

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار- عنابة-
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR –ANNABA-

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT

OPTION : TOXICOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

THEME :

**Impacts écologiques et sanitaires de la
prolifération massive des cyanobactéries toxiques
sur la faune piscicole et la production
aquacole dans le lac Oubeïra : Bioaccumulation
des cyanotoxines dans les poissons et risques
sanitaires associés**

Présentée par : *Mme Amina Amrani*

Membres de Jury :

Pr Djamai Rachid	Président	Université Badji Mokhtar Annaba
Pr Mahanaoui Ismail	Examineur	Université Batna
Dr Frihi Hocine	Examineur	Université Badji Mokhtar Annaba
Dr Bensouileh mourad	Examineur	Université Badji Mokhtar Annaba
Pr Nasri Hichem	Directeur	Université Chadeli Benjedid El Tarf
Dr Bouaïcha Noureddine	Co-Directeur	Université Paris-Sud 11

Année universitaire : 2015-2016

LISTE DES FIGURES

FIGURE	TITRE	PAGE
01	Diversité morphologique des cyanobactéries	06
02	Structure d'une cyanobactérie	07
03	Aspect du bloom à cyanobactéries	11
04	Structure chimique générale des microcystines	21
05	Cluster des gènes de synthèse de la microcystine d' <i>Anabaena</i> , de <i>Microcystis</i> , de <i>Planktothrix</i> et de la Nodularine de <i>Nodularia</i>	25
06	Structure chimique de la nodularine	27
07	Structure chimiques des neurotoxines	28
08	Structure chimique de la cylindrospermopsine	29
09	Structures chimiques des dermatotoxines: (A) lyngbyatoxine A, (B) debromoaplysiatoxine et (C) aplysiatoxine	30
10	Mortalité des tortues dans le lac Oubeïra en Algérie suite à une efflorescence de <i>Microcystis spp.</i>	36
11	Schéma simplifié des biocénoses dulcicoles et voies de contamination par les microcystines.	47
12	Carte de zonage du Parc National d'El Kala	63
13	La carpe commune <i>Cyprinus carpio</i>	68
14	carte de distribution de la carpe commune en Europe et l'Afrique du nord	70
15	Représentation d'une anguille Européenne, <i>Anguilla anguilla</i>	71
16	Représentation schématique du cycle biologique de l'anguille européenne, <i>Anguilla anguilla</i>	72
17	Carte localisant la mer des Sargasses	74
18	photographie d'un filet à plancton	76
19	Photographie représentant la mise à nus des organes de la cavité abdominale de la Carpe commune « <i>Cyprinus carpio</i> »	82
20	Photographie représentant la mise à nus des organes de la cavité abdominale de l'Anguille « <i>Anguilla anguilla</i> »	83
21	Le microtome à rotation RM 2135	86
22	procédure de l'étude anatomo-pathologique	89

23	Photographie du genre <i>Oscillatoria</i>	92
24	Photographie du genre <i>Lyngbya</i>	92
25	Photographie du genre <i>Phormidium</i>	93
26	Photographie du genre <i>Spirulina</i>	93
27	Photographie de genre <i>Microcystis</i>	94
28	Photographie du genre <i>Anabaena</i>	94
29	Photographie du genre <i>Aphanizomenon</i>	95
30	Photographie du genre <i>Pseudanabaena</i>	95
31	Photographie du genre <i>Synéochocystis</i>	96
32	Photographie de genre <i>Merismopedia</i>	96
33	Distribution de la prédominance des différents genres de cyanobactéries identifiées au niveau lac Oubeira.	97
34	Distribution temporelle de l'ensemble des Cyanobactéries récoltées dans le lac Oubeira	98
35	Les concentrations de toxine dans l'eau en ng/l eq MC-LR	99
36	Distributions et variations de la MCs extracellulaire (ligne brisé) et intracellulaire (ligne non brisé) dans l'eau de surface collectée mensuellement	99
37	Résultats d'identification des microcystines par CL/MS/MS.	100
38	La dose des Microcystines dans le foie de l'anguille européenne	101
39	La dose de Microcystines dans les viscères de l'anguille européenne	102
40	La dose de Microcystines dans la chaire de l'anguille européenne	103
41	La dose de Microcystines dans le foie de la carpe commune	104
42	La dose de Microcystine dans les viscères de la carpe commune.	104
43	La dose de Microcystine dans la chaire de la carpe commune.	105
44	Photographie d'un foie sain	106
45	Les coupes histologiques de foie	107
46	Les coupes histologiques des viscères	108

LISTE DES TABLEAUX

N°	TITRE	PAGE
01	Correspondance des deux systèmes de classification des cyanobactéries, I.C.B.N. et I.C.N.B	18
02	Liste non exhaustive des genres ou espèces producteurs de cyanotoxines	19
03	Quelques congénères de la Microcystine	21
04	Valeurs toxicologiques pour les microcystines pour différentes voies d'administration (orale, IP : intrapéritonéale, IN : intranasale, IT : intratrachéale). MC: Microcystine.	23
05	Quelques cas d'intoxication animale par les cyanobactéries	36
06	Effets phytotoxiques des cyanotoxines sur la physiologie et la biologie des plantes aquatiques	44
07	Effets phytotoxiques des cyanotoxines sur le comportement physiologique de quelques plantes terrestres	46
08	Présence de MCs dans la faune aquatique consommée par l'homme	53
09	Recommandations de l'OMS pour la surveillance des eaux brutes	56
10	Diversités des proies vivantes pour alevins de carpe commune	69
11	Etapas de la coloration selon la méthode à l'hématéine - éosine (H et E).	88
12	Diversité générique mensuelle des cyanobactéries répertoriées dans le lac Oubeira. (avril-mars 2011)	91

Liste des abréviations

µg : micro-gramme

ng : nano-gramme

G: gramme

L: litre

MC: microcystine

MC-LR: microcystine – Leucine/Argénine

Ind. : indévidus

Adda: l'acide 3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényl-4,6-diénoïque

Ahp: l'acide 3-amino-6-hydroxy-2-piperidone.

Ala: l'alanine

ATP: Adénosine triphosphate

Da: Dalton

DL₅₀: La dose létale induisant la mortalité de 50% de la population

D-MAsp: l'acide D-érythro-b-méthyl aspartique

EC₅₀: Concentration de la microcystine- LR inhibant 50% de la l'émission lumineuse

ELISA: Enzymes Linked Immuno Sorbent Assay

G: Guanine

Mdha: N- méthyl-déshydroalanine

nm: nanomètre

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

Rubisco: Ribulose- biphosphate carboxylase

UV: Ultra Violet

W H O: World Health Organization

Résumé

Depuis quelques années, l'eutrophisation croissante des rivières et des retenues se traduit par des phénomènes de proliférations d'algues de plus en plus préoccupantes du fait de multiples problèmes liés à la toxicité potentielle de certaines espèces phytoplanctoniques. C'est le cas de certaines espèces de cyanobactéries responsables de la production de diverses toxines (hépatotoxines et neurotoxines). Des études menées sur des barrages et des lacs naturels, notamment le lac Oubeïra et le barrage Cheffia (Est-Algérien), ont montré que ces milieux évoluent rapidement vers l'eutrophisation.

Une étude a été réalisée au niveau du lac Oubeïra dans la Willaya d'El Tarf (Algérie) entre Avril 2010 à Mars 2011, avait pour objectif d'évaluer l'impact toxicologique et histologique des hépatotoxines de type microcystine présentes dans l'eau du lac sur deux espèces de poissons *Cyprinus carpio* et *Anguilla anguilla*. Le dosage de ces toxines a été effectué par le test PP2A et l'identification des variantes de microcystines a été réalisée par CL/SM/SM. Pendant la période d'étude les résultats obtenus ont montré que le genre *Microcystis* est le plus dominant et les concentrations en microcystines varient entre 0.028 à 13.4 µg. La MC-LR est le variant dominant (90% du total) dans les échantillons d'eau, suit par MC-YR et MC-(H₄) YR. La détection de microcystines dans les différents organes des deux poissons, par le test PP2A, montre que la carpe commune a une forte accumulation des toxines au niveau des intestins tandis que l'Anguille européenne au niveau du foie, ce qui a été confirmé par l'étude histologique.

Mots clés : Cyanobactéries, microcystines, *Anguilla anguilla*, *Cyprinus carpio*, bioaccumulation, Etude histopathologie.

Abstract

In recent years, the increasing eutrophication of rivers and reservoirs results in algal blooms phenomena of increasing concern because of multiple problems related to the potential toxicity of certain phytoplankton species. This is the case of certain species of cyanobacteria responsible of producing various toxins (hepatotoxins and neurotoxins). Studies of dams and natural lakes, including Lake Oubeira and Cheffia dam (East-Algerian), have shown that these environments are changing rapidly to eutrophication.

A study was conducted at the lake Oubeira in Wilaya of El Tarf (Algeria) between April 2010 to March 2011, was to evaluate the histological and toxicological impact of type hepatotoxins microcystin present in water lake on two fish species *Cyprinus carpio* and *Anguilla anguilla*. The dosage of these toxins was performed by the PP2A test and identification of microcystins variants was performed by LC / MS / MS. During the study period the results showed that the kind *Microcystis* is the most dominant and microcystin concentrations ranged from 0.028 to 13.4 µg. The MC-LR is the dominant range (90% of total) in water samples, following by MC-YR and MC-(H4)-YR. The detection of microcystins in different organs of the two fish, by the PP2A test, shows that common carp accumulates toxins in the intestines while the European eel in the liver, which was confirmed by histological study .

Keywords: cyanobacteria, microcystins, *Anguilla anguilla*, *Cyprinus carpio*, bioaccumulation, histological study.

ملخص

في السنوات الأخيرة، بسبب التثبع الغذائي المتزايد للأنهار والخزانات ظهر ما يعرف بالتكاثر السريع للطحالب، وتعتبر هذه الظاهرة مثيرة للقلق بسبب المشاكل المتعددة و المتعلقة بالسمية المحتملة لبعض أنواع العوالق النباتية. هذا هو الحال بالنسبة لأنواع معينة من الطحالب الخضراء المزرققة المسؤولة عن إنتاج مجموعة متنوعة من السموم، وقد أظهرت الدراسات الجارية بأن السموم والبحيرات الطبيعية، بما في ذلك بحيرة أوبيرة و سد الشافية الشرق الجزائري)، تتطور بشكل سريع نحو هذا الوضع.

وقد أجريت دراسة في بحيرة أوبيرة في ولاية الطارف (الجزائر) بين أبريل 2010 إلى مارس 2011، من أجل تقييم تأثير بعض هذه السموم الموجودة في ماء بحيرة على اثنين من الأنواع السمكية سمكة الشبوط و سمكة الحنكليس. و قد تم التأكد من جرعة هذه السموم عن طريق اختبار PP2A و LC / MS / MS. خلال فترة الدراسة أظهرت النتائج أن النوع *Microcystis* هو السائد، و أن تركيز سمه قدر بين 0.028 و 13.4 ميكروغرام. كم تم إثبات أن نوع السم الغالب في ماء العينات هو ما يعرف ب MC-LR. أما الكشف المجرى على الأسماك فقد كشفت أن سمكة الشبوط تخزن السموم بنسبة أعلى في أمعائها بينما سمكة الحنكليس فتخزنه أكثر على مستوى كبدها، وهو ما أكدته الدراسة النسيجية.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا الزرقاء، microcystins، *Anguilla anguilla*, *Cyprinus carpio* التراكم الأحيائي، دراسة نسيجية.

Sommaire

Liste des Figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumés

1- Français

2- Anglais

3- Arabe

Introduction Générale **01**

II.Synthèse Bibliographique **05**

II.1. Généralité sur les Cyanobactéries **05**

II.1.1. Description, organisation cellulaire et reproduction **05**

II.1.2. Habitat et Ecologie **10**

II.1.3. Paramètres de croissance **11**

II.1.4. Classification **17**

II.2. Les Cyanotoxines **19**

II.2.1. Classe des cyanotoxines **20**

II.2.1.1. Les hépatotoxines **20**

II.2.1.2. Les neurotoxines **27**

II.2.1.3. Les cytotoxines **28**

II.2.1.4. Les dermatotoxines et les toxines irritantes **29**

II.2.1.5. Autres métabolites secondaires **30**

II.2.2. Impact des Cyanotoxines **31**

II.2.2.1. Impact sur la santé humaine **31**

II.2.2.2. Impact sur la faune **35**

II.2.2.3. Impact sur la flore **41**

II.2.3. Contamination des réseaux trophiques par les microcystines. **47**

II.2.3.1. Contamination directes par les microcystines présentes dans le milieu **47**

II.2.3.2. Contamination directe par ingestion des cyanobactéries toxiques **48**

II.2.3.3. Accumulation de MCs et impact dans le réseau trophique aquatique **50**

II.2.3.4. Contamination indirecte par ingestion de proies contaminées **51**

II.3. Les cyanobactéries et les cyanotoxines : contrôle et moyens de lutte.	54
II.3.1. Tests et techniques d'analyse	56
II.3.1.1. Tests biologiques	57
II.3.1.2. Tests biochimique et immunologique (PP, ELISA)	58
II.3.1.3. Techniques Physico-chimiques	59
II.3.1.4. Techniques Moléculaires	60
II.3.2. Contrôle et moyens de lutte	61
III. Matériels et Méthodes	63
III.1. Présentation du site d'étude : Lac Oubeira	63
III.2. Les modèles biologiques	68
III.2.1. La Carpe Commune <i>Cyprinus carpio</i>	68
III.2.2. L'Anguille européenne <i>Anguilla anguilla</i>	71
III.3. Méthodes d'étude	76
III.3.1. Etude qualitative et quantitative des cyanobactéries récoltées au niveau du lac Oubeira	76
III.3.2. Etude de l'impact des cyanotoxines sur les poissons	81
III.3.2.1. Variation de MC contenant dans les divers organes de poissons	81
III.3.2.2. Etude histologiques des prélèvements (Hould, 1984)	84
IV. Résultats et Interprétation	90
IV.1. Etude qualitative et quantitative des cyanobactéries récoltées au niveau du lac Oubeira	90
IV.1.1. Identification générique des cyanobactéries potentiellement toxiques au niveau du lac Oubeira	90
IV.1.2. Etude quantitative des cyanobactéries identifiées au niveau du lac Oubeira durant la période d'étude	97
IV.1.3. Etude de la dynamique temporelle des Cyanobactéries potentiellement toxique au niveau du lac Oubeira	97
IV.2. Variation des concentrations en microcystines dans l'eau	98
IV.3. L'identification des congénères des Microcystines par LC-MS/MS	99
IV.4. Etude de l'impact des cyanotoxines sur les poissons	101
IV.4.1. Variation de MC contenant dans les divers organes de poissons	101
IV.4.1.1. Chez l'anguille européenne <i>Anguilla anguilla</i>	101
IV.4.1.2. Chez l'anguille européenne <i>Cyprinus carpio</i>	103

IV.5. Interprétation des coupes histologique	105
V.Discussion	109
VI.Conclusion	121
II. Références Bibliographiques	124
VIII.Annexes	

Introduction

Ces dernières années, la communauté scientifique internationale, notamment celle des écotoxicologues, s'est rendue compte de l'appauvrissement et de la dégradation croissante des ressources naturelles sur la Terre (**Maillard & Gonzalez, 2006**). Ces constats sont à l'origine de l'introduction, dans les débats scientifique, économique et politique, d'un nouveau concept celui de la biodiversité (**Harper & Hawksworth, 1994**). Ce nouveau terme a rapidement émergé pour être officialisé lors du sommet de la Terre qui s'est tenu à Rio de Janeiro en 1992 (**Marques, 2001**).

A nos jours, de nombreux pays ont dressé l'état du potentiel en biodiversité des zones humides et de son degré de dégradation. D'importantes bases de données sur la "diversité macroscopique" telles celles des oiseaux, des mammifères ou des végétaux supérieurs ont été réalisées, alors que les données sur la "diversité microscopique" notamment celles de la microflore algale et de la microfaune restent encore fragmentaires (**Revenga et al., 2000 ; Curtis & Sloan, 2004 ; Gessner et al., 2004**).

Cependant, des inquiétudes sérieuses en rapport avec la détérioration de la qualité de l'eau sont principalement des problèmes liés à l'envasement, à la salinisation des retenues. Ces phénomènes représentent une contrainte sérieuse pour une utilisation durable et multiple des ressources en eau stockées dans ces ouvrages. À côté de ces problèmes, viennent s'ajouter l'eutrophisation croissante des milieux aquatiques qui s'accompagne le plus souvent de l'apparition de proliférations phytoplanctoniques causant de nombreuses nuisances pour l'écosystème (**Sivonen & Jones 1999 ; Smith, 2003**).

En effet, les problèmes liés aux efflorescences algales sont variés, depuis l'asphyxie du milieu à cause de la consommation excessive d'oxygène en passant par les problèmes purement esthétiques par la formation d'écumes colorées et malodorantes, aux problèmes techniques liés au colmatage des filtres dans les filières des stations de traitement pour la production d'eau potable jusqu'aux problèmes les plus redoutables de santé publique causés par la production éventuelle de toxines par certaines espèces de cyanobactéries.

Les cyanobactéries, aussi appelées algues bleu-vert, sont des bactéries Gram négatif qui se répartissent en 150 genres regroupant quelque 2000 espèces (**AFSSA-AFSSET, 2006 ;**

Duy et al., 2000). Longtemps considérées comme des algues en raison de leur capacité à réaliser la photosynthèse, des analyses plus approfondies de leur ultrastructure à partir de la microscopie électronique ont permis de démontrer qu'il s'agissait de bactéries photosynthétiques appartenant aux organismes procaryotes (**Carmichael, 1994 ; Chorus & Bartram, 1999 ; Pitois et al., 2000**). D'un diamètre compris entre 3 et 10 μm (**Duy et al., 2000**), les cyanobactéries peuvent se retrouver sous forme unicellulaire, filamenteuse ou en colonies (**AFSSA-AFSSET, 2006; Chorus & Bartram, 1999**).

La prolifération de cyanobactéries dans nos milieux d'eau douce, favorisée par certaines conditions environnementales particulières, expose la population à des doses croissantes de toxines, et constitue un risque potentiel de santé publique, car elles peuvent produire une grande variété de métabolites secondaires, dont des toxines (cyanotoxines) (**Funari & Testai, 2008**). Ces cyanotoxines sont des métabolites ubiquitaires, généralement liées à la présence de fleurs d'eau cyanobactériennes (**Edwards & Lawton, 2009**). Bien que d'importance moindre, la production de cyanotoxines peut cependant avoir lieu en dehors des épisodes d'efflorescence (**Van Apeldoorn et al., 2007**). Toutefois, c'est pendant les efflorescences cyanobactériennes que les concentrations de cyanotoxines sont les plus fortes (**Sigee, 2005**).

On évalue à 40 le nombre espèces productrices des cyanotoxines répartis en 22 genres potentiellement toxiques (**Chorus & Bartram, 1999 ; Van Apeldoorn et al., 2007 ; Khilil, 2011 ; USEPA, 2012**). On distingue deux grands groupes de cyanotoxines : les biotoxines, des molécules dont la toxicité envers les vertébrés est forte, et les cytotoxines, un ensemble de molécules ayant un intérêt plutôt pharmacologique de par leurs propriétés spécifiques (**Jaiswal et al., 2008**).

Parmi les toxines les plus répandues dans le monde entier, les microcystines hépatotoxiques (**Funari & Testai, 2008**), ayant une structure hépta-peptide cyclique, avec plus de 200 congénères (**Dietrich & Hoeger, 2005 ; Hotto et al., 2007; Chen et al., 2009 ; Puddick et al., 2015 ; Svircev et al., 2015**), sont majoritairement produits par *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Microcystis* et *Planktothrix* (**Duy et al., 2000 ; Codd et al., 2005 ; Stewart et al., 2006a ; Carey et al., 2012**). L'activité toxique des microcystines résulte d'un pouvoir inhibiteur puissant sur certains enzymes, de sérines-thréonine phosphatase essentielles pour le métabolisme cellulaire (**Eriksson et al., 1990 ; Falconer et Yeung, 1992; Runnegar et al., 1993 ; Craig et al., 1996**).

Ces hépatotoxines peuvent être accumulées dans les différents organismes aquatiques incluant les zooplanctons, les décapodes, mollusques, poissons, les reptiles et les oiseaux (**Kozlowsky Suzuki et al., 2012**) en causant des graves effets, tel que les mortalités, les malformations morphologiques, physiologiques, et comportementales, etc. (**Firkens, 1953 ; Smitt, 1976 ; Pybus & Hobson 1986 ; Eriksson et al., 1989 ; Kotak et al., 1996 ; Prepas et al., 1997 ; Watanabe et al., 1997 ; Williams et al., 1997a ; Thostrup & Christoffersen, 1999 ; Magalhães et al., 2001 ; Sipiä et al., 2001 ; Mohamed et al., 2003 ; Chen et Xie, 2005 ; Chen et al., 2005 ; 2007 ; Nasri et al., 2008 ; Ferrao-Filho et al., 2014**).

Dans les systèmes aquatiques, les poissons sont le plus haut maillon de la pyramide trophique, dont leur contamination peut être en multiples manières en raison de leur régime alimentaire. Pour cela une diversité d'études ont été mises en points, en classant les poissons dans quatre groupes différents en basant sur ce critère, premièrement, les omnivores qui se nourrissent des animaux, végétaux et détritiques aquatiques, c'est le cas de la carpe commune (**Rabergh et al., 1991 ; Fischer & Dietrich, 2000 ; Li et al., 2001 ; Wu et al., 2002 ; El Ghazali et al., 2010 ; Jiang et al., 2011b ; 2013 ; 2014 ; Shi et al., 2015**) et le carassin doré (**Xu et al., 1998 ; Malbrouck et al., 2003 ; 2004**), suite par celle des carnivores qui s'alimentent sur les invertébrés aquatiques tel que Saumon Atlantique (**Williams et al., 1995 ; 1997**), la truite arc-en-ciel (**Sahin et al., 1996 ; Bury et al., 1996 ; 1997 ; Tencalla & Dietrich, 1997 ; Fischer et al., 2000**) et le poisson chat (**Zimba et al., 2001**), ensuite les piscivores comme la truite marron (**Bury et al., 1997**) et enfin les poissons herbivores c'est le cas des cyprinidés ; la carpe herbivores (**Chen et al., 1995 ; Zhang et al., 1996**), la carpe à grande bouche (**Li et al., 2005**) et la carpe argenté (**Xie et al., 2004 ; Li et al., 2007**).

La carpe commune (*Cyprinus carpio*) et l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) sont parmi les poissons les plus consommés. La Carpe commune est omnivore (**Ranson, 2003**) dont les cyanobactéries représentent des portions importantes dans son régime alimentaire, ce qui conduit à une forte accumulation de leurs toxines dans ses différents tissus. Tandis que l'Anguille européenne est un poisson carnivore (**El Hellali, 2007**) qui se nourrit des invertébrés benthiques (insectes, crustacés, mollusques), de poissons et de batraciens, qui peuvent être exposés aux cyanotoxines dans leur niche écologique.

Ces deux espèces sont les espèces dominantes au niveau du lac Oubeïra un site Ramsar 1982 d'importance internationale qui a reconnu une prolifération massive des cyanobactéries toxiques lors de l'année 2005 dont la concentration en microcystine était équivalente à 1,12 mg/l. Cet incident était accompagné avec la mort de 12 individus de tortues

appartenant à deux espèces, *Mauremys leprosa*, (espèce omnivore) et *Emys orbicularis* (espèce carnivore), qui ont accumulé respectivement 87 % ; 97,7% de la microcystine au niveau du foie, 1,95% ; 6,77% dans les viscères et 0,35% ; 6,23% dans la chair (Nasri et al., 2008).

Le présent travail qui s'inscrit dans le cadre de fructueuses collaborations : d'un projet méditerranéen de recherche scientifique interuniversitaire (MeRSI 6313PS002-815RAIO) financé par l'Agence Universitaire Francophonie (AUF) pour la période 2010-2012 : qui avait comme thématique « l'impact écologique et sanitaire de la prolifération massive des Cyanobactéries toxiques sur la faune piscicole et la production aquacole : bioaccumulation des cyanotoxines dans les poissons et risques sanitaires associés ». Le travail a été lancé à l'université Chadli Bendjedid-El Tarif en étroite collaboration avec le laboratoire Ecologie Système et Evolution à l'université de Paris-Sud, France. Il a pour objectif majeur l'évaluation de l'accumulation des cyanotoxines de type microcystine dans la chaîne trophique.

Pour atteindre ces objectifs, le manuscrit est structuré en quatre chapitres après une introduction générale.

Chapitre I : une « *Synthèse bibliographique sur les cyanobactéries et leur toxines* »

Chapitre II : « *Matériels et Méthodes* » expose les différentes méthodologies de suivi toxicologique et toxinologique (suivi de toxicité et nature de toxines produites).

Chapitre III : « *Résultats et Interprétation* » présente les résultats d'identification, du dosage et l'interprétation des coupes histologiques.

La thèse se poursuit par une discussion et une conclusion générale récapitulant les résultats les plus importants.

Synthèse Bibliographique

II.1. Généralité sur les Cyanobactéries

II.1.1. Description, organisation cellulaire et reproduction

Au début du printemps, les eaux de surface des pays du bassin méditerranéen, enrichies en sels nutritifs durant l'hiver, voient leurs phytoplanctons se multiplier en progression géométrique profitant de l'énergie solaire renaissante et de la température hausse (Guy, 2006). Toutefois les pressions anthropiques conduisent à l'enrichissement excessif des eaux en sels nutritifs (essentiellement le phosphore et l'azote) (Barnabé & Barnabé-Guet, 1997), et par conséquent l'eutrophisation rapides des eaux stagnantes. Ce phénomène est devenu un problème planétaire croissant. La disponibilité des nutriments inorganiques est l'un des principaux facteurs qui contrôle la croissance (Gobler & Sanudo-Wilhelmy, 2001), la biomasse (Caron *et al.*, 2000) et la composition taxinomique (Duarte *et al.*, 2000) du phytoplancton.

Ces derniers regroupent deux types d'organismes qui se diffèrent au niveau cytologique essentiellement par la présence (eucaryotes) ou l'absence (procaryotes) d'un noyau cellulaire (Prescott *et al.*, 2003), à ce jour, huit classes différenciés selon des critères morphologiques, cytologiques, biochimiques et reproductifs sont recensées dans les milieux aquatiques (Rolland, 2009), entre autres les cyanobactéries.

Les cyanobactéries vivent à l'état séparé (unicellulaires), en colonies ou en filaments. Les formes unicellulaires peuvent être sphériques, ovoïdes, coccoïdes, en bâtonnets, ou irrégulières (Komarek & Anagnostides, 1999). Les cyanobactéries pluricellulaires se présentent soit sous forme d'agrégats ou de colonies plus ou moins réguliers, soit sous forme de filaments (Chorus & Bartram, 1999). Les filaments peuvent être unisériés ou plurisériés, non ramifiés ou à vraies ou fausses ramifications, sans gaine ou avec gaine mucilagineuse homogène ou stratifiée (Couté & Bernard, 2001). Les cellules organisées dans les filaments sont de formes sphériques, cylindrique isodiamétrique, plus courte ou plus longue que large (Figure 1) (Komarek & Anagnostidis, 2005).

myxoxanthophylle). Les cyanobactéries possèdent aussi un photosystème complexe (photosystèmes I et II), caractéristique qui permet de les distinguer des autres procaryotes phototrophes tels que les bactéries pourpres ou vertes. Les structures protéiques chargées de capter la lumière incidente sont appelées les phycobilisomes et sont constituées de pigments accessoires particuliers, les phycobiliprotéines (phycocyanine, allophycocyanine, phycoérythrine, phycoérythrocyanine) et sont localisées à l'extérieur de la membrane des thylakoïdes. Ces pigments accessoires constituent le premier complexe collecteur d'énergie lumineuse du photosystème II et ils sont responsables de la couleur bleue ou rouge de certaines cyanobactéries. Grâce à ces structures et pigments, les cyanobactéries réalisent la photosynthèse oxygénique (**Prescott et al., 2003**).

Certaines cyanobactéries sont dotées de caractéristiques morphologiques, physiologiques et métaboliques leur permettant d'optimiser leur croissance et leur reproduction dans certaines conditions environnementales (**Figure 2**).

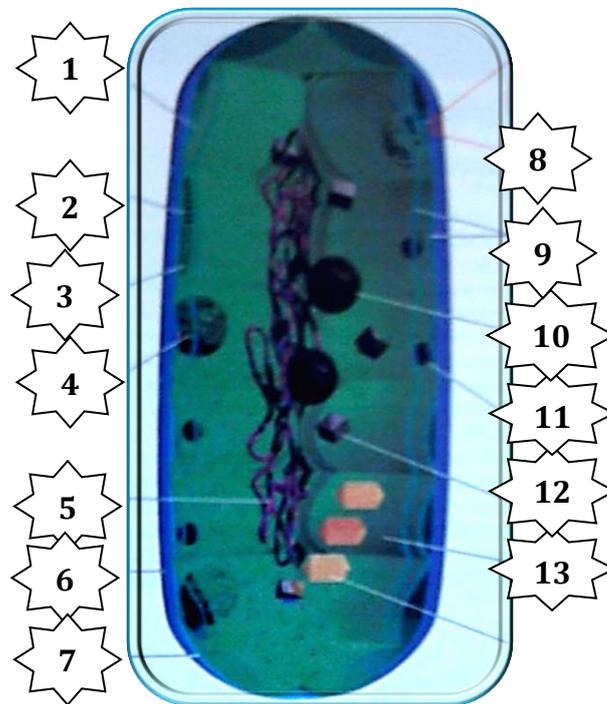


Figure 2: Structure d'une cyanobactérie (**Prescott et al., 2003**)

1 : Granules de glycogène - 2 : Rang du phycobilisomes (vue latérale) – 3 : Rang du phycobilisomes (vue de face) – 4 : granule de cyanophycine- 5 : Nucleoïde ou Nucléoplasme -6 : Paroi Cellulaire–7 : Membrane Plasmique 8 : Thylacoïde –9 : granule de polyphosphate – 10 : granule lipidique - 11 : carboxysome
12 : Ribosome – 13 : Vésicule gazeux.

Fixation de l'azote atmosphérique : de nombreux genres filamenteux (*Anabaena*, *Nostoc*, *Aphanizomenon*,...) possèdent la faculté de différencier des hétérocystes, cellules spécialisées dans la fixation aérobie du diazote N₂ et sa transformation en azote assimilable grâce à la nitrogénase. La fixation de N₂ par des cyanobactéries unicellulaires dépourvues d'hétérocystes est cependant possible (*Synechococcus*, *Gloethece*, *Plectonema*, *Microcoleus*) (Fay, 1992 ; Bergman et al., 1997). La capacité à fixer l'azote atmosphérique confère aux cyanobactéries un avantage sur les autres espèces phytoplanctoniques dès que les ressources en azote minéral deviennent limitantes dans le milieu.

Forme coloniale ou filamenteuse : de nombreux genres de cyanobactéries sont organisés sous forme de filaments ou de trichomes (e.g. *Anabaena*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*...) qui peuvent être assemblés en faisceaux (e.g. *Aphanizomenon*), ou sous forme de colonies (e.g. *Microcystis*, *Aphanothece*...). Cette organisation les rend plus difficiles à consommer par la plupart des organismes brouteurs du zooplancton.

Différentiation de cellules de résistance : certains genres cyanobactériens (*Anabaena*, *Nostoc*,...) sont capables de différencier des cellules spécialisées appelées akinètes qui leur permettent de résister dans des conditions environnementales défavorables.

Protection contre les UV : les cyanobactéries sont munies de dispositifs de protection contre les UV (Ehling-Schulz & Scherer, 1999 ; Sinha & Hader 2008 ; Sommaruga et al., 2009). Elles utilisent des mécanismes actifs de réparation de l'ADN, des acides aminés proches de lamycosporine, des gaines polysaccharidiques absorbantes et des photoantioxydants comme les caroténoïdes.

Adaptation chromatique : en fonction de la nature de la lumière disponible pour réaliser la photosynthèse, les cyanobactéries sont capables de modifier, au niveau transcriptionnel, l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des phycobilisomes et définissant la composition qualitative de ces derniers (Kehoe & Gutu, 2006). Ce mécanisme, qualifié de mécanisme d'adaptation chromatique complémentaire (ACC), correspond à une évolution du ratio cellulaire entre la phycocyanine et la phycoérythrine. Ce type d'adaptation a été mis en évidence chez de nombreuses cyanobactéries possédant la phycoérythrine (Tandeau de Marsac et al., 1977).

Mobilité verticale et horizontale : certaines cyanobactéries sont capables de se déplacer dans la colonne d'eau par glissement (**Hoiczky, 2000**) et par rotation hélicoïdale des filaments tournant sur eux-mêmes. Certains genres (*Microcystis*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon*, ...) possèdent des vésicules à gaz qui sont des structures cylindriques creuses remplies de gaz et dont la paroi est constituée d'un seul type de protéine appelée gas vesicle protein (GVP) (**Walsby, 1994**). Ces vésicules à gaz ont une densité huit fois inférieure à celle de l'eau. Elles confèrent ainsi aux cyanobactéries qui en possèdent une flottabilité qu'elles régulent en fonction des conditions de leur environnement afin d'optimiser leur position verticale dans la colonne d'eau, et ce grâce à l'utilisation d'un ballast d'hydrates de carbone résultant de l'activité photosynthétique des cellules (**Rabouille et al., 2003**). Cela leur permet de réaliser des migrations verticales journalières. Les vésicules à gaz jouent également un rôle important dans le cycle annuel de développement (e.g. *Microcystis*) en permettant notamment le passage de la phase benthique à la phase planctonique. Elles permettent également à *Planktothrix rubescens* de se positionner à une profondeur précise de la colonne d'eau (dans le métalimnion) (**Bright & Walsby, 2000 ; Walsby, 2005 ; Jacquet et al., 2005**).

Production de métabolites secondaires : de nombreux genres cyanobactériens synthétisent des métabolites secondaires (**Welker & vonDöhren, 2006**) dont certains sont toxiques pour les autres organismes, et permettent ainsi aux cyanobactéries toxiques de limiter leur consommation par les organismes phytoplanctonophages (zooplancton, poisson).

La multiplication des cyanobactéries est végétative, ou asexuée, et elle s'effectue par division binaire d'une cellule mère en deux cellules filles, par bourgeonnement ou par divisions multiples. Selon les espèces et les conditions environnementales, les temps de doublement des populations varient de quelques heures à plusieurs jours. Chez les formes unicellulaires la division successive de la cellule mère libère des nanocytes ou baeocytes. Ainsi, les formes filamenteuses se dispersent par fragmentation au niveau des nécridies (cellules dégénérantes) libérant de courts trichomes ou filaments (les hormogonies) (**Bourrelly, 1985 ; Castenholz & Waterbury, 1989 ; Chorus & Bartram, 1999**)

II.1.2. Habitat et Ecologie

On retrouve les cyanobactéries dans la plupart des environnements communs : en eau douce (principalement dans les lacs), sur les littoraux, dans les mers, dans l'air, sur les sols humides et même dans les roches (p. ex. les récifs coralliens) (**Reviers, 2003**). Les cyanobactéries sont également capables de s'imposer au sein de milieux aux conditions plus extrêmes (**Castenholz, 2001**). Des espèces comme *Mastocladus laminosus* ou *Phormidium laminosum* tolèrent des températures de 70°C (**Reviers, 2003**), d'autres espèces ont été retrouvées sur des surfaces rocheuses de régions désertiques (**Yeager et al., 2007**), ou encore dans des lacs à salinité élevée ou même hypersalins (**Dillon, 2009 ; Ken Black et al., 2011**). C'est leur capacité à résister à la dessiccation qui leur permet de croître dans ces milieux (**Castenholz, 2001**). Des cyanobactéries sont également présentes dans certains lacs des régions polaires, notamment en Antarctique, où les températures sont très basses (**Taton, 2003 ; Jungblut, 2005**). Leur développement s'y explique tout d'abord par une très faible présence d'autres organismes autotrophes (donc peu de compétition). De plus, les cyanobactéries peuvent supporter les alternances congélations/décongélations (**Castenholz, 2001**).

Certaines cyanobactéries, du genre *Nostoc* en général, sont impliquées dans des symbioses avec une large variété d'organismes : des champignons (formation des lichens), des plantes (p. ex. avec famille des bryophytes), des éponges, ou encore des protistes (**Adams & Duggan, 2008**). Les cyanobactéries fournissent à ces hôtes de l'azote et des carbones fixés (provenant réciproquement du N₂ et du CO₂) (**Adams & Duggan, 2008 ; Lee, 2008**)

Selon **Chorus & Bartram (1999)**, les cyanobactéries sont des organismes «écostratégiques» pouvant adopter plusieurs comportements qui les conduisent à dominer les peuplements algaux :

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

- « écostratégiques dispersés ou stratifiants » c'est le cas de *Planktothrix* et *Limnothrix*. Ce sont des espèces filamenteuses sensibles aux fortes intensités lumineuses. La régulation de la flottabilité est moins efficace chez ces espèces qui se retrouvent alors dispersées dans l'épilimnion, arrivant parfois à éliminer les autres organismes phytoplanctoniques par simple ombrage. Cependant, ces espèces peuvent aussi adopter une stratégie différente en se développant au niveau de la thermocline où leur richesse en phycoérythrine leur permet d'absorber efficacement la lumière dans les longueurs d'ondes 490 à 570 nm (bleu et vert).

- « écostratégiques fixateurs d'azote » certaines espèces de cyanobactéries appartenant aux genres *Aphanizomenon*, *Nodularia*, et *Nostoc* peuvent profiter d'une limitation de la disponibilité en azote sous forme directement assimilable (NO_3^- ou NH_4^+) pour dominer les autres espèces grâce à leur fixation d'azote.

Dans les milieux aquatiques, la biomasse de cyanobactéries atteint parfois de telles proportions que l'eau se colore et il se forme une efflorescence ou « bloom » selon les Anglo-Saxons. Des couches parfois très épaisses et éventuellement des écumes apparaissent à la surface de l'eau avec une durée assez variable, de quelques heures à plusieurs mois (**Figure3**). Ces efflorescences sont le plus souvent dominées par une ou un petit nombre d'espèces, présentant pour la plupart d'entre elles des vésicules à gaz (**Reynolds, 1987**).



Figure 3 : Aspect du bloom à cyanobactéries

II.1.3. Paramètres de croissance

Les cyanoprocaryotes ont des propriétés spéciales qui déterminent leur importance dans la communauté phytoplanctonique (**Chorus & Bartram, 1999**), ainsi, la composition des phytoplanctons varie au cours de l'année, chaque groupe étant constamment présents dans le milieu à des proportions différentes. En effet le brassage printanier fournit aux

cyanobactéries l'alimentation nécessaire en remettant en suspension les particules ce qui favorise leur croissance.

Les cyanobactéries ont la capacité de se proliférer lorsque les conditions favorables sont réunies typiquement dans les eaux de 20-30°C, du pH basique entre 6 et 9, à faible turbulence et à forte intensité lumineuse et à teneur moyenne à élevée en phosphore et/ou azote (milieu eutrophe ou hypertrophe) (Chorus & Bartram, 1999 ; Duy *et al.*, 2000 ; Oberholster *et al.*, 2004, 2010).

Le développement des cyanobactéries et la formation de fleurs d'eau sont influencés par divers facteurs physiques, chimiques (abiotiques) et biologiques (biotiques) ; dont les effets combinés ont pour conséquence de très grandes fluctuations aussi bien saisonnières qu'annuelles des niveaux de cyanobactéries et de leurs métabolites secondaires (Park *et al.*, 1993 ; Thébault & Lesne, 1995). Ces facteurs ont été examinés par le NRA Toxic Algae Task Group (1990) et par Ransom *et al.* (1994) et ils sont présentés ci-dessous. En raison des effets combinés de ces facteurs, les niveaux de cyanobactéries et de leurs toxines peuvent subir de très grandes fluctuations d'une année à l'autre (Park *et al.*, 1993). Ouattara *et al.* (2001) constatent que les variations des paramètres physico-chimiques enregistrées dans les différentes stations d'études semblent peu influencer la densité du phytoplancton, Elle apparaît plutôt déterminée par le régime hydrologique de la rivière.

II.1.3.1. Facteurs abiotiques

Les cyanobactéries sont présentes et surplombent même les autres microorganismes (algues vertes, diatomées...). Elles sont caractérisées par une croissance massive du printemps jusqu'au début de l'automne. La croissance des cyanobactéries dépend d'abord de la température, de la lumière ainsi que de la présence de sources inorganiques d'azote et de phosphore (Mur *et al.*, 1999 ; Haider *et al.*, 2003). Elles prolifèrent dans une eau dont la température est comprise entre 15°C et 30°C (Skulberg *et al.*, 1984 ; Charmichael *et al.*, 1990), les plus hautes favorisant habituellement un développement plus rapide (Charmichael *et al.*, 1990), un pH plutôt basique (compris entre 6 et 9) avec des concentrations assez importantes en azote et en phosphore, une bonne oxygénation, une intensité lumineuse pas très forte et une faible profondeur (Skulberg *et al.*, 1984 ; Charmichael *et al.*, 1990).

a). La Température : la température est au nombre des facteurs les plus importants qui permettent à une espèce donnée d'apparaître, d'atteindre un développement maximal,

enfin de disparaître à des époques de l'année bien déterminées (**Gayral, 1975**). Les cyanobactéries prolifèrent à une température, comprise entre 15°C et 30°C (**Carmichael et al., 1990**), sachant que les cyanobactéries possèdent un optimum de croissance à des températures élevées (autour de 25°C ; **Robarts & Zohary, 1987**), bien qu'elles soient capables de tolérer et de survivre à des températures bien plus basses (**Briand, 2001**).

b). La Lumière : un autre paramètre important est la lumière, les cellules sont capables d'ajuster le fonctionnement de leur appareil photosynthétique en fonction de l'éclairement. Les cyanobactéries doivent faire face à des conditions lumineuses très changeantes en quantité et en qualité qui dépendent de la latitude, du cycle diurne, des saisons, et de la climatologie (**Smith, 1982**). Ces micro-organismes croissent mieux en présence d'une lumière d'intensité modérée bien qu'ils puissent tolérer des niveaux faibles de lumière (**Carmichael et al., 1990 ; Mur et al., 1999**), la forte luminosité d'été étant habituellement photo-inhibitrice (**Shulberg et al., 1984 ; Carmichael et al., 1990 ; Mur et al., 1999**). Les cyanobactéries sont capable de croître à de très faibles intensités lumineuses en raison de plus faibles exigences énergétiques des cellules (**Richardson et al., 1983**). A titre d'exemple l'espèce *Cylindrospermopsis raciborskii* peut former des efflorescences à des intensités lumineuses très faibles à 0,5 m de profondeur, proches de 9 µE/m²/s dans certains réservoirs brésiliens (**Bouvy et al., 1999**).

c). Le pH : l'augmentation de la biomasse relative des Cyanophytes et des Chlorophytes est favorisée par des pH acides (**Tiffany, 1951**). En revanche, un pH entre 6 et 9 avec des concentrations assez importantes en azote, une bonne oxygénation et une intensité lumineuse pas très forte et une faible profondeur favorisent le développement des cyanobactéries (**Bote, 1984**). Le pH et le carbone inorganique dissous évoluent lors des efflorescences de cyanobactéries, avec généralement de fortes valeurs de pH lors de leur croissance et donc des diminutions importantes en carbone inorganique dissous, généralement défavorables pour les autres communautés phytoplanctoniques (**Shapiro, 1997**).

d). La turbidité : qui est la réduction de la transparence d'un liquide due à la présence de matières non dissoutes, présente elle aussi un facteur limitant de cette prolifération microbienne (**MC Barron et al., 1966**).

e). L'Oxygène dissout : les périodes de fortes densités phytoplanctoniques ne sont pas associées à une saturation en oxygène quelle que soit la station (**Ouattara et al., 2001**).

f). La profondeur : l'augmentation de la profondeur fait diminuer la biomasse relative des Chromophytes (de 61 à 27 %) mais fait augmenter celle des Cyanophytes (de 10 à 24 %). (**Dia & Reynaud, 1982**).

II.1.3.2. Facteurs biotiques

En condition favorable, les cyanobactéries ont tendance à supplanter les autres espèces d'algues. Leur adaptabilité et leur prédominance sont dues à leur composition pigmentaire et à la présence de vésicules à gaz (**Thébault & Lesne, 1995**). Ces microorganismes se développent massivement et forment des efflorescences (blooms) qui apparaissent vers le début de l'automne en Europe. Leur prolifération est induite par l'augmentation dans les eaux eutrophes, d'éléments nutritifs tels que les nitrates et le phosphore qui proviennent des activités urbaines et agricoles (**Dawson, 1998, Bouaïcha, 2001**), en outre le rejet des substances nutritives inorganiques, provenant de stations d'épuration d'eaux usées municipales ou d'activités agricoles, est susceptible de favoriser la prolifération des algues microscopiques et celle des cyanobactéries (**Coote & Gregorich, 2000 ; Duy et al., 2000**).

a). Les teneurs en sels nutritifs (phosphore et azote)

Les teneurs en sels nutritifs, en azote et en phosphore, sont des éléments essentiels de croissance mais sont généralement limitées dans l'eau (**Wetzel & Likens, 2000**). Fréquemment, les efflorescences de cyanobactéries sont liées à de fortes concentrations ponctuelles en phosphore et en azote.

Les cyanobactéries peuvent se reproduire en abondance dans les plans d'eau, notamment s'ils sont surchargés de phosphore (**Chevalier et al. 2001**), sa présence sera déterminante quant à l'apparition de fleurs d'eau (**Carmichael et al., 1990 ; Mur et al., 1999 ; Kaebernick & Neilan, 2001**).

De plus, la présence de phosphore est essentielle pour la croissance et la prolifération des cyanobactéries, ils l'utilisent sous forme d'orthophosphates, le phosphore est identifié comme étant la substance critique puisqu'il est habituellement, l'élément limitant en milieu aquatique dulcicole (**Prairie & Soucisse, 1999**).

Les réserves internes en phosphore sont caractéristiques des cyanobactéries sous forme de polyphosphates (**Kromkamp, 1987**). Ainsi les cellules stockent du phosphore en

conditions non limitantes (près des sédiments) et l'utilisent quand les conditions de lumière deviennent favorables.

Un léger enrichissement des eaux en phosphore total (125 µg/l de PT) et en orthophosphates (25 µg/l de PO₄) coïncide avec le développement des blooms à cyanobactéries. En réalité, la faible profondeur de la colonne d'eau durant cette année sèche associée aux vents quasi-permanents qui règnent au niveau de la retenue (Chergui), favoriseraient largement la resuspension des sédiments fortement enrichis en phosphore (**Piersen & Weyhenmeyer, 1994 ; Derraz, 1995**).

La fixation d'azote atmosphérique moléculaire est l'apanage des cyanobactéries hétérocystées. La capacité de fixer l'azote atmosphérique leur confère un avantage lorsque l'azote inorganique devient l'élément limitant dans la colonne d'eau. De plus les cyanobactéries ont une préférence pour l'a²⁸ sous forme d'ammonium (N-NH₄⁺) alors que le nitrate (N-NO₃⁻) est la forme préférentielle des cellules eucaryotes du phytoplancton (**Blomqvist et al., 1994**).

Les cyanobactéries peuvent utiliser des nitrates et certaines assimilent l'azote atmosphérique. Ils peuvent aussi se développer dans des eaux carencées en azote lorsque le rapport entre la concentration en azote et celle en phosphore devient inférieur à une valeur seuil de 4,5 (**Chorus, 1995**). La diminution sensible des nitrates dans les eaux de surface coïncide avec le développement des blooms à cyanobactérie (**Piersen & Weyhenmeyer, 1994 ; Derraz, 1995**). Certaines cyanobactéries peuvent aussi utiliser l'azote et le dioxyde de carbone (CO₂) atmosphériques lorsque les nitrates et le CO₂ dissous deviennent limitants (**Allard & Aubert, 1985**).

Le rapport azote/phosphore dissout peut être déterminant pour certains auteurs (**Smith, 1983**), avec une prolifération des cyanobactéries quand le rapport est faible, inférieur à 29. D'autres auteurs estiment que la consommation forte d'azote lors des proliférations contribuerait à diminuer ce rapport, ainsi l'explication de ce faible rapport serait plus une conséquence qu'une cause de ces proliférations (**Lathrop, 1988**).

b). Chlorophylle-a

Les algues ayant sensiblement la même densité que le milieu dans lequel elles se développent, il a été admis qu'un µl de matière vivante correspondait à 1 mg (**Dia &**

Reynaud, 1982). Il existe des corrélations positives au seuil de signification de 1 % entre concentration en chlorophylle a et chlorophytes ($r^2 = 0,77$) ou cyanophytes ($r^2 = 0,82$) (**Dia & Reynaud, 1982**).

Selon **Fqih Berrada et al. (2000)**, l'évolution saisonnière de la chlorophylle-a dans la zone qui est euphotique suit plus ou moins bien celle de la biomasse algale. Une corrélation assez élevée ($r = 0,6$) a été trouvée entre ces deux paramètres. Le pic de 40 $\mu\text{l/l}$ de chlorophylle-a en juin 1995 coïncide avec celui de *Microcystis aeruginosa*. Les minima de chlorophylle-a correspondent au déclin de la communauté algale (en hiver notamment). Certaines discordances apparaissent, en particulier durant l'année 1996 : au printemps par exemple (avril), de faibles teneurs en chlorophylle-a sont enregistrées (3,2 $\mu\text{g/l}$), en dépit d'une poussée algale importante.

Cette discordance semble être liée aux variations de la teneur cellulaire en chlorophylle qui dépend notamment de la densité cellulaire (**Holmes, 1966 ; Devaux et al., 1982**), des quotas cellulaires en nutriment (**Capblancq, 1982 ; Dauta, 1982**) et des conditions d'éclairement (un éclairement intense entraîne une réduction du contenu cellulaire en chlorophylle) (**Testard, 1983**).

c). Le Zooplancton

Le broutage par le zooplancton, l'un des facteurs de contrôle descendant du phytoplancton, s'exerce peu sur les cyanobactéries par rapport aux autres groupes du phytoplancton. Certaines cyanobactéries ont développé différents moyens de défense pour éviter leur consommation par le zooplancton. Hormis une libération de composés chimiques, voire toxiques, leur association en colonies ou leur forme en filaments ne permettent pas au zooplancton de réaliser leurs mécanismes de filtration ou de broutage (**Lampert, 1987 ; Bouvy et al., 2001**).

Parmi tous ces facteurs, il est souvent difficile de différencier celui qui domine et structure la communauté phytoplancctonique, car différentes échelles de temps et d'espace sont impliquées pour chacun d'eux, en synergie ou non. Cependant, il est important de souligner l'influence des processus physiques sur la biologie et la physiologie des organismes aquatiques ; leur intégration dans les études d'écologie est indispensable pour comprendre la dynamique d'un compartiment trophique (comme le phytoplancton), et donc de la dynamique générale des propriétés d'un plan d'eau (**Ngansoumana, 2006**)

II.1.4. Classification

D'un point de vue systématique, se sont des procaryotes placés dans le règne des Eubactéria (**Woese, 1987**). La classification de ces organismes dépend à la fois du code international de nomenclature botanique (I.C.B.N., **Greuter et al., 1994 ; 2000**) et du code international de nomenclature des bactéries (I.C.N.B., **Lapage et al., 1992**). L'approche botanique s'appuie sur des critères morphologiques (dimensions cellulaires) et physiologiques telles que la composition en pigments, la présence de vésicules à gaz, la composition en substances de réserve, la paroi cellulaire ou encore la présence de cellules différenciées (hétérocytes et/ou akinètes) et le mode de multiplication. L'approche bactériologique est basée sur les caractères physiologiques et génotypiques de cultures pures.

La classification des cyanophytes a été modifiée de nombreuses fois (**Geitler, 1932 ; Fritsch, 1945 ; Starmach, 1966 ; Drouet, 1968, 1978, 1981 ; Bourrelly, 1985 ; Anagnostidis et Komarek, 1988**).

A l'heure actuelle, l'embranchement ne comprend qu'une classe unique, celle des Cyanophycées, subdivisée en quatre ordres (**Tableau 1**) :

- ⇒ Le premier, celui des **Chroococcales**, regroupe les individus unicellulaires à titre d'exemple *Synechococcus*, coloniaux comme *Microcystis*, ou qui ne forment pas de vrais filaments tel que *Jahannesbaptistia*, donc sans interrelations cellulaires réelles. On peut, toutefois, rencontrer ici des thalles présentant une hétéropolarité également *Chamaesiphon* ou encore des cas de différenciation cellulaire comme *Hyella*.
- ⇒ Les **Oscillatoriales** constituent le second ordre. Sous cette appellation, sont réunis les genres filamenteux unisériés, sans ramifications (vraies ou fausses), sans hétérocystes ni akinètes, et dont les cellules se divisent perpendiculairement à l'axe longitudinal du trichome cas de *Lyngbya*.
- ⇒ Le troisième ordre regroupe, sous le nom de **Nostocales**, les formes filamenteuses avec hétérocystes, akinètes et hormogonies comme *Anabaena*, montrant souvent de fausses ramifications tel que *Scytonema*. Les trichomes sont solitaires ou regroupés dans un mucilage commun par exemple *Nostoc*.
- ⇒ Enfin, les **Stigonématales** forment le quatrième ordre. Les thalles, ici, sont filamenteux le cas de *Geitleria*, certains pouvant être plurisériés c'est pareillement *Stigonema*, avec toujours de vraies ramifications et, parfois, des fausses c'est

également *Fischerella*. Quelques genres sont faits de nombreux trichomes ramifiés, inclus au sein d'un mucilage commun semblablement au *Nostochopsis*.

Les ordres sont divisés en familles par exemple, huit pour les chroococcales (**Komarek et Anagnostidis, 1999**), six pour les Oscillatoriales (**Anagnostidis et Komarek, 1988**), elles-mêmes subdivisées en genres (plus de 150), puis espèces (environ 2000) (**Greuter et al., 1994, 2000**).

Le code de nomenclature bactériologique est basé sur des études comparatives entre souches axéniques en culture. Cette classification prend en compte la morphologie mais aussi les caractéristiques physiologiques, biochimiques et génétiques (**Rippka et Herdman, 1992**). Pour les bactériologistes, ces microorganismes sont des bactéries photo-autotrophes et elles sont appelées cyanobactéries dans le Bergey's Manual (**Garrity et al., 2001**). Les apports de la biologie moléculaire à la systématique et à la phylogénie devraient permettre à terme la définition d'une taxinomie des cyanobactéries stable et universelle.

Tableau 1 : Correspondance des deux systèmes de classification des cyanobactéries, I.C.B.N. et I.C.N.B. (**Rippka et al., 1979 ; Prescott et al., 2003**)

Classification Bactérienne (I.C.N.B.)	Classification Botanique (I.C.B.N.)	Description
Section I	Chroococcales	Individus unicellulaires ou coloniaux, à multiplication par fission binaire et/ou formation d'exospores.
Section II	Pleurocapsales	Individus coloniaux (protohalles), à multiplication par fission multiples donnant des baeocytes.
Section III	Oscillatoriales	Formes filamenteuses unisériées, non hétérocytées, sans ramification, à division cellulaires perpendiculaires à l'axe du trichome.
Section IV	Nostocales	Formes filamenteuses à différenciation cellulaire (hétérocytes, akinètes), à divisions cellulaires dans un seul plan.
Section V	Stigonematales	Formes filamenteuses à différenciation cellulaire (hétérocytes, akinètes) présentant des ramifications (vraies ou fausses), à divisions cellulaires dans plusieurs plans.

II.2. Les Cyanotoxines

Les cyanobactéries forment, sous certaines conditions environnementales, des écumes en surface de l'eau appelées « blooms ». Le développement massif de ces blooms dans les eaux douces à travers le globe est devenu une vraie menace pour la santé humaine, mais aussi pour la faune et la flore aquatique, notamment à cause de la production des toxines accompagnant ces blooms à cyanobactéries (Ibelings & Chorus, 2007; Martins & Vasconcelos, 2009).

Les cyanotoxines sont des toxines produites par 40 espèces répartissent en 22 genres potentiellement toxiques des cyanobactéries (Chorus & Bartram, 1999 ; Van Apeldoorn et al., 2007 ; BGAWB, 2010 ; Khilil, 2011 ; USEPA, 2012) (Tableau 2) en tant que métabolites secondaires. Le terme secondaire signifie, d'une part, que ces composants ne sont pas nécessaires au métabolisme primaire (la photosynthèse, la respiration et la synthèse de macromolécules) et, d'autre part, que les composants biologiques n'ont pas tous un rôle connu (Carmichael, 1986 ; 1992; Rapala, 1998). Orr & Jones (1998) suggèrent que les cyanotoxines de type microcystine et nodularine pourraient être des métabolites primaires, des composés azotés essentiels au métabolisme cellulaire, pouvant servir de transporteurs transmembranaire pour certains métaux.

Tableau 2 : Liste non exhaustive des genres ou espèces producteurs de cyanotoxines (d'après Chorus & Bartram, 1999 ; Khilil, 2011; USEPA, 2012)

Catégorie	Toxines	Genres ou espèces producteurs
Neurotoxine	Anatoxine-a	<i>Anabaena flos-aquae</i> ; <i>Anabaena spiroides</i> ; <i>Anabaena circinalis</i> ; <i>Aphanizomenon</i> sp.; <i>Cylindrospermum</i> sp.; <i>Oscillatoria</i> sp.; <i>Microcystis</i> sp.; <i>Phormidium</i> sp.; <i>Planktothrix</i> sp.; <i>Woronichinia</i> sp.
	Anatoxine-a(s)	<i>Anabaena flos-aquae</i> ; <i>Anabaena lemmermanii</i>
	Homo-anatoxine	<i>Planktothrix</i> sp.
	Saxitoxine	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> ; <i>Anabaena circinalis</i> ; <i>Anabaena</i> sp.; <i>Aphanizomenon</i> sp.; <i>Cylindrospermum</i> sp.; <i>Lyngbya</i> sp.
	Néosaxitoxine	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> ; <i>Anabaena circinalis</i>
Hépatotoxine	Nodularine	<i>Nodularia spumigena</i>
	Cylindrospermopsine	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> ; <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> ; <i>Umezakia natans</i> ; <i>Raphidiopsis curvata</i> ; <i>Anabaena</i> sp.
	Microcystine	<i>Microcystis aeruginosa</i> ; <i>Anabaena millenii</i> ; <i>Microcystis</i> sp.; <i>Planktothrix</i> sp.; <i>Oscillatoria</i> sp.; <i>Nostoc</i> sp.; <i>Anabaena</i> sp.; <i>Anabaenopsis</i> sp.; <i>Hapalosiphon</i> sp.
Dermatotoxine	Lyngbytoxine-a	<i>Lyngbya</i> sp.
	Debromaplysiatoxine	<i>Lyngbya</i> sp.; <i>Schizothrix calcicola</i> , <i>Oscillatoria nigroviridis</i>
	Aplysiatoxine	<i>Lyngbya</i> sp.; <i>Oscillatoria</i> sp.; <i>Planktothrix</i> sp.; <i>Schizothrix</i> sp.
	Lipopolysaccharides	Toutes

II.2.1. Classe des Cyanotoxines

Les cyanotoxines peuvent être classés en cinq groupes fonctionnels en se basant sur leurs effets biologiques, on distingue les hépatotoxines, les neurotoxines, les cytotoxines, les dermatotoxines et enfin les toxines avec un potentiel irritant (les lipopolysaccharides) (Berry et al., 2008).

II.2.1.1. Les hépatotoxines

Les hépatotoxines sont les plus impliquées dans les cas d'intoxication. Elles sont produites par diverses espèces appartenant principalement aux genres *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis* et *Umezakia*. Elles peuvent être divisées en deux groupes selon leur nature chimique : des toxines de structure peptidique cyclique, microcystines et nodularines, et une toxine de structure alcaloïdique, la cylindrospermopsine.

a. Les Microcystines

i. Présentation

Elles sont produites, entre autre, par les genres *Microcystis*, *Anabaena* et *Planktothrix* qui comptent parmi les cyanobactéries les plus abondantes et les plus répandues dans les milieux aquatiques. Ces toxines ont été identifiées dans le monde entier, dans les régions tropicales (Cuvin-Aralar et al., 2002) aux zones polaires (Hitzfeld et al., 2000), en altitude (Mez et al., 1997) comme sur la côte (Henriksen, 2001), dans des lacs (Brittain et al., 2000), rivières (Lehman, 2007 ; Mohamed et al., 2007), étangs (Welker et al., 2005) et même en eaux saumâtres (Matthiensen et al., 2000 ; Lehman et al., 2008)

La structure chimique des microcystines (Figure 4) correspond à des heptapeptides cycliques : cyclo-(D-Ala¹-X²-D-Me-iso-Asp³-Y⁴-Adda⁵-D-iso-Glu⁶-Mdha⁷) où X et Y sont des acides aminés variables dont les initiales sont utilisées pour dénommer les différents congénères. Il existe plus de 100 congénères des microcystines (Tableau 3) différents par les acides aminés X et Y ainsi que par la méthylation des deux acides aminés particuliers Adda et Mdha (Sivonen et Jones 1999, Codd et al., 2005 ; Dietrich & Hoeger, 2005 ; Hotto et al., 2007 ; Chen et al., 2009 ; Puddick et al., 2015 ; Svircev et al.,

2015). La microcystine-LR, la plus répandue et la plus toxique, contient les acides aminés leucine (L) et arginine (R).

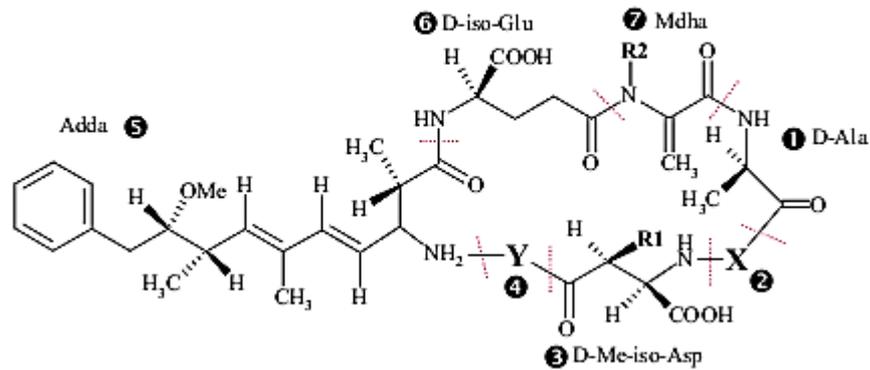


Figure 4 : Structure chimique générale des microcystines (Carmichael, 1997)

Le poids moléculaire des microcystines varie de 909 à 1115 Da. Elles provoquent d'importantes lésions du foie via l'inactivation des protéines phosphatases 1, 2A et 3 (Sivonen & Jones, 1999) induisant lors des fortes doses des insuffisances hépatiques tels qu'une nécrose hépatique évoluant vers la fibrose, la cytolysse ou le plus souvent la mort (Falconer, 1996 ; Ito et al., 1997 ; Hitzfeld et al., 2000). Outre les effets aigus des microcystines, il a été mis en évidence des risques de promotion tumorale ainsi que des phénomènes de cancérogénèse, suite à une exposition chronique aux microcystines (Nishiwaki-Matsushima et al., 1992 ; Falconer, 1998) (Tableau 4).

Tableau 3 : Quelques congénères des Microcystines.

Microcystines	Masse molaire	Toxicité DL ₅₀ (µg/kg)	Espèces productrices	Références
[D-asp ³ , Dha ⁷]MC-LR	966	+	<i>M.aeruginosa</i> <i>Anabaena sp.</i>	Harada et al., 1991b; Sivonen et al., 1992a
[D-Asp ³]MC-LR	980	160-300	<i>A. flos-aquae</i> <i>M. aeruginosa</i> <i>M. viridis</i> <i>O. agardhii</i>	Krishnamyrthy et al., 1989; Cremer et Henning, 1991; Harada et al., 1990b; 1991a; Luukkainen et al., 1993

[Dha ⁷]MC-LR	980	250	<i>M. aeruginosa</i> <i>Anabaena sp.</i> <i>O. agardhii</i>	Harada et al., 1991b; Sivonen et al., 1992a; Luukkainen et al., 1993
[DMAdda ⁵]MC-LR	980	90-100	<i>Microcystis spp.</i> <i>Nostoc sp.</i>	Namikoshi et al., 1992a; Sivonen et al., 1992b
MC-LR	994	50	<i>M. aeruginosa</i> <i>A. flos-aquae</i> <i>M. viridis</i>	Botes et al., 1985; Rinehart et al., 1988; Krishnamyrthy et al., 1989; Watanabe et al., 1988
[D-Asp ³ ,ADMAdda ⁵] MC-LR	1,008	160	<i>Nostoc sp.</i>	Sivonen et al., 1990a; Namikoshi et al., 1990
[D-Asp ³ , ADMAdda ⁵ , Dhb ⁷]MC-LR	1,009	+	<i>Nostoc sp.</i>	Beattie et al., 1998
[D-Asp ³]MC-RR	1,023	250	<i>O. agardhii</i> <i>Anabaena sp.</i> <i>M. aeruginosa</i>	Meriluoto et al., 1989; Sivonen et al., 1992a; Luukkainen et al., 1994
[Dha ⁷]MC-RR	1,023	180	<i>M. aeruginosa</i> <i>Anabaena sp.</i> <i>O. agardhii</i>	Kiviranta et al., 1992; Sivonen et al., 1992a; Luukkainen et al., 1993
[Dha ⁷]MC-YR	1,030	+	<i>M. aeruginosa</i>	Sivonen et al., 1992c
[D-Asp ³]MC-YR	1,030	+	<i>Microcystis spp.</i>	Namikoshi et al., 1992d
MC-RR	1,037	600	<i>M. aeruginosa</i> <i>M. viridis</i>	Kusumi et al., 1987; Painuly et al., 1988; Watanabe et al., 1988; Sivonen et al., 1992a

			<i>Anabaena sp.</i>	
[D-Asp ³ ,MeSer ⁷]MC-RR	1,041	+	<i>O. agardhii</i>	Luukkainen et al. 1993
MC-YR	1,044	70	<i>M. aeruginosa</i> <i>M. viridis</i>	Botes et al., 1985; Watanabe et al., 1988

Tableau 4 : Valeurs toxicologiques pour les microcystines pour différentes voies d'administration (orale, IP : intrapéritonéale, IN : intranasale, IT : intratrachéale). MC: Microcystine.

Toxicité	Voie administrati on	Valeurs repères	Toxine	Source
Aiguë	Orale	DL ₅₀ =5mg / kg (souris, gavage)	MC-LR	Fawell et al. 1994, Fawell et al. 1999a
		DL ₅₀ =10,9 mg/kg (souris, gavage)	MC-LR	Yoshida et al., 1997
	IP	25 µg.kg ⁻¹ < DL50 < 150 µg.kg ⁻¹	MC-LR	Kuiper-Goodman et al.1999
	IN	36 µg.kg ⁻¹ < DL50 < 122 µg.kg ⁻¹	MC-LR	Fitzgeorge et al., 1994
	IT	50 µg kg ⁻¹ < DL50 < 100 µg.kg ⁻¹	MC-LR	Ito et al., 2001
Subchronique	Orale	DSENO = 40 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ (souris, gavage, 13 semaines) DMENO = 50 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ (rat, eau de boisson, 28 j) DMENO = 100 µg/kg p.c. /j(porc, eau de boisson, 44j) DSENO = 333 µg/kg/j (souris, alimentation, 43 j)	MC-LR MC-LR Extrait de <i>M. aeruginosa</i> Extrait d' <i>A.flos-aqua</i>	Fawell et al.,1994, Fawell et al.,1999a Heinze, 1999 Falconer, 1994 Schaeffer et al., 1999

Embryo-toxicité	Orale	DSENO = 600 µg/kg/j (souris, gavage, 10 jours) DSENO = 333 µg/kg/j (souris, alimentation, pendant la gestation et la lactation)	MC-LR Extrait d'A. flos- aquae	Fawell et al.,1994, Fawell et al.,1999a Schaeffer et al.,1999
Tératogénèse	Orale	DSENO = 333 µg.kg/j (souris, alimentation, pendant la gestation et la lactation)	Extrait d'A. flos- aquae	Schaeffer et al.,1999

ii. Voie de synthèse des microcystines

La synthèse des cyanotoxines peptidiques de type microcystines est une synthèse non ribosomale qui fait intervenir des complexes enzymatiques multifonctionnels codant pour des peptide synthétases non ribosomales (NRPS), des polykétidesynthases (PKS) et des enzymes de finalisation des queues peptidiques (tailoring). Le cluster de gènes (**Figure 5**) responsable de la synthèse des microcystines (mcy) a d'abord été séquencé chez *Microcystis* (**Nishizawa et al., 1999 ; Nishizawa et al., 2000 ; Tillett et al., 2000**), puis chez *Planktothrix* (**Christiansen et al., 2003**) et *Anabaena* (**Rouhiainen et al., 2004**). Chez *Microcystis* PCC7806, ce cluster de gènes de 55 kb est constitué de 10 gènes regroupés en deux opérons. Le plus grand des deux opérons mcy D-J code pour une PKS (mcyD), deux enzymes comprenant des modules NRPS et PKS (mcyE et mcyG) ainsi que pour des enzymes impliquées dans le tailoring (mcyJ, mcyF et mcyI) et le transport (mcyH) de latoxine. Le deuxième opéron, constitué des gènes mcyA-B-C code pour des NRPS permettant d'incorporer les 5 autres acides aminés, de circulariser la chaîne peptidique et de détacher la microcystine produite du complexe enzymatique (**Tillett et al., 2000**). L'organisation du cluster de gènes mcy est différente chez les autres genres, avec notamment une organisation des ORFs (*Open Reading Frames*) différente et la présence de 9 gènes seulement chez *Planktothrix agardhii* CYA126, dont mcyT.

Le cluster de gènes codant pour les nodularines a été décrit chez *Nodularia spumigena* NSOR10 (Moffitt & Neilan, 2004) et récemment pour la cylindrospermopsine chez *Cylindrospermopsis raciborskii* AWT205 (Mihali et al., 2008).

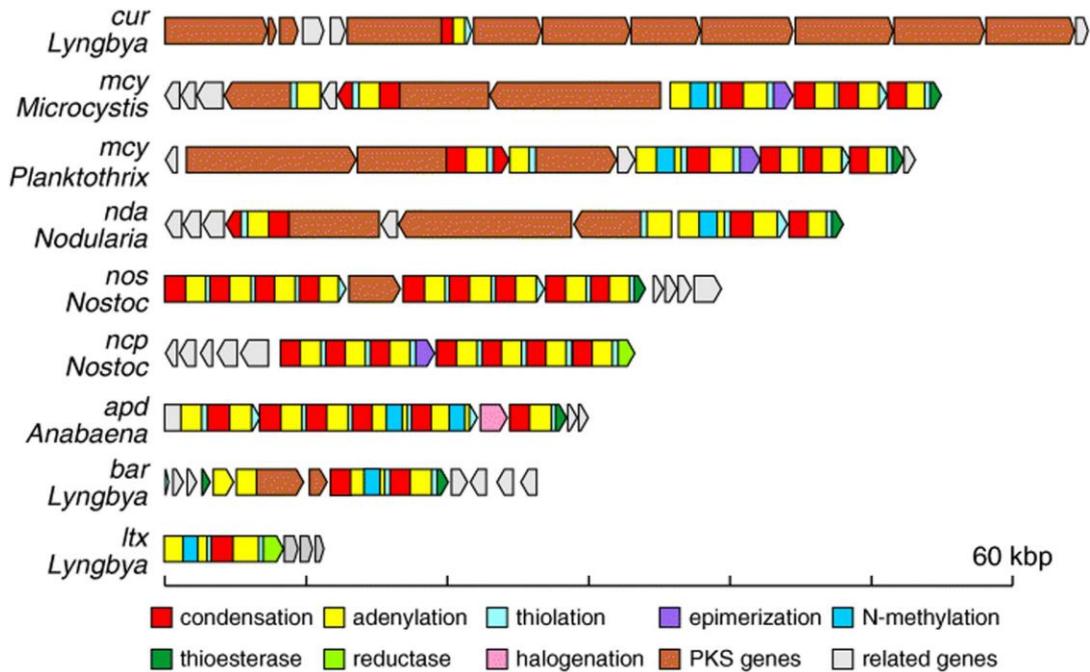


Figure 5: Cluster des gènes de synthèse de la microcystine d'*Anabaena* (Rouhiainen et al., 2004), de *Microcystis* (Tillett et al., 2000) et de *Planktothrix* (Christiansen et al. 2003) et de la Nodularine de *Nodularia* (Moffitt et Neilan 2004) d'après Welker & Dohren (2006)

iii. Influence des facteurs de l'environnement sur la production de microcystines

L'influence de différents facteurs et processus biotiques et abiotiques sur la production de microcystines a été démontrée en conditions contrôlées. La production de microcystines varierait en fonction de la température (Vanderwesthuizen & Eloff, 1985 ; Rapala et al., 1997), du pH (Song et al., 1998), de la lumière (Sivonen, 1990 ; Utkilen & Gjolme, 1992 ; Wiedner et al., 2003), des concentrations en azote (Sivonen, 1990 ; Orr & Jones, 1998 ; Long et al., 2001), en phosphore (Sivonen, 1990 ; Rapala et al., 1997 ; Oh et al., 2000) et en fer (Utkilen & Gjolme, 1995). Dans la majorité des cas, les plus fortes concentrations en microcystines ont été détectées dans des conditions optimales pour la croissance, notamment en termes de température, lumière et nutriments. En fait, tous ces paramètres pourraient agir indirectement sur la production de microcystine via un

effet direct sur le taux de croissance des cellules (**Orr & Jones 1998 ; Long et al., 2001 ; Briand et al., 2005**). Cette hypothèse est corroborée par la corrélation positive observée entre le taux de production des microcystines et le taux de croissance des cellules dans des conditions limitantes en phosphore (**Oh et al., 2000**) ou en azote (**Long et al., 2001**). D'autre part, la production de microcystines serait influencée par des facteurs biotiques. Ainsi, l'exposition à des poissons planctonophages (**Yang et al., 2006, Jang et al., 2008**) et aux kairomones du zooplancton (**Jang et al., 2004**) stimulerait la production de microcystines chez *M. aeruginosa*. Ces effets sous-tendent un hypothétique rôle des microcystines dans la résistance à la prédation.

Enfin, des travaux récents ont mis en évidence l'effet stimulateur de divers xénobiotiques tels que les gibbérellines (**Pan et al., 2008**), l'arsenate (**Gong et al., 2009**) et les nonylphenols (**Wang et al., 2007**) sur la production de microcystines par *M. aeruginosa*.

A ce jour, les facteurs responsables de la production des différents congénères de microcystines ne sont pas clairement identifiés, de même que les mécanismes moléculaires mis en jeu. Cependant, la proportion relative des congénères produits varierait en fonction de paramètres physico-chimiques tels que la température (**Rapala et al., 1997**), l'intensité lumineuse (**Hesse & Kohl 2001 ; Tonk et al., 2005**), les concentrations en nutriments (**Hesse & Kohl, 2001**) et la disponibilité en acides aminés dans le milieu (**Tonk et al., 2008**).

b. Les nodularines

Les nodularines sont des pentapeptides hépatotoxiques produites par le genre *Nodularia*. La structure chimique générale se compose des acides aminés suivants : β -méthylisoAsp¹-Arg²-Adda³-isoGlu⁴-N-méthyl-déhydrobutyrique⁵ (**Figure 6**). La nodularine-R inhibe également certaines protéines phosphatases et montre une hépatotoxicité semblable à celle des microcystines (**Honkanen et al., 1991 ; Bagu et al., 1997**). Cependant, **Lehtonen et al., (2003)** ont montré récemment dans des essais pilotes sur la palourde des effets neurotoxiques de la nodularine-R manifestés par l'altération de l'activité de l'acétylcholinestérase.

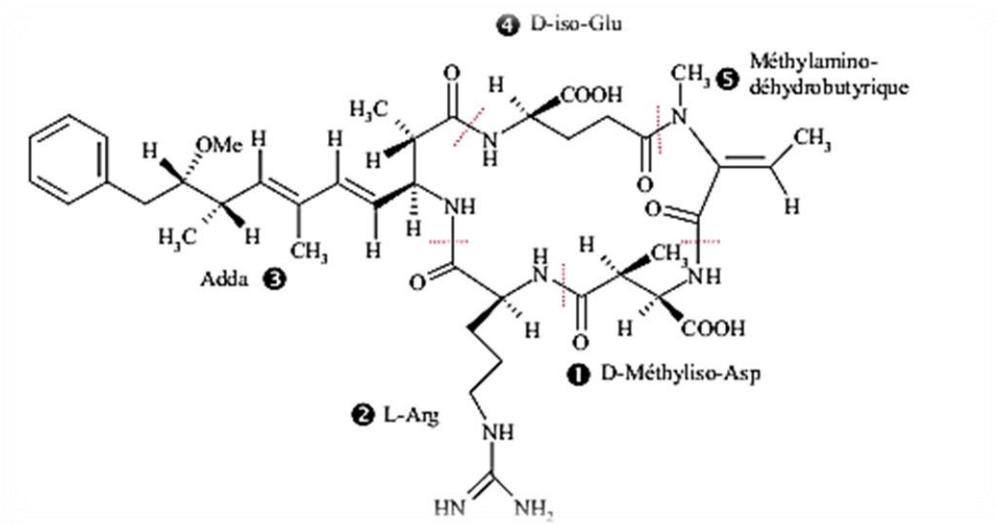


Figure 6 : Structure chimique de la nodularine-R (Carmichael, 1997)

II.2.1.2. Les neurotoxines

Elles ciblent la jonction neuromusculaire. Elles sont essentiellement produites par les genres planctoniques *Anabaena* et *Aphanizomenon*, mais également par le genre benthique *Phormidium*.

a. Les anatoxines

Ce sont des alcaloïdes. L'anatoxine-a est une amine secondaire de 165 daltons (**Figure 7a**). C'est un agent dépolarisant post-synaptique de la jonction neuromusculaire entraînant une paralysie musculaire menant à la mort par arrêt respiratoire chez les mammifères (**Falconer, 1998**). Son homologue, l'homoanatoxine-a (179 daltons) possède des propriétés physico-chimiques et toxicologiques très voisines. L'anatoxine-a(s) est un ester phosphate d'une N-hydroxyguanidine cyclique de 252 daltons. C'est une toxine inhibitrice de l'acétylcholinestérase (**Mahmood & Carmichael, 1987 ; Matsunaga et al., 1989 ; Hyde & Carmichael, 1991**). Elle induit une hyperactivité des neurones post-synaptiques et donc une paralysie musculaire conduisant à la mort par arrêt respiratoire.

b. Les Saxitoxines

Elles appartiennent à une famille de toxines incluant les C-toxines et les gonyautoxines impliquées dans des cas d'intoxications neurologiques parfois mortelles connues sous le nom d'intoxication paralysante par les fruits de mer (IPFM, PSP paralytic shellfish poisoning) (Bates & Rapoport 1975). Ce sont des alcaloïdes de 241 à 491 daltons (Figure 7b) (Schantz et al., 1975) qui inhibent les canaux sodium voltage dépendant des jonctions neuromusculaires (Bay & Strichartz, 1980 ; Strichartz et al., 1986) et provoquent chez les mammifères une paralysie musculaire entraînant la mort par arrêt respiratoire.

c. La β -N-méthylamino-L-alanine (BMAA)

C'est une molécule de type acide aminé non impliquée dans la synthèse ribosomale de protéine (Figure 7c). Elle provoque une excitation des neurones et serait à l'origine de maladies neurodégénératives (Spencer et al., 1987). Cox et al., (2005) ont détecté la BMAA chez 95% des genres et 97% des souches de cyanobactéries étudiées provenant de diverses régions du monde. Selon ces auteurs, cette molécule serait produite par toutes les cyanobactéries symbiotiques, planctoniques ou benthiques, terrestres et aquatiques.

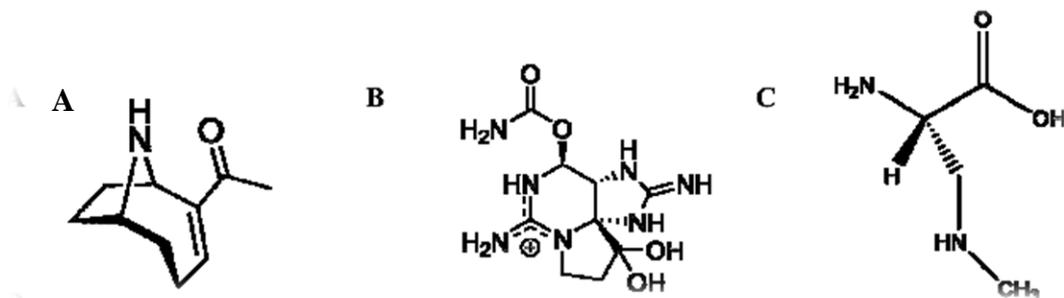


Figure 7 : Structures chimiques des neurotoxines : (A) anatoxine-a, (B) saxitoxine et (C) la La β -N-méthylamino-L-alanine (Carmichael, 1997)

II.2.1.3. Les cytotoxines

Une cytotoxine hautement toxique soit par voie orale ou par voie orale ou par injection c'est la cylindrospermopsine (Falconer, 1999). C'est un alcaloïde de 415 Da, produit principalement par *Cylindrospermopsis raciborskii* (Ohtani et al., 1992 ; Burns et al., 2000), *Umezakia natans* (Harada et al., 1994), *Aphanizomenon ovalisporum* (Bankeret et al., 1997) et

Raphidiopsis curvata (Li et al., 2001), possède une unité guanidine tricyclique (Figure 8). C'est une molécule très polaire et très soluble dans l'eau, en solution sa demi-vie est supérieure à 10 jours (Chiswell et al., 1999). Briand et al., (2003), ont pu isoler deux congénères de cette molécule, une toxique dite la 7 épicylindrospermopsine et l'autre non toxique dite la désoxycylindrospermopsine.

La DL₅₀ par voie intra péritonéale chez la souris de la cylindrospermopsine est de 2,1 mg/kg (Ohtani et al., 1992 ; Runnegar et al., 2002)

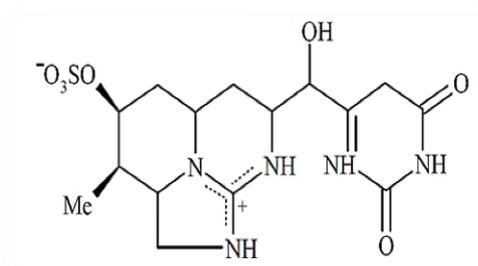


Fig. N°8 : Structure chimique de la cylindrospermopsine (Ohtani et al., 1992).

La cylindrospermopsine bloque la synthèse des protéines (Hawkins et al., 1985, 1997; Chorus et al., 2000) et provoque un empoisonnement au niveau des reins, du foie ainsi que des dommages dans la rate, les intestins, le cœur et la thymus (Chorus et al., 2000 ; Codd, 2000). Chez les animaux intoxiqués par la cylindrospermopsine pure, les gastroentérites observées au niveau des hépatocytes sont suivies d'une accumulation de lipide dans le foie ce qui semble être corrélée avec une inhibition de la synthèse protéique (Terao et al., 1994). Cependant, l'injection intrapéritonéale d'extraits aqueux de *Cylindrospermopsis* met en évidence des dommages dans d'autres organes comme les intestins, les reins, l'estomac, la rate et le cœur, ce qui suggère un mode d'action non sélectif et/ou la présence d'autres toxines (Kuiper-Goodman et al., 1999).

II.2.1.4. Les dermatotoxines et les toxines irritantes

La lyngbyatoxine A (Figure 9a), la débromoaplysiatoxine (Figure 9b) et les aplysiatoxines (Figure 9c) sont des alcaloïdes retrouvés chez des cyanobactéries benthiques telles que *Lyngbya majuscula*, *Oscillatoria nigroviridis* et *Schizothrix calcicola*. Ces toxines sont responsables de cas de fortes irritations cutanées et d'inflammation gastro-intestinales en zones de baignade (Cardellina et al., 1979). La lyngbyatoxine A a par ailleurs une structure similaire à la télécidine A produite par un actinomycète (*Streptomyces*) qui est un agent potentiel de promotion tumorale (Fugiki et al., 1984). Aplysiatoxines et

débromoaplysiatoxine sont également de potentiels agents promoteurs de tumeurs et des activateurs de protéines kinase C (**Fugiki et al., 1990 ; Mynderse et al., 1977**).

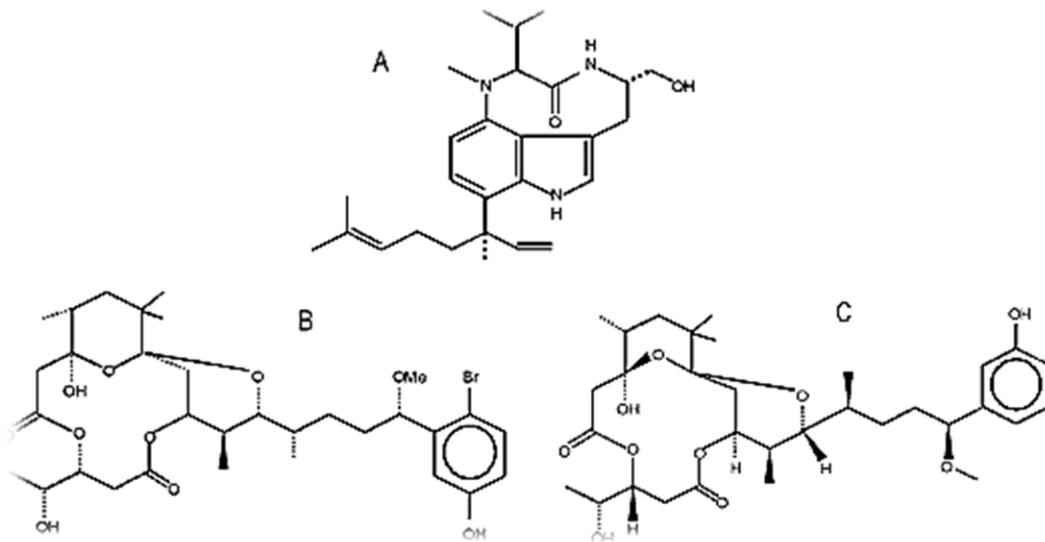


Figure 9 : Structures chimiques des dermatotoxines: (A) lyngbyatoxine A, (B) debromoaplysiatoxine et (C) aplysiatoxine (**Briand, 2008**).

Les lypopolysaccharides (LPS) sont des endotoxines constitutives de la paroi cellulaire de cyanobactéries ou d'autres bactéries Gram négatives. Elles sont constituées d'un sucre et d'un lipide. C'est ce dernier qui est responsable de réactions allergiques et toxiques chez les animaux et les humains et à l'origine d'irritations cutanées (**Sivonen & Jones, 1999 ; Falconer, 1998 ; Codd, 2000**).

II.2.1.5. Autres métabolites secondaires

Les cyanobactéries produisent d'autres variétés de molécules. Cela va de produits utiles, à des composés néfastes comme la géosmine ou le 2-méthyl isobornéol qui confèrent à l'eau du robinet un goût exécrable. Bien que certaines molécules soient tout de même responsables d'irritations cutanées ou de dermatites, ces composés bioactifs, sont généralement étudiés non pas pour leur toxicité vis-à-vis des vertébrés, mais pour leurs propriétés antifongiques, antibactériennes, anti-algues et même anti-cancer (**Jaiswal et al., 2008 ; Humpage, 2008**).

II.2.2. Impact des Cyanotoxines

II.2.2.1. Impact sur la santé humaine

L'homme est exposé aux cyanotoxines qui contaminent aussi bien les eaux utilisées à des fins récréatives que dans les réservoirs d'eau potable. Le degré d'intoxication dépend de l'âge de la personne, de son sexe et de son état de santé, les enfants étant les plus sensibles. Plusieurs intoxications par des eaux provenant de différents plans d'eau, où des cyanobactéries s'étaient accumulées, ont été identifiées dans le monde. Les intoxications induites par les hépatotoxines cyanobactériennes sont plus fréquentes que celles engendrées par les neurotoxines (**Hitzfeld et al., 2000**). L'exposition à des microcystines ou à la nodularine-R peut engendrer des symptômes d'intoxication humaine similaires et peut mener, à de fortes concentrations de ces toxines, au coma et la mort par dommages sévères du foie (**Carmichael, 1997**). Il a été aussi montré récemment chez l'homme que les microcystines et la nodularine-R affectent l'adhésion des leucocytes et portent atteinte aux réactions immunitaires (**Hernández et al., 2000**). Toutefois, les microcystines sont les hépatotoxines les plus impliquées dans les intoxications humaines. Ainsi, on rapporte, ci-dessous, des intoxications provoquées par différentes expositions aux hépatotoxines cyanobactériennes.

a. Cas d'allergies

Chez les humains, les réactions allergiques après contact avec des cyanobactéries dans des eaux de baignades sont relativement fréquentes. Des problèmes respiratoires (asthme, rhume des foins), des irritations des yeux et de la peau, des dermatoses, des fièvres, des troubles gastro-intestinaux et hépatiques, des symptômes de grippe, des maux de gorge et des signes de pneumonie se sont déclarés à la suite d'un contact avec certaines espèces des genres *Oscillatoria*, *Nodularia*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Gloeotrichia*, ou *Microcystis* (**Carmichael et Falconer, 1993 ; Pilotto et al., 1997**). La sensibilité des individus aux réactions allergiques à de faibles densités en cyanobactéries dans le milieu, est plus élevée que celle attribuée au contenu d'endotoxines de ces micro-organismes (**Pilotto et al., 1997**). Tous les symptômes allergiques observés peuvent être attribués aussi bien aux hépatotoxines qu'aux neurotoxines cyanobactériennes. Cependant, **Turner et al. (1990)** ont rapporté des intoxications chez des soldats par contact avec une eau contaminée par des microcystines provenant d'une efflorescence de l'espèce *Microcystis aeruginosa* dans le lac Rudyard en Angleterre. Les symptômes observés chez les soldats intoxiqués étaient des maux d'estomac, des diarrhées, des vomissements, une toux sèche et des céphalées. Des cas d'irritation ont été

aussi signalés après une douche avec une eau mal traitée contenant des microcystines (Falconer, 1999).

b. Intoxications par ingestion

i. Intoxications aiguës

Le premier cas d'intoxication humaine liée aux cyanobactéries a été rapporté par **Tisdale en 1931**. Un important bloom hépatotoxique de *Microcystis* sp. dans les rivières Ohio et Potomac (U.S.A.) a provoqué des gastro-entérites chez plusieurs milliers de personnes ayant consommé l'eau de ces rivières. En 1983, à Palm Island en Australie, une épidémie d'hépatite et d'entérite a été provoquée par une efflorescence de cyanobactéries toxiques dans un réseau d'approvisionnement en eau : la digue de Salomon. Une semaine après le traitement de l'efflorescence par du sulfate de cuivre, 148 personnes dont 138 enfants ayant bu cette eau ont été sévèrement malades. Les symptômes étaient des hépatites, des lésions rénales et intestinales, des vomissements, des céphalées, des douleurs abdominales, des pertes de sang, de glucose et de protéines dans les urines, des constipations suivies de diarrhées sanglantes profuses et des déséquilibres électrolytiques sévères (**Bourke et al., 1983**). Deux espèces de cyanobactéries ont été incriminées dans ces intoxications : une souche d'*Anabaena circinalis* non toxique et une souche de *Cylindrospermopsis raciborskii* très toxique et connue pour la production de la cylindrospermopsine (**Hawkins et al., 1985 ; Falconer, 1991**). Au cours de la même année, dans la petite ville d'Armidale en Australie, des dommages hépatiques caractérisés par une élévation de l'activité de certaines enzymes du foie ont été observés chez les habitants dont l'eau de boisson provenait d'un réservoir contenant une efflorescence de *Microcystis aeruginosa*. Des pics de la γ -glutamyl transférase ont été trouvés dans les échantillons du sang des personnes intoxiquées (**Falconer et al., 1983**).

Cependant, des intoxications humaines plus graves ont engendré la mort. En 1993, une efflorescence massive d'*Anabaena* sp. et de *Microcystis* sp. dans un barrage à Itaparica au Brésil a provoqué l'intoxication de 2000 personnes montrant des signes de gastro-entérites aiguës, ce qui a causé la mort de 88 malades en majorité des enfants (**Teixera et al., 1993**). Une autre intoxication mortelle a eu lieu en 1996 et a engendré la mort de plus de 60 personnes dans un centre d'hémodialyse à Caruaru au Brésil. L'intoxication impliquée était due au développement massif de *Microcystis*, d'*Anabaena* et d'*Anabaenopsis* dans un réservoir d'eau utilisé par le centre (**Jochimsen et al., 1998 ; Pouria et al., 1998 ; Azevedo et al., 2002**). L'analyse d'échantillons provenant du système de traitement d'eau du centre, du

sérum et des tissus du foie des victimes contaminées a permis l'identification de deux groupes d'hépatotoxines cyanobactériennes. Les microcystines existaient dans tous les échantillons testés, quant à la cylindrospermopsine, elle trouvait uniquement dans le système de traitement d'eau (**Azevedo et al., 2002**). Les personnes décédées présentaient en effet des hémorragies hépatiques (**Jochimsen et al., 1998 ; Pouria et al., 1998**). Des lésions hépatiques, indiquées par des augmentations d'enzymes (aspartate et alanine amino-transférases) ont été également observées. L'examen histo-pathologique a montré des modifications hépatiques avec altération des plaques cellulaires, nécrose, apoptose, cholestase, vacuolisation cytoplasmique, infiltration leucocytaire et présence d'hépatocytes multinucléés (**Pourria et al., 1998**). Trois congénères de microcystines ont été identifiées dans les échantillons de foie, en particulier les microcystines-YR, -LR et -AR (**Azevedo et al., 2002**). Des dosages de toxines ont révélé la présence de la Microcystine-LR dans le sang (de 1 à 10 ng/ml) et les tissus de foie (0,6 mg/kg). La concentration en microcystines était de 19,5 µg/l d'eau lors d'approvisionnement du centre de dialyse en 1996 à Caruaru (**Carmichael et al., 2001**) donc la consommation par voie orale n'est pas la seule voie d'exposition aux hépatotoxines cyanobactériennes chez l'homme. Le syndrome d'intoxication de Caruaru a révélé des mortalités humaines dues à une exposition intraveineuse à ces toxines (**Jochimsen et al., 1998 ; Carmichael et al., 2001 ; Azevedo et al., 2002**). L'incident du Brésil et des cas similaires au Portugal ont fait ainsi apparaître ce sujet comme un des thèmes prioritaires dans les stratégies de protection des réservoirs d'eau. Ainsi, depuis le début de l'année 1998, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a mis en place une réglementation concernant ce type d'hépatotoxines, dont le taux maximal toléré pour une consommation orale est de 1 µg microcystine-LR par litre d'eau potable (**WHO, 1998**).

ii. Intoxications chroniques

Chez les humains, les dégâts provoqués par la consommation répétée de faibles quantités de toxines sont probablement plus fréquents que les intoxications aiguës. Les cyanotoxines de type microcystine (microcystines et nodularines) sont considérées comme de puissants promoteurs tumoraux. Elles possèdent une capacité promotrice équivalente à celle du TPA (12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate), mais leur mode d'action diffère les situe dans une nouvelle classe de promoteurs de type acide okadaïque qui n'activent pas la protéine kinase C mais agissent en inhibant les sérine/thréonine phosphatases de type 1, 2A et 3 chez les eucaryotes (**Fujiki et Suganuma, 1999**). Le pouvoir promoteur de tumeurs de ces cyanotoxines a été mis en évidence principalement au niveau du foie. Chez le rat (au 2/3

hépatectomisé), un essai biologique de cancérogenèse a montré que l'administration i.p. de la microcystine-LR (10 µg/kg) deux fois par semaine après initiation avec de la diéthylnitrosamine (DEN) à 200 mg/kg induit une promotion tumorale au niveau du foie (**Nishiwaki-Matsushima et al., 1992**). La promotion tumorale hépatique a été également montrée chez des rats non-hépatectomisés ayant reçu, après initiation avec la DEN, de la nodularine-R (25 µg/kg par voie i.p.) deux fois par semaine pendant une durée de 22 semaines (**Song et al., 1999**). Dans une étude comparative du pouvoir promoteur tumoral entre la nodularine-R et la microcystine-LR, le test de cancérogenèse hépatique (sans hépatectomie partielle) chez des rats initiés avec du DEN a montré que la nodularine-R est un promoteur tumoral plus puissant que la microcystine-LR (**Ohta et al., 1994**). Après le foie, les testicules sont le deuxième organe cible, la microcystine traverse les canaux sanguins testiculaires et interfère avec l'ADN en provoquant des dommages à la chaîne d'ADN, apoptose, et l'arrêt de cycle cellulaire. La toxicité des MC-LR perturbe la motilité et la morphologie des spermatozoïdes et affecte aussi les niveaux d'hormones de système reproducteur masculin (**Lone et al., 2015**).

Les effets toxiques de ces toxines observés au niveau cutané, des reins et des intestins, ont conduit à envisager la possibilité d'une activité cancérogène pour d'autres organes (**Bouaïcha, 2006**). **Falconer (1991)** a montré une augmentation du nombre (1,6 fois) et du poids (7 fois) des tumeurs et des ulcères cutanés sur la peau des souris ayant reçu pendant 52 jours dans l'eau de boisson, après initiation au badigeonnage avec du 7-, 12-diméthylbenzoanthracène (DMBA), un extrait de *Microcystis* sp. contenant des microcystines par rapport aux animaux témoins buvant que de l'eau du robinet. Des résultats similaires ont été observés avec l'acide okadaïque (**Suganuma et al., 1988**). Ainsi, bien que les microcystines soient supposées avoir une spécificité sur le foie, elles peuvent également avoir des effets sur des cellules de la peau et y entraîner des tumeurs. Toutefois, le mécanisme d'action n'est pas encore élucidé compte tenu de la difficulté des microcystines à pénétrer dans les cellules de l'épiderme (**Matsushima et al., 1990**). Les microcystines se sont révélées posséder également une action promotrice de tumeur au niveau du système gastro-intestinal (**Humpage et al., 2000**). La taille des cellules aberrantes, indicatrices du développement du cancer du côlon, a été significativement augmentée dans le côlon de souris initiées avec de l'azoxyméthane et ayant reçu des extraits d'algues contenant des microcystines (dose quotidienne équivalente à 382 et 693 µg/kg) dans l'eau potable (**Humpage et al., 2000**). Cependant, les microcystines ne semblent pas posséder une activité promotrice

d'adénocarcinome duodéal ou de tumeur lymphoïde chez des souris après initiation par voie orale de la N-méthyl-N-nitrosourée (MNU) (**Falconner & Humpage, 1996**). Une seule étude a été effectuée pour l'évaluation du potentiel cancérigène de la cylindrospermopsine sur des souris *albinos Swiss* mâles et qui montre bien le potentiel cancérigène de cette toxine (**Falconner et Humpage, 2001**).

Récemment, la microcystine LR a été identifiée pour la première fois dans le sérum (environ 0,228 ng MC-LR/ml) d'une population humaine après une exposition chronique (pêcheurs en lac Chaohu, Chine) avec un dommage hépatocellulaire (**Chen et al., 2009a**). Ainsi, **Mankiewicz-Boczek et al. (2011)**, ont prouvé dans leur étude la forte cytotoxicité et génotoxicité d'un extrait purifié de microcystines (MC-LR, MC-RR et MC-YR) sur des lymphocytes humaines.

II.2.2.2. Impact sur la faune

Un nombre important de cas d'empoisonnement est maintenant rapporté dans la littérature concernant les ovins et surtout les bovins (**Hayman, 1992**). Georges Francis, chimiste Australien, fut le premier, le 2 mai 1878, à impliquer les cyanobactéries dans le décès d'animaux d'élevages quand il rapporta la mort de bétail, moutons, chevaux et porcs qui avaient consommé de l'eau contenant une efflorescence hépatotoxique de *Nodularias pumigena* dans le lac Alexandrina, à Milang, dans le Sud de l'Australie (**Francis, 1878**). Les intoxications reportées par Francis sont dues probablement à la nodularine-R. Les intoxications animales par des eaux contaminées avec des cyanobactéries toxiques ont fait l'objet de plusieurs études dans le monde. Les cyanotoxines peuvent entraîner des symptômes de morbidité ou causer la mort de mammifères, d'oiseaux ou de poissons qui ingèrent une quantité suffisante de cellules toxiques ou de toxines extracellulaires (**Codd et al., 1992 ; Carmichael, 1994 ; Kuiper-Goodman et al., 1999**). **Carmichael (1992)** a rapporté la mortalité d'animaux ayant consommé de l'eau contenant de grands nombres (>106/ml) de cellules cyanobactériennes. Les animaux incapables de sélectionner leur nourriture comme les oiseaux et les poissons sont directement affectés à la fois par les hépatotoxines et les neurotoxines (**Kaebnick et Neilan, 2001**). La principale voie d'exposition des animaux aux cyanotoxines est l'ingestion. La microcystine-LR et la nodularine-R sont véhiculées par le système de transport biliaire dans le foie essentiellement, mais aussi vers les reins et l'intestin (**Eriksson et al.1990 ; Runnegar et al., 1995**). **Henriksen et al. (1997)** ont rapporté une intoxication des oiseaux d'eau dans un lac au Danemark suite à un fort développement de l'espèce *Anabaena lemmermannii* développant ainsi une neurotoxite. Une mortalité de

flamants roses a été enregistrée au lac Bogoria à Kenya suite à une exposition à des neurotoxines et des hépatotoxines de type microcystine (**Krienitz et al., 2003**). Récemment, **Nasri et al., (2008)** ont rapporté la mortalité de deux espèces de tortues *Emys orbicularis* et *Mauremys leprosa* dans le lac Oubeïra en Algérie suite à une efflorescence de *Microcystis* spp (**Figure 10**). Les concentrations en microcystines les plus importantes ont été détectées au niveau du foie représentant ainsi 87 à 98 % du total de microcystines détectés dans les organes étudiés (viscères et chaire). Le **tableau 5** montre quelques cas de mortalités signalés chez les animaux dans différents pays.



Figure 10 : Mortalité des tortues dans le lac Oubeïra en Algérie suite à une efflorescence de *Microcystis* spp. (**Nasri et al., 2008**).

Tableau 5 : Quelques cas d'intoxication animale par les cyanobactéries

Année	Pays	Animaux intoxiqués	Pathologies	Cyanobactérie	Références
1878	Australie	Moutons, chevaux, chiens, cochons	Stupeur inconscience	<i>Nodularia spumigena</i>	Francis, 1878
1952	Iowa, USA	milliers de mouettes,	Mort rapide (minutes)	<i>Anabaena flos-aquae</i>	Firkens, 1953

		560 canards, 400 foulques, 200 faisans, 50 écureuils, 15 chiens...			
1953	ex USSR	Animaux domestiques, oiseaux	Pas de description	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Vinberg, 1954
1976	Irlande	Milliers de truite	Hépatotoxiose	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Smitt, 1976
1979	Afrique du Sud	3 Rhinocéros	Nécrose du foie	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Soll & Williams, 1985
1984	Argentine	72 vaches	Hépatotoxiose	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Odriozola et al., 1984
1985	Alberta, Canada	Appr. 1000 chauves-souris, 24 colverts et canard siffleurs.	Neurotoxiose	Anabaena flos- aquae	Pybus & Hobson, 1986
1988	France	Poissons	Pas de description	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Sevrin- Reyssac et Pletikovic 1990
1989	Angleterre	20 moutons, 14	Hépatotoxiose	<i>Microcystis</i>	Pearson, 1990

		chiens		<i>aeruginosa</i>	
1991	Australie	1600moutons et bétails	Neurotoxicose	<i>Anabaena circinalis</i>	NSWBGATF, 1992
1993-1994	Danemark	Oiseaux	Neurotoxicose	<i>Anabaena lemmermannii</i>	Henriksen et al., 1997
2005	Algérie	2 espèces de tortues	Hépatotoxicité	<i>Microcystis spp.</i>	Nasri et al., 2008

a. Impact sur la faune aquatique

Les cyanotoxines engendrent des perturbations nettes dans le développement embryonnaire des alevins de poissons (**Oberemm et al., 1999**) et provoquent même des troubles physiologiques notamment cardiaque chez certains poissons (**Best et al., 2001**). Les efflorescences toxiques sont mêmes impliquées dans certains cas de mortalités de poissons (**Zimba et al., 2001**). En 1992 à Scotland, dans des rivières et des lacs, il a été observé la mort de 2000 truites brunes. Cette perte, est causée par la présence dans leur milieu de toxines d'*Anabaena flos-aquae* (**Codd et al., 2005**). Des dommages du foie caractérisés par des nécroses et des dégénérescences cellulaires avec condensation et désintégration des noyaux ainsi que de sévères altérations des branchies ont été observés (**Codd et al., 2005**). A New Hampshire (Etats-Unis d'Amérique), dans le lac Kezar, la perte de 6 tonnes de poissons, causée par une toxine inconnue produite par *Aphanozomenonflos-aquaea* été rapportée (**Humpage et al., 1994**). Dans l'Atlantique entre les côtes de Colombie Britannique et l'état de Washington (Etats-Unis), une importante mortalité de saumons a été observée (**Anderson et al., 1993**). Certaines études expérimentales effectuées chez des poissons montrent que les symptômes d'intoxication par les hépatotoxines de type microcystine dépendent de la voie d'exposition. Une injection i.p. de MCs chez *Cyprinus carpio*, *Salmo trutta* et *Onchorynchus myskiss* provoque les mêmes symptômes classiques développés chez les mammifères, une nécrose et une hémorragie hépatique (**Carbis et al., 1996 ; Bury et al., 1997**). Des mortalités de poissons ont été signalées lors des efflorescences de cyanobactéries (attribuées à une intoxication par les cyanotoxines ou à une faible oxygénation consécutive à l'augmentation de la productivité algale) ayant pour conséquence des problèmes économiques pour l'industrie aquacole (**Penaloza et al., 1990 ; Anderson et al., 1993**).**Rodger et al.(1994)** ont rapporté des mortalités de poissons dans le loch Leven en Ecosse à la suite de la présence de

microcystines pendant une efflorescence d'*Anabaena flos-aquae*. Toutes ces perturbations pourraient handicaper le fonctionnement des étangs de pisciculture et limiter l'introduction de poissons herbivores dans les retenues de barrages en vue de lutter contre l'eutrophisation.

une micro-injection de la MC-LR du 1 à 10 µg/ml dans des embryons de l'*Oryzias latipes* pendant dix jours, a réduit leur taux de survie avec 90% (**Jacquet et al., 2004**). Une autre étude sur les embryons du poisson zèbre (*Danio rerio*) qui sont exposés à 3µg/ ml de microcystine-LR pendant 24h, montre les mêmes résultats précédentes (**El Ghazali et al., 2009**), les analyses protéomiques sur ce poisson après une exposition de 2 à 20 µg/l de MC-LR pendant 30 jours ont montré que ce dernier provoque un stress oxydative, disfonctionnement du l'assemblage du cytosquelette et du métabolisme des macromolécules (**Wang et al., 2010**). De plus, **Wei et al., (2008)** suggèrent que la MC-LR peut provoquer des tumeurs et une immuno-toxicité chez les poissons.

Demott & Dhawale (1995) ont montré que les microcystines agissent sur les phosphatases des cladocères et des copépodes. Ces inhibitions peuvent se traduire par une baisse du taux de broutage et/ou une augmentation du taux de rejet des particules ingérées (**Kumayer & Jüttner, 1999**) mais aussi par une baisse de la capacité de reproduction, une diminution de la croissance et de la taille des individus ainsi qu'une réduction du taux de survie (**Arnold, 1971; Nizan et al., 1986 ; Reinikainen et al., 1999**). Les observations d'**Oudra et al. (2000)** ont confirmé l'effet de toxicité des efflorescences à *Synechocystis* vis-à-vis de certaines espèces de cladocères. En effet, des essais expérimentaux sur des lots de daphnies alimentés par des concentrations de *Synechocystis* dont montré que la reproduction et la croissance de ces cladocères sont largement affectées (**Oudra et al., 2000**).

Les perturbations induites sur les communautés algales ont un effet sur le zooplancton les consommant (**Lundstedt et Brett, 1991**). Les macrophytes ont un rôle important sur l'habitat et l'alimentation de celui-ci par l'intermédiaire du périphyton (**Schrivier et al., 1995**). Or, les cyanobactéries peuvent aussi inhiber la croissance des macrophytes (**Chauhan et al., 1992 ; Kirpenko, 1986**) et pourraient provoquer ainsi la dégradation de l'habitat du zooplancton. Le zooplancton peut consommer des cyanobactéries toxiques, qu'il soit composé d'organismes plutôt détritivores comme les protozoaires (**Cole et Wyne, 1974**), les rotifères (**Fulton et Paerl, 1987 ; Gulati et al., 1993 ; Rothhaupt, 1991**), à tendance herbivore comme les cladocères (**Demott, 1999**) ou certains copépodes (**Kumayer et Jüttner, 1999**). Quelques études récentes ont mis en évidence des phénomènes d'accumulation de ces toxines

dans les organismes zooplanctoniques (**Watanabe et al., 1992**). **Thostrup & Christoffersen (1999)** et **Kotak et al. (1996)** ont montré que le zooplancton pouvait accumuler jusqu'à 24,5 µg de microcystines par gramme de poids sec. Bien que cette dose ne présente pas une concentration létale pour le poisson, elle révèle que des phénomènes de transfert de toxines existent au niveau du réseau trophique (**Tencalla et al., 1994**). Les changements potentiels provoqués par les microcystines sur les populations zooplanctoniques pourraient engendrer un déséquilibre alimentaire pour les compartiments trophiques supérieurs et augmenter leur stress, les rendant de ce fait plus sensibles aux toxines présentes dans le milieu. La bioaccumulation de plusieurs cyanotoxines essentiellement au niveau de l'hépatopancréas de certaines espèces de mollusques et de crustacés d'eau douce et saumâtre a été rapportée par plusieurs auteurs : les microcystines chez une moule d'eau douce *Anadonta cygnee* et un genre d'écrevisse *Pascifastacus* (**Liras et al., 1998**), les nodularines chez une moule d'eau saumâtre *Mytilus edulis* (**Falconer, 1992**), les neurotoxines de type PSP chez un mollusque d'eau douce *Alathyriacondola* (**Negri et Jones, 1995**) et les cylindrospermopsines chez une espèce d'écrevisse *Chraxquadricarinatus* (**Saker et Eaglesham, 1999**). Ces accumulations sont dues soit à la consommation de cyanobactéries toxiques (**Zurawal et al., 1999**), ou à l'ingestion d'eau contaminée (**Saker & Eaglesham, 1999**).

Les microcystines ne présentent pas des effets toxiques sur l'ensemble des bactéries aquatiques dont certaines espèces sont capables de dégrader de fortes concentrations en microcystines (**Heresztyn & Nicholson, 1997; Takenaka & Watanabe, 1997; Sivonen & Jones, 1999**). Les cyanobactéries ont un large spectre d'activités contre plusieurs espèces de bactéries comme *E.coli*. D'autres espèces de cyanobactéries au contraire, favorisent le développement de certaines bactéries pathogènes. C'est le cas de *Synechocystis* qui stimule la croissance de *Vibrio cholerae* (**Mezrioui et al., 1994**). Cependant, aucun effet biocide d'extrait de *Microcystis aeruginosa* ou de la microcystine-LR purifiée n'a été observé sur certaines bactéries telles que *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ou *Pseudomonas hydrophila* (**Kreitlow et al., 1999**). D'ailleurs, il est aussi possible qu'une lente libération de toxines à partir de cellules cyanobactériennes puisse stimuler des associations de certains types de bactéries qui peuvent agir en tant que symbiontes (**Sivonen et Jones, 1999**). Il a été également démontré que les hépatotoxines, libérées dans le milieu suite à la lyse cellulaire, peuvent s'accumuler et inhiber l'activité photosynthétique des plantes supérieures aquatiques (**Codd et al., 1989**).

II.2.2.3. Impact sur la flore

Quoique les végétaux soient un itinéraire significatif pour l'exposition aux toxines cyanobactériennes, ils suscitaient moins d'attention que les animaux (NRA, 1990; Abe et al., 1996; Codd et al., 1997). Les tissus végétaux peuvent être contaminés par les toxines intracellulaires si ces dernières sont dégagées lors de la lyse des cellules cyanobactériennes (Codd et al., 1999).

Comme la plupart des organismes aquatiques, les plantes aquatiques sont aussi confrontées à l'exposition aux cyanotoxines. Il a été remarqué que l'abondance et la diversité des macrophytes connaissent une nette réduction en présence de blooms de Cyanobactéries (Casanova et al., 1999). Ceci a été expliqué par les changements dans les conditions environnementales liées à la prolifération massive des Cyanobactéries, qui se résument dans la réduction de la lumière et de l'oxygène et l'acidification du milieu (Romanowska-Duba & Tarczyńska, 2002). Cependant, d'autres travaux ont montré que le facteur le plus déterminant durant l'apparition des Cyanobactéries, est la libération des cyanotoxines, qui peuvent persister même après le déclin du bloom. Cependant les études faisant références à la phytotoxicité des Cyanobactéries en milieu aquatique sont encore à leur début. Ce n'est qu'en 1986 que Kirpenko a montré pour la première fois l'inhibition de la croissance des plantes aquatiques *Elodea sp.* et *Lemna sp.* par les toxines isolées à partir d'un bloom naturel. Cette action allélopathique a été confirmée par Weiss et al. (2000) suite à la co-culture de la plante *Lemna minor* avec les cellules de *Microcystis aeruginosa*.

Des travaux encore plus récents ont rapporté l'effet négatif des cyanotoxines sur la biologie et la physiologie (la croissance, la photosynthèse, l'accumulation des toxines, stress oxydatif,...etc.) de différentes espèces de la famille des lemnacées ; *Lemna gibba*, *Lemna minor* et *Lemna japonica* (Tableau 6) (Weiss et al., 2000 ; Saqrane et al., 2007 ; Jang et al., 2007). Les microcystines sont aussi des inhibiteurs spécifiques des protéines phosphatases 1 et 2A qui jouent un rôle essentiel dans plusieurs processus physiologiques, comme la production photosynthétique des glucides et le maintien de l'activité chlorophyllienne (Kurki-Helasma & Meriluoto, 1998 ; Weiss et al., 2000). L'effet métabolique des microcystines se manifeste aussi par un changement de l'activité de l'ARNase et de l'acide phosphatase ainsi que par une réduction dans la teneur en chlorophylle (*a+b*) chez la plante aquatique *Spirodella oligorrhiza* (Romanowska-Duda & Tarczyńska, 2002).

Plusieurs études ont montré que la Microcystine-LR peut être accumulée par d'autres macrophytes aquatiques, particulièrement *Ceratophyllum demersum*, *Elodea canadensis*, *Vesicularia dubyana*, et *Phragmites australis* (Pflugmacher et al., 1998, 1999, 2001 ;

Pflugmacher, 2004). L'exposition pendant cinq jours à une concentration de 10 mg. L-1 en MC-LR a conduit à l'accumulation de 0,11 et 0,04 µg MC-LR. g-1 respectivement par *Lemna minor* et *Chladophora fracta* (**Mitrovic et al., 2005**). L'activité de la peroxydase (POD) a augmenté significativement après l'exposition de ces deux plantes aquatiques à une concentration de 25 µg/ml d'anatoxine-a (**Mitrovic et al., 2004**). Les macrophytes qui sont capables d'accumuler ces toxines, peuvent permettre leurs transfert dans le réseau trophique aussi bien aquatique que terrestre (**Pflugmacher et al., 1999**).

La métabolisation des cyanotoxines et la possibilité du stress oxydatif dans les plantes ont été étudiées par plusieurs auteurs (**Chen et al., 2004 ; Pinho et al., 2005**). Cependant, il y a peu de travaux qui sont connus sur la distribution des toxines dans les plantes et la signalisation de leurs effets par l'intermédiaire des ROS. Le stress oxydatif est lié principalement à la formation des ROS qui sont constamment régénérés à l'intérieur de la cellule en tant que produits normaux du métabolisme cellulaire (**Foyer et al., 1994**), mais ils peuvent être également produits comme sous-produits des réactions de biotransformation des toxines (**Polle, 2001**). Le stress oxydatif se produit uniquement si le niveau des ROS dépasse la capacité antioxydante de la plante. Chez *Ceratophyllum demersum*, l'exposition à MC-LR a entraîné la formation du peroxyde d'hydrogène, qui fait augmenter l'activité des enzymes antioxydantes, réduisant ainsi le peroxyde d'hydrogène. Pour empêcher les dommages cellulaires causés par les ROS, les cellules développent un système de protection par implication des enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase (SOD), la glutathionne peroxydase (GPx), l'ascorbate peroxydase (APX), la catalase (CAT) et la glutathionne réductase (GR). L'élévation de ces antioxydants indique indirectement la formation des ROS et la détoxification continue dans la plante (**Pflugmacher, 2004**). L'exposition des plantes aux microcystines peut aussi affecter l'activité des enzymes glutathionne S- transférase (GST) et GPX qui jouent un rôle très important dans la protection des plantes contre les dangers des xénobiotiques (**Pietsch et al., 2001**). Pour la cellule animale, **Gehring et al. (2003)** ont démontré le rôle de la GPX dans la diminution de la MC-LR par la peroxydation des lipides dans le foie des souris exposées. La détoxification de la MC-LR dans le foie se manifeste par la conjugaison de la MC à la glutathionne (**Kondo et al., 1996**) par l'action de la GST (**Pflugmacher et al., 1998**). La plante peut à son tour se débarrasser de la MC-LR par le même mécanisme utilisé dans la cellule animale (**Gehring et al., 2003**). **Pietsch et al. (2001)** montrent que la MC-LR pure augmente l'activité de la GST soluble dans la microalgue *Scenedesmus aramatus*, et la macrophyte *Ceratophyllum*

demersum exposées à 0,25 µg/L respectivement pendant 1 et 24h. **Wiegand et al. (2002)** expliquent que l'exposition à 50 µg/L de MC-LR pendant 24h augmente l'activité de la GST dans la mousse aquatique *Vesiculana dubyana*, et diminue son activité photosynthétique. Ainsi l'activation de la GST et la GPX par MC-LR a été confirmée par **Gehring et al. (2003)** sur *Lepidium sativum*. **Pflugmacher et al. (1998)** ont montré la présence d'un composé de conjugaison de la glutathionne et la MC-LR formé par l'intermédiaire de la GST dans divers organismes aquatiques de nature végétale (*Ceratophyllum demersum*), animale (*Dreissena polymorpha*), invertébrés (*Daphnia magna*) et poissons (*Danio rerio*). La formation de ce complexe semble être la première étape dans la détoxification d'un organisme vivant des toxines de cyanobactéries.

L'exposition des lentilles d'eau (*Lemna giba*) à des concentrations de microcystines allant de 0,075 à 0,3µg équivalent MC-LR/ml, durant 12 jours, a conduit à la réduction de leurs croissance de 55% et de la teneur en *chl (a+b)* de 65%. Les plantes traitées par les microcystines ont également réagit par un changement quantitatif et qualitatif au niveau des composés phénoliques et de l'activité des POD. En plus des microcystines détectées dans les tissus des plantes en question, ces dernières sont suspectées de pouvoir les bio-transformer en un métabolite retrouvé dans l'extrait des cellules de *Limna giba* exposée aux microcystines (**Saqrane, 2008**).

Les investigations concernant les plantes terrestres sont aussi très récentes (**tableau 7**). Ce n'est qu'en 1995 que **Kòs et al.** ont observé pour la première fois l'inhibition de la croissance chez la moutarde blanche *Sinapsis alba* par les microcystines. Par la suite, **Kurki-Helasma & Meriluoto (1998)** ont confirmé, par marquage isotopique de la toxine, l'inhibition de la croissance de *Sinapsis alba* par la MC-LR. Un autre travail sur la moutarde blanche effectué par **M-Hamvas et al. (2003)** ont montré l'effet inhibiteur de la MC-LR sur la croissance et le développement des racines exposées à une concentration de 3 à 30 µg/mL.

Il a été démontré que les cellules de *Microcystis aeruginosa* persistent sur les feuilles de la laitue (*Lactuca sativa*) irriguées, pendant 10 jours, par une eau contenant les cellules de *Microcystis* toxique (**Codd et al., 1999**). Depuis une quinzaine d'années, des investigations relatives à l'interaction plantes-cyanobactéries ont confirmé que les plantes terrestres peuvent aussi accumuler ces toxines dans leurs tissus suite à l'utilisation des eaux contaminées par les cyanotoxines dans l'irrigation (**NRA, 1990 ; MacKintosh & MacKintosh, 1994 ; Codd et al., 1997 ; Abe et al., 1996**).

Tableau 6 : Effets phytotoxiques des cyanotoxines sur la physiologie et la biologie des plantes aquatiques (Saqrane et *al.*, 2008)

Cyanotoxines	Concentrations	Plantes testées	Effets	Références
MC-RR	3 et 5 mg/L	<i>Lemna minor</i>	Diminution de la teneur en chlorophylle <i>a</i> et <i>b</i> et des caroténoïdes totales. Inhibition de la croissance de la plante	Weiss et <i>al.</i>, 2000
MC-LR	0,1 et 0,2 µg/L	<i>Spirodella oligorrhiza</i>	Diminution de la teneur en chlorophylle <i>a</i> et <i>b</i>	Romanowska-Duda & Tarczyńska, 2002
MC-LR	0,5 µg/L	<i>Myriophyllum spicatum</i>	Inhibition de la photosynthèse	Pflugmacher, 2002
MC-LR	[0,1-1 µg/L]	<i>Ceratophyllum demersum</i>	Inhibition de la croissance Changement dans le rapport chlorophylle <i>a</i> et <i>b</i>	Pflugmacher, 2004
MC-LR	[0,1-50 µg/L]	<i>Lemna gibba</i>	Aucun effet significatif sur la chlorophylle ni sur la croissance des frondes	Le Blan et <i>al.</i>, 2005
Extrait de MC-RR et MC-WR	[0,07-0,3 µg/ml]	<i>Lemna gibba</i>	Inhibition de la croissance Stress oxydatif Réduction e la teneur en chlorophylle <i>a</i> et <i>b</i>	Saqrane et <i>al.</i>, 2007

La croissance et le contenu chlorophyllien de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) ont été inhibés par la microcystine-LR à 0,005 et 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ respectivement. De plus, la microcystine-LR, RR et LF ont inhibé la croissance de la moutarde blanche (*Sinapis alba* L.) avec des CI_{50} de 1,9, 1,6 et 7,7 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ respectivement. Il s'est également avéré que la croissance racinaire du haricot (*Phaseolus vulgaris*) diminuait de 30% après l'exposition à la microcystine-LR pendant 18 jours. Le fait de détecter ces toxines dans les tissus des trois plantes exposées suscite des réflexions sur les risques sur la santé humaine pouvant être liés (McElhiney et al., 2001).

L'extrait sec d'un bloom à cyanobactéries prélevé au lac Dianchi, Sud-Ouest de la Chine, a été utilisé afin d'étudier l'effet des microcystines sur le colza (*Brassica napus* L.) et le riz (*Oriza sativa* L.). L'exposition des graines de ces espèces végétales à différentes doses de la toxine (de 0,024 à 3 μg MC-LR/ml) a conduit à l'inhibition de la germination et l'élongation des tiges et des racines primaires. Cependant, cet effet était plus important sur le colza. La détermination de l'activité de la peroxydase (POD) et le superoxyde dismutase (SOD) a démontré que l'effet des microcystines sur ces plantes se manifeste également par un stress oxydatif. Enfin, le dosage des microcystines par le test ELISA au niveau des plantes exposées mène à réfléchir sur les risques sanitaires qui y s'associent. De plus, les différences significatives retrouvées entre les deux plantes suggèrent l'existence de mécanismes de tolérance envers les microcystines (Chen et al., 2004).

Les effets potentiels de l'accumulation de MC-RR par les plantes ont été étudiés par Yin et al. en 2005, ce congénère de microcystines est différemment accumulé par les feuilles et les racines des plantules de *Vallisneria natans*. Un travail plus récent a montré que la MC-LR a été détectée au niveau des racines à des concentrations allant de 0,9 à 2,4 et de 2,5 à 2,6 ng/g du poids frais respectivement chez le brocoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) et la moutarde (*Sinapis alba*) (Järvenpää et al., 2007). Peuthert et al. (2007) ont confirmé que les plantes cultivées irriguées par l'eau contenant les cyanobactéries peuvent accumuler les microcystines à différentes concentrations. Cette étude a concerné les plantes les plus couramment consommées par l'Homme et l'animal telles que les petits pois (*Pisum sativum*), pois-chiche (*Cicer arietinum*), le haricot (*Phaseolus vulgaris*), la luzerne (*Medicago sativa*).

Les résultats obtenus par Saqrane en 2008 viennent confirmer l'effet phytotoxique des microcystines. En effet, son étude confirme la sensibilité de *Pisum sativum* vis-à-vis des microcystines par rapport à *Zea mays*, *Triticum durum* et *Lens esculenta*. Cette dernière espèce végétale semble la moins sensible ; son taux de germination n'a été réduit que par

25,33% alors que celui de *Pisum sativum* a diminué de 97 %. *Zea mays* et *Triticum durum* présentent une sensibilité intermédiaire avec respectivement des pourcentages de réduction de 28,67% et 59,33%.

Toutes ces études ont fait preuve des risques sanitaires potentiels et fortement liés à la bioaccumulation et le biotransfert des cyanotoxines dans les diverses chaînes trophiques.

Tableau 7: Effets phytotoxiques des cyanotoxines sur le comportement physiologique de quelques plantes terrestres (Saqrane et al., 2008)

Cyanotoxines	Concentrations	Plantes testées	Effets	Références
MC-LR	[3-30µg/mL]	<i>Sinapsis alba</i>	Effet négatif sur l'activité de la désoxyribonucléase	M-Hamvas et al., 2003
MC-LR	22µg/mL	<i>Sinapsis alba</i>	Apparition des nécroses au niveau des tissus des cotylédons	M-Hamvas et al., 2003
MC-LR	10µg/mL	<i>Lepidium sativum</i>	Inhibition de la croissance des racines et des feuilles Diminution du poids frais de la plante	Gehringer et al., 2003
Extrait de bloom naturel	[0.024-3 µg équivalent-MC-LR/mL]	<i>Brassica napus L.</i> et <i>Oryza sativa L.</i>	Inhibition de la germination Inhibition de la croissance et le développement des jeunes plantules, Induction du stress oxydatif	Chen et al., 2004
Extrait de bloom naturel (Takerkoust)	[1,6-11,6 µg équivalent-MC-LR/mL]	<i>Lens esculenta</i> <i>Zea mays</i> et <i>Triticum durum</i>	Inhibition de la germination et de la croissance et perturbation de l'assimilation des éléments nutritifs Anomalie dans la structure	Saqrane et al., 2008

		<i>Pisum sativum</i>	
--	--	----------------------	--

II.2.3. Contamination des réseaux trophiques par les cyanotoxines

Les organismes vivant dans/près des eaux où prolifèrent des cyanobactéries productrices de microcystines peuvent se contaminer de manière directe par celles dissoutes dans l'eau (ou adsorbées sur les sédiments) et par celles intracellulaires (en consommant des cyanobactéries toxiques), et de manière indirecte par les microcystines accumulées dans leurs proies (transfert trophique). L'importance relative des différentes sources de contaminations, variant selon l'espèce, est résumée dans le schéma ci-dessous. (**Figure 11**)

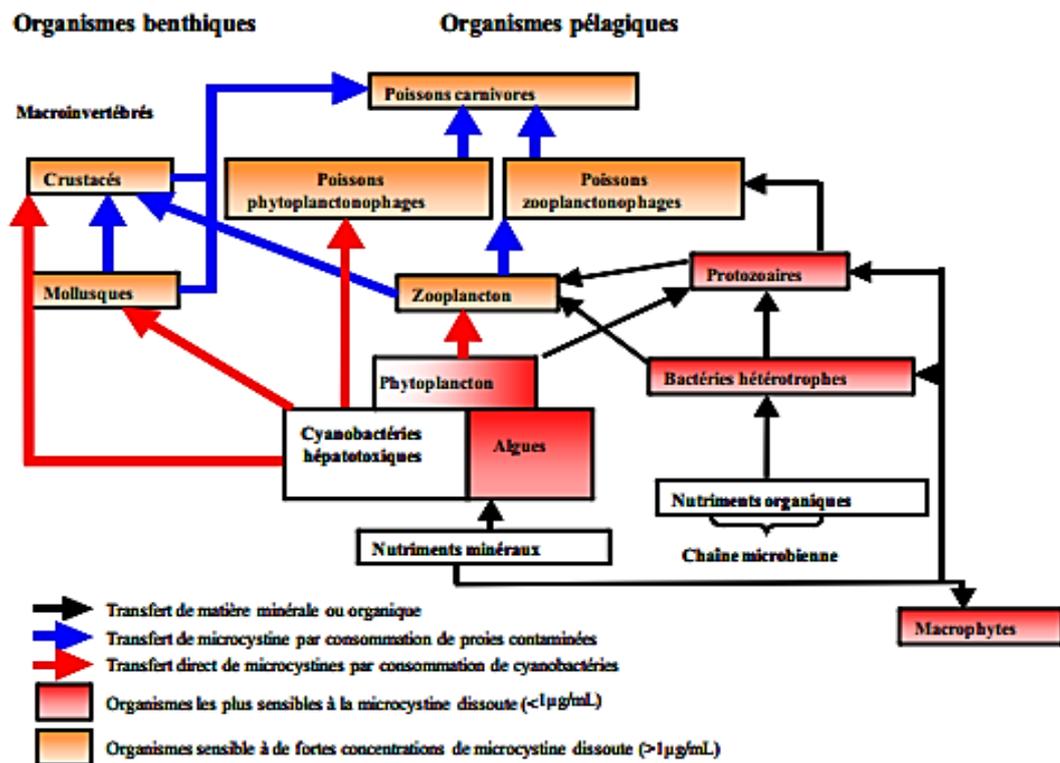


Figure 11 : Schéma simplifié des biocénoses dulcicoles et voies de contamination par les microcystines (Lance, 2009)

II.2.3.1. Contamination directes par les microcystines présentes dans le milieu

Sous formes dissoutes ou adsorbées sur les sédiments ou de particules alimentaires, les MCs pénètrent dans les organismes via l'eau de boisson, la peau ou les branchies (**Hyestrand**

et al., 2003). De manière générale, il existe une relation allométrique pour la concentration de toxine dissoute tolérée et les petites espèces (algues, bactéries, protozoaires, etc.) ainsi que les macrophytes semblent plus sensibles que les espèces de moyenne (zooplanctons) ou de grande taille (macro-invertébrés et les poissons) (**Christoffersen, 1996**). Les MCs inhibent la croissance et la photosynthèse de certaines espèces de phytoplanctons. Chez les macrophytes, l'absorption de ces molécules toxiques engendre une réduction des taux de croissance et de germination, induit des changements morphologiques (réduction du nombre des feuilles) et physiologiques (changement dans les ratios de chlorophylles a et b) et entraîne un stress oxydant c'est le cas de *Ceratophyllum demersum* et *Lemna minor* (**Wiegand & Plufgmacher, 2005 ; Mitrovic et al., 2005 ; Zurawell et al., 2005 ; Saqrane et al., 2007**). De même la toxicité des MCs dissoutes a été démontrée sur les protozoaires (réduction du taux de croissance des flagelles, inhibition du taux de respiration) (**Christoffersen, 1996**). Par contre, les poissons se montrent globalement peu sensibles à des expositions de MCs dissoutes de concentration proches de celles des milieux naturels (**Tencalla et al., 1994 ; Landsberg, 2002**). De manière générale, les zooplanctons, les macroinvertébrés et les poissons se contaminent principalement par ingestion de cyanobactéries toxiques (**Ibelings & Chorus, 2007 ; Wiegand & Plufgmacher, 2005 ; Malbrouk & Kestemont, 2006**). Chez l'homme, **Dawson (1998)**, suggère qu'une consommation régulière d'eau contaminée pourrait favoriser des cancers du foie et du tube digestif. L'OMS, en **1999**, a fixé une concentration maximale des hépatotoxines de 1µg MC-LR/l d'eau potable.

II.2.3.2. Contamination directe par ingestion des cyanobactéries toxiques

De nombreux travaux mettent en évidence l'ingestion de cyanobactéries toxiques par le zooplancton (Rotifères, Copépodes et Cladocères), consommateurs primaires au sein du réseau trophique (**Lampert, 1987 ; Rothhaupt, 1991 ; DeMott, 1999 ; Thostrup et Christoffersen, 1999 ; Rohrlack et al., 2001**). Cependant, certaines espèces de Copépodes et de Rotifères présentent des adaptations comportementales (i.e. tri des souches non toxiques de cyanobactéries) qui augmentent leur capacité à coexister avec les algues bleu-vertes toxiques, c'est le cas des Copépodes (**Fulton & Paerl, 1987 ; Pearl et al., 2001**). La sélection des particules alimentaires par filtrage actif est courantes chez les Copépodes (**Fulton & Paerl, 1987**), alors que la plupart des Cladocères (Daphnies) font un filtrage passif et sont incapables de trier les particules alimentaires (**Rohrlack et al., 1999**). En présence de cyanobactéries toxiques, les Daphnies se protègent en inhibant leur filtration et en augmentant les rejets post-abdominaux, et diminuent fortement leur alimentation. Ainsi, en milieu naturel,

les blooms sont souvent associés au déclin des populations de grands Cladocères et au développement des populations de Copépodes et Rotifères (**Pearl et al., 2001**). Néanmoins, les études sur les zooplanctons sont nombreuses et parfois controversées du fait de l'hétérogénéité des souches de cyanophycées utilisées, et des larges différences entre les espèces (**Yanuso & Sugaya, 1998**).

Au sein des macro-invertébrés aquatiques (crustacés, mollusques et insectes), les données disponibles suggèrent que l'ingestion de cyanobactéries serait la voie prédominante d'intoxication (**Wiegand & Pflugmacher, 2005**). **Liras et al. en 1998** ont trouvé les cyanobactéries dans l'estomac de 99% des écrevisses (*Pacifastacus lemusculus*) après un bloom massives des algues bleu-vertes. Les cyanobactéries toxiques ont aussi un impact écologique sur les bivalves car elles peuvent favoriser les espèces capables de trier les souches toxiques des non toxiques. Ainsi, certains bivalves ont la capacité de trier les particules ingérées et parfois rejeter sélectivement les cyanobactéries toxiques c'est le cas du *Planctothrix agardhii* qui est prélevés par *Anodonta anatina* mais son taux d'ingestion est faible car elle est fortement rejetée dans les pseudofaeces (**Bontes et al., 2007**). **Juhel et al., en 2006**, ont remarqué que les dreissenes sont également capable de détecter la toxicité des cyanobactéries et éviter leur ingestion par réduction des taux de filtration et augmentation du taux de rejet. Cependant, **Naddafi et al. en 2007** suggèrent que cette ingestion dépend de la taille du bivalve ainsi que de la cyanobactérie, filamenteuse ou coloniale.

Les cyanobactéries peuvent constituer une source de nourriture pour certains poissons herbivores comme le cas de l'*Aphanizomenon* pour le gardon (**Kamjunke et al., 2002**). **Carbis et al. (1997)** ont montré qu'elles sont la principale source de nourriture d'une population de carpe exposée à des blooms de *M. aeruginosa*. Cependant, certaines espèces de poissons semblent co-exister avec les cyanobactéries par adaptation similaires à celles rencontrées chez les zooplanctons et les bivalves, le tilapia (*Oreochromis* sp.) et la carpe argentée *Hypophthalmichthys molitrix* diminuent leur activité de broutage quand la proportion de *Microcystis* dans le phytoplancton augmente. La reconnaissance des cellules toxiques est effectuées via des composants membranaires des cyanobactéries (**Beveridge et al., 1993 ; Keshavanta et al., 1994**). D'après l'étude de **Xie et al., (2007)** sur plusieurs espèces de poissons d'un lac tempéré dont *Carassius auratus* et *Cyprinus carpio*, le taux de broutage diminue progressivement au fur et à mesure que le pourcentage de cyanobactéries toxiques augmente. D'une autre part, les poissons zooplanctophages, tel que l'épinoche, se nourrissent moins lors de la prolifération algale, en raison d'un accroissement de la turbidité de l'eau et d'un encombrement des branchies (**Engeström-Öst et al., 2006**).

II.2.3.3. Accumulation de MCs et impact dans le réseau trophique aquatique

Chez le zooplancton (Rotifères, Copépodes et Cladocères), l'accumulation de MCs est souvent conséquente, et varie de 0,3 à 3900 $\mu\text{g MCs g}^{-1}$ DW (Watanabe et al., 1992 ; Ferrao-Filho et al., 2002). Dans un lac eutrophe, environ 80% du zooplancton contient des MCs, avec une moyenne estivale de 63 à 211 $\mu\text{g MCs g}^{-1}$ DW et un maximum de 1352 $\mu\text{g MCs g}^{-1}$ DW (Ibelings et al., 2005). De plus, les MCs ont un impact négatif sur les taux de survie, la croissance et la reproduction du zooplancton (Lampert, 1987 ; Rothhaupt, 1991 ; DeMott et al., 1991 ; Thostrup & Christoffersen, 1999 ; Rohrlack et al., 2001). Chez les cladocères, la croissance et la reproduction sont affectées et le temps de survie est inversement proportionnel aux taux d'ingestion de cyanobactéries toxiques (Rohrlack et al., 2001).

Concernant les invertébrés, des mortalités de Chironomidae, d'Oligochaetes, d'écrevisses (*Orconectes limosus*) et de bivalves (*Anodonta piscinalis* et *Unio tumidus*) ont été observées en Pologne durant un épisode intense de prolifération de cyanobactéries toxiques en 1992 (Codd et al., 2004). En France, une étude révèle que les mollusques bivalves sont très affectés par la présence de cyanobactéries productrices de MCs (Gérard et al., 2008). Certaines espèces semblent plus résistantes aux MCs comme *Anodontacygne* qui accumule de fortes quantités de MCs sans impact (Eriksson et al., 1989).

Cependant, l'impact des MCs sur les bivalves a été peu étudié et la plupart des études reportent uniquement l'accumulation et la détoxification. Falconer et al. (1992) ont signalé que *Mytilus edulis* a pu accumuler jusqu'à 90 mg/g DW (dose largement létale pour les souris) après des blooms algaux dans un estuaire australien soumis à l'eutrophisation, ce qui les rendant particulièrement impropre à la consommation. La détoxification n'est pas toujours totale et dépend de la quantité de MCs accumulée ainsi que de l'espèce de bivalve considérée.

Les crustacés accumulent des MCs mais semblent moins sensibles à leurs effets toxiques que les autres macro-invertébrés. Vasconcelos et al. en 2001, ont montré que l'écrevisse américaine *Procambarus clarkii* ingère des cyanobactéries *Microcystis* sp. sans impact sur la croissance, mais avec une accumulation de MCs jusqu'au 2,9 $\mu\text{g/g}$ de MC dans les intestins et la glande digestive. Pendant la période de dépuración, les MCs sont pratiquement éliminées en 23 jours. D'autre part, les écrevisses nourries avec des souches toxiques ont une meilleure croissance que les écrevisses à jeun, et les tests de toxicité aiguë montrent une faible mortalité des larves exposées (au max de 35% en 48h). De même, 50%

des écrevisses (*Pacifastacus lemusculus*) accumulent des toxines dans leur glande digestive après 14j d'ingestion de cellules toxiques de *P. agardhii*, sans qu'aucune mortalité ou effets négatifs ne soient observés (**Liras et al., 1998**). Cependant, un impact physiologique des MCs (inhibition des ATPases, augmentation de l'activité de GST) sur les branchies du crabe *Chasmagnatus gnatus* a été observé par **Vinagre et al. en 2002**. L'accumulation de MCs a aussi été démontrée chez des crevettes (*Palaemon modestus* et *Macrobrachium nipponensis*) d'un lac eutrophe soumis à des blooms intense et réguliers (**Chen et Xie, 2005**), avec comme sites principaux d'accumulation, la glande digestive et la gonade, mais aussi, les œufs (8 à 29% des MCs dans les œufs).

Chez les poissons, de nombreuses études reportent l'accumulation des MCs, accompagnée d'impact physiologique et histologique (**Ernest et al., 2005, 2006, 2007**). La concentration est souvent plus importante dans le foie et le tube digestif, modérée dans les reins et les gonades, et plus faible dans les muscles mais il existe de grande variations entre les espèces (**Malbrouck & Kestemont, 2006**). L'accumulation dépend des modalités d'exposition (intensité et durée), à court et à long terme, et des processus d'élimination. Une étude menée sur des stades juvéniles de carpe (*Cyprinus carpio*) exposés deux années consécutives à des MCs dissoutes (stimulation de libération naturelles annuelles lors des blooms) a montré une augmentation de l'activité enzymatique de détoxification lors de deuxième exposition. Il y'aurait alors une meilleure tolérance chez les organismes régulièrement exposés (**Palikova et al., 2004**). En milieu naturel, des mortalités massives ont été associées à l'occurrence de blooms toxiques (**Rodger et al., 1994**), **Acou et al. (2008)**, révélés une contamination par les MCs de 50% des anguilles prélevés dans un site en Bretagne (Frémur) affectant leur condition (quantité de réserves lipidiques) avant la migration.

II.2.3.4. Contamination indirecte par ingestion de proies contaminées

Les MCs, dont nous venons de décrire l'accumulation chez un grand nombre d'organisme, peuvent être transmises le long des chaînes trophiques aquatiques et terrestres. Un transfert de MCs a été supposé suite à une importante mortalité de saumons d'élevage liée à l'ingestion de copépodes et de larves de crabes ayant accumulé des MCs (**Williams et al., 1997b**). en milieu naturel, l'hypothèse d'une contamination des poissons omnivores ou carnivores par transfert trophique a déjà été relatée chez plusieurs espèces (**Ibelings et al., 2005 ; Gkelis et al., 2006 ; Xie et al., 2005, 2007**) mais peu d'étude l'ont clairement établi.

Ibelings & Chorus en 2007, distinguent trois types de devenir des MCs dans les réseaux trophiques :

- 1- La **bioaccumulation** : lorsque la concentration de MCs chez un organisme excède celle dans les cyanobactéries.
- 2- La **biomagnification** : lorsque la concentration de MCs en progressent dans le niveau trophique.
- 3- La **biodilution** : lorsque la concentration de MCs diminue en progressant dans le niveau trophique.

Ibelings et al. (2005) ont mis en évidence une présence de MCs à tous les niveaux trophiques (cyanobactéries, zooplanctons, bivalves, poissons zoophages malacophage et piscivores), mais aucune biomagnification n'a été observée. Selon ces auteurs, les MCs auraient plutôt tendance à subir une biodilution en raison des processus de détoxification ayant lieu en chaque niveau trophique. En effet, en laboratoire, **Lauren-Määttä et al. (1995)** n'ont pas détecté de MC-LR chez les larves de diptère (*Chaborus sp.*) nourries avec des zooplanctons (*Daphnia pulex*) contaminés. Les auteurs supposent que la MC-LR au moins (96,5%) a été métabolisée (ou excrétée) par les diptères. Une autre explication à l'absence de biomagnification entre les poissons planctophages et carnivores est proposée par Fisher et Dietrich (2000). Selon ces derniers, l'accumulation de MC devrait être moins importante chez les espèces carnivores comparé aux planctophages en raison de variations dans les capacités d'absorption intestinale : poisson herbivore accumulerait plus de MC qu'un carnivore car il prélève l'intégralité de la toxine du bol alimentaire grâce à un iléon long et de large surface (les carnivores ont un iléon court donc absorberaient moins de toxines lors de la consommation de proies contaminées). Cependant, **Xie et al. en 2007** montrent que l'accumulation de MC est relativement faible dans les organes de la carpe argenté planctonivore alors qu'elle est importante chez les poissons omnivores et prédateurs. Néanmoins, les MCs liées de manière covalente ont très rarement été prise en compte et pourraient engendrer un transfert non négligeable qui passerait inaperçu lors des dosages avec les techniques classiques utilisés.

Le transfert des MCs à l'homme est possible via la consommation de crustacés ou de poissons contaminés (**Ibelings et Chorus, 2007**). Ainsi, dans la baie de Sepetiba au Brésil, un suivie de 11 mois des quantités de MCs dans les crevettes, crabes et muscles de poissons, a permis de monter une accumulation supérieure à la limite autorisée par L'OMS (**tableau 8**)

(Magalhaes et al., 2003). Les MCs peuvent également se fixer sur, et s'accumuler dans, des salades arrosées avec de l'eau contaminée (Codd et al., 1999). Le riz est aussi une source de d'intoxication lorsque des blooms de cyanobactéries se développent dans les rizières. De même, la consommation des suppléments alimentaires à base de cyanobactéries (dont le genre *Spirulina*) présente une source potentielle d'exposition et est soupçonnée d'être à l'origine d'un cas de décès aux Etats Unis (Dietrich et Hoeger, 2005).

Tableau 8 : Présence de MCs dans la faune aquatique consommée par l'homme

Organisme	Organe/ Tissues	Conc. De Toxine (µg/g)	Dose journalière (µg/d)	TDI	Référence	
Poissons : <i>Odontesthes bonariensis</i> <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> <i>Cyprinus carpio</i> <i>Tilapia rendalli</i> <i>Unidentified fish spp.</i> <i>Oreochromis niloticus</i> <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> <i>Platichthys flesus</i> <i>Rutilus rutilus</i> <i>Unidentified fish spp.</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Muscle	0.05/0.34	5.0/34.0	1.8/12.1	Cazenave et al., 2005	
	Muscle	0.00025-0.097	0.0025-0.97	0.009-3.5		
	Muscle	0.038	3.8	1.6	Chen et al., 2005	
	Muscle	0.002-0.337	0.72-101.1	0.3-42.1		
	Muscle	0.04	11.9	5.0	Li et al., 2004	
	Muscle	0.102	10.2	3.6		
	Muscle	0.0016	0.79	0.3	Magalhaes et al., 2001	
	Muscle					
	Muscle	0.0005-0.1	0.075-1.5	0.03-0.6	Magalhaes et al., 2003	
	Muscle	0.0004-0.2	0.06-3	0.05-1.3		
	Muscle	0.0007-0.025	0.08-1.9	0.03-1	Mohamed et al., 2003	
	Muscle	0.035	10.5	3.7		
						Shen et al., 2005
						Sipia et al., 2006
					Sipia et al., 2006	
					Van Buynder et al., 2001	
					Wood et al., 2006	
Moules <i>Anodonta woodiana</i>	patte /muscle	0.009/0.026	2.7/7.8	1.1/3.3	Chen et Xie, 2005a	
<i>Hyriopsis cumingii</i>	Patte/	0.022/0.039	6.6/11.7	2.8/4.9		

<i>Cristaria plicata</i>	muscle				Chen et Xie, 2005a
	patte/	0.01/0.023	3.0/6.9	1.3/2.9	Chen et Xie, 2005a
	muscle				Chen et Xie, 2005a
<i>Lamprotula leai</i>	patte/	0.021/0.058	6.3/17.4	2.6/7.3	Chen et Xie, 2005a
	muscle				Chen et Xie, 2005a
<i>Anodonta woodiana</i>	Tous	0.064	19.2	8	Chen et Xie, 2005a
<i>Hyriopsis cumingii</i>	Tous	0.188	56.4	23.5	Chen et Xie, 2005a
<i>Cristaria plicata</i>	Tous	0.096	28.8	12	Chen et Xie, 2005a
<i>Lamprotula leai</i>	Tous	0.131	39.6	16.5	Chen et Xie, 2005a
<i>Unidentified mussels</i>	Tous	0.247	4.8	1.7	Saker et al., 2004
<i>Unidentified mussels</i>	Tous	2.5	0.8-48.2	0.3-7.2	Van Buynder et al., 2001
Écrevisse	Muscle	0.103	31.0	12.9	Magalhaes et al., 2003
<i>Unidentified crab spp.</i>	Muscle	0.005/0.010	1.5/10.8		Chen et Xie, 2005b
<i>Procambarus clarkia</i>					
Crevettes :	Muscle	0.006/0.026	1.8/7.8	0.8/3.3	Chen et Xie, 2005b
<i>Palaemon modestus</i>	Muscle	0.004/0.012	1.2/3.6	0.5/1.5	Chen et Xie, 2005b
<i>Macrobrachium nipponensis</i>	Tous	0.114	34.2	14.3	Chen et Xie, 2005b
	Tous	0.051	15.3	6.4	Chen et Xie, 2005b
<i>Palaemon modestus</i>					Chen et Xie, 2005b
<i>Macrobrachium nipponensis</i>	Chair	0.205	2.1	1.8	Chen et Xie, 2005b
	Chair	0.005-0.022	0.13-0.55	0.05e0.2	Saker et al., 2004
<i>Unidentified prawns</i>					Van Buynder et al., 2001
<i>Unidentified prawns</i>					

II.3. Les cyanobactéries et les cyanotoxines : contrôle et moyens de lutte

Le risque pour la santé humaine est difficile à évaluer, puisque les effets liés à l'exposition aux cyanotoxines ne sont pas encore totalement élucidés. L'exposition orale par

consommation d'eau potable (**Falconer, 1996, 1999**), l'utilisation d'eau à des fins récréatives (**Pilotto et al., 1997**) et la consommation d'aliments contenant des cyanobactéries (**Gilroy et al., 2000**) ne sont pas les seules voies de contamination. La voie intraveineuse contribue aussi à engendrer un risque non négligeable comme il a été constaté après la mort des patients recevant des eaux contaminées avec des microcystines dans un centre de dialyse au Brésil en 1996 (**Jochimsen et al., 1998 ; Carmichael et al., 2001 ; Azevedo et al., 2002**). La voie dermique peut aussi jouer un rôle dans l'exposition humaine aux eaux de baignades (**Falconer, 1996, 1999**) bien que l'absorption des microcystines par contact cutané est peu probable, car ces toxines ne traversent pas facilement les membranes cellulaires (**Runnegar et al., 1995**). Il ressort que la principale source d'exposition aux hépatotoxines cyanobactériennes demeure la consommation d'eau potable. Face à l'accentuation des effets des cyanotoxines sur les humains, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a mis en place en 1998 des conduites à tenir et recommande une concentration limite tolérée de 1 µg en microcystine-LR par litre d'eau potable (**WHO, 1998**). La microcystine-LR est la seule hépatotoxine pour laquelle on dispose d'informations suffisantes pour établir une valeur de recommandation. L'application de cette valeur guide pour la microcystine-LR n'est devenue obligatoire en France qu'à partir du mois de Janvier 2004. Cette valeur est basée sur la dose journalière acceptable pour la microcystine-LR (DJA ou TDI, Tolerable Daily Intake) qui est de 0,04 µg/kg p.c. et calculée comme suit :

$$\text{DJA} = 40 \mu\text{g/kg p.c. par jour} / 1000$$

Où : - 40 µg/kg p.c. par jour est le NOAEL (dose sans effet nocif observé) pour les changements hépatiques qui est tiré de l'étude d'ingestion de la microcystine-LR à des souris pendant 13 semaines (**Fawell et al., 1994**).

- 1000 est le facteur d'incertitude dérivé d'une extrapolation des études effectuées sur les animaux aux humains (facteur 10 pour les variations intra-spécifiques, facteur 10 pour les variations interspécifiques et facteur 10 pour l'étude d'une durée inférieure à la durée de vie).

Ainsi la teneur maximale acceptable (TMA) proposée pour la microcystine-LR totale (intra et extracellulaire) dans l'eau potable est calculée comme suit :

$$\text{TMA} = 0,04 \mu\text{g/kg p.c. par jour} \times 60 \text{ kg} \times 0,8 / 2 \text{ l par jour}$$

Où : 0,04 µg/kg p.c. par jour est la DJA, 60 kg est le poids corporel moyen d'un adulte, 0,8 est la proportion de l'apport total attribuée à l'ingestion d'eau potable, 2 l par jour est la consommation quotidienne moyenne d'eau potable d'un adulte.

En raison du manque de données pertinentes de toxicité chronique, le calcul de la valeur guide provisoire établie par l'OMS est basé sur des données de toxicité aiguë et sub-chronique. Ainsi, Il ne semble pas actuellement possible d'extrapoler cette valeur pour une exposition chronique aux cyanotoxines parce qu'on ne sait pas si les rapports quantitatifs de la toxicité chronique sont identiques à ceux de la toxicité aiguë. Toutefois, une valeur plus faible de 0,5 µg/l a été proposée au Canada (**Kuiper-Goodman, 1997**). Pour une exposition chronique, une valeur de 0,1µg/l a été aussi suggérée (**Falconer, 1996**).

Concernant la surveillance des ressources en eau, une échelle de risque a été adoptée par l'OMS se basant sur la biomasse ou le biovolume des cyanobactéries ou sur la teneur en chlorophylle a de l'eau brute (**Tableau 9**).

Tableau 9. Recommandations de l'OMS pour la surveillance des eaux brutes (**WHO, 1998, 1999, 2001, 2004**)

Situations	Risques	Recommandations
- Densité des cyanobactéries: 200 cellules/ml - Teneur en chlorophylle a: 0,1 µg/l	Eventuelle apparition d'un bloom algal	Suivi de l'évolution des Cyanobactéries
- Densité des cyanobactéries: 2000 cellules/ml - Teneur en chlorophylle a: 1 µg/l.	Production potentielle de toxines algales dont les teneurs pourraient dépasser la valeur recommandée par l'OMS	Dosage des toxines par l'une des méthodes analytiques
- Densité des cyanobactéries: 100000 cellules/ml - Teneur en chlorophylle a: 50 µg/l - Confirmation de la présence des toxines	Risque pour la santé humaine à court terme	Renforcer le traitement

II.3.1. Tests et techniques d'analyse

Les méthodes d'analyse utilisées dans le biomonitoring des cyanobactéries toxiques dans les écosystèmes aquatiques se différencient par leur degré de sensibilité et de sélectivité (capacité d'identifier les types et le taux de toxines). Toutefois, le type de méthode sélectionnée doit tenir compte du coût, de la logistique, de la rapidité à évaluer le risque, et du type de l'information recherchée.

II.3.1.1. Tests biologiques

Les bioessais utilisés comme des tests de toxicité permettent l'établissement d'un diagnostic simple et rapide des échantillons, basé sur l'évaluation globale de la toxicité et de leurs effets.

a- Biotest "Souris"

Le biotest souris est l'approche la plus ancienne pour déterminer la toxicité des échantillons de cyanobactéries. Les extraits de toxines sont administrés par voie intrapéritonéale (**Nicholson & Burch, 2001**). Ce test permet la quantification globale de la toxicité (DL_{50} ; dose létale de 50% des animaux testés), et la détermination du type de toxicité (neurotoxicité ou hépatotoxicité) déduite d'après les réponses et les symptômes remarqués. Dans ce sens, les hépatotoxines peptidiques (microcystines et nodularines) causent généralement la mort dans les 4 heures avec des symptômes d'engorgement du sang dans le foie. Les neurotoxines peuvent entraîner la mort beaucoup plus rapidement (dans les 15 minutes) avec des symptômes neuromusculaires (**Falconer, 1993**).

Toutefois, le test souris est beaucoup moins sensible pour les échantillons à faibles concentrations en toxines. Une autre limite réside dans l'éthique d'utilisation des animaux comme substrats de biotests, surtout avec le nombre élevé de souris utilisées (**Falconer, 1993**).

b- Test " Artémia"

Un test alternatif simple et peu coûteux est le biotest Artemia. Il est largement utilisé, et il ne nécessite que peu d'expertise. Ce test montre des réponses plus fiables et significatives

pour les hépatotoxines que le test souris (**Kiviranta et al., 1991 ; Campbell et al., 1994 ; Lahti et al., 1995**).

Les Artémies sont exposées aux différentes concentrations de l'extrait de l'échantillon à tester. La durée d'exposition est de 18h à 45h. La toxicité est exprimée en CL₅₀ (concentration de l'échantillon, qui a causé 50% de mortalité). Ce test biologique reste moins spécifique car il peut être fortement influencé par d'autres composées antibiotiques de l'échantillon testé.

c- Autres Biotests

Autres biotests ont été utilisés chez les invertébrés : *Daphnia pulex* (**Reinikainen et al.,1995**), *Drosophila melanogaster* (**Dow &Swododa, 2000**), les larves de moustiques (**Turell & Middlebrook, 1988**), le crustacé *Thamnocephalus platyurus* (**Torokne et al., 2000**), des plantes : *Sinapis alba* (**Rapala & Lahti, 2002**), ou des cellules animales de cultures: hypatocytes (**Erikson et al., 1990**) ou erythrocytes (**Daw & Swododa, 2000**). Ces tests, bienqu'ils ont montré une capacité de détecter la présence de cyanotoxines, ils ne sont pas encore normalisés pour une large utilisation dans les monitorings routinières.

II.3.1.2. Tests biochimique et immunologique (PP, ELISA)

a- Tests d'inhibitions enzymatiques (PPI, PP2A)

Les méthodes biochimiques ont exploité les propriétés des toxines dans l'inhibition des protéines phosphatases (PP). Les dosages sont aussi sensibles, rapides, et accessibles en raison de la disponibilité commerciale des enzymes. Deux types d'enzymes ont été couramment utilisées : PP1 (Protéine Phosphatase Type 1) et PP2A (Protéine Phosphatase Type 2A). La réaction de la microcystine avec PP1 est environ 50 fois moins sensible que celle de PP2A (**Honkanen et al., 1994**).

L'activité de la phosphatase a été mesurée soit par un test radiochimique, soit par un test colorimétrique (**Bouaïcha et al., 2002**). La méthode colorimétrique est basée sur l'utilisation du para-nitrophénylphosphate (pNPP), composé incolore, qui après déphosphorylation par diverses phosphatases libère le para-nitrophénol, composé coloré absorbant à 405 nm (**Tubaro et al., 1996**). Récemment, des substrats fluorescents ont

été utilisés dans le but d'améliorer la sensibilité du test d'inhibition de PP2A permettant ainsi la détection de quantités très faibles en microcystines de l'ordre de picogrammes (**Fontal et al., 1999 ; Bouaïcha et al., 2002**).

b- Test ELISA

Actuellement, les méthodes de détection des microcystines les plus prometteuses impliquent l'utilisation des anticorps convenables aux réactions avec les microcystines (**Metcalf et al., 2000**). Les tests immunoenzymatiques ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays) utilisant des anticorps polyclonaux anti-microcystine-LR (**Chu, 1990 ; An & Carmichael, 1994**) ou monoclonaux (**Kfir et al., 1986**), permettent l'évaluation du contenu total en microcystines dans les échantillons. Cette méthode destinée à analyser une seule toxine, comme la microcystine-LR ou la nodularine, présente des problèmes de réactivité croisée avec des métabolites, des adduits (liaisons covalentes) à des protéines ou d'autres toxines congénères (**Metcalf et al., 2000**).

II.3.1.3. Techniques Physico-chimiques

a- HPLC-PDA (Chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diode)

L'HPLC permet la séparation des cyanotoxines. Les microcystines, les nodularines, les cylindrospermopsines, de même que les anatoxines ou les saxitoxines, sont des composés peu volatiles. Par conséquent, la chromatographie en phase liquide à polarité de phase inversée suivie d'une détection en UV est largement utilisée (**Tsuji et al., 1994**).

L'échantillon à séparer (solutés) est mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans la colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un

détecteur approprié, les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

L'utilisation d'un détecteur à barrette de diode permet de déterminer la présence des toxines ainsi que leur nature par comparaison à des spectres d'absorption lorsque l'on dispose de standards (**Ward et al., 1997**). La plus part des microcystines et des nodularines ont un spectre d'absorption maximum à 238 nm (**Lawton et al., 1994, 1995**). L'HPLC-PDA est aujourd'hui la technique analytique la plus efficace par rapport aux autres utilisées dans le biomonitoring des eaux.

b- CL-SM (Chromatographie liquide couplée a la Spectrométrie de Masse)

La spectrométrie de masse couplée aux différentes techniques, telle la chromatographie liquide, permet l'identification et la confirmation de la présence des cyanotoxines dans des échantillons d'algues et d'eau (**Sirén et al., 1999**).

Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). En fait, le spectromètre de masse comporte une source d'ionisation suivie d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport m/z , d'un détecteur qui compte les ions et amplifie le signal, et enfin d'un système informatique pour traiter le signal. Le résultat obtenu est un spectre de masse représentant les rapports m/z des ions détectés et l'abondance relative de ces ions.

II.3.1.4. Techniques Moléculaires

Avec le développement de méthodes de détection et de caractérisation des acides nucléiques, comme l'extraction, l'hybridation, le séquençage de l'ADN, et l'amplification *in vitro*, de nouvelles approches moléculaires de monitoring environnemental des cyanobactéries ont émergées.

a- PCR (Réaction en chaîne par polymérase)

La PCR constitue un moyen efficace pour caractériser les génotypes toxiques ou non toxiques, utilisés dans le monitoring des cyanobactéries toxiques. L'amplification se fait par l'utilisation des amorces spécifiques capables d'amplifier dans une région (séquence partielle) d'un gène ou séparément dans plusieurs gènes (**Hotto et al., 2005 ;**

Oberholster et al., 2006). Si l'amplification utilise simultanément plusieurs amorces en mixture, la réaction PCR est qualifiée multiplex (**Ouahid et al., 2005**).

b- RAPD (Amplification aléatoire d'ADN polymorphe)

La technique RAPD (de l'anglais Random Amplification of Polymorphic DNA), couplée à une PCR, a été employée pour l'identité taxonomique des organismes au niveau de la souche (**Neilan, 1995**). Les amorces utilisées s'hybrident aléatoirement avec des fragments de l'ADN testé. L'analyse par électrophorèse des fragments amplifiés donnera un profil particulier, caractéristique de l'ADN de départ. Cette technique est sensible et spécifique, car l'ensemble du génome d'un organisme est utilisé comme base pour la production du profil de l'ADN.

c- RFLP (Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction)

La technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) relativement simple et rapide a été appliquée pour l'identité taxinomique et toxigénique des cyanobactéries (**Neilan et al., 1995**). Elle utilise une enzyme de restriction découpant le génome en plusieurs parties dépendant du nombre de sites de restriction présents pour l'enzyme utilisée. Le nombre de ces sites et leur position diffèrent en fonction de l'individu. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction permet de réaliser une empreinte génétique grâce à cette méthode.

Il permet ainsi de différencier deux individus. Lorsque deux individus homozygotes sont comparés après digestion de leur ADN par une enzyme donnée et hybridation avec une sonde donnée on observera des profils d'électrophorèse différents chaque fois que des sites de restriction différeront.

II.3.2. Contrôle et moyens de lutte

La croissance excessive d'une biomasse cyanobactérienne toxique (manifestée ou non par un bloom) dans un hydro-système, utilisé dans l'approvisionnement en eau potable ou pour d'autres activités récréatives ou agricoles, pose un sérieux problème pour la santé humaine. Les procédés de traitement de l'eau contaminée par les cyanotoxines doivent être renforcés par d'autres mesures préalables intégrant des interventions directes et/ou indirectes.

L'intervention indirecte consiste en général à mettre en place des actions préventives au niveau de l'hydro-système. Ces actions visent le contrôle des facteurs déterminants de l'eutrophisation via la maîtrise des paramètres qui régulent la croissance des cyanobactéries comme l'intensité lumineuse, la disponibilité en nutriments et la stabilité physique du milieu.

Les actions directes correspondent à des techniques qui minimisent le transfert des blooms de cyanobactéries aux systèmes d'approvisionnement en eau potable (station de traitement..) telles que le choix de la profondeur de prise d'eau au niveau d'un lac par exemple, l'utilisation de barrières flottantes pour limiter le déplacement des écumes en surface ou l'infiltration des eaux contaminées à travers des sols poreux et leur stockage dans la nappe souterraine (**Hrudey et al., 1999 ; Hitzfeld et al., 2000**).

Une autre intervention technique réside dans le traitement chimique par algicides. Cette technique s'avère efficace pour détruire une efflorescence algale en amont d'une prise d'eau potable ou dans une zone récréative. Toutefois, cette technique peut être utilisée à condition d'éviter l'utilisation de l'eau pendant les premières semaines qui suivent le traitement (**Lam et al., 1995**).

Par ailleurs, les cyanotoxines peuvent être éliminées à travers les filières de traitement, selon la charge de l'eau, en combinant un ou plusieurs procédés :

1) Préoxydation par un agent chloré ou par l'ozone, souvent comme étape d'optimisation de la coagulation.

2) Clarification, par procédés de coagulation-floculation, décantation, flottation, filtration rapide (dégrossissage sur biolites...) ou filtration lente sur sable.

3) Oxydation par l'ozone ou le chlore afin de dégrader la matière organique.

4) Filtration sur charbon actif afin d'adsorber la matière organique dissoute.

5) Désinfection finale, pour l'élimination des organismes pathogènes, par des agents chlorés, l'ozone, l'utilisation d'ultraviolets ou par des procédés physiques comme la filtration sur membranes.

Les traitements qui se sont révélés très efficaces pour l'élimination des cyanotoxines sont l'utilisation du charbon actif et l'ozonation. D'autres traitements comme

l'irradiation UV (**Tsuji et al., 1995**) et les couplages ozonation-filtration par le charbon actif en grain et flottation-ozonation (**Benoufella et al., 1995**) ont donné de bons résultats pour la dégradation des microcystines. La microfiltration et l'ultrafiltration sur membranes sont également très efficaces pour éliminer les cyanobactéries et les cyanotoxines. Egalement, l'élimination des cyanotoxines peut aussi se réaliser par des processus naturels et moins coûteux comme la biodégradation par les bactéries (**Jones et al., 1994**).

Chapitre II : Matériels et Méthodes

III.1. Présentation du site d'étude : Lac Oubeïra

La réserve intégrale du lac Oubeïra, qui est un site Ramsar sous les critères ; 1, 5 et 6, se situe 36°50'N-08°23'E à 3 km à l'Ouest de la ville d'El Kala, dans la wilaya d'El Tarf à l'extrême Nord-Est de l'Algérie, entre lac Mellah et lac Tonga, en couvrant environ 2200 ha de superficie avec une altitude moyenne de 25 m (**De Belair, 1990 ; Messerer, 1999**) (**Figure 12**).

Ce lac d'eau douce endoréique a une profondeur maximale de 4 m, avec en moyenne 1,24 m, dont le fond plus ou moins plat est légèrement incliné vers le Nord. De forme subcirculaire, il est au centre d'un bassin versant de 9900 ha, à 4 km de la mer à vol d'oiseau. (**Benyacoub, 1996 ; Messerer, 1999**).

1) Importance écologique du lac

En Afrique du Nord, c'est l'unique plan d'eau de cette dimension que ne s'assèche jamais même après une longue période sécheresse. Cette singularité lui a donné les caractéristiques écologiques exceptionnelles qui étaient les siennes. On y compté 400.000 oiseaux dans la première partie des années 1980. Un signe indésirable de sont importance écologique à l'origine de son classement comme zone d'importance internationale pour l'avifaune aquatique. C'est l'unique station dans le Maghreb pour la châtaigne d'eau (*Trapanatans*). La végétation aquatique parfaitement adaptée aux conditions de l'environnement nourrissait une faune piscicole riche et variée notamment les mulets et les barbeaux qui étaient pêchés et vendus avec des revenus substantiels (**Baba Ahmed, 2003**).

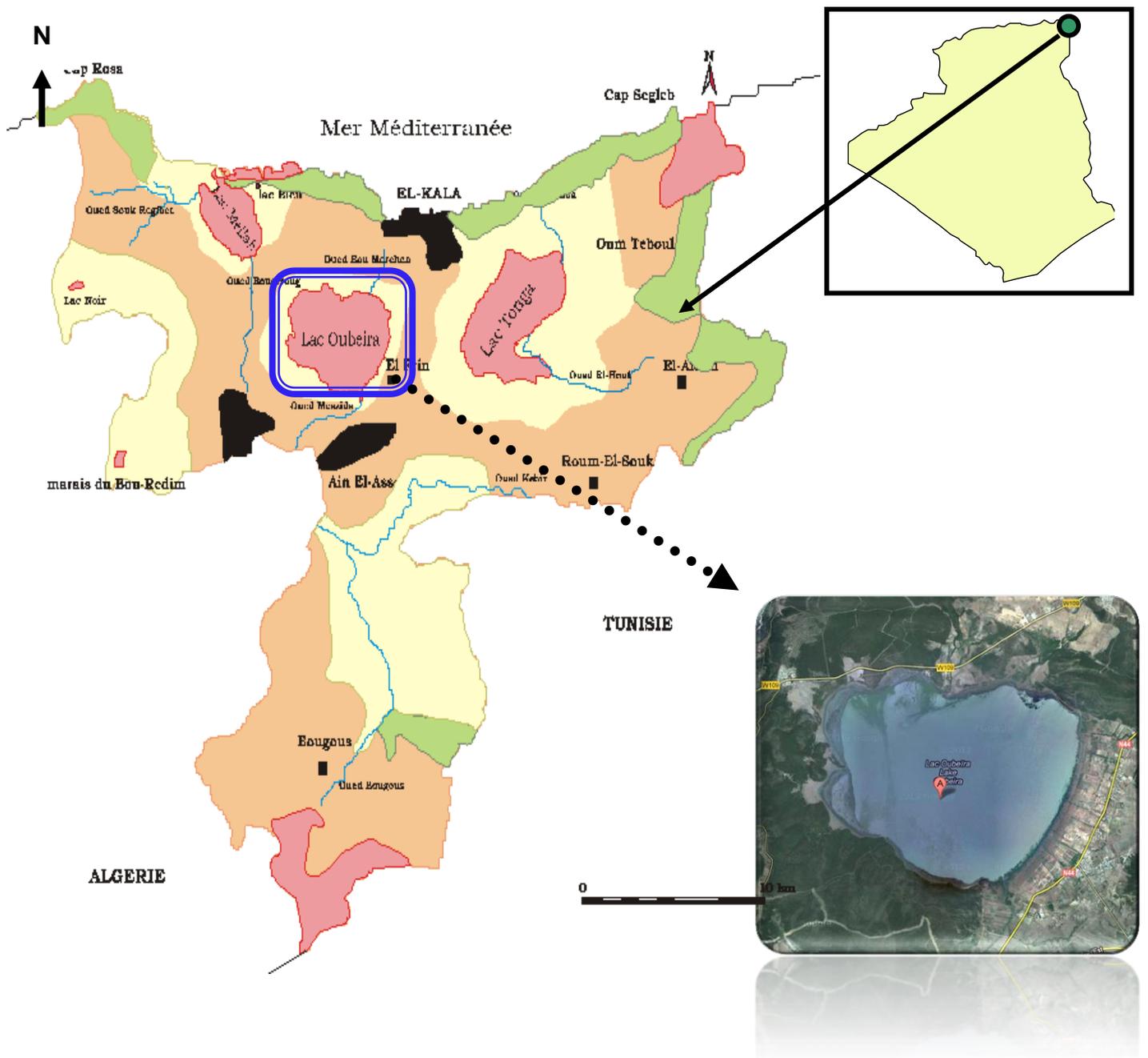


Figure 12 : Carte de zonage du Parc National d'El Kala (Direction Général des Forêt, 2011)

2) Biodiversité du lac Oubeïra

⇒ La richesse Floristique

C'est le seul site du complexe humide de la région qui présente une organisation spatiale typique en ceintures de végétation (Hélophytes) avec une importante superficie colonisée par des herbiers flottants d'hydrophytes.

En été, les ceintures de végétation sont bien visibles et pratiquement ininterrompues tout autour du Lac et ont une largeur et une densité différentes selon les rives ; les ceintures les plus larges (environ 400 m) sont formées d'Hélophytes Phragmites, Typha et Scirpe, qui sont indispensables à la nidification des oiseaux d'eau.

Les herbiers flottants par les Hydrophytes (*Trapa natans*, *Myriophyllum potamogeton*.) et occupent la grande surface d'eau libre. Parmi les espèces rares présentes dans l'Oubeïra: Châtaigne d'eau : *Trapa natans* (seule station en Algérie), Nénuphar blanc : *Nymphaea alba* et Nénuphar jaune : *Nuphar luteum* (MIRI, 1996)

⇒ La richesse Faunistique

On note la nidification du Blongios nain, la Talève sultane, la Rousserolle turdoïde, le Butor étoilé, et le Busard des roseaux, avec la présence du Balbuzard pêcheur qui chasse ses proies dans le lac. Les hivernants sont présentés par l'Erismature à tête blanche, la Grande aigrette, la spatule blanche, l'Oie cendrée, le grand cormoran, plusieurs espèces de limicoles et l'Avocette élégante, et de façon irrégulière, l'Ibis falcinelle et le Flamant rose (Brahmia, 2002). Or les oiseaux, les insectes sont aussi présents avec 28 espèces, dont ; *Anax imperator*, *Anax parthenope*, *Aeshna mixta*, *Aeshna affinis*, *Hemiana xerippiger*, *Orthetrum cancellatum* et *Acisoma panorpoides ascalaphoides*

***L'ichtyofaune du lac Oubeïra**

D'après **Meddour, (1988) et Maachi, (1990)**, il existe deux catégories de poissons dans le lac Oubeïra ; 08 espèces sont locales et 07 espèces introduites.

⇒ **Les espèces autochtones**

☞ **Famille : Clupeidae**

****Alosa fallax fallax* (Linné, 1758)** : c'est un poisson migrateur, hivernant au lac pour se reproduire. Il migre à travers les méandres de l'Oued Mafragh et l'Oued El Kebir pour aboutir au lac Oubeïra, cependant la fermeture des cours d'eau reliant l'Oued au lac empêche le passage de cette espèce vers ce dernier (**Benanik, 2005**)

☞ **Famille : Anguillidae**

****Anguilla anguilla* (Linné, 1758)** : l'anguille vit dans les eaux salées, saumâtres, douces, froides et chaudes. C'est un poisson migrateur, comme il peut séjourner de nombreuses années dans les étangs côtiers pour ensuite, se diriger vers la mer des Sargasses où il va se reproduire vers la fin d'automne, à une profondeur de 1000 m. (**Benanik, 2005**)

☞ **Famille : Poeciliidae**

****Gambusia affinis affinis* (Baird & Girard, 1854)** : il est nommé aussi le poisson moustique car il est insectivore et peut être utilisé comme méthode de lutte contre les moustiques (**Fraval, 2002**). Le mâle est toujours plus petit que la femelle (3 et 6cm respectivement) (**Anonyme, 2006**). La Gambusie est une espèce endémique dans les oueds et les lacs du Nord-Est algérien (**Bénanik, 2005**).

☞ **Famille : Mugilidae**

****Mugil cephalus* (Linné, 1758)** : Le mullet est un poisson qui se caractérise par un corps gris olive sur le dos, des flancs argentés et un ventre blanc. La taille maximale rapportée est de 12 kg pour 120 cm. Le mullet est l'une des espèces autochtone et migratrice qui se reproduit dans la mer.

****Lisa ramada* (Risso, 1826)** : c'est l'un des Poissons migrateurs se reproduisant en mer.

☞ **Famille : Cyprinodontidae**

****Phoxinellus callensis* (Guichenot, 1856)**

****Phoxinellus punicus* (Pellegrin, 1920)**

Ce sont des espèces cosmopolites de petite taille qui se trouvent un peu partout dans les plans d'eau, comme elles sont très abondantes au lac Oubeïra.

☞ **Famille : Cyprinidae**

**Barbus callensis* (Pellegrin, 1921) : elle vit dans les eaux courantes et les lacs, elle se rencontre dans le Nord de l'Algérie et la Tunisie (Benanik, 2005). Elle porte deux paires de barbillons, à chair estimée mais aux œufs toxiques, avec une longueur qui peut atteindre 1 m. Le barbeau est une espèce omnivore.

⇒ **Les espèces introduites ou Allochtones**

☞ **Famille : Cyprinidae**

**Ctenopharyngodon idellus* (Cuvier & Valenciennes, 1842) : il est connu sous le nom la Carpe herbivore. Il a un corps cylindrique avec une courte nageoire dorsale inclinée vers l'arrière et implantée à l'aplomb des paires de nageoires ventrales. C'est une espèce Phyto-planctophage (Anonyme, 2006) introduite dans lac Oubeïra en juin 1985.

**Hypophthalmichthys molitrix* (Cuvier & Valenciennes, 1842), la carpe argenté est connu par son corps latéralement comprimé et profond, sa tête grande et ses petits yeux, sur le côté ventral de la tête. C'est une espèce Phyto-planctophage, utilisé comme lute biologique pour contrôler la communauté planctonique (Hasnaoui et al., 2002). Elle était introduite au lac Oubeïra en juin 1985.

**Hypophthalmichthys nobilis* (Richardson, 1844). La carpe grosse tête sa tête est plus grosse et sa couleur est plus au moins marbrée de brun rouge, elle est Zoo-planctophage (Anonyme, 2006). Elle était introduite dans la même année comme les autres cyprinidés en Juin 1985

**Hypophthalmichthys harmandi* (Sauvage, 1884) : La carpe grosse tête a été introduite en Mai 1985. C'est une espèce planctophage.

**Cyprinus carpio* (Linné, 1758): la carpe commune présente un dos gris noirâtre ou brunâtre, des flancs dorés ou roux, un ventre jaune clair et des nageoires paires rouges pâles lors du frai. En effet, les carpes seront plus claires dans les eaux oxygénées, peu profondes des fleuves et rivières. En revanche, dans les eaux stagnantes, sombres, boueuses, les carpes seront plus foncées (Ranson, 2003), elle est Omnivore. Au contraire des autres espèces, la carpe était introduite en Avril 1986

☞ **Famille : Percidae**

**Stizostidium lucioperca* (Linné, 1758). Elle nommé aussi la Perche, le Brochet ou la Sandre. Elle était introduite en Avril 1986. C'est un poisson prédateur piscivore.

III.2. Les modèles biologiques

III.2.1. La Carpe Commune

III.2.1.1. Taxonomie :

Notre modèle biologique est l'une des espèces les plus répandues dans le monde, et en particulier dans le lac Oubeïra, la carpe commune qui est connue scientifiquement sous la dénomination « *Cyprinus carpio* » (**Figure 13**).

Selon **Nelson, (1994)**, les caractères morphologique et anatomique de *Cyprinus carpio*, lui permettent de se classer dans le règne animal sous la systématique suivante :

Phylum : Cordés

Sous classe : Actinoptérygiens

Infra-classe : Téléostéens

Ordre : Cypriniformes

Sous ordre : Cyprinoïdes

Famille : Cyprinidé

Genre : *Cyprinus*

Espèce : *Cyprinus carpio* (Linné, 1857)

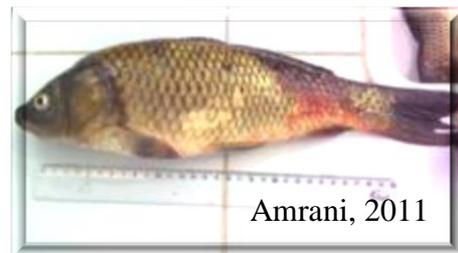


Figure 13 : La carpe commune *Cyprinus carpio*

III.2.1.2. Régime alimentaire

La carpe commune est omnivore, planctophage et benthophage à prédominance carnivore (**Ranson, 2003**). Elle recherche les insectes aquatiques, les vers, les portions de végétaux, les fragments de substances organiques, les parcelles d'engrais, les molécules onctueuses d'une terre limoneuse et grasse dont elle aime à se nourrir, effectivement elles avalent la vase, ce n'est pas pour s'en nourrir mais pour y chercher et en retenir les débris végétaux et les animalcules (invertébrés benthiques) qui s'y cachent (**Ranson, 2003**).

Les pisciculteurs ont bien étudié le régime alimentaire des alevins de carpes qui sont essentiellement planctophages (phyto et zooplancton). Les daphnies, cyclops, rotifères, ainsi que les algues unicellulaires (diatomées) constituent la base de l'alimentation des feuilles ou nourrain. Les carpeaux et les adultes sont eux omnivores et s'alimentent de débris végétaux, de détritus de toutes sortes, de larves d'insectes, de vers, de mollusques, escargots, crustacés, voire également d'alevins d'autres espèces.

La carpe se nourrit surtout au crépuscule. En hiver, dès que la température de l'eau inférieure à 8-10°C, les carpes recherchent les eaux profondes, où elles se rassemblent en grand nombre (**Ranson, 2003**) (**Tableau 10**)

Tableau 10 : Diversités des proies vivantes pour alevins de carpe commune (**Billard, 1995**).

Alevin âge (en jour)	Principales proies alimentaires	Temps nécessaire au développement des proies (en jours)
1-11	Protozoaires, rotifères, petits crustacés	5-7
11-18	Crustacés (petits et moyens), larves d'insectes	10-15
19-33	Gros crustacées, larves d'insectes	15

III.2.1.3. Comportement :

De mœurs tranquilles, plutôt nocturnes, les carpes vivent en petits groupes dans les eaux calmes et tempérées, aux fonds mou, et riches en végétation. Lacs, fossés, étangs, courants lents, méandres morts lui conviennent. Fondamentalement, grégaires les groupes que constitue ce poisson tendent à se disloquer au fur et à mesure que la taille des individus devient importante (**Ranson, 2003**).

III.2.1.4. Reproduction :

Les carpes communes deviennent mûres à partir de deux ans pour les mâles et trois ans pour les femelles. La reproduction naturelle est assez tardive, entre mai et août dans nos régions, car elle nécessite une température de l'eau supérieure à 18°C. La reproduction des carpes donne lieu à des manifestations bruyantes. Le frai se déroule à l'aube, en eau profonde et de préférence dans les prairies inondées si elles sont accessibles.

Chaque femelle pond, parfois en plusieurs fois, entre 80.000 et 120.000 œufs par Kg. Ces œufs de 1.5mm de diamètre, adhèrent à la végétation immergée. L'incubation dure 5 jours à 20 °C. Les alvins, qui mesurent de 5 à 6 mm à l'éclosion, ne se détachent de leur support qu'au bout de deux à trois jours. Après la résorption de leur réserve vitelline, les

premières proies ingérées sont généralement des rotifères et des micro-algues. A partir de 2 cm, ils commencent à consommer des organismes benthiques (**Ranson, 2003**).

III.2.1.5. Origine et habitat :

Cyprinus carpio est devenu le poisson d'eau douce le plus répandu au monde (**Figure 14**). La carpe commune est originaire d'Asie (de la mer caspienne Jusqu'au Danube). Il a migré vers l'Europe par l'intermédiaire du réseau hydrographique (Dniepr, Volga, Danube, Rhine) d'Europe centrale et à colonisé l'Angleterre (1642), l'Afrique du Sud au 18^{ème} siècle, l'Amérique du Nord (1872) et tous les autres continents exceptés l'antarctique et l'arctique, grâce à l'homme. Elle fréquente deux biotopes; les milieux calmes peu profond et riche en végétation pour la croissance et le frais, et les eaux profondes pour l'hivernation (**Brusle & Quignard, 2001**).



Figure 14 : carte de distribution de la carpe commune en Europe et l'Afrique du nord (**Hajlaoui, 2006**)

III.2.2. L'Anguille européenne :

III.2.2.1. Taxonomie

Anguilla anguilla, décrite pour la première fois par Linnaeus en 1758, est la seule espèce d'anguille représentée en Europe (Bertin, 1951). Néanmoins, jusqu'à 19 espèces différentes ont pu être répertoriées sur les cinq continents. (Figure, 15)



Figure 15 : Représentation d'une anguille Européenne, *Anguilla anguilla*

Sa classification taxonomique est la suivante :

Règne : Animal

Infra-classe : Téléostéens

Embranchement : Chordés

Superordre : Elopomorphes

Sous-embranchement : Vertébrés

Ordre : Anguilliformes

Infra-embranchement : Gnathostomes

Sous-ordre : Anguilloïdés

Superclasse : Ostéichtyens

Famille : Anguillidés

Classe : Actinoptérygiens

Genre : *Anguilla*

Sous-classe : Néoptérygiens

Espèce : *anguilla*

III.2.2.2. Son Cycle Biologique :

L'anguille Européenne, *Anguilla anguilla* (Figure 16), est un poisson migrateur amphihaline thalassotoque. Cela signifie que cette espèce est capable de s'adapter à de fortes variations de salinité, lui permettant de se reproduire en milieu marin alors qu'elle grandit majoritairement en milieu continental, c'est à dire en eaux douces à saumâtres. Ces modes de vie et de reproduction particuliers l'obligent donc à effectuer plusieurs migrations qui

entraînent chez cette espèce des adaptations physiologiques et morphologiques appelées métamorphoses. Le cycle biologique de l'anguille Européenne comporte donc deux phases de migrations accompagnées de deux phases de métamorphoses.

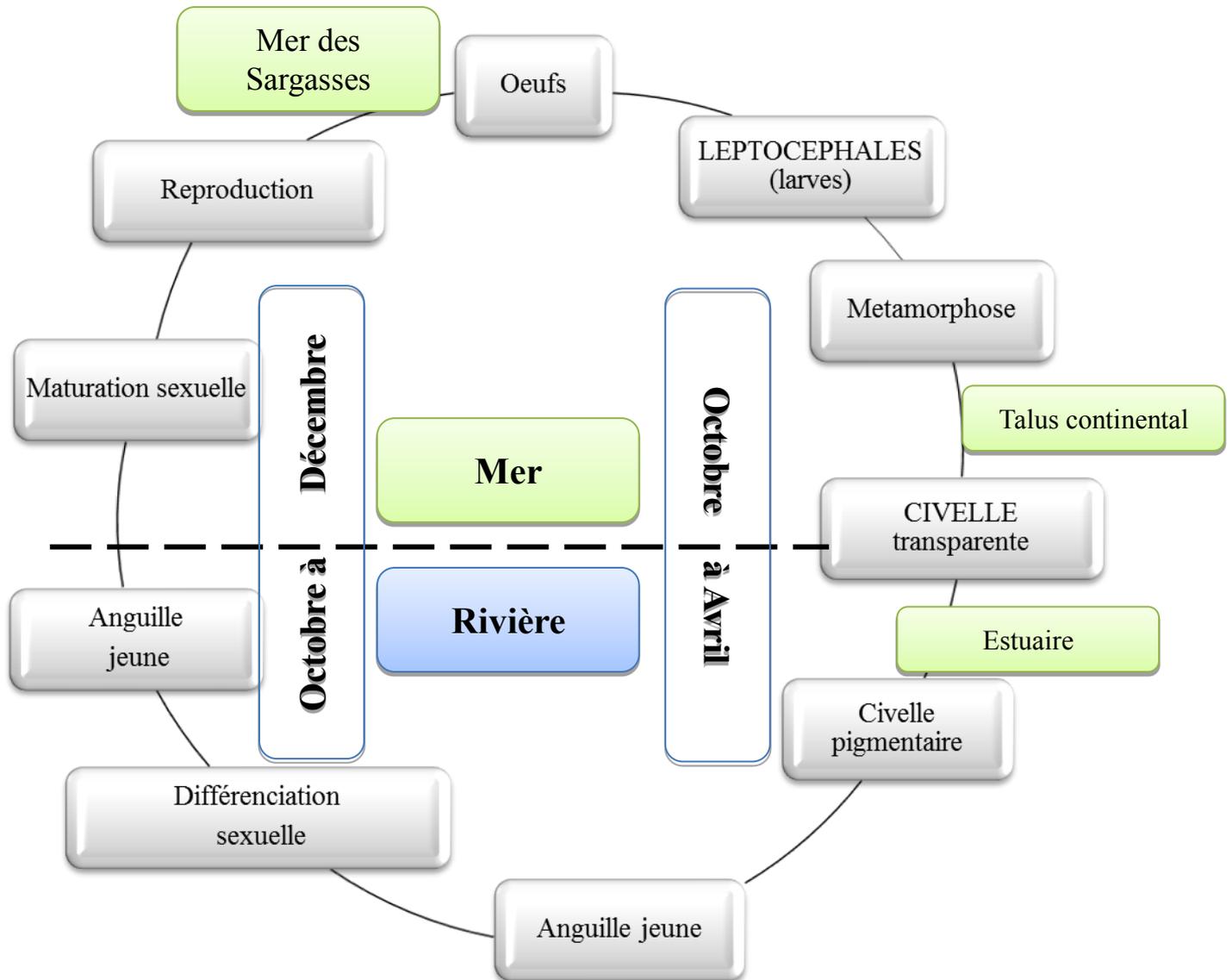


Figure 16 : Représentation schématique du cycle biologique de l'anguille européenne, *Anguilla anguilla* (d'après Schmidt, 1922 ; Kleckner & McCleave, 1985).

a. Reproduction en mer des Sargasses

Le lieu présumé de reproduction de l'anguille Européenne a été situé par Schmidt en 1922, en mer des Sargasses. C'est grâce à l'étude de la répartition géographique des tailles des larves leptocéphales récoltées dans l'océan Atlantique, que cette zone fut localisée entre les Bermudes et les Bahamas. A l'heure actuelle, bien que plusieurs campagnes de recherches

aient été menées (Tesch, McCleave), cette hypothèse n'a pas encore été démontrée puisque aucun individu sexuellement mature, ni aucun œuf n'ont pu être capturés dans cette zone. Seule une photographie prise par le sous-marin américain "Alvin" (**Robins et al., 1979**) a permis d'observer la présence d'une anguille femelle en cours de maturation sexuelle (ventre gonflé) au large des Bahamas par plus de 2000 m de profondeur.

Depuis 2007, cette hypothèse est clairement réfutée par un vétérinaire aquacole français (**Bellet, 2010**) ayant autopsié plusieurs anguilles ayant récemment pondu (présence d'œufs œdémateux non évacués) et situant donc cette zone de reproduction dans les estuaires et notamment au niveau des bouchons vaseux.

Néanmoins, l'hypothèse de Schmidt reste pour l'instant admise par le monde scientifique. L'accouplement et l'éclosion des œufs en grande profondeur aboutissant à la naissance des larves leptocéphales auraient bien lieu en mer des Sargasses. (**Figure 17**).

b. Première migration anadrome : la dispersion des larves leptocéphales

Le stade larvaire de l'anguille Européenne fut découvert en 1893 par deux zoologistes : l'Italien, Giovanni Batista Grassi observa la transformation d'une larve leptocéphale en civelle en mer Méditerranée, et le Français Yves Delage, observa le même phénomène sur des larves leptocéphales en aquarium. Cette larve, dite « leptocéphale » est transparente, vermiforme et aplatie. Il s'agissait en fait d'une espèce anciennement appelée *Leptocephalus brevirostris*, et dont le terme leptocéphale (étymologiquement : « tête plate ») fut conservé pour nommer le stade larvaire de l'ensemble des espèces appartenant à l'ordre des anguilliformes.

Afin de rejoindre le lieu de vie et de croissance de l'anguille Européenne, les larves leptocéphales doivent parcourir une distance de près de 6000 km à travers l'océan Atlantique. Deux hypothèses ont été avancées quant à la méthode de migration transocéanique. Selon **Bertin (1951) ; van Utrecht (1985) et Guérault et al. (1992)**, cette migration se ferait de façon passive par l'intermédiaire des courants marins et notamment par le Gulf Stream et la dérive Nord-Atlantique. Néanmoins, la présence de larves d'*Anguilla anguilla* de taille supérieure à 20 mm, sur un même site de capture, à une profondeur comprise entre 125 et 275 m en pleine journée et 70 m durant la nuit, décrite par **Castonguay & McCleave (1987)**, a

permis la mise en évidence de l'existence de mouvements migratoires verticaux des larves dans la colonne d'eau. Se basant sur ce phénomène, **Lecomte-Finiger (1994) et Arai et al. (2000)** ont émis l'hypothèse d'une migration active des stades larvaires les plus avancés.

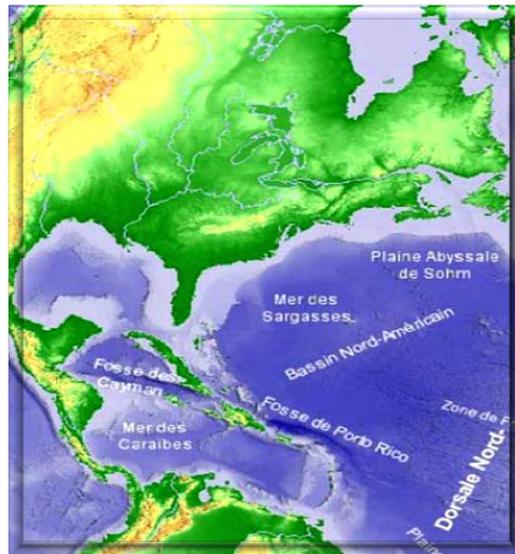


Figure 17 : Carte localisant la mer des Sargasses (**Tabouret, 2009**)

3. Deuxième migration catadrome : vers la reproduction

Durant la période d'avalaison qui s'étend du mois d'octobre au mois de décembre, des regroupements très importants d'anguilles argentées (sur de courtes périodes) dévalent les cours d'eaux. A l'heure actuelle, tous les facteurs qui déclenchent le départ en masse des individus ne sont pas encore connus. Il semble en effet que le phénomène soit dépendant de l'association synchronique de plusieurs facteurs abiotiques, conditionnant une "fenêtre écologique". A titre d'exemple, le cycle lunaire, la pluviométrie (fortes précipitations) et les conditions atmosphériques (dépression) jouent un rôle primordial (**Bertin, 1951; Okamura et al., 2002; Tesch 2003**).

Peu de choses sont actuellement connues sur cette seconde migration transocéanique si ce n'est la vitesse de migration (vitesse de croisière) des individus (**Stasko & Rommel, 1974 ; Aoyama et al., 1999; McCleave & Arnold, 1999**), estimée entre 0,5 et 1 longueur totale des individus par seconde. Cette vitesse représente pour un individu de 50 cm, une vitesse moyenne de 37,5 cm/s et une distance parcourue comprise entre 30 et 40 km par jour. Sachant que la distance à parcourir est approximativement de 5 500 km, une anguille de 50cm met en moyenne entre 5 et 6 mois pour parvenir à son lieu de reproduction. Au vu des changements anatomo-physiologiques intervenant au cours de la seconde métamorphose en anguille argentée dévalant et des capacités d'adaptation exceptionnelles de l'anguille argentée

aux fortes pressions (**Sébert, 2003**), l'hypothèse la plus répandue repose sur une migration des individus à grande profondeur. Il est cependant fortement probable que l'anguille effectue au cours de son voyage des migrations verticales dans la colonne d'eau puisqu'il a été montré expérimentalement que la maturation artificielle des gonades est quasi inexistante à des températures inférieures à 10°C (**Boëtius & Boëtius, 1980**).

Comme évoqué précédemment, cette migration est caractérisée par une absence de prise de nourriture tout au long du voyage. Ce jeûne implique la mise en réserve d'énergie au cours de la phase de croissance, c'est-à-dire au stade anguille jaune. Ces réserves sont ensuite catabolisées au cours de la migration pour fournir l'énergie nécessaire au maintien d'une activité de nage soutenue tout au long des 5 500 km de voyage ainsi que la maturation des gonades. En fait, au cours de la phase de croissance, l'eau et les protéines sont progressivement remplacées par des lipides (**Degani et al., 1986**). Dans une anguille argentée, plus de 80 % de l'énergie disponible est ainsi stockée sous forme de triglycérides principalement déposés entre les myotomes (**Boëtius & Boëtius, 1985**). **Boëtius & Boëtius (1980)** ont estimé que la quantité totale de lipides accumulée au stade anguille jaune doit dépasser en masse 20 % du poids total des individus au stade argenté afin de couvrir les besoins énergétiques de la migration catadrome de l'Anguille Européenne. Plus récemment, **Van Ginneken & Van Den Thillart (2000)** ont estimé que 40 % de ces réserves lipidiques étaient suffisantes pour permettre une activité de nage soutenue sur 5 500 km. Autrement dit, un peu moins de 60 % des réserves lipidiques sont disponibles pour la maturation et la production d'œufs. En se basant sur la quantité moyenne d'énergie renfermée dans un œuf, ils ont estimé que les anguilles argentées femelles pouvaient atteindre un rapport gonadosomatique de 22.

Enfin, à l'issue de leur long périple, les individus matures s'accoupleraient en mer des Sargasses avant de mourir d'épuisement (**Tesch, 2003**). La vie de l'anguille commencerait et se finirait ainsi en mer Sargasses.

III.3. Méthodes d'étude

III.3.1. Etude qualitative et quantitative des cyanobactéries récoltées au niveau du lac Oubeïra

a. Récolte des échantillons :

Nous avons effectué une campagne d'échantillonnage mensuelle au niveau du lac Oubeïra durant la période allant de mars 2010 jusqu'avril 2011.

La technique de récolte des algues bleu-verte destinée à l'identification générique consiste à :

- Filtrer 50 l d'eau brute au moyen d'un filet à plancton de 20 μm vide de mailles (**Figure 18**) ;
- Récupérer 100 ml de l'eau qui s'est concentrée dans le filet dans une bouteille ombrée ;
- Ajouter immédiatement 5 ml de formol à concentration initiale de 35%, ces échantillons fixés sont destinés à l'étude qualitative et quantitative des Cyanobactéries présents (**Nasri, 1998, 2001**).



Figure 18 : photographie d'un filet à plancton.

b. Identification et dénombrement des cyanobactéries

L'identification consiste à l'observation des échantillons sous microscope optique (**x 40**), et ce, après avoir déposé une goutte du matériel fixé et homogénéisé entre lame et lamelle à l'aide d'une pipette Pasteur.

On effectue un parcours horizontal par l'objectif du microscope sur toute la longueur de la lamelle en se décalant nettement sur sa largeur afin qu'il n'y ait pas de chevauchement. Pour chaque échantillon on répète l'opération **5** fois (**Champiat & Larpent, 1998**).

L'identification des différents genres de cyanobactéries a été réalisée selon une clé de détermination basée sur les critères morphologiques suivants :

- ↪ La couleur ;
- ↪ La taille ;
- ↪ La forme des colonies ;
- ↪ La présence ou l'absence de gaines gélatineuses ;
- ↪ La couleur et l'aspect de la gaine gélatineuse ;
- ↪ La présence ou l'absence des vésicules à gaz.

L'ensemble de ces caractéristiques est ensuite confronté aux ouvrages et publications de référence. Parmi eux, il y a les ouvrages clés de la classification des Cyanophytes (**Bornet & Flahaut, 1886-1888 ; Gomont, 1893 ; Geitler, 1930; Huber-Pestalozzi, 1938 ; Desikachary, 1959 ; Starmach, 1966 ; Kondrateva, 1968**), des ouvrages plus récents concernant la révision de la classification des cyanophytes en tenant compte des espèces nouvelles et anciennes et en renommant de nombreux taxons dans des nouveaux genres (**Bourelly, 1985 ; Anagnostidis & Komàrek, 1988 ; 1990; Chretiennot-Dinet, 1990 ; Komarek, 1991 ; Coute, 1995 ; Watanabe, 1996 ; Komàreket al., 2003 ; Komàrek & Komàrkova, 2003 ; Couté & Bouvy, 2004 ; Komàrek & Anagnostidis, 1986, 1989, 1998, 2005**) et enfin des ouvrages et publications spécifiques à l'Afrique et aux espèces rencontrées (**Fritsch & Rich, 1929 ; Frémy, 1930 ; Compère, 1974 ; Compère, 1991**).

Le dénombrement des différents genres de cyanobactéries identifiés est réalisé de la même manière tout en comptant le nombre d'individus rencontrés pour chaque genre. Le nombre de répétitions est aussi de cinq (05) fois.

Le calcul de la densité moyenne de chaque prélèvement s'est fait selon la formule suivante (**Nasri, 2008**) :

$$\text{Densité moyenne} = X \cdot 20 \text{ (colonie/ l)}$$

X : Moyenne du nombre des colonies dans les cinq (5) lames de chaque prélèvement

c. Etude de la variation des concentrations en microcystines dans l'eau

Afin de détecter les concentrations des microcystines dans les différents échantillons d'eau du lac on a suivi les étapes suivantes :

1) Pré concentration des échantillons d'eau par extraction sur phase solide

Les échantillons d'eaux du lac Oubeira ont été filtrés puis concentrés par une extraction liquide-solide sur cartouche C₁₈ (Lawton *et al.*, 1994 ; Maaouk *et al.*, 2002) avant d'être analysés par le test d'inhibition phosphatases (PP2A) et la Chromatographie liquide à hautes performances (CLHP). Ces deux techniques permettent le dosage et l'identification des toxines.

Un volume de 500 ml a été filtré sur membrane en fibre de verre (Whatmann GF/C). Pour séparer les toxines dissoutes dans l'eau brute (filtrat), des toxines contenues dans les Cyanobactéries et/ou adsorbées sur les particules solides (filtre).

Le filtre sur lequel sont retenues les particules solides et les microorganismes, est extrait par 10 ml de méthanol à 80 %, puis il faut le stocker dans le frigo pendant une nuit, afin de lyser les cellules et libérer les toxines. L'extrait est ensuite passé à travers une seringue filtre et évaporé par le Rotavapor à 35 – 40 °C. Le résidu sec est repris dans 500µl de méthanol à 50% et stocké à –20°C avant d'être analysé.

Pour la Pré concentration du filtrat des échantillons d'eau par extraction sur phase solide on a suivi les étapes suivantes :

- Conditionnement de la cartouche avec 10 ml de méthanol à 100 %, puis 10 ml d'eau distillée goutte à goutte et il ne faut pas laisser à sec ;
- Percolation de l'échantillon d'eau ;
- Rinçage de la cartouche avec 5 ml de méthanol à 20% goutte à goutte et il ne faut pas laisser à sec ;
- Séchage de la phase par aspiration d'air pendant 5 mn ;
- Elution des toxines par 3 ml de méthanol acidifié avec de l'acide trifluoroacétique TFA (0,1% v/v) toujours goutte à goutte et il ne faut pas laisser à sec ;

- Récupération de l'éluat dans un tube en verre à fond conique ;
- Evaporation du solvant organique de l'éluat par le Rota Vapor à 35 – 40 °C ;
- Reprise du résidu sec dans 500µl de méthanol à 50% ;
- Stockage à –20 °C avant d'être analysés par PP2A et CLHP.

A partir du filtrat, on peut donc ¹²⁷ la teneur en toxines dans l'eau brute et l'eau potable. A partir du filtre, on peut évaluer la quantité de toxines présente dans les micro-organismes ainsi que celles adsorbées sur les particules solides.

2) Dosage des hépatotoxines de type microcystine par le test d'inhibition de l'activité de la protéine phosphatase de type 2A

a. Principe et protocole du test colorimétrique (PP2A)

Le test d'inhibition de la protéine phosphatase du type 2A (PP2A) est un test colorimétrique basé sur la déphosphorylation par cette protéine du para-nitrophénylphosphate (p-NPP, qui est transformé en un produit coloré le para-nitrophénol (p-NP) . L'activité enzymatique est donc évaluée en fonction du taux de production du composé coloré, le para-nitrophénol, par absorption à 405 nm. On mesure ainsi l'inhibition de la déphosphorylation du p-NPP. Plus l'échantillon contient d'hépatotoxines (microcystines et nodularine), moins la coloration est importante (**Bouaïcha et al., 2002**).

La réaction enzymatique est effectuée dans des plaques multi-puits (96 puits). Les plaques sont séparées en deux, avec 12 demi- colonnes de 4 puits en haut et 12 demi- colonnes de 4 puits en bas. Chaque demi- colonne (4 puits) est traitée par une concentration d'un échantillon. Le volume réactionnel dans chaque puits est de 100µl.

Les réactifs à préparer pour une plaque sont :

- Solution de tampon Tris/HCl : Le Tris/HCl (6,304 g/l) + MgCl₂ (3,236 g/l) ; EDTA (1,169 g/l). Le pH est ajusté à 8,3 avec une solution 2 N de NaOH (Conservation à 4 °C pendant 6 mois)
- Préparation du Tampon complet: 40 ml de tampon Tris/HCl + 0.0248 g D.T.T. (1,4 – Dithio- D, L- threitol High Purity for Molecular Biology : CH₁₀ O₂ S₂).

- Solution de substrat: 6 ml du tampon complet + 0.063 g p.N.P.P. (4 – Nitrophénylphosphate Disodium Hexahydrate- Phosphatase Substrat 5 g $C_2 H_4 NO_6 Na_2 \cdot 6 H_2 O$).
- Préparation du Tampon enzyme : 8 ml Tampon complet + 0.004 g B.S.A. (Albumine de sérum de veau)
- Préparation de l'enzyme : Pour un ml du tampon enzyme il faut 6 μ l d'enzyme.

Le protocole expérimental comprend les étapes suivantes :

- Prélèvement du volume V_1 d'échantillon à tester ;
- Ajout un volume V_2 du tampon complet (dont la quantité de l'échantillon et du tampon complet est de 500 μ l, 1 ml ou 2 ml) ;
- Agitation, puis ajout de 100 μ l du mélange dans chaque puits ;
- Addition de 50 μ l du Tampon enzyme dans chaque puits dans la première ligne et 50 μ l de la solution enzymatique dans chaque puits dans les trois lignes qui reste de chaque demi-plaque ;
- Agitation, puis incubation à 37°C pendant 5 minutes ;
- Ajout de 50 μ l de substrat (para-nitrophénylphosphate) dans chaque puits dans les quatre lignes de la demi -plaque ;
- Agitation, puis incubation à 37°C pendant 1 heure ;
- Lecture de la densité optique à 405 nm, longueur d'onde maximale d'adsorption du p-NP.

b. Evaluation de la concentration en cyanotoxines

Le test d'inhibition enzymatique nous permet de donner une toxicité globale sans distinction possible des différents types d'hépatotoxines inhibitrices de la PP2A. On mesure ainsi l'inhibition totale de cette protéine. Le dosage des hépatotoxines (microcystines) dans les échantillons d'eau à tester est fiable, lorsque l'inhibition de l'activité est située dans le

domaine linéaire de la courbe standard. Par conséquent, l'échantillon à tester sera donc dilué ou concentré. Le résultat sera ensuite présenté en équivalent microcystine-LR.

3) **Identification et caractérisation des variants des microcystines par CLHP**

L'échantillon de terrain positif au test PP2a du mois d'Octobre 2004 a été analysés par des techniques de chimie analytique afin d'identifier et de caractériser les variants de microcystines par leur masse moléculaire. Notre analyse CLHP a été faite dans le Laboratoire Eaux et Environnement de l'Institut Pasteur de Lille, France, cette technique permet d'effectuer simultanément la séparation et l'identification de microcystines dans un mélange (**Edwards et al., 1993a**).

La séparation des microcystines a été réalisée par micro-chromatographie liquide à haute performance (CLHP) équipée d'une colonne en phase inverse C₁₈ (100 x 2.1 mm i.d., 3 µm) couplée en tandem avec un spectromètre de masse (SM) à quadropole équipé d'une source d'ionisation à électrospray (ESI). La phase mobile est l'eau (solvant A) et l'acetonitrile (solvant B) avec 0.428% d'acide hexafluorobutyrique. Le programme de gradient utilisé est : 0 minute 100 % A; 12 minutes 60 % A, 17 minutes 30 % A, 27 minutes 30 % A, 28 minutes 100 % A et 45 minutes 100 % A; le débit est de 0.2 minute ml min⁻¹. Les conditions expérimentales sont celles décrites par **Briand et al. en 2002** et reprises par **Robillot & Hennion en 2004**. L'évaluation des quantités de toxines a été réalisée via l'injection de quantités connues de toxines standards purifiées : MCYST-YR (1044.62, 602.8) m/z, MCYST-LW (1024.29 m/z, 1007.5), MCYST-LR (994.63, 976.3 m/z), MCYST-LF (985.45, 968.07 m/z) et MCYST-RR (518.97, 505.36 m/z).

III.3.2. Etude de l'impact des cyanotoxines sur les poissons

III.3.2.1. Variation de MC contenant dans les divers organes de poissons

Pour l'évaluation de la bioaccumulation de MC, les espèces de poissons consommés localement, y compris surtout la carpe commune, *C. carpio*, et l'anguille européen, *A. anguilla* ont été obtenus mensuellement par un pêcheur dans le lac Obéira lors de l'échantillonnage de l'eau.

Durant une année d'échantillonnage, le poids de la carpe commune et l'anguille européen a varié entre 250 et 1400 g, 400 et 1.050 g, respectivement. Cependant, à chaque date d'échantillonnage, toutes les espèces de poissons a été prise par triple avec un poids corporel similaire. Après la capture, les poissons ont été glacée et transportés au laboratoire

où ils étaient immédiatement disséqués, et, par la suite, l'hépatopancréas, le foie, l'intestin, et 100 g de muscle pour chaque poisson ont été séparés.

Les tissus ont été découpés en petits morceaux et transférés à dans des tubes de 50 ml, lyophilisés et stockés à -20° C pour l'extraction et l'analyse subséquente.

a. Protocole de dissection

On a suit le protocole de dissection suivant :

- a. Mesurer les paramètres biométriques des individus en question, à l'aide d'un ruban mètre pour la taille et une balance numérique pour mesurer le poids minime et autre de ressort pour les individus de grande taille ;
- b. Déposer le poisson, face latérale contre la planche à dissection ;
- c. Réaliser une première incision de l'isthme branchial le long de la ligne médiane vers l'anus ;
- d. La seconde incision va de l'anus vers la région céphalique le long de la ligne latérale ;
- e. Prélever le foie, les viscères et la chair pour les coupes histologiques et le dosage des toxines par PP2A (**Figure 19 ; 20**)

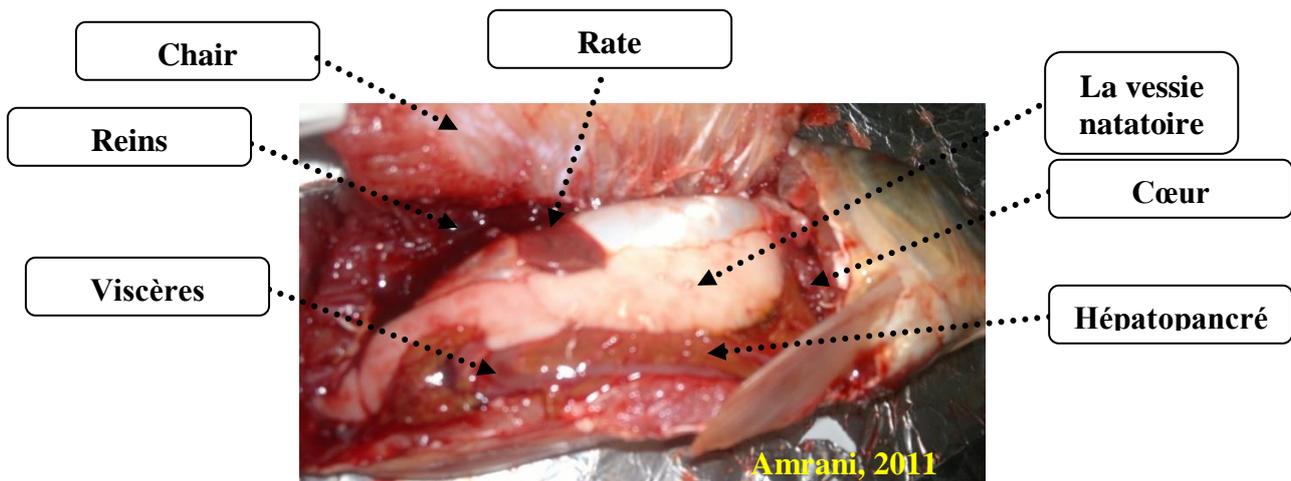


Figure 19 : Photographie représentant la mise à nus des organes de la cavité abdominale de la Carpe commune «*Cyprinus carpio* »

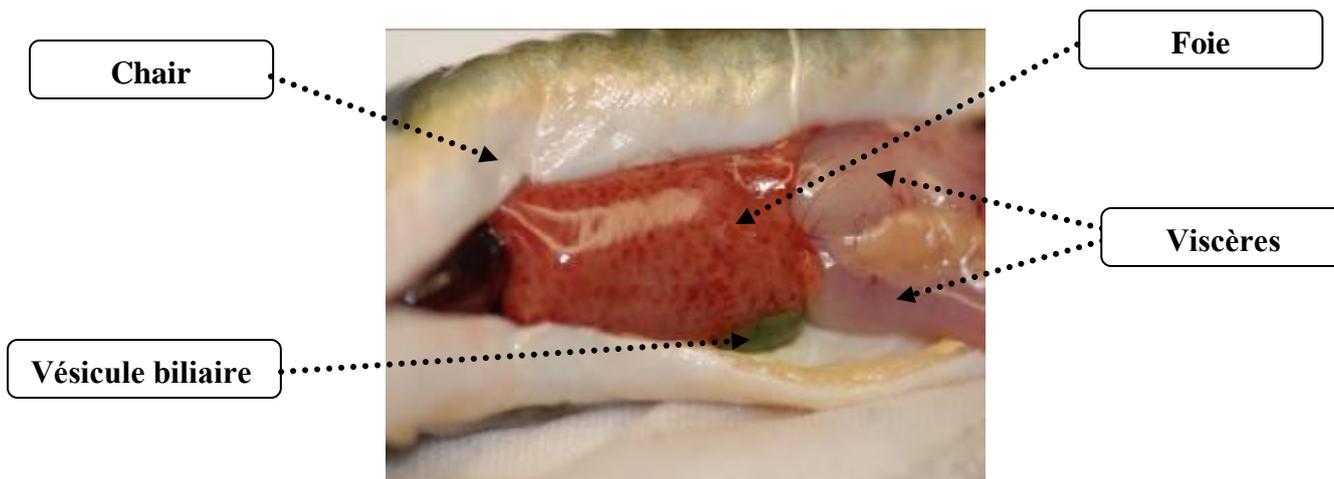


Figure 20 : Photographie représentant la mise à nus des organes de la cavité abdominale de l'Anguille « *Anguilla anguilla* » (Roland, 2007)

b. Dosage des toxines dans les organes (test PP2A)

Après lyophilisation des organes (foie, viscères et chair), une masse de 100g a été prise de chacun et mise dans un tube Eppendorf avec 2 ml de méthanol à 75 %, suivi d'une centrifugation (5000 t/10 minutes), après récupération du surnageant, le culot a été soumis à une deuxième centrifugation (Holmes, 1991 ; Luu *et al.*, 1993). Les deux surnageants obtenus ont été testés par le test PP2A.

Pour cela, 100 µl de chaque organe a été filtré sur un papier Whatman GF/C. Ensuite, l'eau distillée a été ajoutée pour avoir un volume final à 20 % CH₃OH, ce dernier est évaporé à sec sous azote à 35 °C. 5 ml de CH₃OH pur avec 20 ml de l'eau distillée sont ajoutés aux résidus secs avec sonication du mélange obtenu. Pour la Pré concentration de la solution finale il faut suivre les mêmes étapes précédentes.

c. Evaluation de la concentration en cyanotoxines

Le test d'inhibition enzymatique nous permet de donner une toxicité globale sans distinction possible des différents types d'hépatotoxines inhibitrices de la PP2A. On mesure ainsi l'inhibition totale de cette protéine. Le dosage des hépatotoxines (microcystines) dans les échantillons d'eau à tester est fiable, lorsqu'elle est située dans le domaine linéaire de la courbe standard. Le résultat sera ensuite présenté en équivalent microcystine-LR.

III.3.2.2. Etude histologiques des prélèvements (Hould, 1984)

Les méthodes utilisés en histologie varient selon le matériel (échantillons ou pièces) à étudier et les objectifs de l'examen (diagnostic histo-pathologique chez l'homme ou protocole de recherche).

La technique histologique doit à la fois conserver le groupement des cellules dans le tissu prélevé et fournir une coupe suffisamment mince (2 à 5 μm), susceptible d'être étudiée au microscope optique. Les différentes étapes de cette préparation avant l'acte diagnostic sont : la fixation, l'inclusion à la paraffine et obtention de blocs, la coupe à l'aide d'un microtome, la coloration et le montage.

Devant un prélèvement histo-pathologique (dans notre cas : le foie et les viscères), on doit procéder comme suite :

↪ La fixation

Les biopsies du foie, hépatopancréas et les viscères des deux espèces ont été fixés dans du formol à 10% pour but la conservation des structures et le durcissement des pièces. Cette étape consiste à protéger les tissus prélevés de toute hydrolyse due à la libération des enzymes contenues dans les lysosomes cellulaires.

↪ La circulation automatique

La fixation donne déjà au tissu une certaine rigidité mais qui demeure insuffisante. De ce fait, on dispose d'autres moyens pour durcir encore plus le tissu. Parmi ces moyens la circulation automatique est une étape indispensable qui consiste au traitement des pièces pendant 24 heures dans une série de liquides intermédiaires. Ces derniers sont disposés dans un appareil spécialisé appelé Automate ; constitué de 8 bacs d'éthanol, 2bacs d'xylène et 2 bacs de paraffine. Le transport des pièces se fait à l'aide de cassettes perforées en plastique numérotées et contenues dans un panier transférable d'un bain à l'autre à l'aide d'un circulateur automatique.

Lors de l'imprégnation dans ces bains, les échantillons subissent une déshydratation afin d'éliminer l'eau contenue naturellement dans les échantillons et une substitution de l'alcool par le xylène pour préparer l'imprégnation dans la paraffine qui ne se mélange ni à l'eau ni à l'éthanol. Pour se faire deux étapes sont indispensables :

☞ **La déshydratation**

A pour but de faire sortir ou extraire l'eau qui existe dans le tissu. Cette opération dure 14 heures et s'effectue par le trempage des pièces dans 7 bains successifs d'alcool (éthanol) à concentration croissante.

d. L'éclaircissement par le xylène

Ce dernier va remplacer ou extraire l'alcool et permettre la pénétration rapide de la paraffine dans le tissu. Le xylène est un solvant qui remplace l'agent déshydratant (alcool), ce qui induit le fait que le tissu devienne transparent d'où le nom qu'on a donné à cette étape.

e. L'imprégnation

Est l'étape finale de la circulation automatique, après la déshydratation et l'éclaircissement des tissus. On utilise fréquemment la paraffine (2 bains) pour imprégner les pièces.

f. *L'inclusion à la paraffine*

L'étape de l'inclusion suit celle de la circulation. Elle consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc fait d'un milieu d'inclusion : la paraffine. Ce bloc est plus facile à manipuler ; on peut l'attacher à la pince porte objet du microtome.

L'inclusion permet de fournir un rapport externe à la fois pendant et après la coupe. La présence de paraffine autour du tissu facilite la manipulation lors et après la coupe.

☞ ***La coupe des blocs***

Après inclusion et dégrossissement des blocs, on procède à la coupe à l'aide du microtome. La coupe doit être mince de 2 à 5µm d'épaisseur. Elle est effectuée par un appareil spécialisé : le microtome rotatif.

↳ Dégrossissement :

Une fois les cassettes démoulées ; on passe au dégrossissement à l'aide du microtome (**Figure 21**). Cette opération consiste à mettre en évidence le fragment tissulaire pour une meilleure coupe.

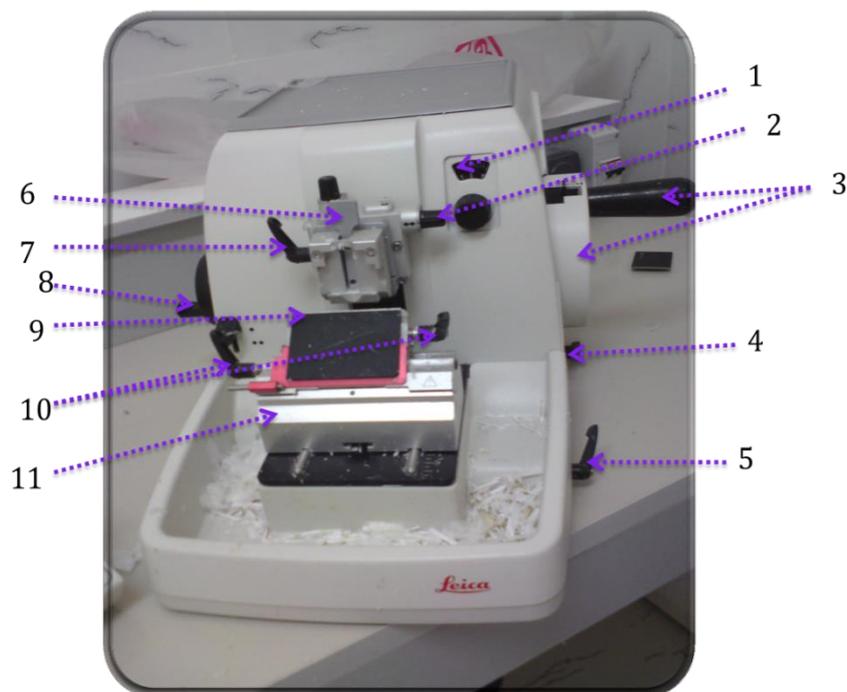


Figure 21 : Le microtome à rotation RM 2135 (photo pers 2012)

- 1 : Echelle (l'épaisseur des coupes est indiqué par).
- 2 : Vis de réglage de l'orientation du bloc de la paraffine.
- 3 : Roue motrice +manivelle de la roue motrice.
- 4 : Vis de fixation de la manivelle de la roue motrice
- 5 : Vis de fixation de la base du rasoir
- 6 : Pince à objet
- 7 : Vis de blocage du bloc de paraffine
- 8 : Manivelle de retour du mécanisme d'avance
- 9 : Rasoir
- 10 : Vis de fixation du rasoir
- 11 : Support du rasoir

↳ **Mode opératoire**

Les grandes étapes de la confection des coupes à l'aide du microtome rotatif se présentent comme suit :

- a- L'installation du rasoir : est importante, le réglage de l'angle d'inclinaison du rasoir doit tenir compte de l'angle de présentation du bloc. Les vis de serrage doivent être bien en place de manière à empêcher le rasoir de vibrer.
 - b- l'installation du bloc : le bloc ou son support est introduit dans la pince à objet et immobilisé grâce à la vis de blocage.
 - c- Le rabotage : le tissu est toujours recouvert d'une mince couche de paraffine qu'il faut enlever avant d'obtenir des coupes utiles, cette opération est appelée rabotage.
 - d- La confection du ruban : l'un des grands avantages de la paraffine tient au fait que, sous l'action de la chaleur produite par le frottement avec le rasoir, elle fond légèrement ce qui permet à la coupe d'adhérer les une des autres et de former un ruban.
 - e- L'étalement de la coupe à la paraffine : les tissus inclus dans la paraffine sont très comprimés pendant la coupe. Le déplissage des coupes se fait à l'aide d'un bain marie sur lequel on dépose le ruban ensuite on l'étale sur les lames.
- À la fin, les coupes sont colorées sur la lame qu'on laisse sécher à l'étuve à 110°C.

↳ ***Préparation à la coloration***

La coloration nécessite une étape préparatoire. En effet, comme les colorants sont en solution aqueuse, les coupes doivent d'abord subir une réhydratation. Celle-ci est effectuée après déparaffinage des coupes (par la chaleur et des bains de xylène) en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant puis dans l'eau courante.

↳ ***La coloration***

Tous les tissus qui arrivent au laboratoire d'histologie subissent une coloration de routine qui permet de mettre en évidence les principaux éléments morphologiques des pièces, c'est à dire le noyau, le cytoplasme et le collagène. Les colorations de routine utilisent un (hématéine) ou deux colorants différents : l'Hématéine-Eosine (H.E.) associe l'hématéine qui colore les noyaux en violet et l'éosine les cytoplasmes en rose (**Tableau N°11**).

Tableau N°11 : Etapes de la coloration selon la méthode à l'hématéine - éosine (H et E).

Bains	Produit	Temps
1	Xylène	10 minutes
2	Ethanol	10 minutes
3	Eau courant	5minutes
4	Hématoxyline Mayer	10 minutes
5	Eau courant	5minutes
6	Eosine	10 minutes
7	Eau courant	5minutes
8	Ethanol	passage
9	Acétone +xylène	passage
10	Xylène	passage

↪ *Préparation au montage*

On doit procéder successivement à la déshydratation et à l'éclaircissement des coupes avant de faire le montage.

- la déshydratation : elle doit être rapide car l'éthanol en faible concentration est susceptible d'extraire plusieurs colorants des coupes (durée 30 à 60).
- l'éclaircissement : pour l'éclaircissement on utilise un premier bain de xylène et acétone (30 à 60 secondes, puis un second bain de xylène seul (30 à 60 secondes).

↪ *Le montage*

C'est l'opération qui consiste à fixer à l'aide d'une substance appropriée une lamelle de verre sur des échantillons histologiques après la coloration, afin de protéger les coupes tissulaires et les colorants contre l'air ambiant. **(Figure 22)**

↪ **L'examen microscopique**

L'analyse microscopique est généralement l'activité principale du pathologiste. Il a pour cela recours aux outils de la microscopie, principalement optique ou photonique afin d'approfondir le diagnostic.

La lecture est basée sur l'appréciation de l'état des éléments cellulaires (noyau, chromatine et nucléole : bleu foncé à noir ; cytoplasme : rouge ; globules rouges et granulation éosinophiles : rouge ; collagène : bleu).

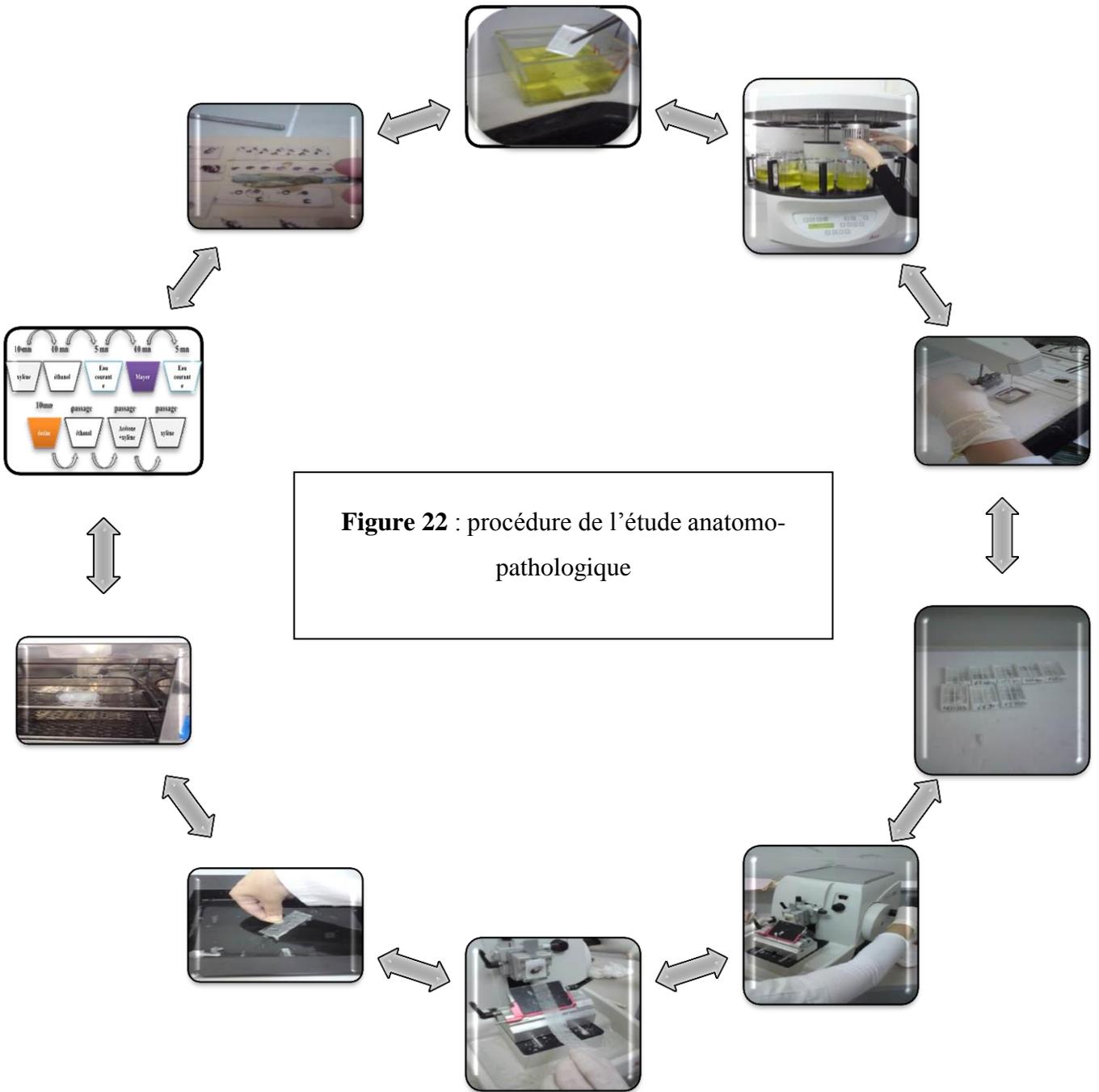


Figure 22 : procédure de l'étude anatomopathologique

Résultats et Interprétation

IV.1. Etude qualitative et quantitative des cyanobactéries récoltées au niveau du lac Oubeira

IV.1.1. Identification générique des cyanobactéries potentiellement toxiques au niveau du lac Oubeira

Le tableau 12 montre la diversité générique mensuelle des cyanobactéries répertoriées dans le lac Oubeira durant la période allant d'avril 2010 à mars 2011, selon les clés de détermination de **Bourrelly, 1985 ; Anagnostidis & Komàrek, 1988, 1990 ; Chretiennot-Dinet, 1990 ; Komarek, 1991 ; Coute, 1995 ; Watanabe, 1996 ; Komàrek et al., 2003 ; Komàrek & Komàrkova, 2003 ; Couté & Bouvy, 2004 ; Komàrek & Anagnostidis, 1986, 1989, 1998, 2005).**

Nous avons pu identifier dix (10) genres de Cyanobactéries en basant des critères morphologiques tels que :

- La forme des cellules (largeur, longueur, filamenteuse, coloniale) ;
- Leurs enveloppes mucilagineuses ;
- La Coloration, pigmentation ;
- La présence ou non de structures cellulaires caractéristiques « akinètes, hétérocystes et vacuoles gazeuses ».

Sur les dix genres identifiés trois genres *Merismopedia*, *Synechocystis* et *Microcystis* sont de forme cellulaire et se présente en colonies (ou en amas). Par contre les genres : *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Anabaena*, *Pseudanabaena*, *phormedium*, *Spirulina* et *Aphanizomenon* sont de formes filamenteuses ou trichomes.

Les fréquences d'apparitions de ces genres, montrent que les mois de juillet 2010 et d'aout 2010 se caractérisent par la présence de sept genres sur les dix genres identifiés, suit par octobre 2010 et novembre 2010 dont on a signalé la présence de 6 genres de cyanobactéries, alors que les autres mois ont reconnu une variation remarquable, avec une absence totale des cyanobactéries le mois de février 2011.

Tableau 12 : Diversité générique mensuelle des cyanobactéries répertoriées dans le lac Oubeira. (avril-mars 2011)

	Mois de prélèvement	Genre		Fréquence de genre
		Coloniale	Filamenteuse	
2010	Avril	<i>Microcystis</i> ,	<i>Aphanizomenon - Phormedium</i>	3
	Mai	<i>Microcystis</i>	<i>Phormedium</i>	2
	Juin	<i>Microcystis</i> ,	<i>Oscillatoria, Lyngbya, Aphanizomenon Phormedium</i>	5
	Juillet	<i>Microcystis</i> <i>Merismepodia</i>	<i>Anabaena, Phormedium, Oscillatoria, Pseudanabaena, Aphanizomenon</i>	7
	Aout	<i>Microcystis</i> , <i>Merismepodia</i>	<i>Anabaena, Pseudanabaena Oscillatoria, Phormedium Lyngbya</i>	7
	Septembre	<i>Microcystis</i> , <i>Merismepodia</i>	<i>Phormedium, Lyngbya, Oscillatoria,</i>	5
	Octobre	<i>Synochocysti</i> , <i>Microcystis</i> <i>Merismepodia</i>	<i>Oscillatoria, Lyngbya, Phormedium,</i>	6
	Novembre	<i>Microcystis</i> <i>Merismepodia</i>	<i>Pseudanabaena, Spirulina, Lyngbya Oscillatoria,</i>	6
	Décembre	<i>Microcystis</i> ,	<i>Oscillatoria</i>	2
2011	Janvier	<i>Microcystis</i>	/	1
	Février	/	/	0
	Mars	<i>Microcystis</i>	<i>Aphanizominon, Lyngbya, Phormedium</i>	4

✚ Description des genres identifiés

➤ Le genre *Oscillatoria*

Les trichomes du genre *Oscillatoria* sont libres, solitaires, dépourvus normalement de gaines. Ils sont droit ou flexueux, parfois tordus en hélice régulière (**Figure 23**).



Figure 23 : Photographie du genre *Oscillatoria*

➤ Le genre *Lyngbya*

Les trichomes droits ou irrégulièrement contournés, parfois hélicoïdaux, sont simples, rarement pseudo rameux et entourés d'une gaine ferme ou diffuse, incolore ou colorée (**Figure 24**).

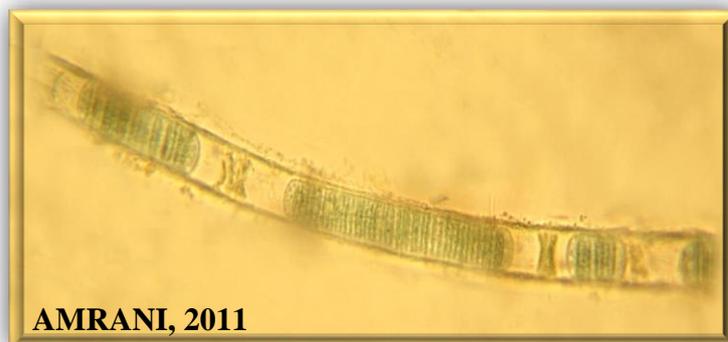


Figure 24 : Photographie du genre *Lyngbya*

➤ **Le genre *phormedium***

Le genre *Phormedium* ne se distingue de celui de *Lyngbya* que par leur gaine presque toujours diffluyente. (Figure 25).

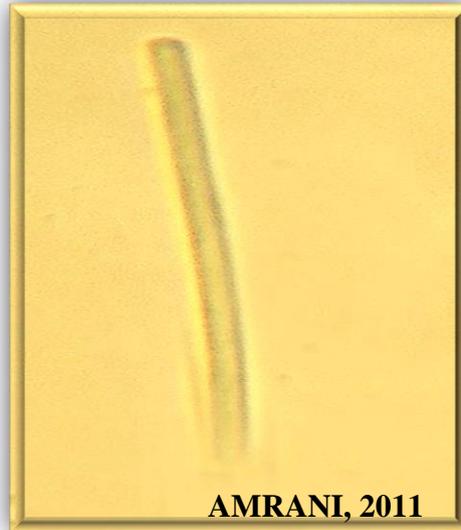


Figure 25 : Photographie du genre *Phormedium*

➤ **Le genre *Spirulina***

Leur trichomes dépourvus de gaine sont solitaire, mobiles, régulièrement enroulés en hélice plus ou moins serrée .les cloisons visibles dans les grandes formes sont pratiquement invisible chez les petites espèces. (Figure 26).



Figure 26: Photographie du genre *Spirulina*

➤ **Le genre *Microcystis***

Les cellules sphériques sont groupées en colonies et le plus souvent incolores. Les colonies ont des formes très variées : elles sont sphériques ou cylindriques, entières ou lobées parfois perforées. (**Figure 27**).



Figure 27 : Photographie de genre *Microcystis*

➤ **Le genre *Anabaena***

Les trichomes sont simples, réguliers, d'égale épaisseur, et présente des hétérocystes intercalaires plus ou moins nombreux. Les trichomes sont libres, sans gaines. (**Figure 28**).



Figure 28 : Photographie du genre *Anabaena*

➤ **Le genre *Aphanizommon***

Les trichomes sont droits réunis le plus souvent en faisceaux flottant librement. Ils possèdent une gaine très diffuse difficilement visible. Les trichomes présentent des hétérocystes et se terminent par des cellules allongées un peu atténuées incolores et vacuolisées. (**Figure 29**).



Figure 29: Photographie du genre *Aphanizommon*

➤ **Le genre *Pseudanabaena***

Les trichomes sont solitaires mobiles, sans gaine. Les cellules cylindriques ou en tonnelet sont distantes les unes des autres et réunies par un pont gélatineux présentant souvent une vacuole médiane, Pas d'hétérocystes. (**Figure 30**).



Figure 30: Photographie du genre *Pseudanabaena*

➤ **Le genre *Synéchocystis***

Les cellules sphérique sont solitaires libres et dépourvues de gaine gélatineuse. (Figure 31).

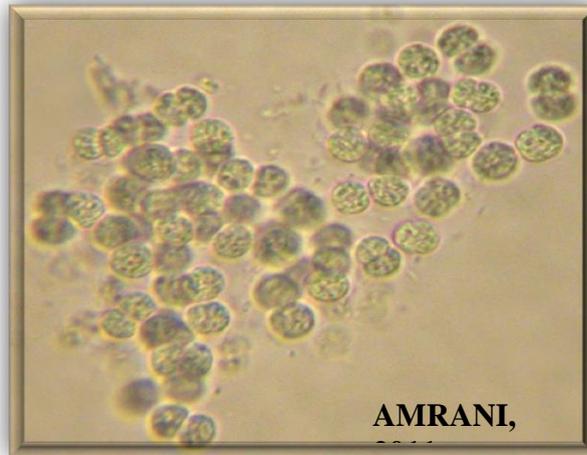


Figure 31: Photographie du genre *Synéchocystis*

➤ **Le genre *Merismopedia***

Les colonies du genre *Merismopedia* sont tabulaires, librement flottantes. Elles sont formées de cellules globuleuses, cylindriques disposées dans une gelée homogène. (Figure 32)

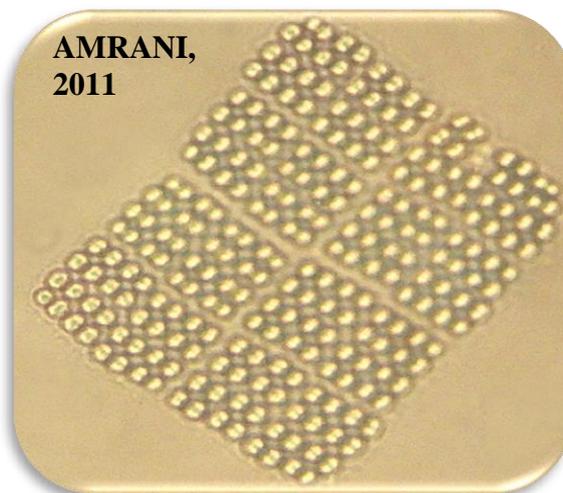


Figure 32: Photographie de genre *Merismopedia*

IV.1.2. Etude quantitative des cyanobactéries identifiées au niveau du lac Oubeïra durant la période d'étude

↳ Détermination de la prédominance des différents genres de cyanobactéries identifiées au niveau lac Oubeïra

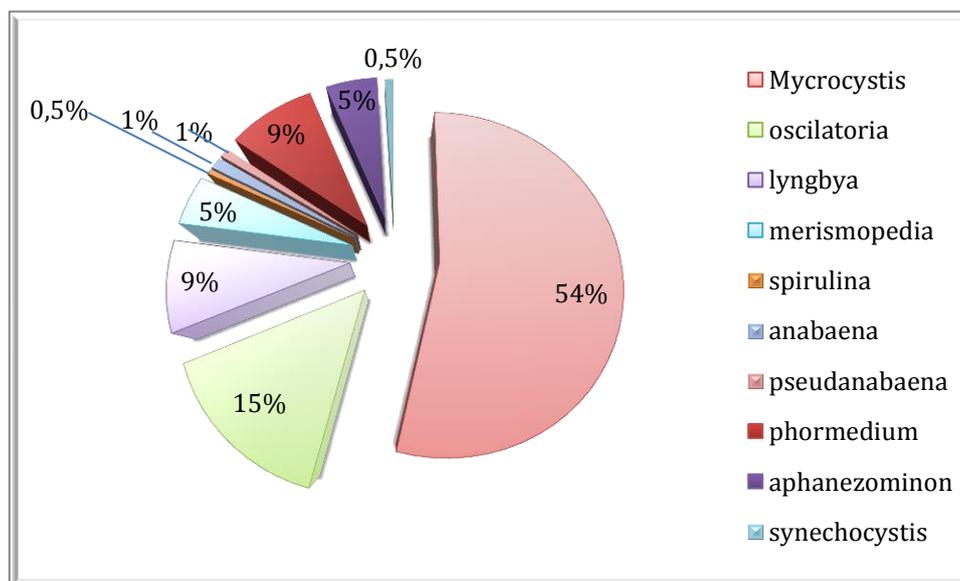


Figure 33: Distribution de la prédominance des différents genres de cyanobactéries identifiées au niveau lac Oubeïra.

La **Figure 33**, qui exprime la distribution de la prédominance générique des cyanobactéries identifiées au niveau du lac Oubeïra pendant toute la période d'étude, montre que le genre *Microcystis* est prédominant avec 54%, suivi par *Oscillatoria* qui représente 15% de l'ensemble des cyanobactéries récoltées au cours de cette étude. Les huit genres restant soit : *Lyngbya*, *Phormedium*, *Merismopedia*, *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Pseudanabaena*, *Synechocystis* et *Spirulina* ont une faible densité (environ 2 % de la densité globale des Cyanoprocaryotes récoltés dans ce lac).

IV.1.3. Etude de la dynamique temporelle des Cyanobactéries potentiellement toxique au niveau du lac Oubeïra

La détermination de la biomasse algale, durant les douze mois du travail, montre des variations considérables. La plus forte densité est observée au mois de septembre 2010 avec environ 10 560 individus par litre. Par contre la densité la plus faible est celle du mois de janvier 2011 avec 100 individus par litre. Cependant, on remarque l'absence pratiquement

totale des Cyanobactéries en février 2011. Les résultats obtenus sont illustrés dans la **figure 34**.

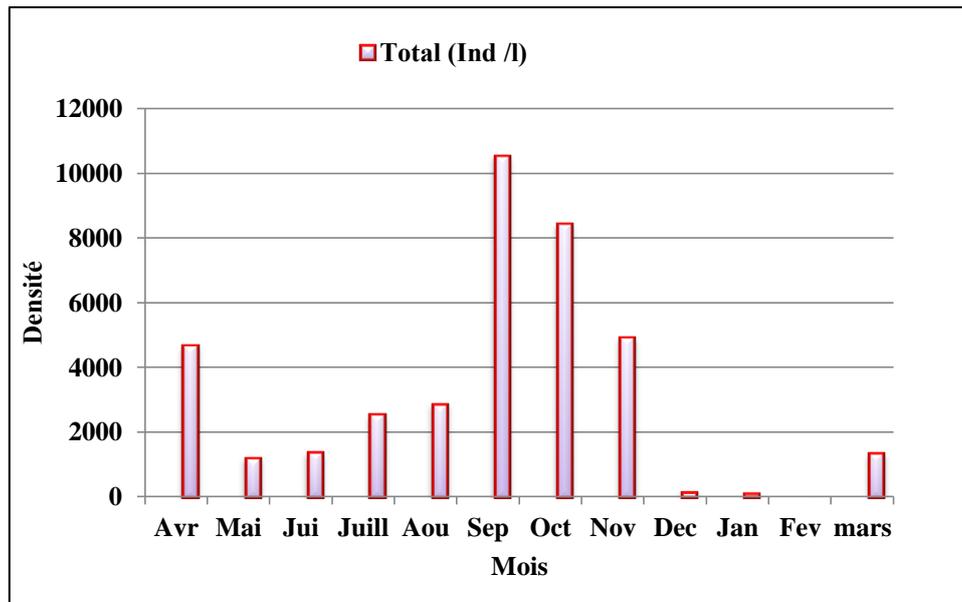


Figure 34 : Distribution temporelle de l'ensemble des Cyanobactéries récoltées dans le lac Oubeira

IV.2. Variation des concentrations en microcystines dans l'eau

Le lac Oubeira a été prospecté plusieurs fois durant L'année 2010-2011. Cette prospection avait pour but de récolter un échantillonnage mensuelle de cyanobactéries, ce qui nous permettra de réaliser le suivi toxicologique et toxinologique (suivi de toxicité et nature de toxines produites).

Les concentrations en microcystines (MCs) dans l'eau (toxines extracellulaires) et les échantillons d'algues (toxines intracellulaires) ont été analysées par le Test d'inhibition PP2A, et leur variation saisonnière est représentée dans les **figures 35** et **36**. Les niveaux mesurables de MCs ont été détectés dans les fractions dissoutes et particulaires dans l'ensemble des échantillons examinés, avec des concentrations allant de 18 à 11 800 et à partir de >10 à 1 600 ng/ l, respectivement. Les concentrations élevées de MCs intracellulaires ont été signalées en 2010 au début d'automne (septembre à octobre) avec une valeur maximale de 1.6 µg/l.

Concernant celles extracellulaires sont de plusieurs ordres de grandeur supérieures à celles des concentrations intracellulaires avec un pic en Septembre de 11,8 µg/l. Au cours de 12 mois d'échantillonnage d'avril 2010 au mars 2011, le total de MCs se situait entre 0,028 et 13,4 µg équivalent MC- LR/l. Le pourcentage de MCs extracellulaires variait de 67 à 99%

pour toutes les dates d'échantillonnage, sauf en juin et juillet où elle a varié de 1,6 à 32 %, respectivement.

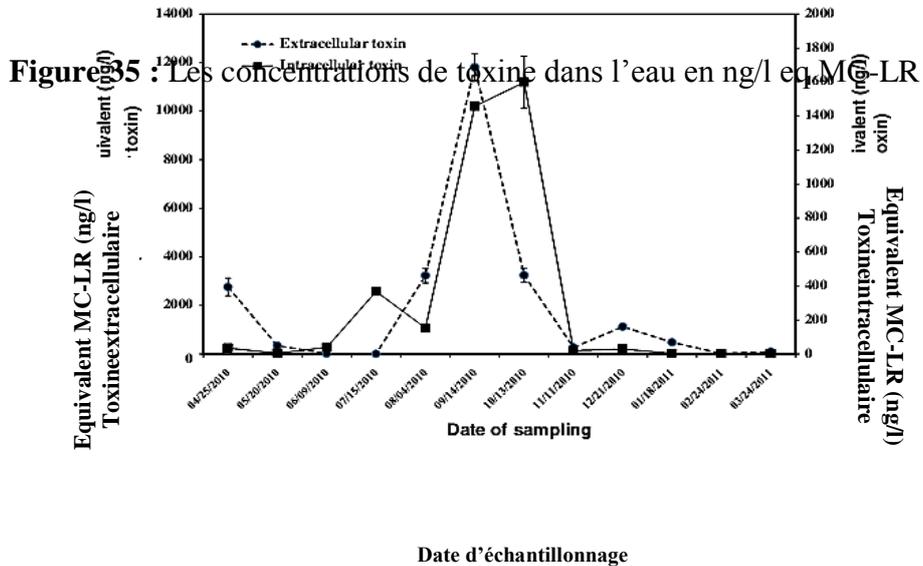
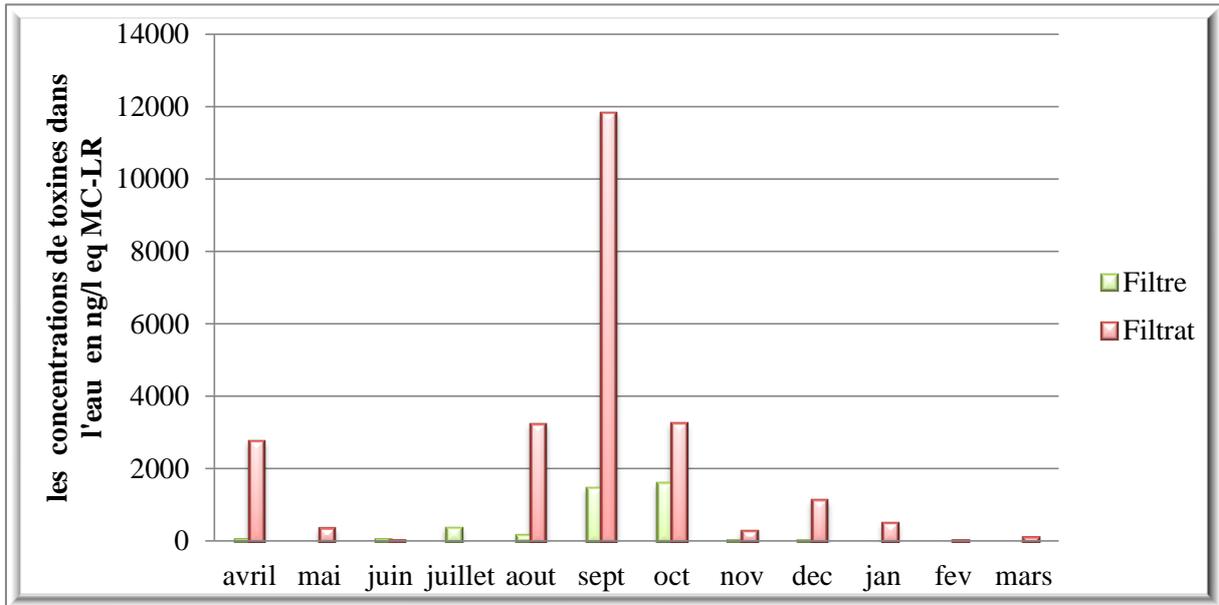


Figure 36 : Distributions et variations de la MCs extracellulaire (ligne brisé) et intracellulaire (ligne non brisé) dans l'eau de surface collectée mensuellement

IV.3. L'identification des congénères des Microcystines par LC-MS/MS

L'échantillon d'eau du lac Oubeïra du mois de septembre 2010, où la concentration la plus élevée de MCs était observée, a été analysé par micro-chromatographie liquide à haute performance (CLHP) couplée à la spectrométrie de masse (SM) afin d'identifier et de caractériser les congénères de microcystines par leur masse moléculaire.

Les spectres de cet échantillon (**Figure 37**) ont révélé la présence de trois pics, dont deux relatifs aux MC-YR 1017,5 et 603,5 et MC- LR 967,9 et 553,4. Nous avons aussi observé la présence d'un autre pic n'est pas très intense. Dans la littérature, le seul congénère MC avec un $[M+H]^+$ ion à m/z : 1049.5 décrit jusqu'à présent est MC- homotyrosineR (MC-(H₄)YR) (Namikoshi et al., 1992). Par conséquent, en fonction du temps de rétention et l'ion parent $[M+ H]^+$, ce composé mineur devrait être MC (H₄) YR. Ainsi, la forme de l'échantillon d'eau du lac Oubeïra recueillies en septembre 2010 présente trois congénères de MC : MC- LR, MC- YR, et MC- (H₄) YR.

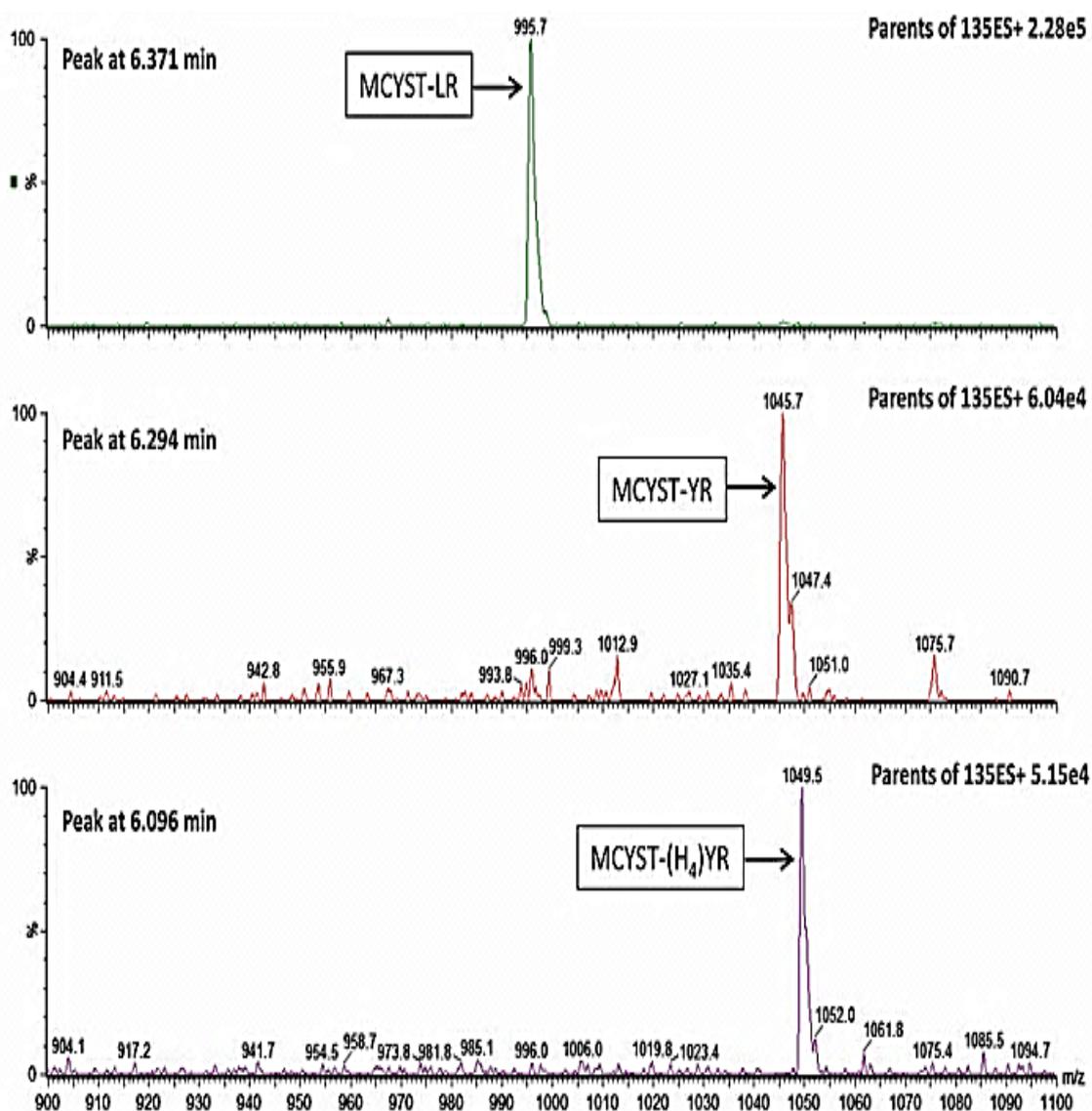


Figure 37 : Résultats d'identification des microcystines par CL/MS/MS.

IV.4. Etude de l'impact des cyanotoxines sur les poissons

IV.4.1. Variation de MC contenant dans les divers organes de poissons

IV.4.1.1. Chez l'anguille européenne *Anguilla anguilla*

Les concentrations de MCs dans les différents tissus de l'anguille européenne variaient de 86 à 333 ng équivalent MC- LR /g dans le foie, de 66 à 233 ng équivalent MC-LR/g dans les viscères et de 54 à 67 ng équivalent MC-LR/g dans les muscles. La concentration la plus élevée était dans le foie (333 ng équivalent MC-LR/g), suivie par l'intestin (233 ng équivalent MC- LR/g) et les muscles (67 ng équivalent MC- LR/g).

⇒ Dose de toxine dans le foie

Les résultats du test d'inhibition de protéine phosphatase 2A (PP2A), réalisé sur les foies d'anguilles européennes pêchées du lac Oubeïra durant la période allant d'avril 2010 ou mars 2011, sont montrés dans la **figure 38** dans lequel on observe deux pics de toxines en janvier 2011 et février 2011, la concentration de toxine la plus élevée était de l'ordre de 333 ng eq MC-LR/g alors que la moins importante est au mois de mars 2011 de l'ordre de 85,8 ng eq MC-LR/g. L'étude statistique de la variance (test ANOVA) montre que les doses de toxines dans le foie de l'anguille présentent une différence significative suivant le temps (P=0,005).

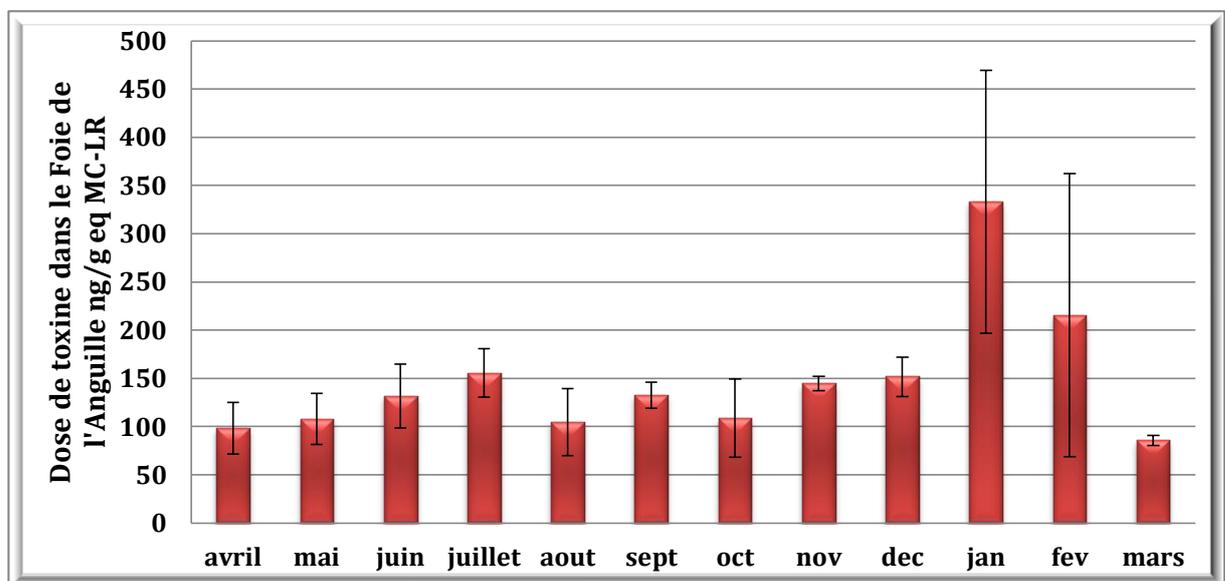


Figure 38 : La dose des Microcystines dans le foie de l'anguille européenne.

⇒ Dose de toxine dans les viscères

Les viscères prélevés après dissection des échantillons d'anguilles européennes du lac Oubeïra durant la période d'étude ont montré une variabilité concernant la dose de toxines détectée par la méthode colorimétrique PP2A, ce qui a été affirmé par le test ANOVA qui a dévoilé qu'il y'a une différence significatives entre les 12 mois ($P = 0,047$), dont la plus forte dose est observée au mois de février 2011 d'environ 233 ng eq MC-LR /g par contre la plus faible est 60,01 ng eq. MC-LR /g au mois de septembre. Les résultats obtenus sont montrés dans la **figure 39**.

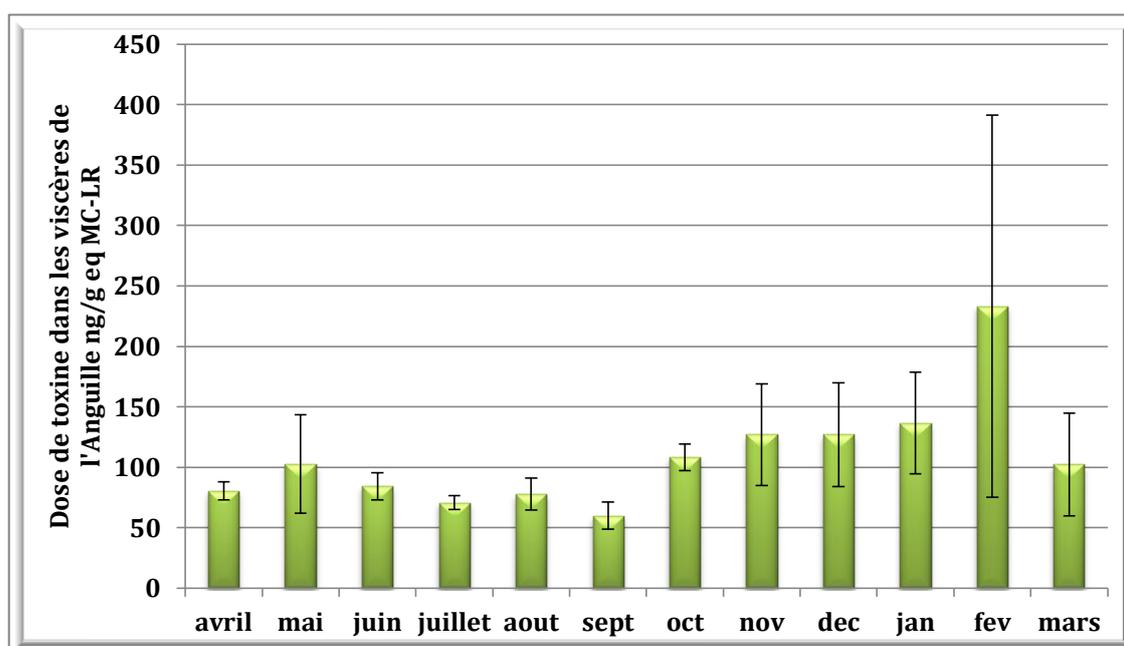


Figure 39 : La dose de Microcystines dans les viscères de l'anguille européenne.

⇒ Dose de toxine dans les muscles :

La détection des microcystines dans les muscles de l'anguille européenne du lac Oubeïra, montre une stabilité remarquable de ces toxines dans cet organe, tandis que le même test, précédemment cité, montre la présence d'une différence significative entre les douze mois ($P=0,023$) dont la dose la plus haute est environ **66,81ng eq MC-LR /g** aux mois de septembre et mars 2010. Tandis que la faible dose est au mois d'Aout avec **54,29ng eq MC-LR/g** (Figure 40)

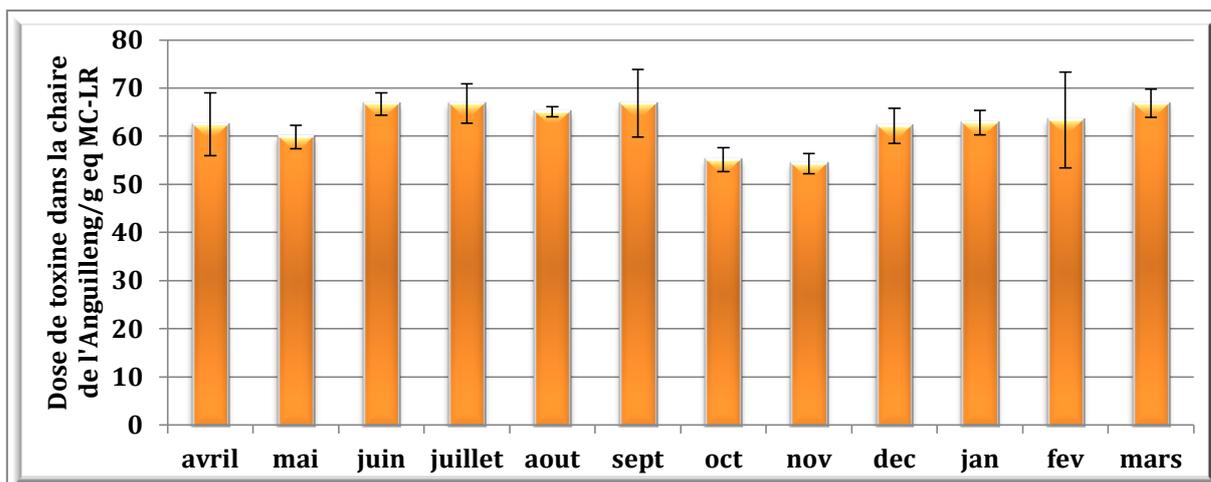


Figure 40 : La dose de Microcystines dans la chair de l'anguille européenne.

IV.4.1.2. Chez la Carpe commune *Cyprinus carpio*

Les MCs mesurées dans les différents tissus de la carpe commune prélevé entre avril 2010 et mars 2011 ont varié de 343-771 ng équivalent MC-LR/g dans l'hépatopancréas, de 371 à 3059 ng équivalent MC-LR/g dans les viscères et de 329 à 680 ng équivalent MC-LR/g dans les muscles. La concentration la plus élevée était trouvée dans les viscères (3059 ng équivalent MC-LR/g), suivie par l'hépatopancréas (771 ng équivalent MC-LR/g) et les muscles (680 ng équivalent MC-LR/g)

⇒ Dose de toxine dans le foie

Le test d'inhibition de protéine phosphatase 2A (PP2A), nous a permis d'évaluer la dose des cyanotoxines de type microcystine dans l'hépatopancréas des individus de la carpe commune prélevé dans le lac Oubeira. La figure 40 nous montre que la dose de MC-LR variée entre **342,65ng eq MC-LR /g** au mois de avril 2010 jusqu'au **770,74ng eq MC-LR /g** en octobre 2010. L'étude statistique montre l'absence d'une différence significative entre les différentes doses de toxine dans cet organe durant toute l'année ($P=0,369$) (**Figure 41**).

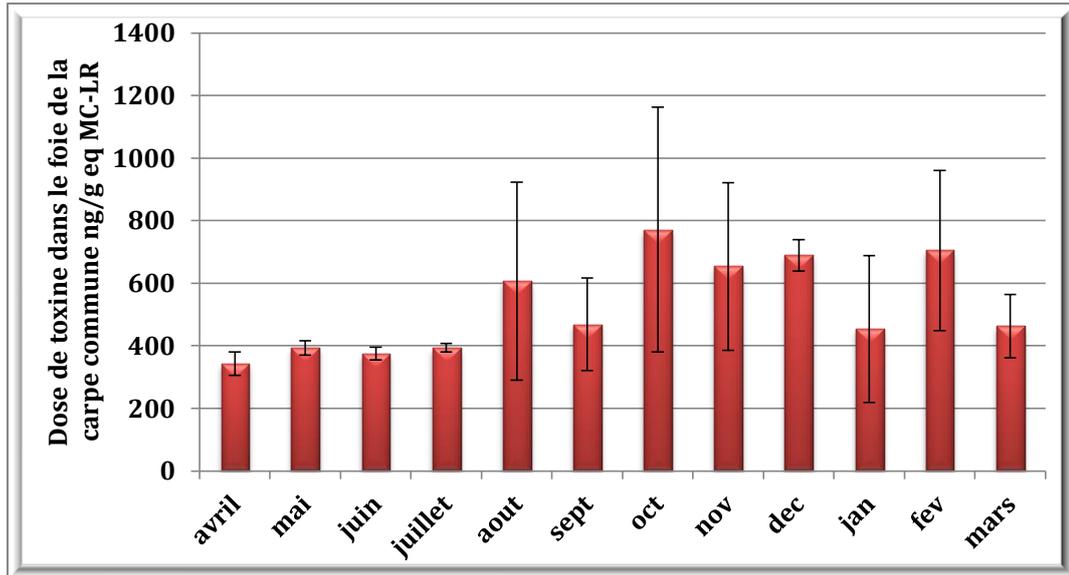


Figure 41 : La dose de Microcystines dans le foie de la carpe commune.

⇒ **Dose de toxine dans les viscères :**

Les viscères sont le deuxième organe de la carpe commune examinés par la méthode colorimétrique PP2A, dont on a remarqué la plus forte dose est observée en mois d’avril 2010 avec **3059** ng eq MC-LR /g par contre la plus faible est **371,25** ng eq MC-LR /g en septembre (**Figure 42**). L’étude statistique réalisée pour cet organe montre une différence très hautement significative entre les différents mois (**P=0,000**).

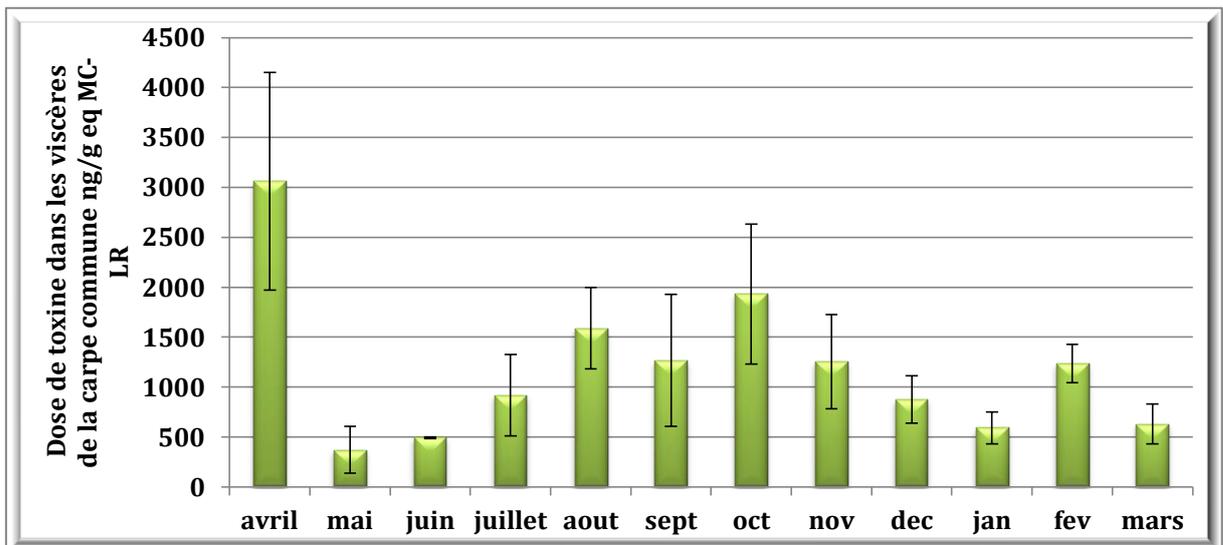


Figure 42 : La dose de Microcystine dans les viscères de la carpe commune.

⇒ Dose de toxine dans les muscles :

Les MCs détectées dans la chair de la carpe commune du lac Oubeïra durant la période du travail, montre une stabilité remarquable des toxines sauf au mois décembre 2010 dont on a signalé **680,7 ng eq MC-LR /g**. Tandis que la plus faible est observée au mois juillet avec **329,32ng eq MC-LR /g (Figure 43)**. Alors que, le test statistique réalisée, prouve la présence d'une différence très hautement significative entre les différents concentrations durant les 12 mois d'étude (**P=0,000**).

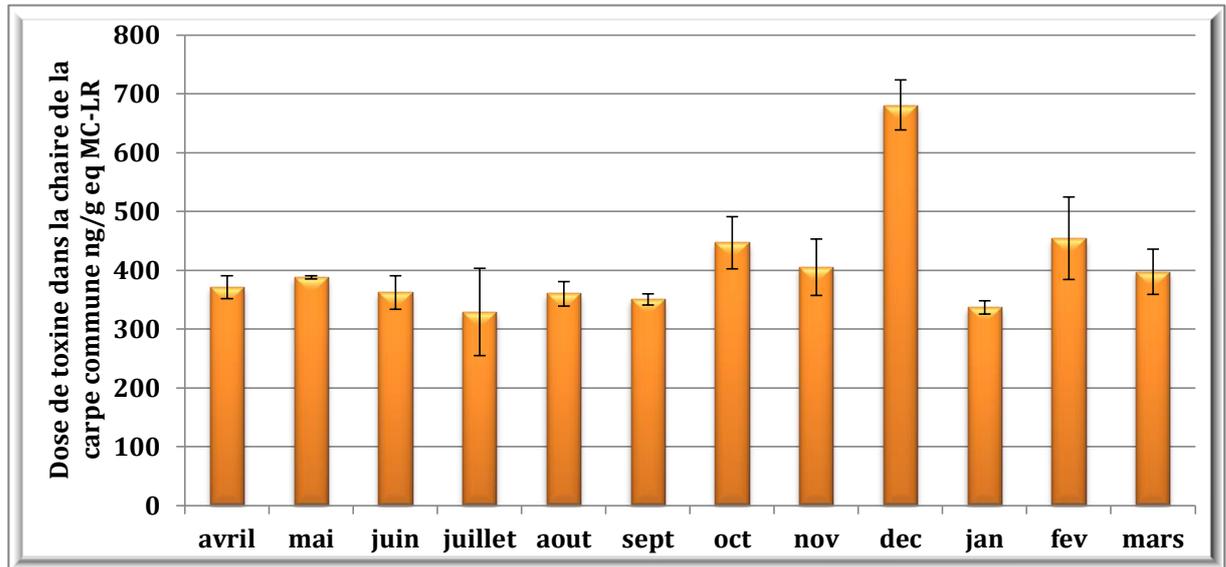


Figure 43 : La dose de Microcystine dans la chair de la carpe commune.

IV.5. Interprétation des coupes histologique

Après dissection des individus de carpe commune *Cyprinus carpio* et de l'anguille européenne *Anguilla anguilla*, leurs foie et viscères sont orientés vers les coupes histologiques qui ont été réalisées au niveau du laboratoire de l'anatomo-pathologie au niveau de l'hôpital d'El Tarf.

IV.5.1. Le Foie

En ce qui concerne le foie de la carpe commune, les remarques obtenues montrent la présence des lésions hépatitiques légères, ce sont des lésions inflammatoires avec une conservation de toute la composante épithéliale, avec une dilatation de sinusoiide, c'est-à-dire une dilatation de l'espace porte constituer des 03 canaux : artère, veine et le canal biliaire, c'est une forme de souffrance, comme il est intéressant de noter la présence des stéatoses en périphérie, ce sont des adipocytes ou des dépôts de lipides qui ne doivent pas exister dans le foie. Ainsi, l'étude histologique nous a permis de signaler l'existence des sidérophages, se sont des cellules inflammatoires qui indiquent la présence d'une hémorragie.

Sur l'ensemble des prélèvements et niveaux de coupe réalisés aux dépends du foie de l'anguille européenne, on observe des lésions histologiques en faveur d'une hépatopathie chronique représentée par un élargissement de la majorité des espaces portes par une fibrose modérée périportale et un infiltrat inflammatoire mononucléé essentiellement lymphoplasmocytaire. Dans les lobules les hépatocytes s'organisent en fines travées présentant par endroits des signes de souffrance cellulaire à type de ballonisation avec un cytoplasme abondant clarifié. A noté également, qu'environ 10 % des hépatocytes présentent des lésions de stéatose macro et microvacuolaire (**Planche1**).

IV.5.2.Les viscères

On a constaté que l'aspect histopathologique des viscères des deux espèces *C. carpio* et *A. anguilla* est similaire. La muqueuse est faite de villosités larges diminuées de hauteur, bordées d'un épithélium tantôt remanié tantôt totalement abrasé. A noté également un infiltrat inflammatoire lymphoplasmocytaire panparietale par endroits (**Planche 2**).

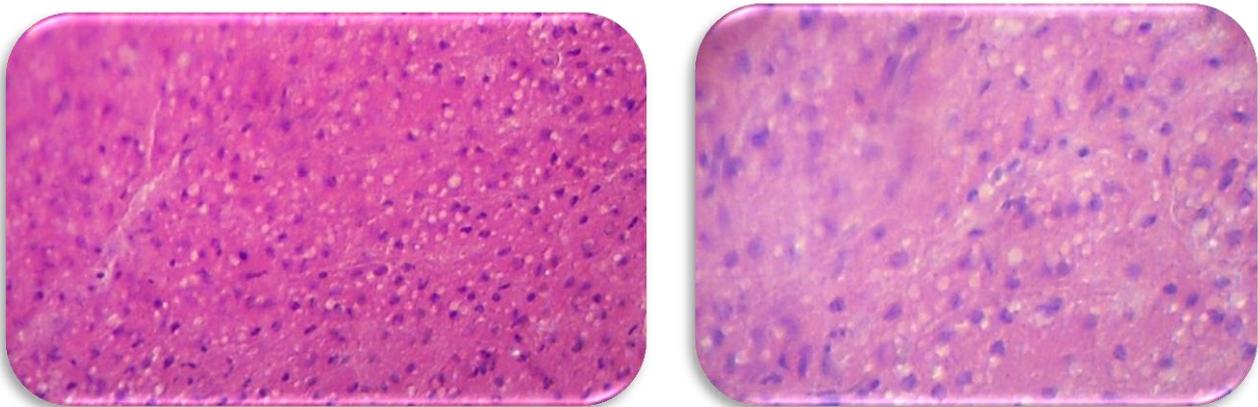
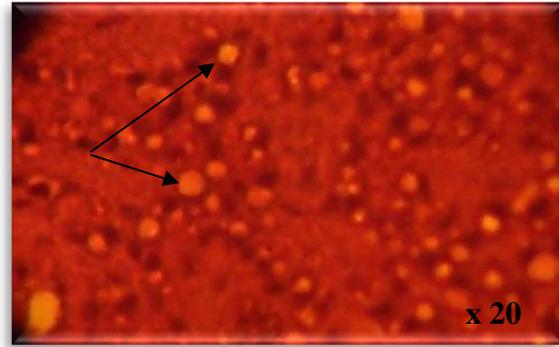
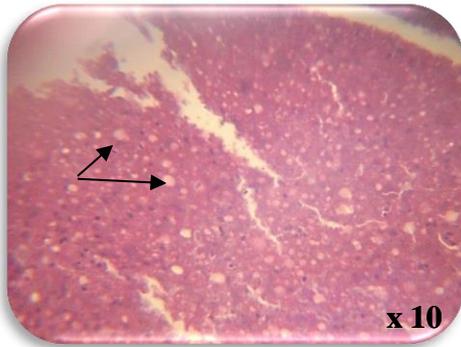
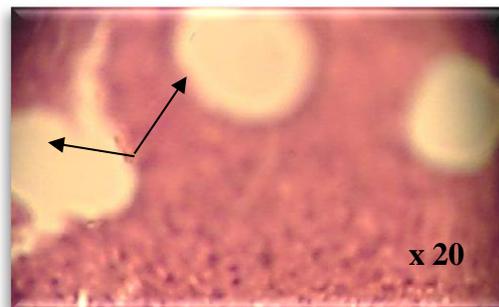
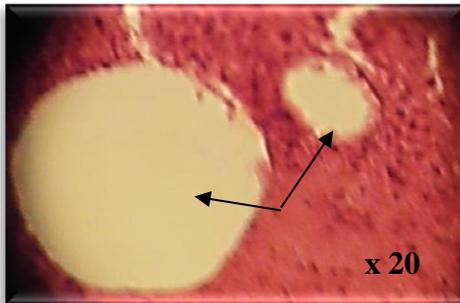


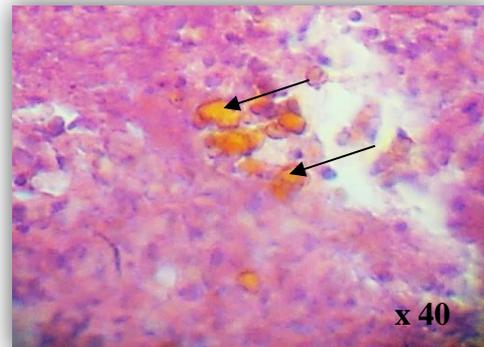
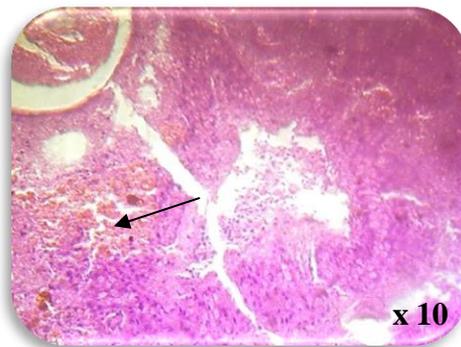
Figure 44 : Tissue sain du foie.



Pathologie 1 : Stéatose micro-vésiculaire

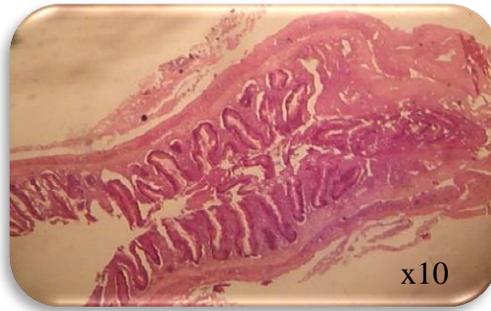


Pathologie 2 : Stéatose macro-vésiculaire.



Pathologie 3 : Dépôt d'hemosédirine (sédérophage).

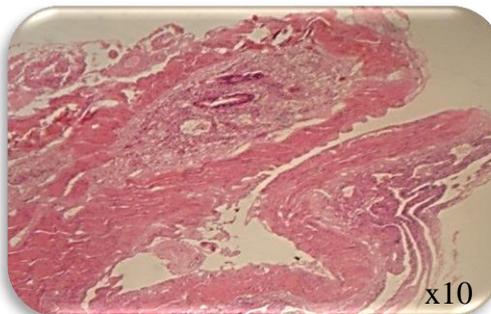
Planche 1 : Les coupes histologiques du foie



Photographie d'un viscère sain



Pathologie 1 : Viscère totalement ulcéré



Pathologie 2 : Abrasion totale de l'épithélium avec remaniements inflammatoires

Planche 2 : Les coupes histologiques des viscères

Discussion

Dans les milieux aquatiques, les problèmes de santé posés par l'apparition du phytoplancton toxique dans les eaux côtières ont conduit souvent à la fermeture de certains parcs conchylicoles. En revanche, les microorganismes d'eau douce susceptibles de produire des toxines ont reçu peu d'attention. C'est le cas des cyanobactéries photosynthétiques qui se présentent sous forme unicellulaire ou pluricellulaire.

Lorsque l'environnement leur est favorable, les algues bleu-vert se développent massivement et forment des efflorescences (blooms) qui apparaissent vers le début de l'automne. Leur prolifération est induite par l'augmentation, dans les eaux eutrophes, d'éléments nutritifs tels que les nitrates et les phosphates qui proviennent des activités urbaines et agricoles.

Une des conséquences de l'apparition de ces blooms est l'augmentation de la concentration en toxines dans les eaux douces, ce qui constitue un vrai danger de santé publique. Ces toxines contaminent aussi bien des retenues servant d'aires récréatives que des réservoirs d'eau potable. Les dispositifs de traitement des eaux ne semblent pas filtrer parfaitement les Cyano-procaryotes, ni éliminer complètement leurs toxines. La population humaine risque alors d'être exposée à des doses croissantes de ces toxines.

Les microcystine sont parmi les cyanotoxines les plus dangereuses et les plus diversifiées avec plus de plus de 200 congénères (**Dietrich & Hoeger, 2005 ; Hotto et al., 2007 ; Chen et al., 2009 ; Puddick et al., 2015 ; Svircev et al., 2015**). Ces heptapeptides monocycliques produits par plusieurs genres potentiellement toxiques sont rapportées dans le monde entier (**Zurawell et al., 2005**). Les microcystines sont reconnues par leur forte inhibition des protéines phosphatases 1 et 2A (**Codd, 1995 ; Dawson, 1998**) ainsi que leur critère cancérigène lors des intoxications chroniques (**Nishiwaki-Matushima et al., 1991, 1992 ; Lone et al., 2015**). L'organe privilégié de ces toxines est le foie grâce à leur forte affinité aux transporteurs des acides biliaires (**Sahin et al., 1996**), l'hyper-phosphorylation

des protéines cytosquelettiques du foie provoque le dommage (**Falconer & Yeung, 1992**), l'hémorragie (**Hooser et al., 1990**) et la mort des hépatocytes (**Ding et al., 2000**).

Dans le but d'évaluer l'accumulation de cette cyanotoxines dans la chaîne trophique, une étude était réalisée entre avril 2010 et mars 2011 au niveau du lac Oubeïra (Parc National El Kala, Nord-est algérien), un site Ramsar d'importance internationale (1982), qui a reconnue des phases de prolifération massive des cyanobactéries potentiellement toxiques, dont **Nasri et al., (2008)**, on put détecter une forte concentration de MC dans l'eau du lac allant à 1.12 mg/l en dépassant ainsi les réglementations de l'OMS qui sont 1µg/l pour l'eau potable et 20 µg/l pour les eaux récréatives (**WHO, 1998**).

Notre travail comporte un échantillonnage mensuel de deux espèces de poissons, la **carpe commune** *Cyprinus carpio*, une espèce omnivore à 90% herbivore, et **L'anguille européenne** *Anguilla anguilla*, un poisson carnivore, accompagné d'un prélèvement d'eau du lac afin de déterminer la charge en cyanobactéries et en toxines dans ce bassin d'eau douce et les différentes variantes existantes.

La première étape était d'identifier les différents genres de cyanobactéries qui y sont présents au niveau de lac Oubeïra et d'étudier la dynamique temporelle de ces genres.

En effet, on a pu identifier dix (10) genres taxonomiques parmi les peuplements de cyanobactéries qui peuplent le lac Oubeïra, qui sont: ***Microcystis*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Lyngbya*, *Merismopedia*, *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Synechocystis*, *Pseudanabaena* et *Spirulina*** avec la prédominance du genre ***Microcystis***.

En comparant avec une étude effectuée au niveau du même site, qui a permis d'identifier dix (10) genres qui peuplent ce lac : *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Gomphosphaeria*, *Synechocystis*, *Merismopedia*, *Lyngbya*, et *Pseudanabaena*, avec toujours la prédominance du genre *Microcystis* (**Nasri et al., 2004**). Par rapport à la nôtre, on remarque la présence de deux nouveaux genres : *Phormidium* et *Spirulina* avec l'absence durant toute la période d'étude des deux genres : *Gomphosphaeria* et *Planktothrix*.

Un autre travail réalisé au niveau du barrage Chaffia, montre presque les mêmes genres qui sont *Microcystis*, *Pseudanabaena*, *Phormidium*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*. (**Nasri,**

2008), avec l'absence des genres *Merismopedia*, *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Synechocystis*, et *Spirulina*. Du même, une tâche effectuée au niveau du barrage Koudiat Medaouar (Timgad, Algérie), a permis d'identifier à travers les observations des critères morphologiques des cyanobactéries récoltés durant la période de Janvier à Juin 2009, sept (7) genres, dont quatre sont similaire à les notre *Phormidium*, *Lyngbia*, *Merismopedia*, *Spirulina*, en plus de *Aphanothèce*, *Calothrix* et *Johannesbaptisti* (**Aggoune, 2009**).

Le genre *Phormedium* ne se distingue de celui de *Lyngbya* que par son gaine presque toujours diffluente et leur thalle formant des plaques étalées, gélatineuses ou pelliculaires (**Bourrelly, 1985**). Alors que le genre *Spirulina*, leur trichomes dépourvus de gaine sont solitaire, mobiles, régulièrement enroulés en hélice plus ou moins serrée. Les cloisons visibles dans les grandes formes sont pratiquement invisible chez les petites espèces. Ceci a conduit de nombreux auteurs à séparer les *Spirulina*, forme sans cloisons visibles des *Arthrospira* dont les cloisons se voient facilement (**Stzenberger, 1852**). **Elenkin** a placé les *Spirulina* sans cloisons parmi les Cyanophycées unicellulaires ou les **Chroococcales**. Mais les travaux de nombreux auteurs (**Schmid, 1920 ; Figini, 1921**) ont montré qu'à l'aide de coloration, il était possible de mettre en évidence les cloisons invisible de *Spirulina*. De ce fait, il n'y a aucune raison de conserver la coupure générique entre *Spirulina* et *Arthrospira* (**Bourrelly, 1985**).

Nos résultats montrent que les genres *Microcystis* et *Oscillatoria* représentent la quasi-totalité des cyanobactéries toxiques qui prolifèrent aux saisons d'été et d'automne dans le lac Oubeira. Cependant on relève une absence des cyanobactéries toxiques pour le mois de février. Cette fluctuation peut être expliquée par la baisse de température et les précipitations rencontrés dans certains mois car la température et la stabilité du plan d'eau sont parmi les facteurs majeurs de la prolifération des Cyanophycées (**Wicks & Thiel, 1990 ; Jacoby et al., 2000**).

Ces résultats concordent avec ceux trouvés par de nombreux auteurs, notamment **Carmichael, 1992 et Adams, 2000** qui constatent que dans les eaux de surface des pays tempérés, les cyanophycées sont pratiquement absentes en hiver (elles passent l'hiver dans les sédiments), mais connaissent aux périodes chaudes des développements pouvant être explosifs. **Codd et al. (1989)** et **Sivonen et al., (1990)** ont expliqué que si les algues bleues atteignent des densités élevées, en surface c'est grâce au brassage des eaux qui font remonter les substances nutritives accumulées au fond qui regagnent les couches supérieures.

Ainsi, nous estimons que les progressions génériques des cyanobactéries, dépendent de la capacité de chaque genre à s'adapter aux différentes conditions environnementales. Ce qui explique les différences qui peuvent apparaître dans la dynamique temporelle de cyanobactéries sous différentes latitudes et régions du monde (**Nasri et al., 2004**).

Nos observations nous ont permis aussi de constater que les genres, *Microcystis* et *Oscillatoria* sont les plus adaptés à se développer majoritairement dans des conditions où ils sont avantagés par rapport aux autres micro-organismes. Par ailleurs, **Pinckney et al. (1997)** estiment, que les cyanobactéries qui sont les plus répandues durant les mois d'été, doivent avoir une grande contribution à l'enrichissement de la biomasse du phytoplancton.

Dans cette étude, même si aucun bloom dense de cyanobactéries n'a été observé au cours de la période d'échantillonnage, les concentrations totales en MC variaient entre 0,028 et 13,4 µg équivalent MC- LR/l. Par rapport à la concentration totale de la toxine, la proportion de MCs extracellulaires était généralement supérieur (> 65%) que les MCs intracellulaires, à l'exception de deux mois juin et juillet 2010, quand la proportion des toxines dissoutes était 1,6 et 32%, respectivement. Ces hauts pourcentages des MCs dissoutes dans l'eau du lac Oubeïra peuvent être le résultat de leur libération des cellules cyanobactériennes au cours de sénescence et la décomposition.

Durant certains mois on a signalé des fortes concentrations de toxines allant jusqu'au 13,4 µg équivalent MC- LR/l qui dépasse la réglementation pour l'eau potable mis par l'OMS en 1998 (**WHO, 1998**) qui est de 1 µg/l. Des résultats similaires ont été détectés dans ce même lac par **Nasri et al. (2004)** dont ils ont noté en avril, mai et août 2000 respectivement 1070, 522 et 444 µg/l or en 2001 la plus grande valeur était en mois de août avec 29,163 µg/l. De plus, récemment lors d'une efflorescence massive du genre *Microcystis* **Nasri et al. (2008)** ont détecté une forte concentration en microcystine d'environ 1,12 mg/l.

L'analyse par la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse des toxines dissoutes dans l'eau du lac au mois du septembre 2010, où la plus forte concentration de MC ; a été observée par le test PP2A, montre la présence majeure de la variante MC-LR (90% du totale) et mineur de deux variantes MC-YR (6%) et MC-(H₄) YR (4%). Ce qui confirme les études précédentes effectuées dans le même lac (**Nasri et al. 2004, 2007, 2008**), qui ont indiqué que la variante dominante dans le lac est généralement MC-LR suivie par deux à trois autres variantes hydrophobes, tel ; MC-RR, MC-YR, D-Asp3-

MC-LR, et pour la première fois MC-(H₄) YR. Les variantes de microcystines de nos échantillons sont assez semblables à ceux annoncés au Maroc par **Oudra et al. en 2001** et **El Ghazali et al., 2011**.

L'accumulation des cyanotoxines dans la chaîne alimentaire est à l'heure actuelle la question la plus préoccupante. De nombreuses études ont suggéré que les cyanotoxines s'accumulent dans les organismes aquatiques (**Li et al., 2004 ; Sipia et al, 2001a ; Negri & Jones, 1995**). Les organismes peuvent être contaminés soit par voie transdermique ou par ingestion via la prise de nourriture. Afin de comprendre ce processus on a effectué un échantillonnage de deux espèces de poissons *Cyprinus carpio* et *Anguilla anguilla* pendant une année d'étude. Les résultats obtenus montrent que ces deux espèces peuvent accumuler des doses différentes de MCs dans les trois organes étudiés (foie, viscères et muscle).

La carpe a fait l'objet d'une multitude de travaux sur sa réponse physiologique et histologique contre les cyanotoxines à l'inverse du l'anguille européen (**Zambrano & Canoelo, 1996 ; Fischer & Dietrich, 2000 ; Li et al., 2003, 2004 ; Paliková et al., 2007 ; El Ghazali et al., 2010 ; Amado et al., 2011 ; Shi et al., 2015**), qui ont prouvé le pouvoir remarquable de cette cyprinidé à accumuler les microcystines dans ses organes.

Les résultats obtenus par le dosage de MC par la méthode d'inhibition de protéine phosphatase 2A (PP2A), indiquent que le viscère est l'organe le plus accumulateur des toxines avec **3059 ng équivalent MC-LR/g** au mois d'avril 2010 chez la carpe, nos résultats ont été confirmé par l'étude de **Chen et al. en 2006**, dans laquelle ils ont trouvé que la carpe argenté naturellement peut accumuler plus de 84,4% de toxines dans leurs intestins, ainsi que le travail de **Tencalla & Dietrich, (1997)** sur la truite arc-en-ciel où ils ont trouvé que l'intestin est la première barrière pour les cyanotoxines. **Tricarico et al. (2008)** ont rapporté que les écrevisses (*Procambarus clarkii*) recueillies dans le lac de Massaciucoli (Italie) accumulées les cyanotoxines dans tous les organes analysés mais la plus forte concentration de MCs a été retrouvée dans l'intestin. Cependant, les viscères de l'anguille sont en seconde classe dont ils ont accumulé près de 233 ng équivalent MC-LR/g en mois de février 2011. Ce qui a été trouvé chez les tortues du lac Oubeira par **Nasri et al. en 2008** qui ont motionné que l'*Emys orbicularis* et *Mauremys leprosa* exposés naturellement, en 2005, a une dose aigue ont accumulé respectivement 1,95% (0,006µg/g MC-LR) et 6,77% (0,02 µg/g MC-LR) de toxines dans leurs viscères. Une espèce d'escargots, *Sinotaia histrica* a accumulé la plus forte

concentration de MC dans le contenu de l'appareil digestif (9,03 pg/g), suivie par les gonades (6,90 pg/g) et l'hépatopancréas (5,38 pg/g), tandis que la concentration inférieure dans les pieds (2,48 pg g⁻¹) (**Xie et al., 2007**).

L'explication proposée pour ce phénomène est la nature du régime alimentaire des cyprinidés, car ils sont des herbivores ou encore des cyanobactériophages, c'est-à-dire ils ingèrent les cellules cyanobactériennes de façon qui permet à ces dernières de libérer leurs endotoxines (**Tencalla & Dietrich, 1997 ; Fischer et al., 2000 ; Winfield & Nelson, 1991**). Ainsi, dans le lac Chaohu (Chine), les MCs accumulées dans les viscères de la carpe argenté (137 µg g⁻¹) ont été 20 fois plus que celles présentes chez les poissons carnivores et omnivores (<6.5 µg g⁻¹) (**Xie et al., 2005**). En plus, la dose de toxines accumulée dépend du régime alimentaire de chaque poisson, qui sera moins important chez les espèces carnivores que celles herbivores (**Gkelis et al., 2006**). **Fischer & Dietrich (2000)** ont suggéré qu'il existe plusieurs différences entre le système gastro-intestinal des poissons carnivores tel que la truite arc en ciel si l'on compare avec un autre planctophage ou herbivores comme la carpe commune.

Le deuxième organe étudié c'est le foie, dont la dose la plus remarquable pour l'anguille est équivalente à 333 ng eq MC-LR/g tandis que chez la carpe est de l'ordre de 770,74 ng eq MC-LR /g. D'après **Falconer (1993)**, les microcystines sont transportées par les acides biliaires à l'intestin où elles vont être absorbées et orientées vers le foie, elles s'accumulent et inhibent les protéines phosphatases 1, 2A ou 3 (PP1, PP2A, PP3) (**Zurawell et al., 2005**). Nos remarques ont été similaires aux autres travaux comme ceux de **Chen et al. (2006)** avec la carpe argenté, **Marzec et al. (2006)** avec *Platichthys flesus* L., et **Amé et al. (2010)** avec la Tilapia du nille. En ce qui concerne le travail réalisé sur les tortues au niveau de notre site d'étude, **Nasri et al. (2008)** ont trouvé que les deux espèces de tortues *Emys orbicularis* et *Mauremys leprosa* ont accumulé une immense dose de toxines dans leur foie dont les doses étaient respectivement 0,300 µg eq. MC-LR /g (97,7%) et 0,27 µg eq. MC-LR/g (87%). Dans une autre étude, le MC-RR a été détectée dans le foie de *Carassius auratus* et *Cyprinus carpio* à une dose de 0,82 et 2,06 µg/g, respectivement (**Xie et al., 2007**). Un autre cas similaire rencontré chez deux espèces de poissons (*Carassius auratus*, *Linnaeus auratus*) qui ont accumulé les MCs dans le foie avec 461,8 à 3628,6 ng/g (**Song et al., 2007**). Du même, la tortue *Pelodiscus sinensis* a accumulé la plus forte concentration de MC dans son foie (20,8 ng/g) (**Chen et al., 2009**).

Le foie est la cible privilégiée des microcystines (**Ernst et al., 2006 ; Papadimitriou et al., 2012**) qui doivent passer du contenu de l'intestin grêle vers les transporteurs sanguins avant d'être véhiculées directement dans les lobules du foie. Ces toxines sont absorbées rapidement dans le foie et beaucoup plus efficacement par voie intrapéritonéale que par exposition orale (**Kiviranta et al., 1990 ; Nishiwaki et al., 1994**). Après injection intraveineuse ou intrapéritonéale à des souris et des rats des doses sub-létales de microcystines radiomarquées (marquage avec ^{125}I , ^{14}C et ^3H), environ 70 % des toxines se sont rapidement localisés dans le foie (**Falconer et al., 1986 ; Runnegar et al., 1986 ; Robinson et al., 1989, 1991 ; Eriksson et al., 1990a ; Meriluoto et al., 1990 ; Hooser et al., 1991a ; Reinehart et al., 1994 ; Zhang et al., 2002b**). Il a été aussi montré que la distribution de la ^3H -dihydronodularine dans différents tissus de souris, en particulier le foie et à un moindre niveau l'intestin (**Spoof et al., 2003**), est similaire à celle de la ^3H -dihydromicrocystine-LR (**Meriluoto et al., 1990 ; Eriksson et al., 1990a**).

L'accumulation de la microcystine-LR dans le foie de souris (**Yoshida et al., 1998 ; Ito et al., 2000 ; Guzman & Solter, 2002**), les tissus hépato-pancréatiques de la carpe (**Fischer & Dietrich, 2000**) et les tissus du foie de la truite arc-en-ciel (**Fischer et al., 2000**) a été également confirmée par des méthodes immunohistochimiques suite à la détection de liaisons covalentes entre la toxine et certaines protéines cellulaires.

Robinson et al. (1991) ont observé une accumulation de microcystines dans le foie après 6 jours d'exposition, alors que **Ito et al. (2001)** ont confirmé l'accumulation de MCs après 14 jours par une méthode immunohistochimique dont la sensibilité est meilleure que les marquages radioactifs.

Enfin, l'organe qui nous a intéressé de plus, c'est la muscle, c'est la partie consommée, au mois de décembre 2010 on a signalé la plus forte dose pour *Cyprinus carpio* équivalente à 608,7 ng eq MC-LR /g, alors que pour *Anguilla anguilla* on a détecté que 66,81 ng eq MC-LR/g aux mois de septembre 2010 et mars 2011. L'OMS a mis en évidence une dose journalière admissible équivalente à 0,04 µg eq MC-LR/kg pour une personne pesant 60-70 kg et consommant 100 g de poissons (**Kuiper-Goodman et al., 1999**). Pour une dose sub-chronique de 50 µg/kg, **Li et al. En 2004**, ont trouvé de fortes concentrations dans les muscles de la carpe commune très supérieures à la dose journalière tolérable, contrairement aux résultats de **Chen et al., (2006)**, qui ont remarqué que la carpe argenté ingère une grande

quantité de MCs mais accumule moins dans ces organes et surtout dans sa chair. La moule d'eau douce *Anodonta cygnea* accumulé la Cylindrospermopsine (CYL) à des concentrations allant jusqu'à 2,52 mg/g dans ces muscles (**Saker et al., 2005**). Ainsi, chez l'écrevisse, *Cherax quadricarinatus* la dose de CYL dans ses tissus musculaires abdominaux était de l'ordre de 0,9 pg/g, après exposition au *C. raciborskii* pendant 14 jours. De plus, après 16 jours d'exposition, la moule d'eau douce *Anodonta cygnea* a pu accumuler jusqu'à 2,52 ug CYL/g, dont 50% a été retenu dans les tissus après deux semaines de dépuración (**Saker et al., 2004**).

Néanmoins, plusieurs études ont rapportés que les MCs peuvent être transférées à des hauts niveaux trophiques, c'est à dire, du zooplancton et mollusques aux poissons carnivores, dans les systèmes naturels et en aquaculture (**Mohamed et al., 2003; Smith et al., 2008**). **Smith et al. (2008)** ont rapporté que >80% de MC liées au zooplancton *Bosmina longirostris* utilisés comme nutrition à *Lepomis gibbosus*, transférées directement au poisson, indiquant que MC conjugués ou libre peuvent transférer efficacement dans la chaîne trophique. Ainsi, les variations de concentrations dans les différents tissus des deux espèces de poissons capturés dans cette étude sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature. **Xie et al. (2005)** ont signalé que la concentration en MCs dans le foie était la plus élevée dans les poissons carnivores, suivie par les poissons omnivores, et était plus basse dans les poissons phyto-planctophage et herbivores. Cependant, la concentration de MCs dans l'intestin est généralement montrée une tendance inverse, avec des concentrations étant plus élevée dans les poissons phyto-planctophages suivie par les poissons omnivores et carnivores. En revanche, **Zhang et al. (2009)** ont constaté que la concentration de MCs dans le muscle était plus élevée chez les poissons omnivores, suivi par les poissons phyto-planctophage, et le plus faible chez les poissons carnivores.

Jusqu'à présent, plus d'attention a été accordée au contact de l'homme avec les MCs dans l'eau potable (**WHO 1998**) et à la bioaccumulation de MC chez les animaux aquatiques dans les eaux naturelles. Les poissons, au sommet de la chaîne alimentaire aquatique, sont susceptibles d'être les plus affectés par l'exposition à des substances toxiques cyanobactériennes, et donc leur consommation peut poser de grands risques pour l'homme. Pendant toute la durée de cette étude, les résultats obtenus ont montré que la TDI a été dépassé que dans la chair de la carpe commune. Cependant, si nous utilisons les lignes directrices établies par **Ibelings & Chorus (2007)** aucun des échantillons de tissus musculaires de la carpe commune et l'anguille européenne au cours de cette même période

auraient dépassé la valeur saisonnière pour les adultes. Cependant, pour les enfants seulement les échantillons musculaires de la carpe commune auraient dépassé la valeur saisonnière. Les présents résultats sont en accord avec plusieurs études rapportées dans la littérature. C'est le cas du **Garcia et al. (2010)** qui ont rapporté que la concentration de MCs qui se produisent dans le tissu du crabe était de 105 µg MCs / kg représentant un EDI, basée sur le poids du corps humain et la quantité de tissu de crabe consommé, de 0,46 µg MC/kg de poids corporel/j, une valeur >10 fois la DJA de l'OMS. **Peng et al. (2010)** ont indiqué que la majeure partie des produits aquatiques des trois grands lacs chinois semblent être impropre à la consommation humaine en raison de l'accumulation du MCs avec des concentrations 2-148 fois plus grande que la TDI mis par l'OMS. Une étude antérieure a montré que l'accumulation du MC dans les muscles du carassin et la carpe commune, récoltés dans le lac Taihu en Chine, varie de 0,93 à 3,55 fois les valeurs de TDI (**Zhang et al. 2009**).

Après avoir doser les toxines dans les différents organes, on a essayé de voir leur impact histologique sur eux, l'organe cible de microcystines est la première partie étudiée, où on a constaté chez les deux espèces, concernant la carpe commune, la présence des lésions hépatitiques légères, ce sont des lésions inflammatoires avec une conservation de toute la composante épithéliale, une dilatation de sinusoïde, c'est une dilatation de l'espace porte constituer des 03 canaux : artère, veine et le canal biliaire, qui est une forme de souffrance, comme il est intéressant de noter la présence des stéatoses en périphérie, ce sont des adipocytes ou des dépôts de lipides qui ne doivent pas exister dans le foie. Ainsi, l'étude histologique nous a permis de signaler l'existence des sidérophages, se sont des cellules inflammatoires qui indiquent la présence d'une hémorragie.

Les biopsies du foie de l'anguille européenne, montrent différentes formes de souffrance, d'une part, la présence des signe du nécrose centro-lobulaire, dont il existe un ballonnement cellulaire avec disparition de certains nombres de noyaux et un cytoplasme clair. D'une autre part, l'apparition de deux types de stéatoses micro et macro-vésiculaire. Les hémosidéroses, qui sont une forme de trouble de surcharge en fer qui entraîne l'accumulation d'hémosidérine, sont aussi signalée dans ces coupes, avec un élargissement de l'espace porte et la présence d'un infiltrat péri-portale et de la fibrose.

Fischer et Dietrich en 2000, ont signalé une condensation du cytoplasme, une perte de structures squelettiques du foie et une présence des dépôts lipidiques après un gavage

des alevins de la carpe commune avec une dose sub-létale de 400 µg/kg. Or **Li et al. (2005)** ont aperçu des bulles membranaires, des stéatoses et des signes d'hémorragie sur des hépatocytes de la carpe à grande bouche exposée à une dose de 200 µg/kg et 500 µg/kg MC-LR par voie intra-péritonéal. Une autre étude sur ce contexte, réalisée par **Li et al. (2007)** montre presque les mêmes remarques rencontrées avec la présence des larges vacuoles à l'extrémité du membrane cellulaire du foie de la carpe argenté se nourrit naturellement sur un bloom de *Microcystis*. **Trinch et al. (2011)** ont montré dans leur étude réalisée sur l'*Oryzias latipes* exposé à une dose chronique de 5µg MC-LR /l, la présence d'une dilatation de sinusoidale et l'existence des lysosomes dans plusieurs hépatocytes. Nos résultats sont concordés aussi, avec ceux de **Gutiérrez-Praena et al. (2012)**, où ils ont mentionné l'accumulation du glycogène et la présence des dépôts lipidiques au niveau du foie de la Tilapia exposée par voie orale à une dose de 200 µg/kg de la Cyindrospermopsine, les stéatoses sont devenues plus important après 5 jours d'exposition.

Atencio et al. (2008), ont rapporté que des lésions pathologiques incluant des stéatoses macro-vésiculaires sont observées dans le foie du *Tincatinca* après une exposition orale aux cyanobactéries. En plus, la toxicité de MC est due à leur transport actif aux hépatocytes par le système du transport ionique par l'acide biliaire suivie par l'inhibition des protéines phosphatase eucaryotes sérine-thréonine type 1 et 2A (**Eriksson et al., 1990**), ce qui engendre une hyper-phosphorylation des protéines associées au cytosquelette des hépatocytes (**Toivola et al., 1997**). En effet, la perte rapide de l'architecture sinusoidale et l'attachement l'une avec les autres, engendrent l'accumulation du sang dans le foie, puis la mort des poissons après une hémorragie (**Jiang et al., 2011**). Nos observations histo-pathologiques, en particulier la dilatation de la lumière sinusoidale hépatique et l'hémorragie intra-épithéliale, sont similaires aux résultats trouvés par des études antérieures concernant l'hépatotoxicité des Cyanobactéries chez les poissons (**Dong et al., 2012 ; Ernst et al., 2006 ; Fischer & Dietrich 2000**).

Dans une étude précédente, **Nasri et al. (2008)** ont rapporté pour la première fois, la mort de deux espèces de tortues des eaux douces *E. orbicularis* et *M. leprosa*, dans Lac Oubéira durant octobre 2005, avec un foie émettant après la vérification de la carcasse fraîche de *M. leprosa*. Récemment, **Mitsoura et al. (2013)** ont observé des changements histo-pathologiques, caractérisés par la présence des gouttelettes lipidiques et symptômes d'hémorragique sporadique dans le foie de la carpe commune pêchés dans le Lac Karla

(Grèce) avec des concentrations importantes en MCs (0,75 à 3,9 µg/l). Une étude plus récente effectuée sur la carpe commune exposée par voie intra-péritonéale à deux doses de la MC-LR, la 50µg/kg montre qu'au bout de 24h les hépatocytes souffrent d'une rupture endothéliale de l'espace porte, une hémorragie hépatique, dissociation des hépatocytes et l'apparition de l'apoptose. Concernant la deuxième dose de 120 µg/kg, une nécrose, dissociation complète des cellules hépatiques, des cytoplasmes clairs avec la présence des cellules inflammatoires ont été observés ; alors qu'après 48h d'exposition les individus traités par la faible dose, montre une régénération hépatique et la disparition des cellules inflammatoires, tandis que pour la forte dose n'a présenté aucun signe de guérison par contre les signes de souffrance ont été aggravés (**Shi et al., 2015**).

Le deuxième organe étudié c'est les viscères, où on a détecté un remaniement inflammatoire avec une conservation régulière de toute la composante épithéliale représentée par un infiltrat plasmocytaire modéré, comme il est important de noter la disparition d'une des couches de la membrane externe des viscères de l'un des individus en question dont le degré d'inflammation devient plus important de l'un à l'autre. Certaines coupes exposent un intestin totalement ulcérée, avec une abrasion totale de l'épithélium, c'est une atrophie totale des villosités. **Gutiérrez-Praena et al. (2012)** ont signalé la présence des lésions plus importantes traduites par des nécroses des entérocytes, et aussi l'absence de la microvillosité. Or **Trinchet et al. (2011)** ont désigné que l'intestin de l'*Oryzias latipes* a montré des lésions épithéliales et des lésions des jonctions intracellulaires en causant une désorganisation cellulaire.

Il semblerait donc qu'il existe un lien entre la diversité des cyanobactéries et le risque que représentent ces organismes pour la santé humaine et animale. Ainsi, le maintien de la diversité serait un moyen de prévenir l'apparition d'efflorescences à cyanobactéries. Or, il est aujourd'hui acquis que l'eutrophisation des systèmes aquatiques aboutit à une diminution de la biodiversité phytoplanctonique ainsi qu'à une augmentation des proliférations de cyanobactéries (**Reynolds, 1984, 1987 ; Chorus, 2001**). Les actions préventives consistent donc à lutter contre l'installation des conditions favorables ou aggravantes pour le développement de ces efflorescences de micro-algues et de cyanobactéries. Celles-ci passent par une gestion intégrée des ressources, avec la prise en considération d'un certain nombre de paramètres tels que les caractéristiques du bassin versant, le nombre d'habitants et de leurs

rejets, le volume de la retenue d'eau, le temps de renouvellement de la masse d'eau, son exploitation ...

Ceci rejoint la notion de « bon état écologique » d'une eau de surface qui s'appuie sur des éléments de qualité associés aux communautés aquatiques (éléments de qualité biologique), mais aussi aux caractéristiques physicochimiques et hydro-morphologiques ayant une influence sur la biologie (**Lefeuvre & Guiral, 2005**). Si l'état de santé des écosystèmes aquatiques est une préoccupation croissante des pays du Nord (e.g. Directive Cadre sur l'Eau en France) cet aspect est d'autant plus important à prendre en considération dans les pays où la ressource en eau est précieuse comme les pays d'Afrique du nord et sub-saharienne. Ces derniers devront donc tenir compte des connaissances acquises et prendre en considération les trois grand axes que sont la prévention des développements de cyanobactéries toxiques, la détection et le suivi des biomasses des espèces toxiques et des cyanotoxines et l'élimination efficace des toxines en cas de contamination.

Conclusion

La présence des cyanobactéries toxiques et de leurs toxines, dans l'eau potable, constitue un risque potentiel de santé publique pour de nombreuses populations. Parmi les toxines cyanobactériennes, les hépatotoxines de type microcystines (microcystine-LR) et la nodularine sont, dans l'état actuel des connaissances, les seules à poser des problèmes d'exposition chronique en raison de leur caractère promoteur tumoral. Toutefois, l'évaluation précise des risques chroniques pour la santé publique est encore impossible, car de nombreux aspects concernant ces toxines sont insuffisamment connus voire controversés, notamment ceux relatifs à leurs effets génotoxiques et cancérigènes.

L'objectif de cette thèse a été d'étudier la biodiversité en cyanobactéries toxiques et leurs toxines dans un site Ramsar le lac Oubeïra, l'un des plus grands lacs d'eau douce des zones humides en Algérie avec une diversité faunistique et floristique remarquable. Ceux-ci dans le but d'évaluer l'impact toxicologique et histologique des hépatotoxines de type microcystine présentes dans l'eau du lac sur deux espèces de poissons.

En première partie du travail, nous nous sommes intéressés à identifier la communauté cyanobactérienne présente dans notre site d'étude.

Les Cyanobactéries se développent sous des conditions précaires ce qui suggère l'importance de l'interaction des conditions environnementales et des propriétés physicochimiques des eaux.

Nous résultats révèlent la présence de dix genres de cyanobactéries dont trois genres (*Merismopedia*, *Synechocystis* et *Microcystis*) sont de forme cellulaire et se présente en colonies (ou en amas). Par contre les genres : *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Anabaena*, *Pseudanabaena*, *phormedium*, *Spirulina* et *Aphanizomenon* sont de formes filamenteuses ou trichomes. Pour les fréquences d'apparitions de ces genres on remarque que les mois de juillet et d'aout se caractérisent par la présence de sept genres sur les dix genres identifiés, avec l'absence totale des Cyanobactéries le mois de février.

La prédominance générique des Cyanobactéries pendant toute la période d'étude, montre que le genre toxique *Microcystis* est prédominant avec 54%, suivi par *Oscillatoria* qui représente 15% de l'ensemble des Cyanobactéries récoltés au cours de cette étude.

Un dosage colorimétrique d'inhibition des protéines phosphatase 2A (PP2A), nous a permis de constater la présence d'un risque sanitaire potentiel compte tenu de la présence de fortes concentrations en microcystines dans l'eau du lac.

Les concentrations élevées des microcystines intracellulaires ont été signalées en 2010 avec un pic maximal de 1.6 µg/l. Concernant celles extracellulaires sont de plusieurs ordres de grandeur supérieures à celles des concentrations intracellulaires aux angles avec un pic en Septembre de 11,8 µg / l. Au cours de 12 mois d'échantillonnage d'Avril 2010 au Mars 2011, le total du MC se situait entre 0,028 et 13.4µg équivalent MC- LR/l. Le pourcentage de la MC extracellulaire variait de 67 à 99% pour toutes les dates d'échantillonnage, sauf en Juin et Juillet où elle a varié de 1,6 à 32 %, respectivement.

Trois variantes de microcystines : MC- LR, MC- YR, et MC- (H₄) YR ont été identifiées par la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC).

En deuxième partie du travail, des prélèvements mensuels de la carpe commune *Cyprinus carpio* et l'anguille européen *Anguilla anguilla*, ont été prélevés.

Le dosage par le test PP2A, montre l'accumulation des hépatotoxines dans les différents organes étudiés le foie, les viscères et la chair.

Chez *A. anguilla* la dose la plus élevée était MC dans le foie (333 ng équivalent MC- LR/g), suivie par l'intestin (233 ng équivalent MC- LR/g) et le muscle (67 ng équivalent MC- LR/g).

Alors que chez *C. carpio* la dose remarquable était trouvé dans l'intestin (3059 ng équivalent MC-LR/g), suivie par l'hétopancréas (771 ng équivalent MC- LR/ g) et le muscle (680 ng équivalent MC-LR/g) cette dernière est supérieur à la dose journalière acceptable mis par l'OMS..

En outre, un impact chronique des cyanobactéries toxiques sur l'histologie du foie et des intestins, était observé après étude anatomo-pathologique.

D'une part, sur l'ensemble des prélèvements hépatiques on a signalé des lésions histologiques en faveur d'une hépatopathie chronique représentée par un élargissement de la majorité des espaces portes par une fibrose modérée périportale et un infiltrat inflammatoire mononucléé essentiellement lymphoplasmocytaire. Dans les lobules les hépatocytes s'organisent en fines travées présentant par endroits des signes de souffrance cellulaire à type de ballonnisation avec un cytoplasme abondant clarifié, dont environ 10 % des hépatocytes présentent des lésions de stéatose macro et microvacuolaire.

D'une autre part, on a constaté que l'aspect histo-pathologique des viscères des deux espèces est similaire. La muqueuse est faite de villosités larges diminuées de hauteur, bordées d'un épithélium tantôt remanié tantôt totalement abrasé avec un infiltrat inflammatoire lymphoplasmocytaire panparietale par endroits.

Pour éviter et prévenir tout risque sanitaire, il est impératif d'effectuer des études approfondies et d'instaurer un suivi de contrôle systématique des teneurs en toxines dans les eaux destinées à l'alimentation et de mettre en place un réseau de surveillance des blooms à cyanobactéries surtout dans les réservoirs destinés à l'approvisionnement en eau potable, à l'irrigation et à l'abreuvement du bétail. Si l'on se réfère aux résultats obtenus dans le cadre de cette thèse quelques perspectives de recherche peuvent se dégager pour d'autres écosystèmes aquatiques et terrestres en Algérie :

- ↳ Etudier la biodiversité en cyanobactéries présentes dans divers retenues d'eau utilisées pour la production d'eau potable, l'irrigation et la pisciculture ;
- ↳ Etablir un screening des souches toxiques susceptibles d'occasionner un développement massif de cyanobactéries (blooms) ;
- ↳ Etudier le potentiel toxique des espèces présentes dans les retenues de barrage et des souches isolées et cultivées au laboratoire ;
- ↳ Instaurer un suivi des cyanobactéries et contrôler les teneurs en cyanotoxines dans les eaux des retenues de barrage destinées à la production d'eau potable ;
- ↳ Proposer une stratégie de prévention et de lutte contre les blooms de cyanobactéries et de leurs toxines.

Et pour le moment trois sujets de recherches sont au cours :

1- L'étude de l'accumulation des cyanotoxine dans diverse espèces de poissons dans lac Oubeïra Algérie

2- l'étude de l'impact des cyanobactéries toxiques sur la faune terrestre et aquatique.

3- L'étude comparative de la contamination potentielle de l'eau potable par les microcystines de la région d'El Tarf et de Tébessa et risques sanitaires associés.

Références Bibliographiques

1) Afssa, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. (2006). Évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries dans les eaux destinées et de leurs toxines à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives (231p)

- 2) **Aggoun K. (2009).** Etude de la biodiversité des cyanobactéries au niveau de Barrage Koudiat Medaouar Timgad (Batna). Thèse d'ingénieur, CUET
- 3) **Amado L.L., Garcia M.L., Ramos P.B., Yunes J.S. et Monserrat J.M. (2011).** Influence of a Toxic *Microcystis aeruginosa* Strain on Glutathione Synthesis and Glutathione-S-Transferase Activity in Common Carp *Cyprinus carpio* (Teleostei: Cyprinidae). *Arch Environ Contam. Toxicol.* 60:319–326
- 4) **Amé M.V., Galanti L.N., Menone M.L., Gerpe M.S., Moreno V.J. et Wunderlin D.A. (2010).** Microcystin-LR, -RR, -YR and -LA in water samples and fishes from a shallow lake in Argentina. *Harmful Algae* 9:66–73
- 5) **An J. & Carmichael W.W., 1994.** Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immuno- sorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon*, 32, 1495- 1507.
- 6) **Anagnostidis, K. et Komàrek, J. (1988).** Modern approach to the classification system of cyanophytes 3- Oscillatoriales. *Algol. Stud.* 50-53: 327-472.
- 7) Anderson, R. J., Luu, H. A., Chen, D. Z. X., Holmes, C. F. B, Kent, M., Leblanc, M., Taylor, F. J. R., et Williams, D. E. (1993). Chemical and biological evidence links microcystins to salmon "Nepten liver Disease". *Toxicon*, 31, 1315-1323.
- 8) **Arnold D.E. (1971).** Ingestion, assimilation, survival, and reproduction by *Daphnia pulex* fed seven species of blue-green algae. 16:906-920
- 9) **Azevedo, S. M. F. O., Carmichael, W. W., Jochimsen, E. M., Rinehart, K. L., Lau, S., Shaw, G. R. et Eaglesham, G. K. (2002).** Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru--Brazil. *Toxicology*, 181-182, 441-446.

10) B 11) **abica P, Bláha L, Marsalek B., 2006.** Exploring the natural role of microcystins—a review of effects on photoautotrophic organisms. *J. Phycol.*, 42, 9-20.

12) **Bagu, J. R., Sykes, B. D., Craig, M. M. et Holmes, C. F. (1997).** 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*, 272, 5087-97.

- 13) **Banker, R., Teltsch, B., Sukenik, A., and Carmeli, S., 2000.** 7-Epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from Lake Kinneret, Israel. *J. Natural Products*, 63, 387–389.
- 14) **Barnabé G. et Barnabé-Quet R. (1997).** Ecologie aménagement des eaux côtières. Lavoisier. 2^{ème} édition. Paris. (391p).
- 15) **Bártová K., Hilscherová K., Babica P. et Maršálek B. (2010).** Extract of *Microcystis* water bloom affects cellular differentiation in filamentous cyanobacterium *Trichormus variabilis* (Nostocales, Cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology*.
- 16) **Beattie K.A., Kaya K., Sano T. & Codd G.A., 1998.** Three dehydrobutyrine (Dhb)-containing microcystins from the cyanobacterium *Nostoc* sp. *Phytochemistry* 47: 1289-1292.
- 17) **Benoufela F., Laplanche A., Boisdon V. & Bourbigot M.M., 1995.** Elimination de trois genres d'algues de type cyanobactéries par un procédé d'ozonation. Approche de la toxicité avant et après traitement. *Tech. Sci. Méthodes*, 10, 737-742.
- 18) **Bergman B., Gallon J.R., Rai A.N. et Stal L.J. (1997).** N₂ fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 19:139-185
- 19) **Best J.H., Eddy F.B. & Codd G.A., 2001.** Effects of purified microcystin-LR and cell extracts of *Microcystis* strains PCC 7813 and CYA 43 on cardiac function in brown trout (*Salmo trutta*) alevine. *Fish Physiol. Biochem.* 24, 171–178.
- 20) **Botes, D.P., Wessels, P.L., Kruger, H., Runnegar, M.T.C., Santikarn, S., Smith, R.J., Barna, J.C.J., Williams, D.H., 1985.** Structural studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA, and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 1*, 2747-2748.
- 21) **Bouaïcha et al., 2002).** Bouaïcha N., Maatouk I., Vincent G. & Levi Y., 2002. A colorimetric and fluorometric microplate assay for the detection of microcystin-LR in drinking water without preconcentration. *Food and Chemical Toxicology* 40: 1677–1683.
- 22) **Bourke, A. T. C., Hawes, R. B., Neilson, A. and Stallman, N. D., 1983,** An Outbreak of Hepato-Enteritis (the Palm Island Mystery Disease) Possibly Caused by Algal Intoxication, *Toxicon* 21: 45–48.
- 23) **Bourrelly P. (1985).** Les algues d'eau douce; tome III: Les algues bleues et rouges. Boubée, éd. Rev. 606 pp.
- 24) **Bury N.R., Flik G., Eddy F.B. et Codd G.A. (1996).** The effects of the cyanobacterium and cyanobacterial toxin microcystin-LR on Ca²⁺ transport and Na⁺/K⁺-ATPase in tilapia gills. *Journal of Experimental Biology* 199 : 1319–1326.

25) **Bury N.R., McGeer J.C. et Codd G.A. (1997).** Liver damage in brown trout, *Salmo trutta* L, and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following administration of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR via the dorsal aorta. *Journal of Fish Disease* 20, 209–215.

26)

C

27) **arbis C.R., Rawlin G.T., Mitchell G.F., Anderson J.W., McCauley I. (1996).** The histopathology of carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to microcystins by gavage, immersion and intraperitoneal administration. *J.*

Fish. Dis. 19, 199–207.

28) **Cardellina J.H., Marnier F.J. & Moore R.E., 1979.** Seaweed dermatitis, structure of lyngbyatoxin A. *Science* 204: 193-195.

29) **Carey, C. C., Ibelings, B. W., Hoffmann, E. P. et al. (2012).** Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Research*, 46: 1394-1407.

30) **Carmichael et al., 2001 ; Carmichael W.W., Azevedo S.M., An J.S., Molica R.J., Jochimsen E.M., Lau S., Rinehart K.L., Shaw G.R., Eaglesham G. K., (2001).** Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins, *Environ. Health Perspect.* **109**, 663-668.

31) **Carmichael W.W., Evans W.R., Yin Q.Q., Bell P. et Moczydlowsky E. (1997).** Evidence of paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei*. *Appl Environ Microbiol* 63:3104-3110.

32) **Carmichael W. W. & Falconer I. R., 1993.** Diseases related to freshwater blue-green algal toxins and control measures, Dans : Falconer, I. algal toxins in seafood and drinking water, *Academic Press*, London. pp. 187-209.

33) **Carmichael W.W. (1994).** The toxins of Cyanobacteria. *Sci. Am.* 270: 78- 86

34) **Carmichael W.W., 1997.** The Cyanotoxins. *Adv. Bot. Res.*, 27, 211,-256.

35) **Carmichael WW. (1992).** Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72: 460–466.

36) **Carmichael, W. W. (1994).** The toxins of cyanobacteria. *Sci Am*, 270, 78-86.

37) **Caron D.A., Lim E.L., Sanders R.W., Dennett M.R. et Berninger U.G. (2000).** Response of bacterioplankton and phytoplankton to organic carbon and inorganic nutrient additions in contrasting oceanic ecosystems. *Aqu.Mic.Eco.*22: 175-184.

38) **Chauhan, V. S., Marwah, J. B. and Bagchi, S. N., 1992,** Effect of an Antibiotic from *Oscillatoria* Sp. On Phytoplankters, Higher Plants and Mice, *New Phytologist* **120**: 251–257.

39) **Chen J, Xie P, Li L et Xu J. (2009a).** First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage. *Toxicol Sci*; 108(1):81 –89.

- 40) **Chen J, Xie P, Li L et Xu J. (2009a).** First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage. *Toxicol Sci*; 108(1):81–89.
- 41) **Chen J. et Xie P. (2005).** Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Toxicon*. 45:615–625.
- 42) **Chen J., Song L., Dai J., Gan N. et Liu Z. (2004).** Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Toxicon*, 43: 393–400.
- 43) **Chen J., Xie P., Guo L.G., Zheng L. et Ni L.Y. (2005).** Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in a freshwater snail (*Bellamya aeruginosa*) from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Environmental Pollution* 134, 423-430.
- 44) **Chen J., Xie P., Zhang D. et Lei H. (2007).** In situ studies on the distribution patterns and dynamics of microcystins in a bio-manipulation fish the bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Environmental Pollution* 147 : 150-157
- 45) **Chen J., Xie P., Zhang D., Ke Z., Yang H. (2006).** In situ studies on the bioaccumulation of microcystins in the phytoplanktonivorous silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) stocked in Lake Taihu with dense toxic *Microcystis* blooms. *Aquaculture* 261 : 1026 – 1038.
- 46) **Chorus I. et Bartram J. (1999).** Toxic Cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. E and FN Spon, Londres. (388p.)
- 47) **Chu, 1990, Chu F.S., Huang X. & Wei R.D., 1990.** Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms. *J. Assoc. Analyst. Chem.*, 73, 451- 456.
- 48) **Codd G.A., Lindsay J., Young F.M., Morrison L.F., Metcalf J.S., (2005).** Harmful cyanobacteria from mass mortalities to management measures. In: Huisman J., Matthijs H.C.P., Visser P.M. (eds.) *Harmful Cyanobacteria*, Springer, Netherlands. p 1 - 23.
- 49) **Codd G.A. (1995).** Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Water Science and Technology*. 32: 149–156.
- 50) **Codd G.A., Bell S.G. et Brooks W.P. (1989).** Cyanobacterial toxins in water. *Water Science and Technology* 21: 1–13.
- 51) **Codd G.A., Bell S.G. et Brooks W.P. (1989).** Cyanobacterial toxins in water. *Water Science and Technology* 21: 1–13.
- 52) **Codd G.A. (2000).** Cyanobacterial toxin, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering* 16: 51–60.
- 53) **Codd, G. A., Edwards, C., Beattie, K. A., Barr, W. M. et Gunn, G. J. (1992).** Fatal attraction to cyanobacteria? *Nature*, 359, 110-1.

- 54) **Codd, G.A., Lindsay, J., Young, F.M., Morrison, L.F., Metcalf, J., 2005.** Harmful cyanobacteria. From mass mortalities to management measures. Huisman J, Matthijs HCP, Visser PM. *Harmful cyanobacteria*. Springer (Dordrecht).
- 55) **Couté A. & Bernard C., 2001.** Les cyanobactéries toxiques. Dans : Frémy, J. M. et Lassus, P. Toxines d'algues dans l'alimentation, *Ed. Ifremer*, pp. 21-37.
- 56) **Cox et al., (2005)** Cox, P. A., Banack, S. A., Murch, S. J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R. R., Metclaf, J. S., Morrison, L. F., Codd, G. A., Bergman, B., 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 102, 5074–5078.
- 57) **Craig, M., Luu, H.A., McCready, T.L., Williams, D., Andersen, R.J., Holmes, C.F.B. (1996).** Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases. *Biochem. Cell Biol.*, 74, 569–578.
- 58) **Cremer, J. et Henning, K. (1991).** Application of reversed-phase medium-pressure liquid chromatography to the isolation, separation and amino acid analysis of two closely related peptide toxins of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806. *J. Chromatog.*, 587: 71-80.
- 59) **Curtis T. P., and Sloan W., T. (2004).** Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Cur. Op. Microbiol.*, 7, 3, 221-226.
- 60) **Cuvin-Aralar M-L., Fastner J., Focken U., Becker K. & Aralar E -V., 2002.** Microcystins in natural blooms and laboratory cultured *Microcystis aeruginosa* from Laguna de Bay, Philippines. *System. Appl. Microbiol.* 25, 179-182.

61) D

62) **awson R.M. (1998).** The toxicology of microcystins. *Toxicon* 36: 953–962

63) **Demott W. & Dhawale S., 1995.** Inhibition of *in vitro* protein phosphatase activity in three zooplankton species by microcystin-LR, a toxin from cyanobacteria. *Arch. Hydrobiol.*, 134, 417-424.

- 64) **Demott W., Zhang Q.-X. et Carmichael W.W. (1991).** Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.*, 36, 1346-1357.
- 65) **DeMott, W. R. (1999)** Foraging Strategies and Growth Inhibition in Five *Daphnids* Feeding on Mixtures of a Toxic Cyanobacterium and a Green Alga, *Freshwater Biology* **42**: 263–274.
- 66) **Dietrich D.R. et Hoeger S.J. (2005).** Guidance values for microcystin in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algae supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 203, 273–289.

- 67) **Ding, W. X., Shen, H. M., and Ong, C. N. 2000b.** Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology*, 32(3): 547-555.
- 68) **Dittmann E. & Börner T., 2005.** Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicol. Appl. Pharm.* 203: 192-200.
- 69) **Dow CS et Swoboda UK. (2000).** Cyanotoxins. In: Wihhton BA, Potts M [eds.], *The ecology of Cyanobacteria*, 614–632. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 70) **Drouet F. (1968).** Revision of the classification of the Ocillatoriaceae. *Acad. Natl. Sci. Nat. Philadelphia, Monogr.*, 15, 370 p.
- 71) **Drouet F. (1981).** Revision of the Stigone mataceae with a summary of the classification of blue - green algae. *Beih. Nova Hedw.*, 66, 1 - 221.
- 72) **Drouet F. (1978).** Revision of the Nostocaceae with constricted trichomes. *Beih. Nova Hedw.*, 57, 1- 258.
- 73) **Duarte C.M., Agusti S. et Agawin S.R. (2000).** Response of the Mediterranean phytoplankton community to increased nutrient inputs. *Mar. Eco. Pro. Ser.* 195: 61-70.
- 74) **Duy T.N., Lam P.K.S., Shaw G.R. et Connell D.W. (2000).** Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue- green algal) toxins in water. *Rev. Environ. Contam. Toxicology.* 163: 113- 186.

75) E 76) **hling-Schulz M, Scherer S (1999)** UV protection in cyanobacteria. *European Journal of Phycology* 34,329-338

- 77) **El Ghazali I., Saqrane S., Carvalho A. P., Youness O., Oudra B., Francisca F. Del Campo, Vasconcelos V. (2010).** Effects of the microcystin profile of a cyanobacterial bloom on growth and toxin accumulation in common carp *Cyprinus carpio* larvae. *Journal of Fish Biology* 76, 1415–1430
- 78) **El Ghazali I., Saqrane S., Carvalho A.P., Ouahid Y., Oudra B., Del Campo F.F. et Vasconcelos V. (2009).** Compensatory Growth Induced in Zebrafish Larvae after Pre-Exposure to a *Microcystis aeruginosa* Natural Bloom Extract Containing Microcystins. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 133-146.
- 79) **El Ghazali I., Saqrane S., Saker M., Youness O., Oudra B., Vasconcelos V., Franscica F. Del Campo (2011).** Biochemical and molecular characterization of cyanobacterial bloom in Lalla Takerkoust lake reservoir (Morocco).
- 80) **EL Helali M. (2007).** L'anguille européenne (*Anguilla Anguilla L.*, 1758) dans le Bas-Sebou : Biologie, et Infestation par *Anguillicola crassus*. Thèse de doctorat – université Med V-Marroc, 201p.

- 81) **Elenkin, A.A., 1936-1949.** Monographia Algarum Cyanophycearum aquidulcium et terrstrium in finibus URSS inventarum. I et II. Izd Akad Nauk SSSR, Moskva-Leningrad, I: 684 p, II: 1908 p.
- 82) **Eriksson J.E., Meriluoto J.A. & Lindholm T., 1989.** Accumulation of a peptide toxin from th cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Hydrobiologia*, 183, 211-216.
- 83) **Eriksson J.E., Toivela D., Meriluto J.A.O., Karaki H., Han Y.G. & Harstshorne D., 1990.** Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 193 (3), 1347-1353.
- 84) **Ernst B, Hoeger SJ, O'Brien E, Dietrich DR. (2006).** Oral toxicity of the microcystincontaining cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Aquat Toxicol.* 2006;79(1):31–40
- 85) F** **86) Falconer I. R. et Humpage A. R.** Preliminary evidence for in vivo tumor initiation by oral administration of extracts of the blue green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin [Revue] // *Environmental Toxicology.* - 2001. - pp. 16(2):192-195.
- 87) **Falconer I. R., 1998** – Algal toxin and human health . The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 5 Part C. Quality and Treatment of Drinking Water II (ed. By J. Hrubec) pp. 53 – 81.
- 88) **Falconer I. R., Humpage A. R., 2001.** Preliminary evidence for in vivo tumor initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. *Environ. Toxicol.* 16, 192–195.
- 89) **Falconer I.R. (1993).** Measurement of toxins from blue-green algae in water and foodstuffs. In: Falconer I.R. (Ed.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water.* Academic Press, London, pp. 165– 175.
- 90) **Falconer I.R. et Yeung D.S.K. (1992).** Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by Microcystis toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chem. Biol. Interact.* 81: 181–196.
- 91) **Falconer I.R., 1991.** Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria, *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6: 177-184.
- 92) **Falconer IR.** Measurement of toxins from blue-green algae in water and foodstuffs. In: Falconer IR, editor. *Algal toxins in seafood and drinking water.* London, UK: Academic Press; 1993. p. 165–75.
- 93) **Falconer, I. R. (1999).** An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environmental Toxicology*, 14, 5-12.

- 94) **Falconer, I. R. et Humpage, A. (1996).** Tumour promotion by cyanobacterial toxins. *Phycologia*, 35, 74-79.
- 95) **Falconer, I. R., Cereford, T. et Runnegar, M. T. C. (1983).** Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga. *Microcystis aeruginosa*. *Med J aust*, 1, 511-514.
- 96) **Falconer, I. R., Dornbusch, M., Moran, G. et Yeung, S. K. (1992).** Effect of the cyanobacterial (blue-green algal) toxins from *Microcystis aeruginosa* on isolated enterocytes from the chicken small intestine. *Toxicon*, 30, 790-793.
- 97) **Falconer, I.R. et Yeung, D.S.K. (1992).** Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by Microcystis toxins and their relations to hyperphosphorylation of cell proteins, *Chem Bio. Interactions*, 81: 181-196.
- 98) **Falconer, I.R., 1996.** *I. Phycologia* 1996, 35 ŽSuppl 6, 6-11.
- 99) **Falconer, I.R., Humpage, A.R., 1996.** Tumour promotion by cyanobacterial toxins. *Phycologia*, 35, 74–79.
- 100) **Fawell, J. K., James, C. P. et James, H.A. (1994).** Toxins from blue-green algae : Toxicological Assessment of Microcystin-LR and a Method for its Determination in Water, *Water Research Center, Medmenham, UK*, 1-46.
- 101) **Fay P 1992.** Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol Rev* 56:340–373
- 102) **Ferrao-Filho A.S., Herrera N.A., Echeverri L.F. (2012).** Microcystin accumulation in cladocerans: First evidence of MC uptake from aqueous extracts of a natural bloom sample. *Toxicon* 87, 26-31.
- 103) **Firkens G.S. (1953).** Toxic algae poisoning. *Iowa State Coll. Vet.*, 15:151.
- 104) **Fischer W.J., Dietrich D.R. (2000).** Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164 : 73–81.
- 105) **Fischer W.J., Hitzfeld B.C., Tencalla F., Eriksson J.E., Mikhailov A. et Dietrich D.R. (2000).** Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in livers of bluegreen algae exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicological Sciences* 54, 365–373.
- 106) **Fogg G.E., Stewart X.D.P., Fay P. et Walsby A.E. (1973).** The blue-green algae. Academic Press-London and New York 9-297pp.
- 107) **Francis, G. (1878).** Poisonous Australian lake *Nature*, 18,11-12
- 108) **Fritsch F.E. (1945).** Structure and reproduction of algae. II. Phaeophyceas, Rhodophyceae, Myxophyceae and forword; cambridge University Press, 939 p.
- 109) **Fugiki H., Suganuma M., Hakii H., Bartoloni G., Moore R.E., Takayama S. & Sugimura T., 1984.** A two-stage mouse skin carcinogenesis study of lyngbyatoxin A. *J. Cancer Res. Clin.* 108: 174-176.

110) **Fugiki H., Suganuma M., Suguri H., Yoshizawa S., Takagi K., Nakayasu M., Ojika M., Yamada K., Yasumoto T., Moore R. E. & Sugimura T., 1990.** New tumor promoters from marine natural products. In: *Marine toxins, origin, structure and molecular pharmacology*, Hall, S. & Strichartz, G. (Ed), American Chemical Society, Washington D.C., 418:232-240.

111) **Fujiki, H. et Sukanuma, M. (1999).** Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters. *J Cancer Res Clin Oncol*, 125, 150-5.

112) **Funari E, Testai E (2008).** Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 38:97-125

113) G **114) eitler L. (1932).** Cyanophyceae. In *Kryptogamen- Flora von Deutschland, Oesterreich und der Schweiz*, ed. L. Rabenhorst, Volume 14. Akademische Verlagsgesellschaft M.B.H Leipzig.

115) **Gessner M. O., Inchausti P., Persson L., Raffaelli D.R., Giller P.S. (2004).** Biodiversity effects on ecosystem functioning: insights from aquatic systems. *Oikos*, 104, 419-422.

116) **Gilroy D.J., Kauffman K.W., Hall R.A., Huang X., Chu F.S. (2000).** Assessing potential risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements. *Environ. Health Pers.*, 108(5):435-439.

117) **Gkelis S., Iannaras T. et Sivonen K. (2006).** The presence of microcystins and other cyanobacterial bioactive peptides in aquatic fauna collected from Greek freshwaters. *Aquat. Toxicol.* 78, 32–41.

118) **Gobler C.J. et Sanudo-Wilhelmy S.A. (2001).** Effect of organic carbon, organic nitrogen, and iron additions on the growth of phytoplankton and bacteria during a brown tide bloom. *Mar. Eco. Pro. Ser.* 209: 19-34.

119) **Greuter W., Barrie F.R., Burdet H.M., Chaloner W.G., Demoulin V., Hawksworth D.L., Jorgensen P.M., Nicholson D.H., Silva P.C., Trehane P. et McNeill J. (1994).** International Code of Botanical Nomenclature. Koeltz Scientific Books, Koenigstein. *Regnum Vegetabile*, 131, 389 p.

- 120) **Greuter W., Mc Neil J., Barrie F.R., Burdet H. M., Demoulin V., Filgueiras T. S., Nicolson D. H., Silva P. C., Skog J.E., Trehane P., Turland N.J. et Hawksworth D.L. (2000).** International Code of Botanical nomenclature (Saint Louis Code). 138, Koeltz scientific Books, 474 pp.
- 121) **Guy J. (2006),** Ecologie du plancton. Lavoisier (283p)
- 122) **H** 123) **Harada KI, Ogawa K, Matsuura K, Nagai H, Murata H, Suzuki M, Itezono Y, Nakayma N, Shirai M. & Nakano M., 1991b.** Isolation of two toxic heptapeptide microcystins from an axenic strain of *Microcystis aeruginosa*, K-139. *Toxicon* 29:479-489.
- 124) **Harada, K.I., Matsuura, K., Suzuki, M., Watanabe, M.F., Oishi, S., Dahlem, A.M., Beasley, V.R., Carmichael, W.W., 1990b.** Isolation and characterization of the minor components associated with microcystins-LR and -RR in the cyanobacterium (blue-green algae). *Toxicon* 28, 55-64
- 125) **Harada, K.I., Ogawa, K., Kimura, Y., Murata, H., Suzuki, M., Thorn, P.M., Evans, W.R., Carmichael, W.W., 1991b.** Microcystins from *Anabaena flos-aquae* NRC 525-27. *Chem. Res. Toxicol.* 4, 535-540.
- 126) **Harper J.L. et Hawksworth D.L. (1994).** Biodiversity: measurement and estimation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 345, 5-12.
- 127) **Hawkins P.R., Runnegard M.T.C., Jackson A.R.B., et Falconer I.R. (1985).** Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green algae) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Journal of Applied Environmental Microbiology* 50: 1292–1295.
- 128) **Hayman J., 1992.** Beyond the Barcoo – probable human tropical cyanobacterial poisoning in outback Australia. *Med. J. Aust.*, 157.
- 129) **Henriksen, P., Carmichael, W. W., An, J. et Moestrup, O. (1997).** Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. *Toxicon*, 35, 901-913.
- 130) **Heresztyn, T. et Nicholson, B. C. (1997).** Nodularin concentrations in lakes Alexandrina and Albert, South Australia, during a bloom of the cyanobacterium (blue-green alga) *Nodularia spumigena* and degradation of the toxin. *Environ Toxicol Water Qual*, 12, 273-283.
- 131) **Hernandez, M., Macia, M., Padilla, C. et Del Campo, F. F. (2000).** Modulation of human polymorphonuclear leukocyte adherence by cyanopeptide toxins. *Environ Res*, 84, 64-8.

- 132) **Hitzfeld B.C., Hoger S.J. & Dietrich DR., 2000.** Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environ Health Perspect* 108:113-22.
- 133) **Hitzfeld et al., 2000** Hitzfeld, B.C., Lampert, C.S., Spaeth, N., Mountfort, D., Kaspar, H., Dietrich, D.R., 2000. Toxin production in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Toxicon*, 38, 1731-1748.
- 134) **Hitzfeld, B. C., Hoger, S. J. et Dietrich, D. R. (2000).** Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environ Health Perspect*, 108, 113-22.
- 135) **Honkanen, R. E., Dukelow, M., Zwiller, J., Moore, R. E., Khatara, B. S. et Boynton, A. L. (1991).** Cyanobacterial nodularin is a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *Mol Pharmacol*, 40, 577, 583.
- 136) **Hooser S.B., Beasley V.R., Basgall E.J., Carmichael W.W. et Haschek W.M. (1990).** Microcystin-LR-induced ultrastructural changes in rats. *Vet. Pathol.* 27: 9–15.
- 137) **Hotto AM, Satchwell MF, Boyer GL. (2007).** Molecular characterization of potential microcystin-producing cyanobacteria in Lake Ontario embayments and nearshore waters. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 4570-4578.
- 138) **Hrudey et al., 1999, Hrudey S., Burch M., Drikas M., Gregory R., 1999.** Remedial measures. In *Toxic Cyanobacteria in water : A guide to their public health consequences, monitoring and management.* E & FN Spon, London. 416p.
- 139) **Humpage, A. R., Hardy, S. J., Moore, E. J., Froscio, S. M. et Falconer, I. R. (2000).** Microcystins (cyanobacterial toxins) in drinking water enhance the growth of aberrant crypt foci in the mouse colon. *J Toxicol Environ Health A*, 61, 155-65.
- 140) **Humpage, A. R., Rositano, J., Bretag, A. H., Brown, R., Baler, P. D., Nicholson, B. C. et Steffensen, D. A. 1994.** Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. *Aust J Mar Freshwater Res*, 45(5), 761-771.

141)

I 142) **belings, B.W., Chorus, I. 2007.** Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution*, 150, 177-192.

- 143) **Ito, E., Kondo, F. Terao, K. et Harada, K. (1997).** Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR. *Toxicon*, 35, 1453-7.

144)

J 145) **acoby J.M., Collier D.C., Welch E.B., Hardy F.J. et Crayton M. (2000),** Environmental factors associated with a toxic bloom

of *Microcystis aeruginosa*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57: 231-240.

- 146) Jacquet, C., Thermes, V., Luze, A. d., Puiseux-Dao, S., Bernard, C., Joly, J.-S., Bourrat, F. et Edery, M. (2004). Effects of microcystin-LR on development of medaka fish embryos (*Oryzias latipes*). *Toxicol*, 43, 141-147.
- 147) **Jaiswal P, Singh PK, Prasanna R. (2008)** Cyanobacterial bioactive molecules-an overview of their toxic properties. *Can J Microbiol.* 54(9):701-17. Review.
- 148) **Jiang JL, Gu XY, Song R, Zhang Q, Geng JJ, Wang XR, Yang LY (2011b)**. Time-dependent oxidative stress and histopathological alterations in *Cyprinus carpio* L. exposed to microcystin-LR. *Ecotoxicology* 20:1000–1009
- 149) **Jiang JL, Shan ZJ, Xu WL, Wang XR, Zhou JY, Kong DY, Xu J (2013)**. Microcystin-LR induced reactive oxygen species mediate cytoskeletal disruption and apoptosis of hepatocytes in *Cyprinus carpio* L. *PLoS One* 8(12):e84768. doi:10.1371/journal.pone.0084768
- 150) **Jiang JL, Shi Y, Shan ZJ, Yang LY, Wang XR, Shi Y (2012)**. Bioaccumulation, oxidative stress and HSP70 expression in *Cyprinus carpio* L. exposed to microcystin-LR under laboratory conditions. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 155:483–490
- 151) **Jiang JL, Wang XR, Shan ZJ, Yang LY, Zhou JY, Bu YQ (2014)**. Proteomic analysis of hepatic tissue of *Cyprinus carpio* L. exposed to cyanobacterial blooms in Lake Taihu, China. *PLoS One* 9(2):e88211. doi:10.1371/journal.pone.0088211
- 152) **Jochimsen, E. M., Carmichael, W. W., An, J. S., Cardo, D. M., Cookson, S. T., Holmes, C. E., Antunes, M. B., de Melo Filho, D. A., Lyra, T. M., Barreto, V. S., Azevedo, S. M. et Jarvis, W. R. (1998)**. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N Engl J Med*, 338, 873-8.
- 153) **Jones et al., 1994 Jones G., Blackburn S. I. & Parker N. S., 1994**. A toxic bloom of *Nodularia spumigena* Mertens in Orielton lagoon, Tasmania. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 45: 787-800.
- 154) **K** **155) aebernick, M. et Neilan, B. A. (2001)**. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol Ecol*, 35, 1-9.
- 156) **Khilil, N. (2011)**. État des lieux des microcystines (MCs) dans les eaux alimentant le Grand Casablanca et état de l'art de l'optimisation de l'élimination de la MCLR, par chlorination, en utilisant la Méthodologie de Surface de Réponse(RSM). Mémoire de thèse de l'université de Casablanca, Casablanca, Maroc, 108p.

- 157) **Kirpenko N.I., 1986.** Phytopatic properties of blue-green algae toxins. *Hydrobiol. J.*, 22, 44-47.
- 158) **Kiviranta, J., Namikoshi, M., Sivonen, K., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L., 1992.** Structure determination and toxicity of a new microcystin from *Microcystis aeruginosa* strain 205. *Toxicon* 30, 1093-1098.
- 159) **Kiviranta, J., Sivonen, K., Luukkainen, R., Lahti K. et Niemelä, S. I. (1991)** Production and biodegradation of cyanobacterial toxins; a laboratory study, *Arch. Hydrobiol.*, 121: 281-294.
- 160) **Komárek J. & Anagnostidis K., 2005.** Cyanoprokaryota. 2. Teil Oscillatoriales. in: Süßwasserflora von Mitteleuropa. 19/2, Mollenhauer, D., Stuttgart-Jena, pp.
- 161) **Komarek J. et Anagnostidis K. (1999).** Cyanoprokaryota. I. Chroococcales. *In:* Süßwasserflora von Mitteleuropa. Ettl H., Gärtner G., Heynig H. & Mollenhauer D. (eds). G. Fischer. Publ., 548 p.
- 162) **Kotak B.G., Semalulu S., Fritz D.L., Prepas E.E., Hrudey S.E. et Coppock R.W. (1996).** Hepatic and renal pathology of intraperito nearly administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon*. 34, 517-525.
- 163) **Kozlowsky-Suzuki, B., Wilson, A.E., Ferrao-Filho, A.S., (2012).** Bio-magnification or biodilution of microcystins in aquatic foodwebs? Meta-analyses of laboratory and field studies. *Harmful Algae* 18, 47 e 55.
- 164) **Krienitz L., Ballot A., Kotut K., Wiegand C., Pütz S., Metcalf J.S., Codd G.A. & Pflugmacher S., 2003.** Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya, *FEMS Microbiology Ecology* 43, 141-148.
- 165) **Krishnamyrthy, T., Szafraniec, L., Hunt, D.F., Shabanowitz, J., Yates, J.R., Hauer, C.R., Carmichael, W.W., Skulberg, O., Codd, G.A., Missler, S., 1989.** Structural characterization of toxic cyclic peptides from blue-green algae by tandem mass spectrometry. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 86, 770-774.
- 166) **Kuiper-Goodman T., Falconer I. & Fitzgerald J., 1999.** Human health aspects, Dans : Chorus, I. et Bartram, J. (Eds.). *Toxic Cyanobacteria in water. A guide to their public Health consequences, monitoring and management. WHO Ed. E & FN SPON*, pp 113-53.
- 167) **Kuiper-Goodman, T. (1997).** Risk assessment of microcystins in Canasa. *Wabolu-Hfte*, 4/97, 9-12.
- 168) **Kurmayer R. & Jüttner F., 1999.** Strategies for the coexistence of zooplankton with the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in Lake Zurich. *J. Plankton Res.*, 31, 659-683.
- 169) **Kusumi, T., Ooi, T., Watanabe, M.M., Takahashi, H., Kakisawa, H., 1987.** Cyanoviridin RR, a toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis viridis*. *Tetrahedron Letters* 28, 4695-4698

170)

L

171) **am et al., 1995 Lam A.K., Prepas E.E., Spink D. & Hrudey S.E., 1995.** Chemical control of heparotoxic phytoplankton blooms: implications for human health. *Water Res.*, 29, 1845-1854.

- 172) **Lapage S. P., Sneath P.H.A., Lessel E.F., Skerman V.B.D., Seeliger H.P.R. et Clark W .A. (1992).** International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 revision). Washington D.C., American Society for Microbiology, 199 p.
- 173) **Lawton, L. A., C. Edwards, and G. A. Codd.** 1994. Extraction and highperformance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* **119**:1525–1530.
- 174) **LeBlanc, S.,** Pick, F.R., Aranda-Rodriguez, R., 2005. Allelopathic Effects of the Toxic Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on Duckweed, *Lemna gibba* L. *Environ. Toxicol.*, 20, 67.
- 175) **Lehtonen, K. K., Kankaanpaa, H., Leinio, S., Sipia, V. O., Pflugmacher, S. et Sandberg-Kilpi, E. (2003).** Accumulation of nodularin-like compounds from the cyanobacterium *Nodularia spumigena* and changes in acetylcholinesterase activity in the clam *Macoma balthica* during short-term laboratory exposure. *Aquatic Toxicology*, 64, 461-476.
- 176) **Li L., Xie P. et Chen J. (2005).** In vivo studies on toxin accumulation in liver and ultrastructural changes of hepatocytes of the phytoplanktivorous bighead carp i.p.-injected with extracted microcystins. *Toxicon* 46 : 533–545
- 177) **Li L., Xie P., Li S., Qiu T. et Guo L. (2007).** Sequential ultrastructural and biochemical changes induced in vivo by the hepatotoxic microcystins in liver of the phytoplanktivorous silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146 : 357–367
- 178) **Li X., Liu Y., Song L., Liu J. (2003).** Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicon*, 42: 85–89
- 179) **Li X.Y., Chung I.K., Kim J.I. et Lee J.A. (2004).** Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon*, 44, 821-827.
- 180) **Li X.Y., Liu Y.D. et Song L.R., 2001.** Cytological alterations in isolated hepatocytes from common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to microcystin-LR. *Environmental Toxicology* 16, 517–522.
- 181) **Liras, V., Lindberg, M., Nystrom, P., Annadotter, H., Lawton, L. A. and Graf, B., 1998,** Can Ingested Cyanobacteria Be Harmful to the Signal Crayfish (*Pacifastacus Leniusculus*)?, *Freshwater Biology* **39**: 233–242.

- 182) **Lone Y., Koiri R.K. et Bhide M. (2015).** An overview of the toxic effect of potential human carcinogen Microcystin-LR on testis. *Toxicology Reports* 2 : 289–296
- 183) **Lundstedt L. & Brett M.T., 1991.** Differential growth rates of three cladoceran species in response to mono-and mixed-algal cultures. *Limnol. Oceanogr.*, 36, 159-165.
- 184) **Luukkainen R., Sivonen, K., Namikoshi, M., Färdig, M., Rinehart, K.L. et Niemelä, S.I. (1993).** Isolation and identification of eight microcystins from 13 *Oscillatoria agardhii* strains: structure of a new microcystin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 2204-2209.
- 185) **Luukkainen, R., Namikoshi, M., Sivonen, K., Rinehart, K.L., Niemela, S.I., 1994.** Isolation and identification of 12 microcystins from four strains and two bloom samples of *Microcystis spp.*: structure of a new hepatotoxin. *Toxicon* 32, 133-139.
- 186) **Lyck S., Gjolme N., Utkilen, H., 1996.** Iron starvation increases toxicity of *Microcystis aeruginosa* CYA 228/1 (Chroococcales, Cyanophyceae). *Phycologia* 35 : 120-124.
- 187) M** **agalhães V.F., Soares R.M. & Azevedo S.M.F.O., 2001.** Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua' Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* 39, 1077–1085.
- 188) **agalhães V.F., Soares R.M. & Azevedo S.M.F.O., 2001.** Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua' Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* 39, 1077–1085.
- 189) **Mahmood N. A & Carmichael W. W, 1987.** Anatoxine- a (s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos- aqua* NRC- 525- 17, *Toxicon*, 27 (11): 1221-1227.
- 190) **Maillard JC et Gonzalez JP. (2006).** Biodiversity and emerging diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1081, 1-16.
- 191) **Malbrouck C., Trausch G., Devos P. et Kestemont P. (2003).** Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 135, 39- 48.
- 192) **Malbrouck C., Trausch G., Devos P., Kestemont P. (2004).** Effect of microcystin-LR on protein phosphatase activity in fed and fasted juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Toxicon* 43: 295–301.
- 193) **Mankiewicz-Boczek J., Palus J., Gaęala I., Izydorczyk K., Jurczak T., Dziubaltowska E., Stępnik M., Arkusz J., Komorowska M., Skowron A., Zalewski M. (2011).** Effects of microcystins-containing cyanobacteria from a temperate ecosystem on human lymphocytes culture and their potential for adverse human health effects. *Harmful Algae* 10: 356–365

- 194) **Marques JC. (2001).** Diversity, biodiversity, conservation, and sustainability. *Sc. Worl. J.* 11, 534-43.
- 195) **Matsushima, R., Yoshizawa, S., Watanabe, M. F., Harada, K., Furusawa, M., Carmichael, W. W. et Fujiki, H. (1990).** *In vitro* and *in vivo* effects of protein phosphatase inhibitors, microcystins and nodularin, on mouse skin and fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 171, 867-74.
- 196) **Mazur-Marzec H., Tyminska A., Szafranek J. et Plinski M. (2006).** Accumulation of Nodularin in Sediments, Mussels, and Fish from the Gulf of Gdansk, Souther in Baltic Sea. *Wiley Inter Science*, 22: 101–111
- 197) **McElhiney J., Lawton L.A. et Leifert C. (2001).** Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon* 39:1411–1420.
- 198) **Meriluoto, J.A., Sandstrom, A., Eriksson, J.E., Remaud, G., Craig, A.G., Chattopadhyaya, J., 1989.** Structure and toxicity of a peptide hepatotoxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Toxicon* 27, 1021-1034.
- 199) **Metcalf J.S., Bell S.G., Codd G.A., (2000).** Production of novel polyclonal antibodies against the REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES LR and their application for the detection and quantification of microcystins and nodularin. *Water Res.* 34, 2761 – 2769.
- 200) **Mez K., Beattie K. A., Codd G.A., Hanselmann K., Hauser B., Naegeli H. & Preisig H. R., 1997.** Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *Eur. J. Phycol.* 32: 111-117.
- 201) **Moffitt M.C. & Neilan B.A., 2004.** Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of the cyanobacterial hepatotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6353-6362
- 202) **Mohamed Z.A. (2008).** Polysaccharides as a protective response against microcystin induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem. *Ecotoxicology*, 17 : 504–516.
- 203) **Mohamed Z.A., Carmichael W.W. et Hussein A.A. (2003).** Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. *Environ. Toxicol.* 18 (2), 137–141.
- 204) **Mur L.R., Skumberg O.M. & Utkilen H., 1999.** Cyanobacteria in the Environment. In : Chorus, I. et Bartram, J. (Eds.). *Toxic Cyanobacteria in water. A guide to their public Health consequences, monitoring and management.* WHO Ed. E & FN SPON, pp 41-111.
- 205) **Mynderse J.S., Moore R. E., Kashiwagi M. & Norton T.R., 1977.** Antileukemia activity of the Oscillatoriaceae, isolation of debromoaplysiatoxin from *Lyngbya*. *Science* 196: 538-540.

206) N²⁰⁷ amikoshi, M., Rinehart, K.L., Sakai, R., Sivone, K., Carmichael, W.W., 1990. Structures of three new cyclic hepatotoxins produced by the cyanobacterium (blue-green alga)

Nostoc sp. strain 152. J. Org. Chem 55, 6135-6139.

- 208) **Namikoshi, M., Rinehart, K.L., Sakai, R., Stotts, R.R., Dahlem, A.M., Beasley, V.R., Carmichael, W.W., Evans, W.R., 1992a.** Identification of 12 hepatotoxins from a Homer lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, *Microcystis wesenbergii*; nine new microcystins. J. Org. Chem 57, 866-872.
- 209) **Namikoshi, M., Sivonen, K., Evans, W.R., Sun, F., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L., 1992d.** Isolation and structures of microcystins from a cyanobacterial water bloom (Finland). *Toxicon* 30, 1473-1479.
- 210) **Nasri A.B., Bouaïcha N. et Fastner J. (2004).** First Report of a Microcystin-Containing Bloom of the Cyanobacteria *Microcystis* spp. in Lake Oubeïra, Eastern Algeria. *Arch Environ Contam Toxicol*, 46:197 - 202.
- 211) **Nasri H, Bouaïcha N, Kaid Harche M (2007)** A new morphospecies of *Microcystis* sp. forming bloom in the Cheffia Dam (Algeria): seasonal variation of microcystin concentrations in the raw water and their removal in a full-scale treatment plant. *Environ. Toxicol.*, 22, p. 347-356.
- 212) **Nasri H., El Herry S. et Bouaïcha N. (2008).** First reported case of turtle deaths during a toxic *Microcystis* spp. bloom in Lake Oubeïra, Algeria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71 : 535–544
- 213) **Negri, A. P. et Jones, G. J. (1995).** Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis* by the freshwater mussel *Alathyria condola*. *Toxicon*, 33 (5), 667-678.
- 214) **Neilan B.A., 1995.** Identification and phylogenetic analysis of toxigenic cyanobacteria by multiplex randomly amplified polymorphic DNA PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2286, 229 p.
- 215) **Neilan, B.A., Jacobs, D., Goodman, E., 1995.** Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3785–3883.
- 216) **Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, W. W. et Fujiki, H. (1992).** Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J Cancer Res Clin Oncol*, 118, 420-4.

- 217) **Nishiwaki-Matushima R., Nishiwaki S., Ohta T., Yoszawa S., Suganuma M., Harada K., Watanabe M.F. et Fujiki H. (1991).** Structure function relations hips of microcystins, liver-tumor promoters, in interaction with protein phosphatase. *Jpn. J. Cancer Res.* 82: 993–996.
- 218) **Nishiwaki-Matushima R., Ohta T., Nishiwaki S., Suganuma M., Yoszawa S., Kohyama K., Ishikaawa T., Carmichael W.W. et Fujiki, H. (1992).** Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystins-LR. *J. Cancer Res. Clin.* 118: 420–424.
- 219) **Nishizawa T., Ueda A., Asayama M., Fujii K., Harada K.I., Ochi K. & Shirai M., 2000.** Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. *J. Biochem.* 127: 779-789.
- 220) **Nizan S., Dimentman C., Shilo M. (1986).** Acute toxic effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnniamagna*. *Limnol. Ocenogr.*, 31: xx-xx
- 221) **Norris, R.L., Eaglesham, G.K., Pierens, G., Shaw, G.R., Smith, M.J., Chiswell, R.K., Seawright, A.A. and Moore, M.R., 1999.** Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology*, 14, 163-165.
- 222) **NSWBGATF (1992).** Blue-green algae. Report of the NSW Blue-Green algae Task Force. NSW Dept Of Water Resources. Parramatta, NSW.
- 223) **Oberemm et al., 1999** Oberemm, A., Fastner, J. et Steinberg, C. E. W. (1997). Effects of microcystin-LR and cyanobacterial crude extracts on embryo-larval development of zebrafish (*Danio rerio*). *Water Research*, 31, 2918-2921.
- 224) **beremm et al., 1999** Oberemm, A., Fastner, J. et Steinberg, C. E. W. (1997). Effects of microcystin-LR and cyanobacterial crude extracts on embryo-larval development of zebrafish (*Danio rerio*). *Water Research*, 31, 2918-2921.
- 225) **Odriozola E., Ballabene N., Sala,anco A. (1984).** Intoxicacion en ganado bovin oporalgasverd-azulades. *Rev. Argent. Microbiol.*, 16(4):219-224.
- 226) **Ohta, T., Sueoka, E., Iida, N., Komori, A., Suganuma, M., Nishiwaki, R., Tatematsu, M., Kim, S. J., Carmichael, W. W. et Fujiki, H. (1994).** Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. *Cancer Res*, 54, 6402-6.
- 227) **Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C., 1992.** Cylindrospermopsin, a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Amer. Chem. Soc.*, 114, 7941-7942.
- 228) **Orr P.T. & Jones G.J., 1998.** Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnol. Oceanogr.*, 43(7):1604-1614.

229) **Oudra B., M. Loudiki, B. Sbiyyaa, R. Martins, V. Vasconcelos et M. Namikoshi (2001).** Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of Lalla Takerkoust lake reservoir (Morocco). *Toxicon.*, 39, 1375–81.

230) P **aerl, H.W., Millie, D.F., 1996.** L'écologie physiologique des cyanobactéries toxiques aquatiques. *Phycologia* 35, 160 à 167 (Suppl.).

232) **Painuly, P., Perez, R., Fukai, T. et Shimizu, Y. (1988).** The structure of a cyclic peptide toxin, cyanogenosin-RR from *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron Letters*, 29: 11-14.

233) **Paliková M., R. Krejci, Hilscherov K., Babica P., Navratil S., Kopp R., Blàhà L. (2007).** Effect of different cyanobacterial biomasses and their fractions with variable microcystin content on embryonal development of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology* 81 : 312–318

234) **Papadimitriou, T., Kagalou, I., Stalikas, C., et al. (2012).** Assessment of microcystin distribution and biomagnification in tissues of aquatic food web compartments from a shallow lake and evaluation of potential risks to public health. *Ecotoxicology*, 21: 1155-1166.

235) **Papadimitriou, T., Kagalou, I., Stalikas, C., et al. (2012).** Assessment of microcystin distribution and biomagnification in tissues of aquatic food web compartments from a shallow lake and evaluation of potential risks to public health. *Ecotoxicology*, 21: 1155-1166.

236) **Pearson M.J. (1990).** Toxic blue-green algae. Report of the National Rivers Authority. Water Quality Series N°2. National Rivers Authority, London.

237) **Penalzoza, R., Rojas, M., Vila, I. et Zambrano, F. (1990).** Toxicity of soluble peptide from *Microcystis* sp. to zooplankton and fish. *Freshwat Biol*, 24(2), 223 – 240.

238) **Pflugmacher et al. (2001)** Pflugmacher, S., Wiegand, C., Beattie, K. A., Krause, E., Steinberg, C. E. et Codd, G. A. (2001). Uptake, effects, and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant *Phragmites australis* (cav.) trin. ex steud. *Environ Toxicol Chem*, 20, 846-52.

239) **Pilotto LS, Burch MD, Douglas RM, Cameron S, Roach GJ, C owie CT, Beers M, Robinson P, Kirk M, Hardiman S, Moore C. et Attewell RG. 1997.** Health effect of recreational exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water activities. *Australian and New Zealand Journal of Public Health* 21: 562–566.

240) **Pitois, S, Jackson, MH et BJB Wood. (2000).** Problems associated with the presence of Cyanobacteria in recreational and drinking waters. *International journal of Environmental Health Research*, 10: 203- 218.

- 241) **Pouria, S., de Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R. L., Barreto, V. T., Ward, C. J., Preiser, W., Poon, G. K., Neild, G. H. et Codd, G. A. (1998).** Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet*, 352, 21-6.
- 242) **Prepas E.E., Kotak B.G., Campbell L.M., Evans J.C., Hruddy S.E., Holmes C.F.B. (1997).** Accumulation and elimination of cyanobacterial hepatotoxins by the freshwater clam *Anodonta grandis simpsoniana*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 54(1):41-46.
- 243) **Prescott L.M., Harley J.P. et Rlein D.A. (2003).** Microbiologie (1137p)
- 244) **Puddick, J., Prinsep, M., Wood, S., et al. 2015.** Further Characterization of Glycine-containing Microcystins from the McMurdo Dry Valleys of Antarctica. *Toxins*, 7: 493-515
- 245) **Pybus M.J. et Hobson D.P. (1986).** Mass mortality of bats due to probable blue-green algae toxicity. *J. Wildlif. Dis.*, 22(3):449-450. **Rapala et Lahti, 2002**
- 246) **Honkanen R.E., B.A. Codispoti, K. Tse, A.L. Boynton, R.E. Honkanan,** Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases, *Toxicon* 32 (1994) 339–350.
- 247) R** **abergh C.M.I., Bylund G. et Eriksson J.E. (1991).** Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga). *Aquatic Toxicology* 20, 131–146.
- 249) **Ranson S.P. (2003).** L'alimentation de la carpe (*Cyprinus carpio*) dans son biotope et en élevage. Thèse de Doctorat en vétérinaire. La faculté de médecine de Créteil. ALFORT. 120p.
- 250) **Rapala J. & Sivonen K., 1998.** Assessment of environmental conditions that favour hepatotoxic and neurotoxic *Anabaena spp.* strains in cultured under light-limitation at different temperatures. *Microbiol. Ecol.*, 36:181-192.
- 251) **Rapala J., Sivonen K., Lyra C. & Niemelä S.I., 1997.** Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena spp.* as a function of growth stimuli. *App. Environ. Microbiol.*, 64: 2206-2212.
- 252) **Reinikainen M., Hietala J. & Walls M., 1999.** Reproductive adaptation in *Daphnia* exposed to toxic cyanobacteria. *J. Plankton Res.*, 21, 1553-1564.
- 253) **Revenga C, Brunner J., Henninger N., Kassem K., Payne R. (2000).** Pilot analysis of global ecosystems: freshwater ecosystems. World Resources Institute, Washington, DC. 83 pp.
- 254) **Reynolds C.S., 1987.** Cyanobacterial water blooms. *Adv. Biol. Res.* 13, 67-143.
- 255) **Rinehart K.L., Harada K.I., Namikoshi M., Chen C., Harvis C.A., Munro M.H.G., Blunt J.W., Mulligan P.E., Beasley, V.R., Dahlem, A.M. & Carmichael W.W.,**

1988. Nodularin, microcystin, and the configuration of adda. *J. Amer. Chem. Soc.* 110: 8557-8558.
- 256) **Rippka R. et Herdman M. (1992).** Paris, Collection Nationale de Cultures de Microorganismes Institut Pasteur, Catalogue et Taxonomic Handbook. Vol. 1, p. 103.
- 257) **Rippka R., Deruelles J., Wtarebury J.B., Herdman M. & Stanier R.Y., 1979.** Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 111, A-61.
- 258) **Rodger, H. D., Turnbull, T., Edwards, C. et Codd, G. A. (1994)** Cyanobacterial bloom associated pathology in brown trout *Salmo Trutta* L. in Loch Leven, *Scotland. J Fish Dis*, 17, 177-181.
- 259) **Rolland A. (2009).** Dynamique Et Diversité Du Phytoplancton Dans Le Réservoir Marne (Bassin Versant De La Seine). Thèse de doctorat, université de Savoie, France, (262p)
- 260) **Rouhiainen L., Vakkilainen T., Siemer B. L., Buikema W., Haselkorn R. & Sivonen K. 2004.** Genes Coding for Hepatotoxic Heptapeptides (Microcystins) in the Cyanobacterium *Anabaena* Strain 90. *App. Environ. Microb.* 70: 686-692.
- 261) **Runnegar M.T., Kong, S. et Berndt N. (1993).** Protein phosphatase inhibition and in vivo hepatotoxicity of microcystins. *Am. J. Physiol.* 265, G224–G230.
- 262) **Runnegar, M. T. C., Berndt, N. et Kaplowitz, N. (1995b).** Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicol Appl Pharmacol*, 134, 264-72.
- 263) **Runnegar, M. T. C., Berndt, N., Kong, S. M., Lee, E. Y. et Zhang, L. (1995c).** *In vivo* and *in vitro* binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochem Biophys Res Commun*, 216, 162-9.
- 264) **Runnegar, M. T. C., Kong, S. M., Zhong, Y. Z. et Lu, S. C. (1995a).** Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, 49, 219-225.
- 265) **Runnegar, M. T. C., Kong, S. M., Zhong, Y. Z. et Lu, S. C. (1995a).** Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, 49, 219-225.
- 266) **S** 267) **ahin A., Tencalla F.G., Dietrich D.R. et Naegeli H. (1996).** Biliary excretion of biochemically active cyanobacteria (blue-green algae) hepatotoxins in fish. *Toxicology*. 106: 123–130.
- 268) **Saker, M.L., Eaglesham, G.K., 1999.** The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Toxicon*, 37 (7), 1065-1077.

- 269) **Saqrane S., ElGhazali I., Ouahid Y., El Hassni M., ElHadrami I., Bouarab L., del Campo F.F., Oudra B. et Vasconcelos V.(2007).** Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemnagibba*: Microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction. *Aquatic Toxicology*, 83: 284-294.
- 270) **Schriver, P., Bogestrand, J., Jeppesen, E. and Sondergaard, M., 1995,** Impact of Submerged Macrophytes on Fish-Zooplankton-Phytoplankton Interactions: Large-Scale Enclosure Experiments in a Shallow Eutrophic Lake, *Freshwater Biology* **33**: 255–270.
- 271) **Seawright, A.A., Nolan, C.C., Shaw, G.R., Chiswell, R.K. Norris, R.L., Moore, M.R. and Smith, M.J., 1999.** The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). *Environmental Toxicology*, 14, 135-142.
- 272) **Shi Y., Jiang J., Shan Z., Bu Y., Deng Z., et Cheng Y. (2015).** Oxidative stress and histopathological alterations in liver of *Cyprinus carpio* L. induced by intraperitoneal injection of microcystin-LR. *Ecotoxicology* 24:511–519
- 273) **Shi, L.; Carmichael, W.W.; Miller, I.** Immuno-gold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells. *Arch. Microbiol.* **1995**, 163, 7–15.
- 274) **Sigee D.C. (2005)** Freshwater microbiology. Biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment. Chichester, John Wiley and Sons.
- 275) **Singh, D.P., Tyagi, M.B., Kumar, A., Thakur, J.K., Kumar, A., 2001.** Antialgal activity of a hepatotoxin-producing cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 15-22.
- 276) **Sinha R.P., Hader D.P 2008.** UV-protectants in cyanobacteria. *Plant Sci.* 174 :278–289.
- 277) **Sipiä V.O., Kankaanpää H.T., Flinkman J., Lahti K. et Meriluoto J.A.O. (2001).** Time-dependent accumulation of cyanobacterial hepatotoxins in flounders (*Platichthys flesus*) and mussels (*Mytilus edulis*) from the northern Baltic Sea. *Environ. Toxicol.* 16, 330-336.
- 278) **Sirén et al., 1999 Siren H., Jussila M., Liu H., Peltoniemi S., Sivonen K. & Riekkola M.L., 1999.** Separation, purity testing and identification of cyanobacterial hepatotoxins with capillary electrophoresis and electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 839, 203- 215.
- 279) **Sivonen K et Jones J. (1999).** Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J [eds.], Toxic cyanobacteria in water: REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES nce, consequences, monitoring and management , 41–111. E&FN SPON, London.
- 280) **Sivonen K., 1990a.** Effects of light, temperature, nitrate; orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *App. Environ. Microbiol.*, 56:2658-2666.
- 281) **Sivonen, K., Carmichael, W.W., Namikoshi, M., Rinehart, K.L., Dahlem, A.M., Niemela, S.I., 1990.** Isolation and characterization of hepatotoxic microcystin homologs from

- the filamentous freshwater cyanobacterium *Nostoc sp.* strain 152. *Appl Environ Microbiol* 56, 2650-2657.
- 282) **Sivonen, K., Jones, G.J., 1999.** Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.* World Health Organization, Taylor and Francis, London and New York, pp. 41–111.
- 283) **Sivonen, K., Namikoshi, M., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Sun, F., Rouhiainen, L., Luukkainen, R. et K.L. Rinehart. (1992a).** Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. *App. Env. Microbiol.*, 58, 2495-2500.
- 284) **Sivonen, K., Namikoshi, M., Evans, W.R., Fardig, M., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L., 1992b.** Three new microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, from *Nostoc sp.* strain 152. *Chem Res Toxicol* 5, 464-469.
- 285) **Sivonen, K., Namikoshi, M., Evans, W.R., Gromov, B.V., Carmichael, W.W., Rinehart, K.L., 1992c.** Isolation and structures of five microcystins from a Russian *Microcystis aeruginosa* strain CALU 972. *Toxicon* 30, 1481-1485.
- 286) **Smith VH (2003).** Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems - A global problem. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 10:126-139
- 287) **Smitt R.V. (1976).** Annual Report on Research and Technical Work. Freshwater Biological Investigation Unit. Dpt Agriculture, Northern Ireland, pp.131-148.
- 288) **Soll M.D. et Williams M.C. (1985).** Mortality of a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) suspected to be associated with the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 56:49-51.
- 289) **Song L., Chen W., Peng L., Wan N., Gan N., Zhang X., (2007).** Distribution and bioaccumulation of microcystins in water columns: A systematic investigation into the environmental fate and the risks associated with microcystins in Meiliang Bay, Lake Taihu. *Water Research*, 41, 2853-2864.
- 290) **Song, K. Y., Lim, I. K., Park, S. C., Lee, S. O., Park, H. S., Choi, Y. K. et Hyun, B. H. (1999).** Effect of nodularin on the expression of glutathione S-transferase placental form and proliferating cell nuclear antigen in N-nitrosodiethylamine initiated hepatocarcinogenesis in the male Fischer 344 rat. *Carcinogenesis*, 20, 1541-8.
- 291) **Spencer P.S., Nunn P.B., Hugon J., Ludolph A.C., Ross S.M., Roy D.N. et Robertson R.C. (1987).** Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 237; 517–522.
- 292) **Starmach K. (1966).** Cyanophyta - sinice, Glaucophyta - glaukofity - Flora slodkow. *Polski PAN Warszawa*, 2, 1- 808.

- 293) **Stewart I., Schluter P. et Shaw G. 2006a.** Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health – a review. *Environmental Health*, 5: 7.
- 294) **Suganuma, M., Fujiki, H., Sugiri, H., Yoshizawa, S., Hirota, M., Nakayasu, M., Ojika, M., Wakamatsu, K., Yamada, K. et Sugimura, T. (1988).** Okadaic acid : an additionnal non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate typ tumor promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 1768-1771.
- 295) **Summerer M, Sonntag B, Hörtnagl P, Sommaruga R, 2009.** Symbiotic ciliates receive protection against UV damage from their algae: a test with *Paramecium bursaria* and *Chlorella*. *Protist*. 160:233–243.
- 296) **Svircev Z., Lujic J., Marinovic Z., Drobac D., Tokodi N., Stojiljkovic B. et Meriluoto J. (2015).** Toxicopathology Induced by Microcystins and Nodularin: A Histopathological Review. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 33:125–167, 2015
- 297) T** 298) **akenaka S. & Watanabe M.F., 1997.** Microcystin-LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *Chemosphere*, 34, 749-757.
- 299) **Teixera, M. G. L. C., Cotsa, M. C. N., Carvalho, V. L. P., Pereira, M. S. et Hage. E. (1993).** *Bulletin of the Pan American Health organization*, 27, 244-253.
- 300) **Tencalla F. et Dietrich D. (1997).** Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon* 35 : 583–595.
- 301) **Terao, K., Ohmori, S., Igarashi, K., Ohtani, I., Watanabe, M., Harada, K.-I., Ito, E. et Watanabe, M. (1994).** Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon*, 32, 833-843.
- 302) **Thostrup L. et Christoffersen K. (1999).** Accumulation of microcystin in *Daphnia magna* feeding on toxic *Microcystis*. *Arch. Hydrobiol.*, 145, 447-467.
- 303) **Thostrup, L. and Christoffersen, K., 1999,** Accumulation of Microcystin in *Daphnia Magna* Feeding on Toxic *Microcystis*, *Arch Hydrobiol* 145: 447–467.
- 304) **Tillett D., Dittmann E., Erhard M., Von Dohren H., Borner T. & Neilan B. A., 2000.** Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem. Biol.* 7: 753-764.

- 305) **Tisdale, E. S., 1931**, Epidemic of Intestinal Disorders in Charleston, W. Va., Occurring Simultaneously with Unprecedented Water Supply Conditions, *American Journal of Public Health* **21**: 198–200.
- 306) **Tricarico, E., Bertocchi, S., Brusconi, S., Casalone, E., Gherardi, F., Giorgi, G., Mastromei, G., Parisi, G. (2008)**. Depuration of microcystin-LR from the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* with assessment of its food quality. *Aquaculture*, 285, 90–95.
- 307) **Tsavkelova, E.A., Lobakova, E.S., Kolomeitseva, G.L., Cherdyntseva, T.A., Netrusov, A.I., 2003a**. Associative cyanobacteria isolated from the roots of epiphytic orchids. *Mikrobiologiya*. 72(1):105-110.
- 308) **Tsavkelova, E.A., Lobakova, E.S., Kolomeitseva, G.L., Cherdyntseva, T.A., Netrusov, A.I., 2003b**. Localization of associative cyanobacteria on the roots of epiphytic orchids. *Mikrobiologiya*.72 (1), 99-104.
- 309) **Tsuji et al., 1994 Tsuji K., Nalto S., Kondo F., Ishikawa N., Watanabe M.F., Suzuki M. & Harada K.-I., 1994**. Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerization. *Environ. Sci. Technol.* 28, 173-177.
- 310) **Tsuji, K., Watanuki, T., Kondo, F., Watanabe, M. F., Suzuki, S., Nakazawa, H., Suzuki, M., Uchida, H. et Harada, K. I. (1995)**. Stability of microcystins from cyanobacteria--II. Effect of UV light on decomposition and isomerization. *Toxicon*, 33, 1619-31.
- 311) **Tubaro A., Sosa S., Della Loggia R. & Yasumoto T., 1996**. A protein phosphatase 2A inhibition assay for fast and sensitive assessment of okadaic acid contamination in mussels. *Toxicon*, 35, 1033- 1041.
- 312) **Turner P.C., Gammie A.J., Hollinrake K., Codd G.A. (1990)**. Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. *Br. Med. J.*, 300:1440-1441.
- 313) U** **314) S EPA. (2012)**. TechBrief – Environmental technology verification program : Immunoassay test kits for Microcystins. US EPA report N° EPA/600/S/12/511, USA, 2p.
- 315) **Utkilen H., Gjolme N., 1995**. Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 : 797-800.

- 316) V** **317) van Appeldoorn, M .E., van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.I., (2007)**. Toxins of Cyanobacteria. *Mol.Nutr.Food*

- 318) **Van der Westhuizen A.J. & Eloff J.N., 1985.** Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Planta*, 163:55-59.
- 319) **Vinberg G.G. (1954).**Toxic phytoplankton. National Research Council of Canada Technical Translation TT-549.Ottawa, 25pp.

320)

W

321) **alsby A.E. (1994),** Gas vesicles.*Microbiol. Rev.* 58(1), 94-144

322) **Wang et al., 2010 Wang M., Wang D., Lin L., Hong H. (2010).** Protein

profiles in zebrafish (*Danio rerio*) brains exposed to chronic microcystin-LR. *Chemosphere*, 81, 716–724.

- 323) **Ward C.J., Beattie K.A., Lee E.Y.C. & Codd G.A., 1997.** Colorimetric protein phosphatase inhibition assay of laboratory strains and natural blooms of Cyanobacteria : comparison with high-performance liquid chromatography analysis for microcystins, *FEMS Microbiol. Lett.* 153 : 465-473.
- 324) **Watanabe M. F., Park H.D., Kondo F., Harada K., Hayashi H. et Okino T. (1997).** Identification and estimation of microcystins in freshwater mussels. *Nat. Toxins*, 5:31-35.
- 325) **Watanabe M.F., Oishi, S., Harada, K.-I., Matsuura, K., Kawai, H. et Suzuki, M. (1988).**Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*, 26: 1017-1025.
- 326) **Wei L., Sun B., Song L. et Nie P. (2008).** Gene expression profiles in liver of zebrafish treated with microcystin-LR. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 26: 6–12
- 327) **Weiss et al., 2000 ; Weiss, D. J. et Lunte, C. E. (2000).** Detection of a urinary biomarker for oxidative DNA damage 8-hydroxydeoxyguanosine by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Electrophoresis*, 21, 2080-5.
- 328) **Wicks R. et Thiel P.G. (1990).** Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in hypertrophic African reservoir. *Environ. Sci. Technol.* 24: 1413-1418.
- 329) **Williams D.E., Dawe S.C., Kent M.L., Andersen R.J., Craig M. et Holmes C.F. (1997).** Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus*

edulis, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. *Toxicon*, 35, 1617-1625.

- 330) **Williams D.E., Kent M.L., Andersen R.J., Klix H. et Holmes C.F.B. (1995).** Tissue distribution and clearance of tritium-labeled dihydromicrocystin-LR epimers administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection. *Toxicon* 33, 125–131.
- 331) **Winfield I.J. et Nelson, J.S. (1991).** Cyprinid fishes. Systematics, biology and exploitation. In *Fish and Fisheries Series*, 1st ed. edited by (I. J. Winfield, Ed.), Chapman & Hall Publishers, London.
- 332) **Woese C.R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 51: 221- 271.
- 333) **World Health Organization (WHO) (1998).** Guidelines for Drinking-water Quality. 2nd edition, Addendum to Vol. 2. *Health Criteria and Other Supporting Information*. World Health Organization, Geneva. 416 p
- 334) **Wu W., Qu J.H., Chen J.Z., Hu G.D. et Liu H. (2002).** Toxicological effects on the fish liver by microcystins. *China Environmental Science* 22, 67–70 (in Chinese with English abstract).

335) X 336) **Xie L, Xie P, Ozawa K, Honma T, Yokoyama A, Park H (2004).** Dynamics of microcystins-LR and-RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. *Environ Pollut* 127(3):431–439

- 337) **Xie L., Xie P., Guo L., et al. (2005).** Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. *Environmental Toxicology*, 20: 293-300.
- 338) **Xie, L., Yokoyama, A., Nakamura, K., Parka, H. (2007).** Accumulation of microcystins in various organs of the freshwater snail *Sinotaia histrica* and three fishes in a temperate lake, the eutrophic Lake Suwa, Japan. *Toxicon*, 49, 646–652.
- 339) **Xu L.H., Chen G.S., Chen J.P., Xu J.M. et Zhang Y.Y. (1998).** Toxic effects of microcystin on fish liver. *Acta Hydrobiologica Sinica* 22, 379 (in Chinese).

340) Y 341) **Yatsunami, J., Komori, A., Ohta, T., Suganuma, M. et Fujiki, H. (1993).** Hyperphosphorylation of retinoblastoma protein and p53 by okadaic acid, a tumor promoter. *Cancer Res*, 53, 239-41.

342)

Z

343) **ambrano F. et Canelo E.**

(1996). Effects of microcystin-LR on the partial reactions of the Na⁺-K⁺ pump or the gill of carp (*Cyprinus carpio* Linneo). *Toxicon*, 34(4): 451-

458.

344) **Zhang Y. et Prepas E.E.** (1996), "Short-term effects of Ca(OH)₂ additions on phytoplankton biomass: A comparison of laboratory and in situ experiments", *Water Research*, vol. 30,p. 1285-1294.

345) **Zimba P.V., Khoo L., Gaunt P., Carmichael W.W., Brittain S.** (2001).Confirmation of catfish mortality from *Microcystis* toxins. *J. Fish Dis.*, 24:41-47.

346) **Zurawell R. W., Chen H., Burke J. M. et Prepas E. E.** (2005). Hepatotoxic Cyanobacteria: A Review of the Biological Importance of Microcystins in Freshwater Environments. *Toxicology and Environmental Health Part B*, 8(1): 1-37

347) **Zurawell, R. W., Kotak, B. G. and Prepas, E. E.,** 1999, Influence of Lake Trophic Status on the Occurrence of Microcystin-Lr in the Tissue of Pulmonate Snails, *Freshwater Biology* **42**: 707.

