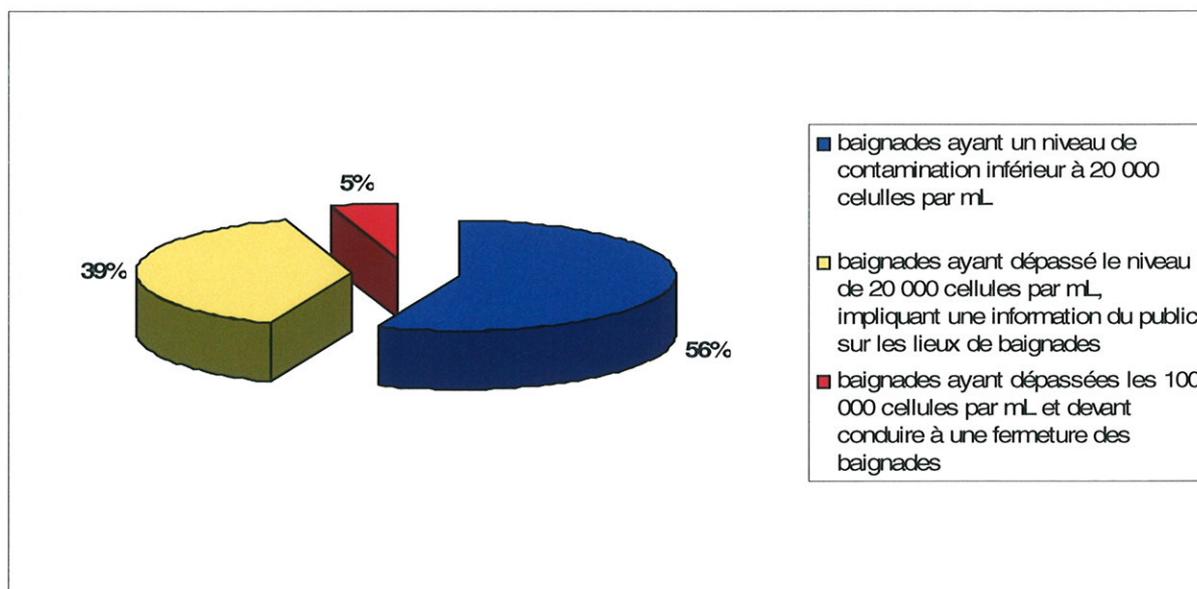


Source : DDASS de la Corrèze

Ce graphique permet de se rendre compte de l'importance du suivi des cyanobactéries dans les plans d'eau du département puisque 45 % des sites de baignades ont été concernés par un dépassement du seuil de 20 000 cellules par mL. Ce résultat est du même ordre que celui observé pour l'année 2005 puisque 44 % des baignades étaient victimes de proliférations algales.

Une analyse sur les données 2005 permet de comparer l'évolution entre les deux saisons.

Figure 17 : Contamination des baignades par les cyanobactéries en 2005.

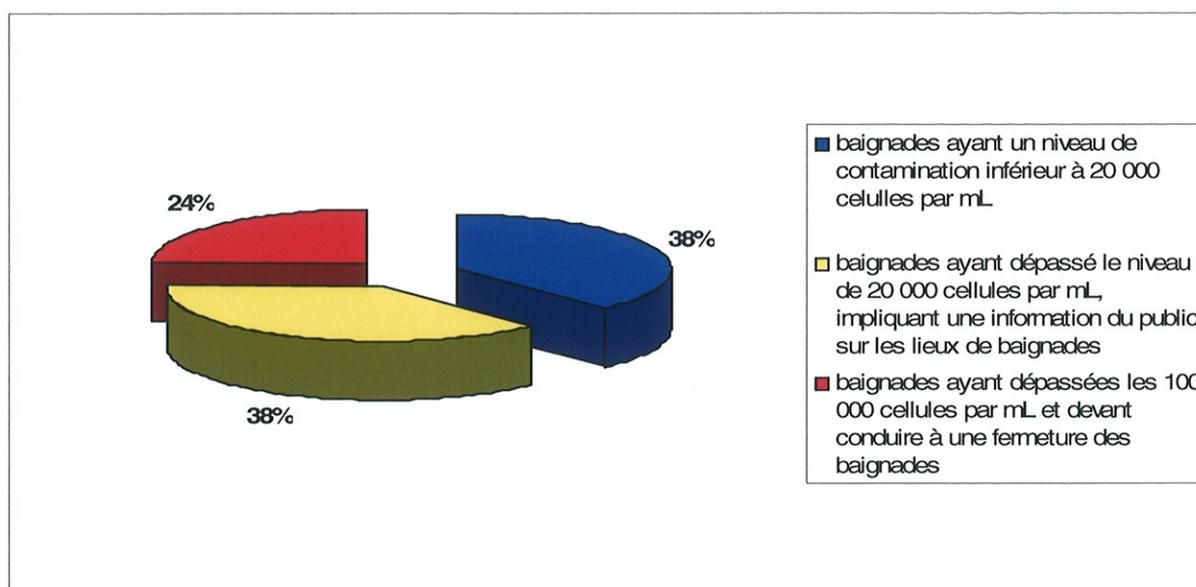


Source : DDASS de la Corrèze

L'évolution la plus caractéristique concerne les baignades ayant dépassées le seuil de 100 000 cellules par mL : la proportion de baignades concernées passe de seulement 5 % en 2005 à 22 % en 2006. En considérant les baignades ayant dépassé le seuil de 20 000 cellules par mL, ce taux reste à peu près identique d'une année sur l'autre : 44 % en 2005 et 45 % en 2006. Toutefois, ce type de comparaison ne permet pas de vérifier si les baignades touchées une année le sont forcément l'année suivante. Il faut alors cumuler les données 2005 et 2006.

En effet, si nous calculons les trois pourcentages sur les valeurs obtenues lors des deux saisons estivales on obtient le résultat suivant :

Figure 18 : Contamination des baignades par les cyanobactéries sur la période 2005-2006.



Source : DDASS de la Corrèze

Nous constatons ainsi qu'un peu plus d'un tiers des baignades de la Corrèze n'ont pas dépassé le seuil de 20 000 cellules nécessitant une information du public sur les saisons estivales 2005 et 2006. Cela signifie donc que la contamination liée aux cyanobactéries a touché la plupart des plans d'eau du département. Même si, au bout du compte, seuls 15 sites ont dépassé le seuil de 20 000 cellules en 2006 contre 17 en 2005, ce sont au total 23 baignades qui ont dépassé ce seuil sur les deux saisons.

Comme cela a été vu dans les paragraphes précédents, le danger est variable en fonction des genres de cyanobactéries. En Corrèze, chaque prélèvement s'accompagne d'un dénombrement et d'une identification des genres présents. Le tableau ci-après décrit, pour chaque plan d'eau ayant été concerné par un dépassement du seuil de 20 000 cellules par mL, quels ont été les principaux genres dominants pour l'année 2006.

Tableau 13 : Genres dominants en cas de dépassement du niveau 1 (année 2006).

Sites	Date de prélèvements	Genres dominants	Commentaires
Ambrugeat	31/07/2006	<i>Merismopedia</i>	
	08/08/2006	<i>Merismopedia</i>	
	16/08/2006	<i>Merismopedia</i>	
	22/08/2006	<i>Merismopedia</i>	
Auriac	23/08/2006	<i>Oscillatoria</i>	dépôts d'Aphanothece et d'Anabaena
Beynat	03/07/2006	<i>Aphanothece</i>	
Eygurande	11/07/2006	<i>Woronichinia - Microcystis - Aphanothece</i>	
	16/08/2006	<i>Romeria</i>	
Liginiac - chabrat	01/08/2006	<i>Microcystis - Anabaena</i>	baignade privée : moins représentative que le site de Neuvic
	07/08/2006	<i>Romeria - Microcystis - Aphanothece</i>	
	07/08/2006	<i>Microcystis</i>	
	17/08/2006	<i>Microcystis</i>	
	21/08/2006	<i>Microcystis</i>	
	21/08/2006	<i>Microcystis</i>	
Lissac s/Couze	05/09/2006	<i>Aphanothece</i>	dépôts d'Aphanothece
Masseret	16/08/2006	<i>Aphanothece - Microcystis</i>	dépôts d'Aphanothece
Meilhards	16/08/2006	<i>Microcystis - Aphanothece</i>	
St Salvadour	22/08/2006	<i>Microcystis</i>	
Sornac	31/07/2006	<i>Microcystis - Woronichinia - Aphanothece</i>	
	08/08/2006	<i>Aphanothece</i>	
	24/08/2006	<i>Microcystis - Aphanothece</i>	
Tarnac	31/07/2006	<i>Merismopedia</i>	
Ussel	04/07/2006	<i>Aphanothece - Microcystis - Woronichinia</i>	Dépôts d'Aphanothece, d'Oscillatoria ou d'Anabaena
	11/07/2006	<i>Aphanothece - Microcystis - Woronichinia</i>	
Vigeois	16/08/2006	<i>Microcystis</i>	

Source : DDASS de la Corrèze

Plusieurs points sont à remarquer. En premier lieu, en ce qui concerne la répartition géographique des genres, il faut noter que ce sont souvent des genres différents qui sont détectés d'un plan d'eau à un autre, même si le genre *Aphanothece* se retrouve sur beaucoup de sites. Cela illustre parfaitement la grande diversité de ces organismes. De plus, lorsqu'un plan d'eau est touché par une contamination, c'est souvent le même genre qui persiste toute la saison : Ambrugeat par *Merismopedia*, Liginiac par *Microcystis*, Sornac par *Aphanothece* ou Ussel par les trois genres *Woronichinia*, *Microcystis* et *Aphanothece* à la fois. Par contre, seuls les sites de Liginiac et d'Ambrugeat ont été concernés par des épisodes prolongés de contamination. Les autres sites n'ont été touchés que ponctuellement.

Tableau 14 : Genres dominants en cas de dépassement du niveau 1 (2005 et 2006).

Sites	Genres dominants en 2005	Genres dominants en 2006
Ambrugeat	<i>Anabaena</i>	<i>Merismopedia</i>
Aubazine		Baignade ayant fait l'objet d'un ttt en 2006
Auriac	<i>Aphanothece</i>	<i>Oscillatoria</i>
Beynat		<i>Aphanothece</i>
Camps		
Chamberet		Baignade fermée en 2006 cause construction piscine
Chamboulive	<i>Microcystis</i>	Baignade ayant fait l'objet d'un ttt en 2006
Chaumeil		
Clergoux	<i>Merismopedia</i>	
Egletons		
Espagnac	<i>Oscillatoriales</i> (prolifération subite et éphémère)	
Eygurande	<i>Woronichinia</i>	<i>Woronichinia - Microcystis - Aphanothece - Romeria</i>
Lapleau		
La Roche-Canillac		
Liginiac - chabrat	<i>Anabaena</i>	<i>Romeria - Microcystis - Aphanothece - Anabaena</i>
Liginiac - le maury	<i>Anabaena - Microcystis</i>	<i>Microcystis</i>
Lissac s/Couze	<i>Merismopedia - Aphanothece</i>	<i>Aphanothece</i>
Marcillac la Croisille		dépassement ponctuel
Marcillac la Croisille		
Masseret	<i>Aphanothece - Microcystis</i>	<i>Aphanothece - Microcystis</i>
Meilhards	<i>Aphanothece - Microcystis</i>	Baignade interdite (<i>Microcystis - Aphanothece</i>)
Meyrignac l'Eglise	<i>Microcystis</i>	Baignade interdite
Neuvic	<i>Anabaena - Microcystis</i>	dépôts d' <i>Aphanothece</i>
St Martial Entraygues		
St Priest de Gimel		
St Privat		
St Salvadour		<i>Microcystis</i>
Sarroux	<i>Aphanizomenon</i>	
Seilhac	<i>Woronichinia - Microcystis</i>	
Servieres le Chateaux		
Sornac	<i>Aphanothece</i>	<i>Microcystis - Woronichinia - Aphanothece</i>
Soursac		
Tarnac		<i>Merismopedia</i>
Treignac		
Ussel	<i>Microcystis - Woronichinia</i>	<i>Aphanothece - Microcystis - Woronichinia</i>
Viam		
Vigeois		<i>Microcystis</i>

Source : DDASS de la Corrèze

Ce tableau permet de comparer les causes de contamination d'une année sur l'autre. Première constatation, qui reprend les conclusions apportées par la figure 18, certains sites concernés une année ne le sont pas forcément les deux. Deuxièmement, il faut remarquer que, sur la plupart des sites concernés par une prolifération en 2005 et en 2006, les genres mis en

cause sont souvent les mêmes. D'autres voient le genre dominant évoluer d'une année à l'autre. C'est ainsi le cas des baignades d'Ambrugeat ou d'Auriac par exemple.

Grâce aux prélèvements et aux travaux réalisés par les services de la DDASS de la Corrèze, il est possible d'observer l'évolution du risque lié aux cyanobactéries dans les plans d'eau du département. Ainsi, la plupart des sites ont été concernés, une saison au moins, par un épisode de contamination en cyanobactéries.

4.3. L'information du public par les médias

Depuis quelques années, les médias locaux traitent régulièrement du risque lié aux cyanobactéries. En effet, la fermeture d'un plan d'eau pour cause de mauvaise qualité de l'eau aura forcément des conséquences sur l'activité touristique et économique du site. Les médias permettent alors de relayer ces informations et d'expliquer quelles sont les origines de la fermeture.

ETANGS ■ La DDASS n'a relevé quasiment aucun problème dans les plans d'eau de l'arrondissement

Tout baigne autour de Tulle

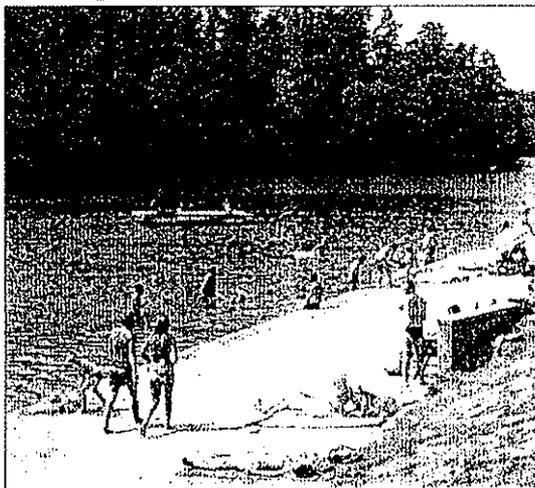
Les techniciens de la Direction départementale des affaires sanitaires et sociales jugent satisfaisante la qualité des eaux de baignades sur l'arrondissement de Tulle.

PASCAL GOURY

Il n'est pas forcément nécessaire de posséder une piscine pour s'adonner au plaisir de la baignade. Les plans d'eau de l'arrondissement de Tulle permettent en effet de faire trempette sans courir le moindre risque sanitaire. Depuis le début de l'été, les techniciens de la Direction départementale des affaires sanitaires et sociales (DDASS) n'ont relevé aucun problème majeur. Si ce n'est à Masseret où la détection, la semaine passée, de la présence d'une cyanobactérie, a nécessité la fermeture du plan d'eau pendant quelques jours et un « suivi renforcé » pendant quelques jours.

Les cyanobactéries principales responsables

Les cyanobactéries, ou algues bleues, sont la principale « pollution » conduisant à la



RUFFAUD. Soleil aidant, les plages des étangs des environs de Tulle ne désertent pas, comme ici, à Ruffaud. Photo: Yves Ruffaud

fermeture des étangs. Elles se forment dans des eaux peu profondes, tièdes et calmes. « Les facteurs favorisant l'apparition de ces cyanobactéries

sont très divers, voire opposés. Cela va des orages violents entraînant un afflux de matériaux organiques au faible renouvellement des eaux par

manque de pluie », explique Cyril Couraze, technicien à la DDASS. Hormis à Masseret donc, aucun dépassement du seuil de cyanobactérie n'a été

constaté sur les plans d'eau de l'arrondissement. Du lac des Barrousses à Treignac, à Ruffaud, en passant par Marcillac-la-Croisille, les estivants n'hésitent pas à se mouiller... sans pour autant risquer quoi que ce soit. Et ils ont raison de le faire, car la DDASS veille au grain en s'appuyant sur une échelle de pollution à deux niveaux. « Le niveau 1 est fixé à 20.000 cellules par millilitre. Lorsqu'il est dépassé, obligation est faite d'informer les baigneurs et de leur donner

quelques recommandations, comme de se doucher tout de suite après la baignade, poursuit Cyril Couraze.

Une échelle de pollution à deux niveaux

Le niveau 2 débute à 100.000 cellules par millilitre. Lorsqu'il est atteint, on procède à la fermeture. »

Bonne fréquentation dans les campings

Est-ce lié à la qualité des eaux de baignade ? Difficile à dire. Toujours est-il que les campings installés à proximité des plans d'eau connaissent une bonne affluence. Jean-Claude Hugonin, le directeur du camping du lac de Marcillac-la-Croisille, annonce ainsi un taux de remplissage « de 90 % pour les mini-châteaux et de 100 % pour les chalets tout confort ».

Les Hollandais en force

Son homologue du camping des Barrousses, à Treignac, Evelynne Coëtze, a enregistré pour sa part une hausse de la fréquentation de 10 % par rapport à l'année dernière. « En

terme de taux d'occupation, c'est à dire par rapport au nombre d'emplacements occupés sur un mois, nous étions à 51 % en juillet. Il convient tout de fois de relativiser ce chiffre car en juillet, nous avons bénéficié de l'organisation des championnats de France de kayak sur la Vézère ».

À Ruffaud, Didier Garande concède faire « un peu mieux tous les ans depuis quatre ans », soit depuis qu'il a repris la gestion du camping. « En ce début août, notre taux de remplissage est de 60 % grâce, notamment, aux touristes hollandais qui sont revenus en force cette année. »

Article 1 - Source : La Montagne – Tulle, 11 août 2005

Cet article publié dans La Montagne en 2005 permet d'informer sur la qualité des eaux des baignades situées autour de Tulle. Bien que n'ayant relevé « aucun problème majeur », l'article explique les raisons qui ont conduit à la fermeture de l'étang de Masseret « pendant quelques jours ». Le rôle joué par les cyanobactéries est alors évoqué et expliqué par Monsieur Couarraze, ingénieur sanitaire à la DDASS : « les facteurs favorisant l'apparition de ces cyanobactéries sont très divers, voire opposés. Cela va des orages violents entraînant un afflux de matériaux organiques au faible renouvellement des eaux par manque de pluie ». En plus d'informer sur l'origine de la contamination, l'article explique également comment s'articulent les niveaux de pollution : niveau 1 à 20 000 cellules par mL, avec obligation d'informer les baigneurs et de leur donner des recommandations (douches,...), et niveau 2 à 100 000 cellules par mL qui, lorsqu'il est atteint, entraîne la fermeture du site.

L'encart intitulé « Bonne fréquentation dans les campings » est intéressant également car il permet de prendre conscience de l'interconnexion forte qui existe entre le suivi de la qualité d'un plan d'eau et les activités touristiques et donc économiques qui vivent grâce à ce plan d'eau. En effet, même si un plan d'eau de bonne qualité n'est pas forcément gage d'activités touristiques élevées, l'inverse n'est pas si évident. Toutes ces activités dépendent presque entièrement de l'état du milieu naturel et si, pour une raison ou pour une autre, celui-ci vient à se dégrader, entraînant une possible fermeture du site, cela aura forcément un impact sur l'activité économique.

Il faut donc que les différents partis liés à l'utilisation d'un plan d'eau (les exploitants, les services de la DDASS, les acteurs économiques,...) se réunissent et discutent ensemble de la gestion du risque pouvant entraîner la fermeture d'un site. C'est en confrontant les avis de chacun qu'un processus de surveillance du site, accompagné éventuellement d'un traitement, pourra être mis en place et ainsi assurer la sécurité de tous.

Feu vert malgré les « algues bleues »

Pendant la saison estivale, la qualité des eaux des 36 baignades répertoriées en Corrèze fait l'objet de contrôles particulièrement sévères.

ALAIN BORDES

« Les programmes de surveillance comprennent au minimum un prélèvement une quinzaine de jours avant le début de la saison estivale, puis deux échantillons mensuels. Cependant, des contrôles peuvent être effectués en fonction de la fréquentation des sites et des précédents contrôles ».

Le propos est de Cyril Couaraze, ingénieur sanitaire responsable du service santé-environnement à la Direction départementale des affaires sanitaires et sociales.

La qualité s'affiche sur Internet

Les visites effectuées sur chacune des 36 baignades sont basées sur l'observation de l'eau (présence de substances indésirables, transparence), des abords (entretien du site) et des prélèvements de



PROPRE. Le lac de Bourmazel, à Sellhaç, fait partie des nombreux points d'eau corréziens où il fait bon faire trempette, surtout en cette période de canicule.

cette même eau pour des analyses microbiologiques.

Une surveillance particulière est exercée face à la prolifération des cyanobactéries (ou algues bleues). « En cas d'atteinte du niveau 1, un suivi hebdomadaire est assuré et un document d'information doit être affiché sur le site, avec la fiche sanitaire établie par la direction des affaires sanitaires et sociales après chaque

contrôle », indique pour sa part Jacqueline Fuguet. La technicienne sanitaire précise qu'un premier échantillonnage des cyanobactéries a été effectué en juin sur les baignades qui, au cours des saisons 2004 et 2005, avaient atteint au moins une fois le niveau d'alerte. Les résultats des contrôles ont été favorables à l'ouverture des 36 baignades. L'an dernier, 38 baignades

étaient recensées. Cette année, seules 36 sont autorisées, l'étang de la Besse à Meilhards ayant subi deux pollutions consécutives en 2004 et 2005 est interdit à la baignade. Cependant, il fait tout de même l'objet d'une surveillance sanitaire en vue d'une éventuelle réouverture en 2007. Quant à la baignade du Ris-Combet, à Chamberet, elle a été fermée suite à la réali-

sation d'une piscine. Les résultats des contrôles peuvent également être consultés sur le site Internet du ministère de la santé. www.baignades.sante.gouv.fr

Des toxines à l'origine de risques sanitaires

Le document d'information qui doit être affiché sur le site contaminé niveau 1 (20.000 cellules/ml), met en garde sur les risques potentiels et les mesures préventives face à ces algues bleues ou cyanobactéries. Ce sont des organismes microscopiques se développant en eau douce et dont certaines espèces peuvent produire et libérer des toxines pouvant être à l'origine de risques sanitaires pour les baigneurs ou les pratiquants d'activités nautiques. Les effets actuellement connus sont de deux ordres : lors de contacts avec l'eau, des irritations et rougeurs de la peau, du nez, de la gorge, des yeux, des muqueuses peuvent survenir. Lors de l'ingestion de l'eau, des maux de ventre, diarrhées, nausées, vomissements sont les symptômes les plus fréquents. Le document délivre

quelques conseils lors des baignades : éviter d'ingérer et de respirer des aérosols de l'eau, éviter tout contact prolongé avec l'eau, prendre une douche « soignée » après la baignade ou l'activité nautique, nettoyer le matériel de loisirs nautiques après l'utilisation. En cas d'apparition de troubles de santé, ne pas hésiter à consulter un médecin en lui précisant la pratique de la baignade sur un plan d'eau affecté par des proliférations d'algues bleues. Quant au site atteint au niveau 2, c'est-à-dire 100.000 cellules/ml, la baignade y est interdite et ce, jusqu'à nouvel ordre. « Ces mesures de prévention sanitaire liées aux situations de prolifération algales sont prises sur la base de recommandations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et du Conseil supérieur d'hygiène publique de France », précisent les responsables du service de santé, ajoutant que « les traitements résident en la conduite d'actions de fond. Il faut notamment identifier l'origine de la pollution et envisager les mesures spécifiques ». Le principal facteur de ces pollutions est le phosphore provenant de l'activité humaine et qui a la particularité de se stocker dans les sédiments. C'est dire si la lutte demande une constante vigilance ».

Article 2 - Source : La Montagne - Tulle, 12 juillet 2006

Dans cet article, l'auteur met l'accent sur le problème lié aux cyanobactéries, en construisant notamment le titre avec l'expression « algues bleues ». Plus détaillé que celui de 2005, cet article insiste particulièrement sur l'impact des cyanobactéries et indique de façon précise comment s'organisent les prélèvements au cours de la saison. Il reprend également l'articulation en deux niveaux de la pollution liée aux cyanobactéries et surtout il explique au lecteur que ce sont des « organismes microscopiques se développant en eau douce et dont certaines espèces peuvent produire et libérer des toxines » et qu'elles peuvent être responsables de risques sanitaires : « les effets actuellement connus sont de deux ordres : lors de contact avec l'eau, des irritations et des rougeurs de la peau, du nez, de la gorge, des yeux, des muqueuses peuvent survenir. Lors de l'ingestion de l'eau, des maux de ventre, diarrhées, nausées, vomissements sont les symptômes les plus fréquents ». Sans dire qu'il existe trois types de toxines, l'auteur informe toutefois les lecteurs sur les principaux risques et les principaux symptômes évocateurs.

DÉPÔTS D'ALGUES BLEUES

Baignade interdite depuis hier, à Ponty

Depuis hier, 16 heures, la ville d'Ussel a décidé d'interdire la baignade dans le lac de Ponty en raison de la présence de cyanobactéries. En raison d'un niveau élevé de ces algues bleues, environ 30.000 cellules par ml (*), relevé par la Direction départementale des affaires sanitaires et sociales, le niveau d'alerte 1 avait été déclenché ces derniers jours sur le site : la baignade restait possible mais les personnes devaient prendre des précautions (ne pas ingérer d'eau, se laver après un bain).

Hier, même si les analyses de la DDASS relevaient 18.000 cellules par ml, loin du niveau de fermeture fixé à 100.000 cellules par ml, des dépôts d'algues bleues ont inquiété les services de la ville. Ces fortes concentrations ne pouvant

être enlevées, la décision d'interdire la baignade a été prise par mesure de précaution.

Les cyanobactéries, organismes microscopiques se développant en eau douce, peuvent en effet produire et libérer des toxines pouvant être à l'origine de risques sanitaires pour les baigneurs ou les pratiquants d'activités nautiques, comme des irritations et rougeurs, des maux de ventre, diarrhées, nausées, vomissements.

Le drapeau rouge flotte donc sur Ponty, au moins jusqu'au début de la semaine : les prochaines analyses de la DDASS, lundi prochain, infirmeront ou confirmeront les inquiétudes des services de la ville. ■

(*) Le niveau d'alerte 1 est déclenché quand le taux de cyanobactéries est supérieur à 20.000 cellules par ml.

Article 3 - Source : La Montagne – Tulle, le 22 juillet 2006

Ce dernier article sur les baignades de la Corrèze relate la fermeture du lac de Ponty, aux environs d'Ussel, « en raison de la présence de cyanobactéries ». Alors qu'une alerte de niveau 1 avait été déclenchée quelques jours avant, la DDASS a décidé de fermer le site, non pas parce que le seuil de 100 000 cellules a été dépassé mais en raison de la présence de dépôts de cyanobactéries. Cet article met en relief le rôle des exploitants des sites, et des agents de la DDASS, qui grâce à leur connaissance précise du milieu naturel peuvent proposer une fermeture temporaire au titre du principe de précaution.

Cyanobactérie : la petite dernière

Tenant compte des récents déboires qu'a connus avec son eau potable La Coquille, petite commune du Périgord vert, Jean-François Causse, ingénieur à la DDASS, indique que ses services recherchent dans les lacs d'eau douce les cyanobactéries. Signalées dans l'eau du robinet, celles-ci ont contraint la préfecture à interdire son usage pour la boisson et à faire distribuer des bouteilles d'eau de source à la population.

Cette interdiction levée, il a fallu fournir des explications. « Longtemps classées dans les algues, ces cyanobactéries produisent des toxines qui peuvent engendrer, si on les absorbe, des démangeaisons et des troubles digestifs, commente l'ingénieur. Depuis 2003, nous tenons compte de cette bactérie, y compris dans les eaux de baignade. Si on dénombre plus de 100 000 cellules par millilitre, nous interdisons la baignade. En 2006, ce chiffre n'a pas été dépassé. »

Article 4 - Source : Sud Ouest – Gironde, le 23 août 2006

Enfin, cet article nous a semblé important car il illustre un cas de contamination par les cyanobactéries dans un réseau d'eau potable sur la commune de La Coquille en Dordogne, entre Périgueux et Limoges. En plus du suivi des eaux de baignades, les autorités doivent aussi assurer la surveillance des plans d'eaux utilisés pour l'alimentation en eau potable des communes. Cette activité revêt toute son importance d'une part parce qu'une contamination du réseau va toucher une population plus importante que dans le cas d'une baignade, et d'autre part en raison du danger que peuvent représenter les toxines par voie orale.

Conclusion

Le risque lié à la prolifération des cyanobactéries et à la libération des toxines dans le milieu aquatique est un problème d'actualité. Les récentes interdictions au cours de l'année 2006 de consommation de coquillages, liées à une contamination par des toxines marines chimiquement proches des toxines d'eau douce présentées dans cette thèse, sont là pour nous le rappeler.

Il revient alors aux scientifiques de poursuivre leurs efforts afin d'éclaircir certains points. En effet, si beaucoup d'éléments sont déjà connus notamment en terme de toxicité, de caractéristiques physico-chimiques ou encore nutritionnelles et écologiques, ils ne concernent cependant que certains genres de cyanobactéries, ou que certaines toxines. Le manque de moyens nécessaires pour mener des études scientifiques et épidémiologiques explique sans doute en partie cette carence de données.

Pourtant, depuis quelques années, les pouvoirs publics ont inscrit la surveillance des proliférations dans la réglementation. Cela constitue un signe fort de prise en compte réel du risque et des conséquences d'ordre sanitaire (intoxications...), environnemental (anoxie des plans d'eau,...) et économique (fermeture de sites, ...) qui en résultent.

Ainsi, en s'appuyant sur les actions menées dans le département de la Corrèze, nous pouvons nous rendre compte que, si de nombreux sites touristiques de baignades ont été concernés par un risque de prolifération de cyanobactéries, les services de la DDASS de la Corrèze et le Laboratoire Départemental d'Analyses, récemment accrédité pour le dosage des microcystines –LR –YR et –RR par chromatographie liquide haute performance et détection UV, sont fortement sensibilisés et disposent de moyens pour pouvoir assurer un suivi régulier et fiable de ces risques. Le dosage des microcystines reste toutefois une analyse coûteuse, surtout du fait des standards commerciaux. Il convient alors d'agir en amont, notamment sur les origines des eutrophisations.

Il est cependant nécessaire de poursuivre des investigations en continuant les études de toxicité et de déterminisme de libération des toxines dans le milieu, et en centralisant les données recueillies. Il serait ainsi possible de construire des études épidémiologiques reliant

les effets observés sur les baigneurs aux concentrations en cyanobactéries et en toxines dans le milieu aquatique. Un rapport publié conjointement par l'AFSSA et l'AFSSET en juillet 2006 propose trois principaux axes de recommandations :

- « permettre l'évaluation des risques liés aux cyanotoxines » : en développant les connaissances sur les toxines, les milieux et les méthodes analytiques et sur l'efficacité des traitements de l'eau destinée à la consommation humaine,
- « renforcer la prévention et la maîtrise des risques » : en améliorant les moyens mis en œuvre pour informer et prévenir les usagers et les gestionnaires de sites,
- « recommandations spécifiques à la problématique des baignades et autres activités aquatiques récréatives ».

Cependant, si ces recommandations qui ciblent des objectifs en terme d'évaluation, de recherche, de prévention et d'information s'adressent bien évidemment aux scientifiques et aux « décideurs », elles s'intéressent également aux usagers.

C'est en effet, de la concomitance des rôles et actions de chacun de ces acteurs que dépendra, au-delà de la prise de conscience collective, l'efficacité de la maîtrise du risque lié aux cyanobactéries et à leurs toxines.

Bibliographie

- [1] Agence de l'Eau Adour-Garonne. Colloque « Les cyanobactéries : états des lieux, évolution, dangers et solutions ». (2006, Florac). [en ligne]. Disponible sur : <http://www.eau-adour-garonne.fr/page.asp?page=1586> (page consultée le 23 août 2006)
- [2] Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Journée d'échange scientifique sur les biotoxines – Toxines de micro-algues et cyanobactéries- (2003).
- [3] Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments – Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail. Risques sanitaires liés à la présence de cyanobactéries dans l'eau. Évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.afsset.fr> ou sur <http://www.afssa.fr> (page consultée le 24 octobre 2006)
- [4] ARAOZ R., NGHIÊM H.O., RIPPKA R. et al. Neurotoxins in axenic oscillatorian cyanobacteria : coexistence of anatoxin-a and homoanatoxin-a determined by ligand-binding assay and GC/MS. *Microbiology*, 2005 ; **151** (4), 1263-1273.
- [5] BAGU J.R., SYKES B.D., CRAIG M.M. et al. A molecular basis for different interactions of marine toxins with protein phosphatase-1. Molecular models for bound motuporin, microcystins, okadaic acid, and calyculin A. *J. Biol. Chem.*, 1997 ; **272** (8), 5087-5097.
- [6] BERNARD C., HARVEY M., BRIAND J.F ET AL. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* toxic strains : Evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environ. Toxicol.*, 2003 ; **18**, 176-186.
- [7] BERTRAND F., DUNAND A., FOSSE J. et al. Les intoxications par les cyanobactéries. *Le Point Vétérinaire*, 2004 ; **250**, 46-50.
- [8] BOYEAU C. Fleur d'eau de cyanophycées et toxicité chez l'homme. Thèse de doctorat en pharmacie. Limoges : Université de Limoges, 1995, 82 p.
- [9] BRIAND J.F., JACQUET S., FLINOIS C. et al. Variations in the microcystine production of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria) assessed from a four-year survey of Lac du Bourget (France) and from laboratory experiments. *Microb. Ecol.*, 2005 ; **50** (3), 418-428.
- [10] BRIAND J.F., JACQUET S., BERNARD C. et al. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vet. Res.*, 2003 ; **34**, 361-377.
- [11] BRIENT L, VEZIE C, BERTRU G. Evaluation des efflorescences à cyanobactéries dans des eaux de cours d'eau et plans d'eau bretons. Rapport réalisé pour la DIREN Bretagne. 2001. Disponible sur le site <http://ecobio.univ-rennes1.fr> (page consultée le 10/08/2006).

- [12] CARMICHAEL W.W., EVANS W.R., YIN Q.Q et al. Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb.nov. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997 ; **63** (8), 3104-3110.)
- [13] CHEN W., LI L., GAN N., SONG L. Optimization of an effective extraction procedure for the analysis of microcystins in soils and lake sediments. *Environmental Pollution*, 2006 ; **143** : 241-246.
- [14] CHISWELL R.K., SHAW G.R., EAGLESHAM G et al. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: Effect of pH, temperature and sunlight on decomposition. *Environ. Toxicol.*, 1999 ; **14** (1), 155-161).
- [15] CHONG M.W.K., WONG B.S.F., LAM P.K.S et al. Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophytotoxin in primary rat hepatocytes. *Toxicon*, 2002 ; **40** (2), 205-211
- [16] Code de la Santé Publique. Décret n°2001-1220 relatif aux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles. [en ligne] Disponible sur : www.legifrance.gouv.fr/WAspd/Visu?cid=5632018&indice=1&table=JORF&ligneDeb=1 (page consultée le 6 septembre 2006).
- [17] DAWSON R.M. The toxicology of microcystins. *Toxicon*, 1998 ; **36** (7), 953-962.
- [18] EDWARDS C., BEATTIE K.A., SCRIMGEOUR C.M. et al. Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicon*, 1992 ; **30** (10), 1165-1175.
- [19] FASTNER J., CODD G., METCALF J. et al. An international intercomparison exercise for the determination of purified microcystin-LR and microcystins in cyanobacterial field material. *Anal Bioanal Chem*, 2002 ; **374** : 437-444
- [20] FASTNER J., NEUMANN U., WIRSING B. et al. Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German fresh water bodies. *Environ. Toxicol.*, 1999 ; **14** (1), 13-22.
- [21] FAWELL J.K., JAMES C.P., JAMES H.A., 1994. Toxins from blue-green algae : Toxicological assessment of Microcystin-LR and a method for its determination in water. Water Research Centre, Medmenham, UK. 1-46.
- [22] GUPTA N., PANT S.C., VIJAYARAGHAVAN R. et al. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology*, 2003 ; **188** (2-3), 285-296.
- [23] HERROU-TREGUIER V., OLLIVIER J.M., CUN C. Validation of analysis method of microcystins by SPE/HPLC/UV-DAD. *European J. water quality*, 2004 ; **35**(1)29-46.
- [24] HAWKINS P.R., RUNNEGAR M.T.C., JACKSON A.R.B. et al. Severe hepatotoxicity caused by tropical cyanobacterium (blue-green algae) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985 ; **50** (5), 1292-1295.

[25] HUMPAGE A.R., FALCONER I.R. Microcystin-LR and liver tumor promotion: Effects on cytokinesis, ploidy, and apoptosis in cultured hepatocytes. *Environ. Toxicol.*, 1999 ; **14**, 61-75.

[26] JOCHIMSEN E.M., CARMICHAEL W.W., AN J.S et al. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New Engl. J. Med.*, 1998 ; **338** (13), 873-878.

[27] LABERCHE J.C. Biologie Végétale. 2^{ème} éd. Paris : Dunod, 2004, 240p. (Collection Sciences sup.)

[28] LAWTON L.A., EDWARDS C., CODD G.A. Extraction and High Performance Liquid Chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst*, 1994; **119** :1525-1530.

[29] MEZ K., BEATTIE K.A., CODD G.A. et al. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *Eur. J. Phycol.*, 1997 ; **32**, 111-117.

[30] MILUTINOVIC A., ZIVIN M., ZORC-PLESKOVIC R. et al. Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins -LR and -YR. *Toxicon*, 2003 ; **42** (3), 281-288.

[31] Ministère de l'écologie et du développement durable. In : La loi n°2006-1772 du 30 décembre 2006 sur l'eau et les milieux aquatiques. [en ligne] Disponible sur le site : www.ecologie.gouv.fr/rubrique.php?id_rubrique=1072. (page visitée le 28 janvier 2007)

[32] Ministère de la santé et des solidarités. Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine. Journal Officiel du 6 février 2007.

[33] Ministère de la santé et des solidarités. Circulaire DGS/SD7 A n°2003-633 du 30 décembre 2003 relative à l'application des articles R. 1321-1 et suivants du code de la santé publique concernant les eaux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles. [en ligne]. Disponible sur : www.sante.gouv.fr/adm/dagpb/bo/2004/04-04/a0040280.htm (page consultée le 6 septembre 2006).

[34] Ministère de la santé et des solidarités. Circulaire DGS/SD7 A n°2003-270 du 4 juin 2003 relative aux modalités d'évaluation et de gestion des risques sanitaires face à des situations de prolifération de micro-algues (cyanobactéries) dans des eaux de zones de baignades et de loisirs nautiques. [en ligne] Disponible sur : www.sante.gouv.fr/adm/dagpb/bo/2003/03-26/a0261885.htm (page consultée le 6 septembre 2006).

[35] Ministère de la santé et des solidarités. Circulaire DGS/SD7 A n°2004-364 du 28 juillet 2004 relative aux modalités d'évaluation et de gestion des risques sanitaires face à des situations de prolifération de micro-algues (cyanobactéries) dans des eaux de zones de baignades et de loisirs nautiques. [en ligne] Disponible sur : www.sante.gouv.fr/adm/dagpb/bo/2004/04-36/a0362536.htm (page consultée le 6 septembre 2006).

- [36] Ministère de la santé et des solidarités. Circulaire DGS/SD7 A n°2005/304 du 5 juillet 2005 relative aux modalités d'évaluation et de gestion des risques sanitaires face à des situations de prolifération de micro-algues (cyanobactéries) dans des eaux de zones de baignades et de loisirs nautiques. [en ligne] Disponible sur : www.sante.gouv.fr/adm/dagpb/bo/2005/05-08/a0080029.htm (page consultée le 6 septembre 2006).
- [37] AFNOR, Agence Française de NORMALISATION. Norme XP T 90-210 1999. Qualité de l'eau – Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence. 57p.
- [38] ISO, International Organization for Standardization. Norme 20179. 2005. Water quality – Determination of microcystins – Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection. 17p.
- [39] PEREIRA P., ONODERA H., ANDRINOLO D. et al. Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon*, 2000 ; **38** (12), 1689-1702
- [40] PILOTTO L.S., DOUGLAS R.M., BURCH M.D. et al. Health effects of recreational exposure to cyanobacteria (blue-green) during recreational water related activities. *Aust. NZ J. Pub. Health*, 1997 ; **21** (6), 562-566.
- [41] POMATI F., SACCHI S., ROSSETI C. et al. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* SP. FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Phycol.*, 2000 ; **36** (3), 553-562.
- [42] POURIA S, DE ANDRADE A, BARBOSA J. et al. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet*, 1998 ; **352** : 21-26.
- [43] RAPALA J., ERKOMAA K., KUKKONEN J. et al. Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high performance liquid chromatography-UV-detection, and enzyme-linked immunosorbent assay. Comparison of methods. *Anal. Chim. Acta*, 2002 ; **466** : 213-231.
- [44] RIVASSEAU C., MARTINS S., HENNION M.C. Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1998 ; **799** :155-169.
- [45] RIVASSEAU C., RACAUD P., DEGUIN A. et al. Development of a bioanalytical phosphatase inhibition test for the monitoring of microcystins in environmental water samples. *Anal Chim Acta*, 1999 ; **394** : 243-257
- [46] ROBILLOT C. Etude de la complémentarité des méthodes analytiques et bioanalytiques pour la détermination des contaminants organiques environnementaux. Application aux toxines de cyanobactéries et aux xéno-estrogènes. Thèse de doctorat du muséum national d'histoire naturelle. 2001. 3948p.

- [47] ROBILLOT C., HENNION M.C. Les principales classes de cyanotoxines et leur détermination. In *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Ifremer (ed). Plouzané, Ifremer-Afssa. 2001 p. 39-85.
- [48] RUNNEGAR M., BERNDT N., KONG S.M. et al. In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995 ; **216** (1), 162-169.
- [49] RUNNEGAR M.T.C., KONG S.M., ZHONG Y.Z. et al. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 1995 ; **49** (2), 219-225.
- [50] SEAWRIGHT A.A., NOLAN C.C., SHAW G. et al. The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). *Environ. Toxicol.*, 1999 ; **14**, 135-142.
- [51] SHAW G.R., SEAWRIGHT A.A., MOORE M. et al. Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid : evaluation of its toxicologic activity. *Ther. Drug Monit*, 2000 ; **22** (1), 89-92.
- [52] TEIXEIRA M., COSTA M., DE CARVALHO V.L. et al. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bull. Pan Am. Health Organ.*, 1993 ; **27** (3), 244-253.
- [53] TOWNER R.A., STURGEON S.A., KHAN N. et al. In vivo assessment of nodularin-induced hepatotoxicity in the rat using magnetic resonance techniques (MRI, MRS and EPR oximetry). *Chem. Biol. Interact.*, 2002 ; **139** (3), 231-250.
- [54] TURNER P.C., GAMMIE A.J., HOLLINRAKE K et al. Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. *Brit. Med. J.*, 1990 ; **300**, 1440-1441.
- [55] WELTE B. Problématiques des cyanobactéries et des toxines algales dans les eaux de surface. *TSM*, 2005 ; **4**, 37-42.

Table des matières

Introduction	14
Les cyanobactéries et leurs toxines	16
1.1. Les cyanobactéries	17
1.1.1. Systématique	17
1.1.2. Morphologie	18
1.1.3. Biodiversité écologique et nutritionnelle	18
1.1.4. Multiplication	19
1.1.5. Les cyanobactéries toxiques.....	19
1.2. Les conditions de prolifération des cyanobactéries.....	20
1.3. Les toxines : structure et caractéristiques physico-chimiques	22
1.3.1 Les hépatotoxines	23
1.3.2. Les neurotoxines	26
1.3.3. Les dermatotoxines	27
1.3.4. Conditions de libération des toxines	28
1.3.5. Répartition géographique des toxines	28
Les dangers liés aux cyanobactéries.....	31
2.1. Aspects toxicologiques.....	32
2.1.1. Les hépatotoxines.....	32
2.1.2. Les neurotoxines	35
2.1.3. Les dermatotoxines	37
2.1.4. Conclusion.....	37
2.2. Aspects épidémiologiques.....	38
2.2.1. Impacts sanitaires	38
2.2.2. Impacts environnementaux	40
2.3. La réglementation sur les cyanobactéries et leurs toxines	43
2.3.1. Eaux de baignades.....	43
2.3.2. Eaux destinées à la consommation.....	46
Les méthodes d'identification et de quantification des cyanobactéries et des toxines	48
3.1. Prélèvement.....	49
3.2. Détection et dénombrement des cyanobactéries	52
3.2.1. Les méthodes de détection	52
3.2.2. Les méthodes d'identification et de quantification	54
3.3. Détection et quantification des cyanotoxines.....	56
3.3.1. Les méthodes immunoenzymatiques	56
3.3.2. Les méthodes chromatographiques	62
3.4. Applications au dosage des microcystines au Laboratoire Départemental d'Analyses de la Corrèze	64
3.4.1. Présentation de la norme ISO 20179.....	64
3.4.2. Validation de la méthode.....	67
3.4.3. Bilan	78
Situation sur le département de la Corrèze.....	80
4.1. Les analyses de toxines au laboratoire	81
4.1.1. Généralités.....	81
4.1.2. Exemples	82
4.2. Le rôle de la Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales.....	87
4.3. L'information du public par les médias	95

Conclusion.....	100
Bibliographie.....	102
Table des matières.....	107
Table des figures.....	109
Table des tableaux.....	110
Revue de presse.....	111
Annexes.....	112
Annexe n°1 : Structure des microcystines –LR, –YR et –RR.....	113
Annexe n°2 : Résultats pour la microcystine-YR.....	114
Annexe n°3 : Résultats pour la microcystine-RR.....	116
Annexe n°4 : Validation de méthode (1).....	118
Annexe n°5 : Validation de méthode (2).....	120
Annexe n°6 : Exemples de cartes de contrôle pour la microcystine-LR.....	121
Annexe n°7 : Baignades surveillées en Corrèze en 2006.....	122

Table des figures

Figure 1 : Structure générale des microcystines.....	24
Figure 2 : Structure de la cylindrospermopsine.	25
Figure 3 : Structure des anatoxines.	26
Figure 4 : Structure de l'anatoxine-a(S).....	26
Figure 5 : Structure générale des saxitoxines.....	27
Figure 6 : Test ELISA en absence de microcystine.	57
Figure 7 : Test ELISA en présence de microcystine.....	57
Figure 8 : Schéma d'une plaque 96 puits pour la recherche de microcystine.....	60
Figure 9 : Principe général du test PP2A en absence puis en présence de microcystine.	61
Figure 10 : Schéma d'extraction de la microcystine extra et intracellulaire selon la norme ISO 20179.....	66
Figure 11 : Représentation graphique de la fonction d'étalonnage.....	71
Figure 12 : Représentation graphique de la droite de recouvrement.....	76
Figure 13 : Chromatogramme du point de gamme à 2 ppm.....	83
Figure 14 : Chromatogramme d'un échantillon positif et d'un point de gamme.	84
Figure 15 : Spectre UV des microcystines-LR, -YR et -RR.	85
Figure 16 : Contamination des baignades par les cyanobactéries en 2006.	90
Figure 17 : Contamination des baignades par les cyanobactéries en 2005.	91
Figure 18 : Contamination des baignades par les cyanobactéries sur la période 2005-2006...	92

Table des tableaux

Tableau 1 : Toxicité comparée des cyanotoxines.....	37
Tableau 2 : Recommandations pour la gestion des situations de contamination d'eaux de baignades et de zones de loisirs nautiques par prolifération de cyanobactéries.....	44
Tableau 3 : Gradient de phase mobile selon la norme ISO 20179.....	67
Tableau 4 : Valeurs d'informations obtenues pour l'étude de linéarité de la microcystine-LR.....	70
Tableau 5 : Valeur des caractéristiques de la droite de régression.....	71
Tableau 6 : Test d'adéquation du modèle linéaire.....	72
Tableau 7 : Test de Cochran - Homogénéité des variances.....	73
Tableau 8 : Vérification de la limite de quantification.....	74
Tableau 9 : Récapitulatif des résultats.....	75
Tableau 10 : Résultats statistiques de l'étude de la spécificité.....	76
Tableau 11 : Normes bactériologiques des baignades aménagées.....	87
Tableau 12 : dénombrements cellulaires pour la gestion du risque lié aux cyanobactéries.....	89
Tableau 13 : Genres dominants en cas de dépassement du niveau 1 (année 2006).....	93
Tableau 14 : Genres dominants en cas de dépassement du niveau 1 (2005 et 2006).....	94

Revue de presse

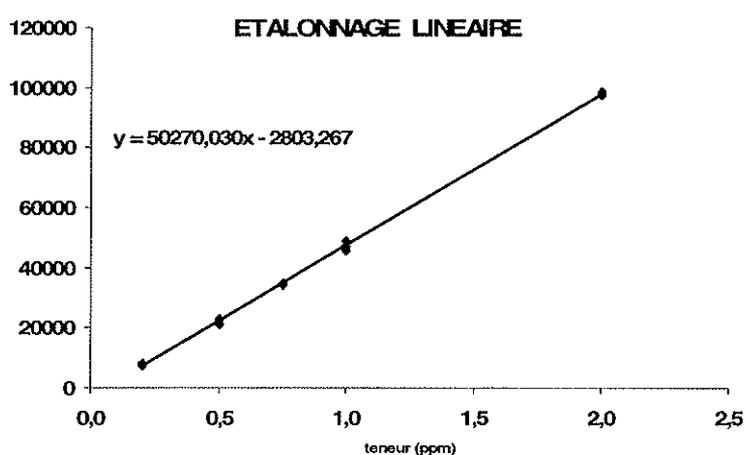
<i>Article 1 - Source : La Montagne – Tulle, 11 août 2005</i>	95
<i>Article 2 - Source : La Montagne – Tulle, 12 juillet 2006</i>	97
<i>Article 3 - Source : La Montagne – Tulle, le 22 juillet 2006</i>	98
<i>Article 4 - Source : Sud Ouest – Gironde, le 23 août 2006.....</i>	99

Annexes

Annexe n°2 : Résultats pour la microcystine-YR

1^{ère} étape : linéarité

	niv1	niv2	niv3	niv4	niv5	coefficient de corrélacion	CV résiduel
répétitions	0,2	0,5	0,75	1	2		
J1		22443	34204	48767	97308	0,99965	23,14%
J2	8405	22772	34586	45642	98117	0,99943	3,03%
J3	7294	21043	34246	48827	97507	0,99941	2,68%
J4	7546	21505	34431	48902	98464	0,99960	2,21%
J5		22902	34888	46676	97450	0,99988	23,09%
CV	7,52%	3,70%	0,81%	3,16%	0,51%		
Ecart-type	582,5	818,3	278,7	1509,8	496,8		



droite : $y = b_0 + b_1 u$	ordonnée à l'origine (b0)	penne (b1)
coefficients de la droite	-2497,1046	50057,1810
écart-type sur les coefs	369,9232	328,4084
limite inf à : 99%	-3544,4902	49127,3387
limite sup à : 99%	-1449,7189	50987,0233

Test d'adéquation	avec CVe=		avec $\sigma_e =$			
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Variance estimée	F	Valeur critique à	5%
Régression	2,11E+10	1	2,11E+10	24125	4,54	(VC1)
Erreur de modèle	5,96E+06	6	9,93E+05	1,13	2,79	(VC2)
Erreur aléatoire	1,31E+07	15	8,75E+05			
Totale	2,11E+10	22				

2^{ème} étape : vérification de la limite de quantification

	Valeur obtenue		Valeur critique	Conclusion
Critère de justesse	$\left \frac{LQ - \bar{u}_{LQ}}{\frac{s_{LQ}}{\sqrt{n}}} \right $	0,357	10	<i>LQ juste</i>
Critère de fidélité	$CV = s_{LQ} / LQ$	18,9%	20%	<i>LQ > 0</i>
Limite de quantification choisie	LQ	0,2 µg/L		<i>LQ acceptable</i>
Moyenne des grandeurs	\bar{u}_{LQ}	0,1956		

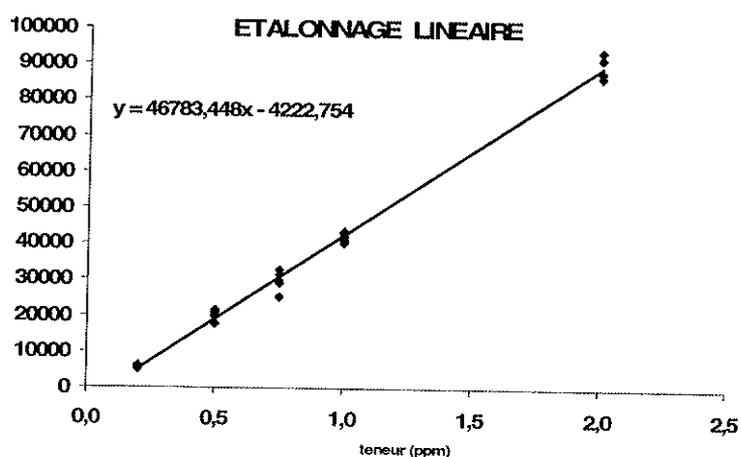
3^{ème} étape : étude de la spécificité

$r = c_0 + c_1v$	Valeur		Valeur critique pour $\alpha = 1\%$	Conclusion
Pente de la droite de régression	c_1	1,057	1,000	
Ecart-type de la pente	$s(c_1)$	0,085		
Limite inférieure de la pente à 1%		0,772		
Limite supérieure de la pente à 1%		1,341		
Ordonnée à l'origine de la droite	c_0	-0,113	0,000	
Ecart-type de l'ordonnée à l'origine	$s(c_0)$	0,089		
Limite inférieure de l'ordonnée à l'origine à 1%		-0,412		
Limite supérieure de l'ordonnée à l'origine à 1%		0,185		
Nombre de mesures	p	10		
Test de signification de la pente	t_{obs}	0,667	$t(p-2, 1-\alpha/2) = 3,355$	$t_{obs} < t$ donc pente acceptable
Test de signification de l'ordonnée à l'origine	t'_{obs}	1,274		$T_{obs} < t'$ donc ordonnée à l'origine acceptable
Spécificité de la méthode				Spécificité acceptable

Annexe n°3 : Résultats pour la microcystine-RR

1^{ère} étape : étude de la linéarité

	niv1	niv2	niv3	niv4	niv5	coefficient de corrélation	CV résiduel
répétitions	0,2	0,5	0,75	1	2		
J1		20842	33038	43547	93982	0,99966	23,92%
J2	5513	21593	29033	41207	88171	0,99822	4,68%
J3	6172	20146	29915	40348	91708	0,99739	5,32%
J4	5184	19904	31602	43113	88171	0,99973	1,64%
J5		17811	25336	42021	86738	0,99749	26,20%
CV	8,95%	7,07%	9,82%	3,14%	3,33%		
Ecart-type	503,1	1418,7	2926,6	1320,9	2991,7		



droite : $y = b_0 + b_1 u$		ordonnée à l'origine (b_0)	penne (b_1)
coefficients de la droite		-3100,1572	46003,0030
écart-type sur les coefs		941,1674	835,5444
limite inf à :	99%	-5764,9404	43637,2763
limite sup à :	99%	-435,3739	48368,7296

Test d'adéquation	avec $CV_e =$		avec $\sigma_e =$		Valeur critique à 5%
	Somme des carrés	Degré de liberté	Variance estimée	F	
Source des variations					
Régression	1,78E+10	1	1,78E+10	3142	4,54 (VC1)
Erreur de modèle	3,84E+07	6	6,40E+06	1,13	2,79 (VC2)
Erreur aléatoire	8,51E+07	15	5,67E+06		
Totale	1,80E+10	22			

2^{ème} étape : vérification de la limite de quantification

	Valeur obtenue		Valeur critique	Conclusion
Critère de justesse	$\left \frac{LQ - \bar{u}_{LQ}}{\frac{s_{LQ}}{\sqrt{n}}} \right $	2.1	10	<i>LQ juste</i>
Critère de fidélité	CV = s_{LQ} / LQ	9,2%	20%	<i>LQ > 0</i>
Limite de quantification choisie	LQ	0,2 µg/L		<i>LQ acceptable</i>
Moyenne des grandeurs	\bar{u}_{LQ}	0,1885		

3^{ème} étape : étude de la spécificité

$r = c_0 + c_1v$	Valeur		Valeur critique pour $\alpha = 1\%$	Conclusion
Pente de la droite de régression	c_1	1.108	1,000	
Ecart-type de la pente	$s(c_1)$	0,064		
Limite inférieure de la pente à 1%		0,895		
Limite supérieure de la pente à 1%		1,322		
Ordonnée à l'origine de la droite	c_0	-0,080	0,000	
Ecart-type de l'ordonnée à l'origine	$s(c_0)$	0,067		
Limite inférieure de l'ordonnée à l'origine à 1%		-0,304		
Limite supérieure de l'ordonnée à l'origine à 1%		0,143		
Nombre de mesures	p	10		
Test de signification de la pente	t_{obs}	1.702	$t(p-2, 1-\alpha/2) = 3,355$	$t_{obs} < t$ donc pente acceptable
Test de signification de l'ordonnée à l'origine	t'_{obs}	1.206		$T_{obs} < t'$ donc ordonnée à l'origine acceptable
Spécificité de la méthode				Spécificité acceptable

Annexe n°4 : Validation de méthode (1)

Formules utilisées dans l'étude de la linéarité des molécules
selon la norme AFNOR XP T 90-210

Equation de la droite de régression linéaire :

$$y = b_0 + b_1 u$$

avec b_0 : ordonnée à l'origine de la droite de régression
et b_1 : pente de la droite de régression

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{u}$$

$$b_1 = \frac{SPE(u, y)}{SCE(u)}$$

$$\bar{u} = \frac{\sum_i \sum_j u_{ij}}{np} \quad \bar{y} = \frac{\sum_i \sum_j y_{ij}}{np} \quad \text{moyennes générales}$$

$$SCE(u) = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (u_{ij} - \bar{u})^2 \quad \text{somme totale des carrés des étalons}$$

$$SPE(u, y) = \sum_i \sum_j (u_i - \bar{u})(y_{ij} - \bar{y}) \quad \text{somme des produits des écarts}$$

$$s^2(res) = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y(u_i))^2}{np - 2} \quad \text{variance résiduelle}$$

$$s(b_1) = \sqrt{\frac{s^2(res)}{SCE(u)}} \quad \text{écart-type de la pente}$$

$$s(b_0) = \sqrt{s^2(res) \left(\frac{1}{np} + \frac{\bar{u}^2}{SCE(u)} \right)} \quad \text{écart-type de l'ordonnée à l'origine}$$

$b_0 - t(v, 1-\alpha/2) \times s(b_0)$; $b_0 + t(v, 1-\alpha/2) \times s(b_0)$ intervalle de confiance pour l'ordonnée à l'origine

$b_1 - t(v, 1-\alpha/2) \times s(b_1)$; $b_1 + t(v, 1-\alpha/2) \times s(b_1)$ intervalle de confiance pour la pente

$t(v, 1-\alpha/2)$ est la valeur bilatérale de la variable de Student au risque α à $v = np - 2$ degrés de liberté

Test d'adéquation au modèle linéaire :

$$SCE(y) = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y})^2$$
 somme totale des carrés des réponses

$$SCE_l(y) = \frac{(SPE(u, y))^2}{SCE(u)}$$
 somme des écarts due à la régression

$$SCE_e(y) = \sum_{i=1}^p SCE_i(y)$$
 somme des carrés des écarts due à une erreur expérimentale

$$SCE(u) = \sum_i \sum_j (u_{ij} - u)^2$$
 somme totale des carrés des étalons

$$SCE_i(y) = \sum_j (y_{ij} - \bar{y})^2$$
 somme des carrés pour un niveau

$$SPE(u, y) = \sum_i \sum_j (u_i - u)(y_{ij} - \bar{y})$$
 somme des produits des écarts

Annexe n°5 : Validation de méthode (2)

Formules utilisées pour l'étude de la spécificité des molécules
selon la norme XP T 90-210

Equation de la droite de recouvrement :

$$r = c_0 + c_1 v$$

Avec c_0 : ordonnée à l'origine de la droite de recouvrement

Et c_1 : pente de la droite de recouvrement

$$c_0 = \bar{r} - c_1 \bar{v}$$

$$c_1 = \frac{SPE(v, r)}{SCE(v)}$$

Le calcul de la variance résiduelle permet ensuite le calcul des variances des deux coefficients.

$$s^2(res) = \frac{SCE_r(r) - c_1 SPE(v, r)}{p - 2} \quad \text{variance résiduelle}$$

$$s^2(c_1) = \frac{s^2(res)}{SCE(v)} \quad \text{variance de la pente}$$

$$s^2(c_0) = \left(\frac{1}{p} + \frac{\bar{v}^2}{SCE(v)} \right) \times s^2(res) \quad \text{variance de l'ordonnée à l'origine}$$

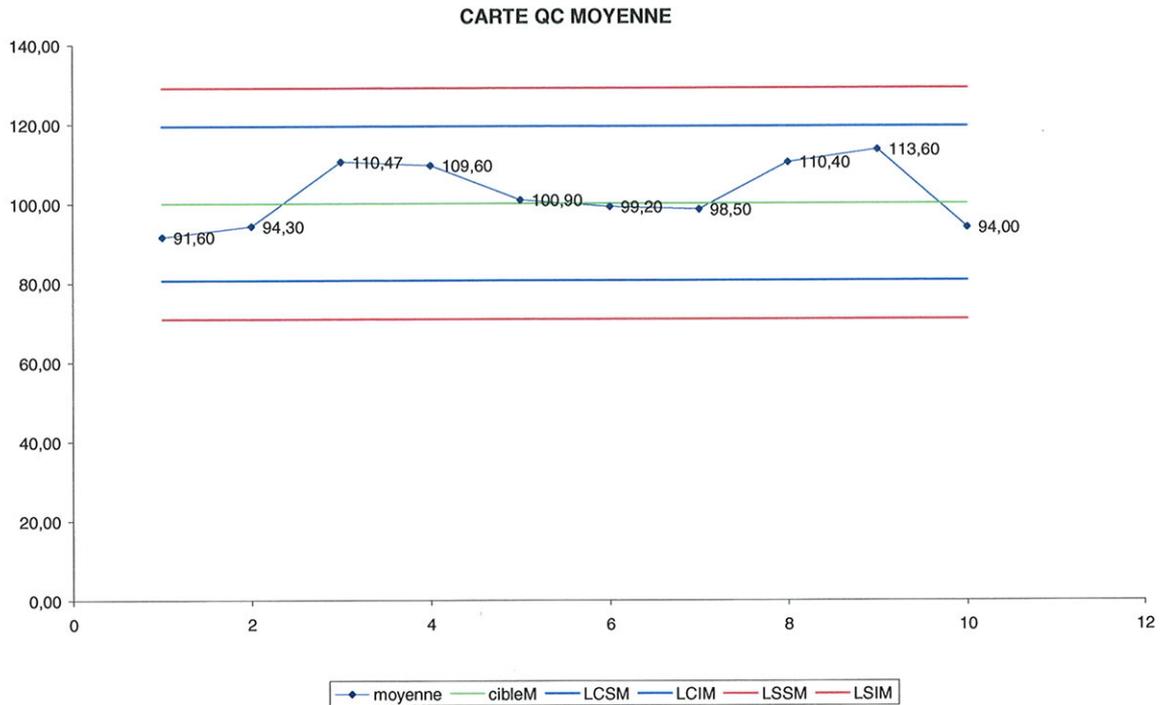
$c_0 - t(p-2, 1-\alpha/2) \times s(c_0)$; $c_0 + t(p-2, 1-\alpha/2) \times s(c_0)$ intervalle de confiance pour l'ordonnée à l'origine

$c_1 - t(p-2, 1-\alpha/2) \times s(c_1)$; $c_1 + t(p-2, 1-\alpha/2) \times s(c_1)$ intervalle de confiance pour la pente

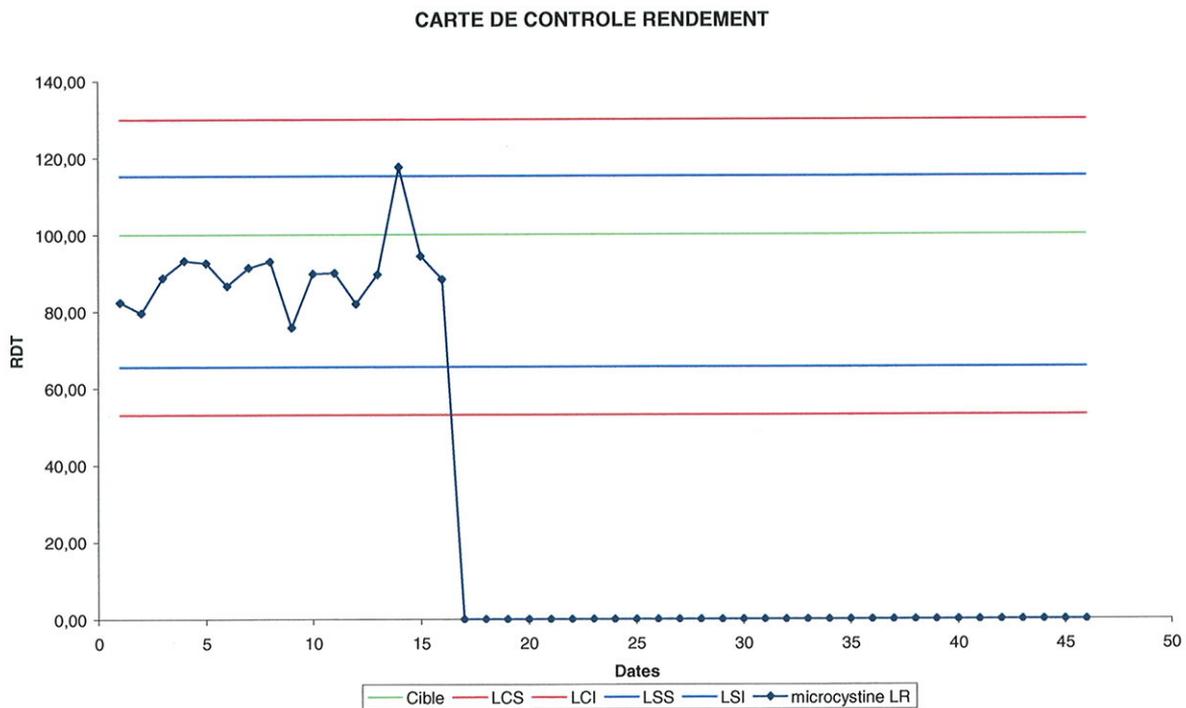
$t(p-2, 1-\alpha/2)$ est la valeur bilatérale de la variable de Student au risque α à $p-2$ degrés de liberté

Annexe n°6 : Exemples de cartes de contrôle pour la microcystine-LR

1^{er} exemple : carte sur le contrôle qualité de microcystine-LR ; valeurs exprimées en pourcentage.



2^{ème} exemple : carte de contrôle sur le rendement de la méthode d'analyse



Annexe n°7 : Baignades surveillées en Corrèze en 2006

COMMUNES	BAIGNADES
AMBRUGEAT	Séchenailles
AUBAZINE	Plan d'eau du Coiroux
AURIAC	Plan d'eau communal
BEYNAT	Etang de Miel
CAMPS	Etang du Moulin
CHAMBOULIVE	Chanteloiseau
CHAUMEIL	Maurianges
CLERGOUX	Etang Prévot
EGLETONS	Le Lac
ESPAGNAC	Etang de Taysse
EYGURANDE	L'Abeille
LAPLEAU	Etang de Vendahaut
LA ROCHE CANILLAC	Etang de Laborde
LIGINIAC	Chabrat
LIGINIAC	Le Maury
LISSAC/COUZE	Plan d'eau Intercommunal
MARCILLAC LA CROISILLE	Meyrignac
MARCILLAC LA CROISILLE	Puy Nchet
MASSERET	Plan d'eau Masseret Lamongerie
MEILHARDS	Etang de la Besse
MEYRIGNAC L'EGLISE	Etang
NEUVIC	La Plage
ST MARTIAL ENTRAYGUES	Le Gibanel
ST PRIEST DE GIMEL	Etang de Ruffaud
ST PRIVAT	Les Chanaux
ST SALVADOUR	Pré Chaton
SARROUX	Les Aubazines Hautes
SEILHAC	Bournazel
SERVIERES LE CHATEAU	Lac de Feyt
SORNAC	Les Chaux
SOURSAC	Pont Aubert
TARNAC	L'Encluse
TREIGNAC	Les Bariousses
USSEL	Ponty
VIAM	Lac de Viam
VIGEOIS	Pontcharal

BON A IMPRIMER N° 356

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

Titre de la thèse

Les cyanobactéries et leurs toxines.

Risques pour la santé et l'environnement.

Aspects analytiques.

Résumé de la thèse

Les cyanobactéries, ou « algues bleues », sont des organismes capables de se développer dans les milieux aquatiques. Elles peuvent, sous certaines conditions, produire des toxines potentiellement dangereuses pour l'homme ou l'environnement. Une réglementation existe : le Code de la Santé Publique introduit la recherche de microcystines dans les eaux de consommation et des textes encadrent la surveillance des baignades.

Cette thèse présente l'état actuel des connaissances (classification, biologie, toxicologie) sur les cyanobactéries et leurs toxines. Elle rapporte des cas de contamination répertoriés en France ou dans le monde. Sur le plan analytique, les principales méthodes de recherche, dont le dosage des microcystines par chromatographie liquide haute performance et détection ultraviolette, sont décrites. Cette méthode sert également de support à la présentation des étapes permettant aux laboratoires d'analyses d'être accrédités. Enfin, en s'appuyant sur les données recueillies en Corrèze, la dernière partie expose la situation du risque lié aux cyanobactéries dans les plans d'eaux destinés à la baignade du département.

Discipline

Pharmacie

Mots clés

Cyanobactérie – Algues bleues – Toxicité – Microcystine – CLHP – Dosages

Intitulé et adresse de l'UFR

Université de Limoges
Faculté de Pharmacie
2, rue du Docteur Marcland
87 025 LIMOGES Cedex