

Accord Cadre ZABR - Agence de l'Eau

Fiche projet

2020-13-CYANOTOX-RIV-LEHNA

TITRE DU PROJET : Déterminisme du développement et modélisation de la toxicité des cyanobactéries en rivière

RESPONSABLE SCIENTIFIQUE DU PROJET :
LEHNA (S. Dolédec)

EQUIPES DE RECHERCHES ZABR CONCERNEES et CONTACT SCIENTIFIQUE DE L'EQUIPE
IRSTEA (Nicolas Lamouroux, Hervé Capra, Hervé Pella)

AUTRES PARTENAIRES

- Recherche :
 - **ISARA (Joël Robin) : co-responsable du projet**
 - **Université de Clermont-Ferrand (Delphine Latour) : prestataire**
- Institutionnel :

THEME DE RATTACHEMENT ZABR
FFHB/FPEE (Ecotoxicologie)

THEME DE RATTACHEMENT AGENCE DE L'EAU -QUESTIONS AGENCE DE L'EAU

Thème : Les risques environnementaux et la vulnérabilité des milieux

Question : Inventaire des besoins en matière de connaissance opérationnelle pour la gestion des milieux aquatiques

SITE OU OBSERVATOIRE DE RATTACHEMENT ZABR

SARAM

RESUME DU PROJET GLOBAL

L'eutrophisation entraîne la prolifération des algues, l'anoxie, la réduction de la biodiversité aquatique, la diminution des stocks de poissons et de crustacés et déclenche une prolifération d'algues nuisibles ayant de graves conséquences sur la santé humaine (par exemple, l'émission de neurotoxines). Actuellement, aucun modèle général ne permet de prédire les foyers de prolifération algale à l'échelle du micro-habitat. Or, la prolifération algale peut s'accompagner du développement de biofilms à cyanobactéries (BAC) et représente un **enjeu sanitaire important puisqu'une proportion significative des cyanobactéries benthiques retrouvées dans les rivières peut synthétiser des neurotoxines**. Cependant, le risque toxique lié aux BAC reste mal connu. Le projet proposé émane de travaux menés dans un programme conjoint EDF/Agence de l'eau (convention CNRS no. 109651) traitant de la *Dynamique, fonctionnement et biodiversité des communautés aquatiques face aux pressions anthropiques sur la vallée de l'Ain* qui a montré que les conditions hydrologiques induisaient des variations temporelles dans les proliférations de BAC avec des dominances en période plus sèche (automne 2014 et 2015) et des régressions en période plus humide (été 2014, printemps 2016). Ce programme a également souligné les variations spatiales de cette prolifération des BAC dont les raisons restent à élucider. Du point de vue scientifique, le projet quantifiera le **rôle de l'histoire hydraulique locale** (reconstitution de vitesse, hauteur sur des arêtes de maille 2.5 m) **et des différents paramètres d'influence** (concentration en

nitrate et phosphates, nature du substrat, influence souterraine, macroinvertébrés benthiques) sur les proliférations algales et les BAC en se basant sur un modèle hydraulique 2D et II évaluera la **toxicité potentielle des BAC** (analyses moléculaires) et avérée (macroinvertébrés) sur **la basse vallée de l'Ain**. Du point de vue opérationnel, ce projet vise à **poser les bases d'un modèle permettant à moyen terme de prédire le risque toxique lié aux biofilms à cyanobactéries en rivière. Ce projet vient en appui et conditionne une demande de bourse de thèse faite auprès du programme ANR H2O.**

- Cout complet du projet : €
- Subvention demandée : €
- Livrables : Rapport identifiant les paramètres permettant le développement des cyanobactéries benthiques et caractérisation du risque toxicogène lié aux cyanobactéries benthiques

ENCART 2020-13-CYANOTOX-RIV-LEHNA (Dolédéc Sylvain)

- Tache de l'équipe dans le projet : L'équipe sera chargée de la coordination du projet, de la définition du plan expérimental en collaboration avec les autres équipes, de la collecte et de l'identification des macroinvertébrés et contribuera à l'analyse des réponses des macroinvertébrés aux cyanobactéries, et de la rédaction du rapport final. Le LEHNA délèguera à l'équipe de l'ISARA (Joël Robin), le traitement des données concernant les cyanobactéries, l'identification et de la quantification des espèces de cyanobactéries potentiellement toxiques, la mise en œuvre des moyens nécessaires pour transférer du matériel biologique (biofilms de cyanobactéries) qui seront le support des expérimentations en mésocosmes permettant d'analyser les réponses des macroinvertébrés aux cyanobactéries. Le LEHNA délèguera la caractérisation du risque toxicogène lié aux cyanobactéries à l'équipe réseaux trophiques aquatiques de l'UMR CNRS 6023 Microorganismes : Génome et Environnement (Delphine Latour) par l'identification des gènes responsables de la production de neurotoxines et le dosage des concentrations de neurotoxines produites par certaines espèces cibles.
- Cout total du projet pour l'équipe : €

ENCART 2020-13-CYANOTOX-RIV-IRSTEA RIVERLY (Lamouroux Nicolas)

- Tache de l'équipe dans le projet : L'équipe sera chargé du calcul des métriques éco-hydrauliques à partir du modèle 2D développé sur la basse rivière d'Ain. L'équipe contribuera au plan expérimental et à la rédaction du rapport final.
- Cout total du projet pour l'équipe : €

FINALITES ET ATTENDUS OPERATIONNELS :

Les activités anthropiques récentes, notamment l'agriculture intensive et l'urbanisation, ont doublé les flux d'azote, et multiplié par quatre les flux de phosphore circulant sur la Terre, entraînant un transfert excessif d'éléments nutritifs vers les écosystèmes d'eau douce et provoquant une eutrophisation mondiale qui altère le fonctionnement des écosystèmes d'eaux douces et marins (Breitburg et al. 2018). L'eutrophisation entraîne la prolifération des algues, l'anoxie, la réduction de la biodiversité aquatique, la diminution des stocks de poissons et de crustacés et déclenche une prolifération d'algues nuisibles ayant de graves conséquences sur la santé humaine (par exemple, l'émission de neurotoxines). Les pressions anthropiques sur les écosystèmes aquatiques devraient s'intensifier notamment en raison de la croissance démographique jusqu'au milieu du siècle (Seitzinger et al. 2010). Dans ce contexte, la pollution par l'azote et ses conséquences sur les écosystèmes sont considérées comme un enjeu environnemental mondial des plus urgents de concert avec l'érosion de la biodiversité et le changement climatique (Rockström et al. 2009). La conclusion d'une récente expertise scientifique sur l'eutrophisation menée par le CNRS (ESCo 2017) et réunissant plus de 45 spécialistes des différents instituts français (CNRS, Inra, Irstea, Ifremer) et des universités, a conclu que la pollution diffuse à la fois d'azote et de phosphore est la principale cause d'eutrophisation, par opposition à la pollution ponctuelle issue des installations de traitement des eaux usées ou de l'industrie.

Le processus d'eutrophisation en rivière aboutit à la croissance excessive d'algues (biofilm) et conduit à l'altération du fonctionnement trophique des communautés aquatiques. Dans certains cas, les biofilms sont essentiellement constitués de cyanobactéries (BAC). Ces cyanobactéries peuvent présenter un risque sanitaire à travers leur capacité à produire différents types de toxines (hépat-, dermato- et neurotoxines) (Codd et al. 2005, Kuiper-Goodman et al. 1999). Le risque engendré peut même remettre en cause divers usages des milieux aquatiques (loisirs et prélèvements d'eau destinés à la consommation humaine; AFSSA, 2006). Plusieurs cas de mortalités de mammifères, principalement des chiens, liées aux cyanobactéries ont été enregistrés depuis un douzaine d'années en France au niveau de différents cours d'eau (Tarn, Loue, Loire, Cher, Moselle, Ardèche, Ain; Codd et al. 2005, Boisseleau et al. 2018). Dans la grande majorité des cas l'analyse post-mortem a permis de confirmer la responsabilité de certaines neurotoxines issues des BAC (voir par exemple Gugger et al. 2005, Cadel-Six et al. 2007). Selon la bibliographie, les trois genres principaux *Oscillatoria*, *Phormidium* ou *Lyngbya* sont responsables de la prolifération des cyanobactéries benthiques dans les rivières (Hudon et al. 2014, et revues de Quiblier et al.

2013 et Watson et al. 2015). *Phormidium* forme des biofilms verts brun foncé pouvant atteindre des épaisseurs de l'ordre du centimètre (Biggs & Kilroy 2000). En Nouvelle-Zélande, le genre *Phormidium* génère des blooms toxiques chaque été dans différentes rivières du pays et est responsable chaque année de la mort de dizaines de chiens (Hamill 2001, Wood et al. 2007). Cela a conduit le pays à mettre en place un système de surveillance et des recommandations visant à limiter les risques de toxicité (Wood et al. 2009). En France, le genre *Phormidium* a été impliqué dans les efflorescences toxiques entraînant la mort des chiens dans les rivières Loue et Tarn (Gugger et al. 2005, Cadel-Six et al. 2007). On sait à l'heure actuelle que Les souches toxiques de *Phormidium* produisent principalement de l'anatoxine a et de l'homoanatoxine dont les effets neurotoxiques sont connus (Faassen et al. 2012, Gugger et al. 2005, Lilleheil et al. 1997, Wood et al. 2007).

L'un des enjeux majeurs de l'étude proposée est de mieux anticiper l'apparition des BAC et le potentiel risque toxique associé en modélisant le déterminisme des proliférations algales. Les effets combinés de la radiation solaire, des nutriments, de la température, des variations de débits et de substrats sur les proliférations algales sont bien documentés. Malgré tout, aucun modèle général ne permet l'identification des facteurs de proliférations algales en rivière amenées à s'intensifier en raison des réductions de débit plus importantes liées aux changements climatiques. Il s'agit donc de poser les bases d'un modèle permettant à moyen terme de prédire le risque toxique lié aux BAC en rivière. Pour cela, **nous prendrons comme site-pilote la basse rivière d'Ain.** D'après des travaux antérieurs récents (convention CNRS no. 109651 traitant de la *Dynamique, fonctionnement et biodiversité des communautés aquatiques face aux pressions anthropiques sur la vallée de l'Ain, 2016*), les deux genres *Phormidium* et *Oscillatoria* ont été identifiés à des densités importantes sur certaines zones de la basse-vallée de l'Ain.

Sur cette base, les **attendus opérationnels** de l'étude proposée visent à :

- (1) Faire un **état des lieux de la toxicité des BAC en rivière (Rhône-Alpes),**
- (2) **Caractériser les conditions hydrauliques** (utilisant des paramètres soit couramment employés dans les réseaux de surveillance) favorables ou non aux BAC en vue d'une **intégration potentielle dans les modèles d'habitat** opérationnels.
- (3) **Caractériser le rôle des brouteurs de biofilms sur les BAC**

OBJECTIFS ET METHODOLOGIE :

Les proliférations d'algues/cyanobactéries résultent de la succession de différents taxons sur le substrat avec une accumulation progressive de biomasse (Stock & Ward 1989, Suren et al. 2003a). Cette succession peut être complexe (McCormick & Stevenson 1991) et les mécanismes impliqués incluent la facilitation, l'inhibition et la tolérance. Les caractéristiques hydrauliques affectent ces mécanismes en détruisant les cellules des algues et en contrôlant leur forme (Keithan & Lowe 1985). En outre, la biomasse développée des habitats lents est plus susceptible d'être affectée par une augmentation de débit. Horner et al. (1990) ont situé la plage de vitesses efficaces de remédiation comprise entre 20 et 60 cm/s. La vitesse du courant agit également sur le taux de colonisation des substrats nus (Lau & Liu 1993). Enfin, les facteurs de température, chimiques (azote, phosphore), biologiques (consommateurs) et autres interagissent avec la vitesse du courant et peuvent modifier la cinétique de développement des algues (Keithan & Lowe 1985).

Dans un **premier objectif de modélisation**, la dynamique spatiale locale des BAC (échantillonnages *in situ* pendant les périodes à risque identifiées sur des périodes pluri-hebdomadaires stables aux niveaux thermique et hydraulique) sera appréhendée avec (1) les données d'un modèle hydraulique 2D (établi sur la basse rivière d'Ain par l'IRSTEA et EDF) permettant de différencier les secteurs en termes de variations hydrauliques en fonction des variations de débit, (2) des mesures de nutriments, d'oxygène, de température et d'éclairement et (3) la dynamique des consommateurs primaires (échantillonnés *in situ*). Un **modèle de développement d'algues/cyanobactéries sera construit en utilisant des échantillons d'algues** (diatomées, algues vertes, cyanobactéries) collectés à 4 dates à risque différentes sur 20 emplacements différents (80 zones échantillonnées avec un effort d'échantillonnage à l'échelle de la zone dépendant de la surface colonisée par les BAC) pour suivre la succession de colonisation de substrats artificiels.

Le modèle hydraulique 2D (couvrant 50 km de cours d'eau, résolution de 2 m, calé sur la base d'un lidar bathymétrique de 2015-2016) sera utilisé à la fois pour optimiser la stratégie d'échantillonnage *a priori* et comme une opportunité unique d'avoir des variables explicatives des abondances de cyanobactéries *a posteriori*. Des crues ont modifié la morphologie de l'Ain depuis le développement du modèle 2D, mais un nouveau passage de Lidar 2018 a permis d'identifier les zones à éviter (où le modèle n'est plus fiable). Par ailleurs, les relevés de terrain seront associés aux mailles du modèle 2D les plus proches et de profondeur d'eau équivalente, afin d'optimiser la pertinence de la modélisation 2D. Ainsi le modèle devrait identifier avec pertinence les zones longtemps stagnantes. Les débits horaires sont connus sur le secteur, et le modèle 2D fournira ainsi des métriques

écohydrauliques instantanées (profondeur, vitesse, et contraintes de cisaillement) et dynamiques (vitesses et contraintes maximales journalières dans les 2 semaines précédant l'échantillonnage, fréquences d'assèchement). Ces descriptions seront complétées par des mesures, des éléments nutritifs, de l'oxygène et de la température (données de terrain et télédétection). Enfin, nous échantillonnerons les macro-invertébrés en début et fin de campagne pour connaître l'influence de la biomasse algale sur le réseau trophique. Nous supposons que la forte biomasse algale entraîne une régression des macro-invertébrés les plus sensibles, notamment des brouteurs de biofilm.

Le **deuxième objectif porte sur l'évaluation de la toxicité des BAC**. Nous caractériserons la toxicité des échantillons réalisés sur la basse-rivière d'Ain **par voie moléculaire grâce à un séquençage à haut débit** ciblant deux gènes spécifiques codant pour la production de neurotoxines (faisant partie de la petite sous-unité de l'ARN ribosomal 16S et 18S). Nous estimerons également la toxicité potentielle des BAC en calculant la proportion de souches potentiellement toxiques contenues dans ceux-ci.

Le **troisième objectif sera consacré à l'effet de la toxicité des BAC sur les macro-invertébrés en se centrant sur le site-pilote**. Pour cela, nous transférerons du biofilm et des macro-invertébrés récoltés sur le terrain (de préférence brouteurs de biofilms, sur la base des listes faunistiques établies sur la basse-vallée de l'Ain) dans un mésocosme afin de reproduire en condition contrôlée au laboratoire une situation naturelle. Les biofilms transférés au laboratoire, à dominante de cyanobactéries neurotoxiques, seront caractérisés avec les mêmes méthodes d'analyse que pour le deuxième objectif. De plus, des dosages de toxines intracellulaires réalisés par chromatographie liquide-spectrométrie de masse permettront de corroborer l'évolution cinétique de la toxicité de chaque biofilm étudié au laboratoire pendant la totalité de la durée de la phase expérimentale (4 à 6 semaines). Nous identifierons le potentiel effet des toxines sur ces macro-invertébrés en mesurant les taux de survie de ces derniers et le taux de consommation des cyanobactéries.

Un potentiel verrou pour cette étude réside dans la création d'un biofilm de cyanobactéries toxiques. Il faudra contrôler les paramètres physiques, le milieu nutritif pour conserver en mésocosme un biofilm de cyanobactéries prélevé *in situ*, identifier les souches de cyanobactéries aptes à se maintenir, et à ce que les souches sélectionnées progressivement pendant l'expérimentation maintiennent leur potentiel toxique en microcosme. Il a été montré que les cyanobactéries se développent au cours de la phase intermédiaire ou avancée de maturation du biofilm (Barranguet et al. 2005, Brasell et al. 2015, et Roeselers et al. 2007). Il en est de même pour les algues vertes et d'autres micro-algues (Battin et al. 2003, Besemer et al. 2007, Díaz Villanueva et al. 2011, Majdi et al. 2012). L'analyse de l'avancement de la maturité du biofilm *in situ* doit donc permettre de maximiser les chances de parvenir à prélever un BAC potentiellement toxique. Malgré tout, les incertitudes sur les conditions de développement des BAC *in situ* et en mésocosmes nous font anticiper un projet sur 24 mois afin d'optimiser les chances de succès.

Ce projet vient en appui et conditionne une demande de bourse de thèse faite auprès du programme ANR H2O. Dans cette perspective, nous avons récemment contacté Isabelle Domaison de l'INRA Thonon (équipe de la ZABR) pour lui demander de participer au comité de thèse en question.

DUREE DU PROJET: 24 mois

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFSSA / AFSSET, 2006. Evaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives, 231p.
- Barranguet, C., Veuger, B., Van Beusekom, S.A.M., Marvan, P., Sinke, J.J., Admiraal, W., 2005. Divergent composition of algal-bacterial biofilms developing under various external 183 factors. *Eur. J. Phycol.* 40, 1-8.
- Battin, T.J., Kaplan, L.A., Denis Newbold, J.D., Hansen, C.M.E., 2003a. Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature* 426, 439-442.
- Besemer, K., Singer, G., Limberger, R., Chlup, A.-K., Hochedlinger, G., Hödl, I., Baranyi, C., Battin, T.J., 2007. Biophysical controls on community succession in stream biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4966-74.
- Biggs, B.J.F., Kilroy, C., 2000. Stream Periphyton Monitoring Manual, Network. NIWA, Christchurch.
- Boisseleau D., Peigner P., Polato P. 2018. Cas groupés d'intoxication de chiens par des cyanobactéries dans la Loire. *Bulletin épidémiologique : santé animale, alimentation, ANSES*, 1-2.
- Brasell, K. A., Heath, M.W., Ryan, K.G., Wood, S. A., 2015. Successional change in microbial communities of benthic Phormidium-dominated biofilms. *Microb. Ecol.* 69, 254-266.
- Breitburg D. et al. 2018. Declining oxygen in the global ocean and coastal waters. *Science*, 359,46, 1-11
- Cadel-Six, S., Peyraud-Thomas, C., Brient, L., Tandeau de Marsac, N., Rippka, R., Méjean, A., 2007. Different genotypes of anatoxin-producing cyanobacteria coexist in the Tarn River, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7605-14
- Codd GA, Lindsay J, Young FM, Morrison LF & Metcalf JS, 2005. Harmful cyanobacteria. *Harmful Cyanobacteria*, Vol.3 (Huisman J, Matthijs HCP & Visser PM, eds), pp. 1–23. Springer, Dordrecht, the Netherlands.
- Díaz Villanueva, V., Font, J., Schwartz, T., Romaní, A.M., 2011. Biofilm formation at warming temperature: acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. *Biofouling* 27, 59-71.
- Faassen, E.J., Harkema, L., Begeman, L., Lurling, M., 2012. First report of (homo)anatoxin-a and dog neurotoxicosis after ingestion of benthic cyanobacteria in The Netherlands. *Toxicon* 60, 378-84.
- Gugger, M., Lenoir, S., Berger, C., Ledreux, A., Druart, J.-C., Humbert, J.-F., Guette, C., Bernard, C., 2005. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* 45, 919-28.
- Hamill, K.D., 2001. Toxicity in benthic freshwater cyanobacteria (blue-green algae): First observations in New Zealand. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 35, 1057-1059.
- Horner R.H., Welch E.B., Seeley M.R., Jacoby J.M., 1990. Responses of periphyton to changes in current velocity, suspended sediment and phosphorus concentration. *Freshwater Biology*, 24, 215-232.
- Hudon, C., Sève, M. De, Cattaneo, A., 2014. Increasing occurrence of the benthic filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*: a symptom of freshwater ecosystem degradation. *Freshw. Sci.* 33, 606-618.
- Keithan E.D., Lowe R.L., 1985. Primary productivity and spatial structure of phytolith growth in streams in the Great Smoky Mountains National Park, Tennessee. *Hydrobiologia*, 123(1), 53-67.
- Kuiper-Goodman T., Falconer I., Fitzgerald J. 1999. Chapter 4. HUMAN HEALTH ASPECTS in Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management Edited by Ingrid Chorus and Jamie Bartram.
- Lau Y.L., Liu D., 1993. Effect of flow rate on biofilm accumulation in open channels. *Water Research*, 27(3), 333-360.
- Lilleheil, G., Andersen, R. A., Skulberg, O.M., Alexander, J., 1997. Effects of a homoanatoxina-containing extract from *Oscillatoria formosa* (Cyanophyceae/cyanobacteria) on neuromuscular transmission. *Toxicon* 35, 1275-1289.
- McCormick P.V., Stevenson J., 1991. Mechanisms of Benthic Algal Succession in Lotic Environments. *Ecology*, 72(5), 1835-1848.
- Majdi, N., Mialet, B., Boyer, S., Tackx, M., Leflaive, J., Boulêtreau, S., Ten-Hage, L., Julien, F., Fernandez, R., Buffan-Dubau, E., 2012. The relationship between epilithic biofilm stability and its associated meiofauna under two patterns of flood disturbance. *Freshw. Sci.* 31, 38-50.
- Quiblier, C., Wood, S., Echenique-Subiabre, I., Heath, M.W., Villeneuve, A., Humbert, J.-F., 2013. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria- Ecology, toxin production and risk management. *Water Res.* 47, 5464-79.
- Rockström J. et al. 2009. A safe operating space for humanity *Nature*, 461, 472-475.
- Roeselers, G., Van Loosdrecht, M.C.M., Muyzer, G., 2007. Heterotrophic pioneers facilitate phototrophic biofilm development. *Microb. Ecol.* 54, 578-585.
- Seitzinger, S. P., et al. (2010), Global river nutrient export: A scenario analysis of past and future trends, *Global Biogeochem. Cycles*, 24, GB0A08, doi:10.1029/2009GB003587.
- Stock M.S., Ward A.K., 1989. Establishment of a Bedrock Epilithic Community in a Small Stream: Microbial (Algal and Bacterial) Metabolism and Physical Structure. *Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques*, 46(11), 1874-1883.
- Suren A.M., Biggs B.J.F., Kilroy C., Bergery L., 2003. Benthic community dynamics during summer low-flows in two rivers of contrasting enrichment 1. Periphyton. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 37, 53-70.
- Wood, S.A., Selwood, A.I., Rueckert, A., Holland, P.T., Milne, J.R., Smith, K.F., Smits, B., Watts, L.F., Cary, C.S. 2007. First report of homoanatoxin-a and associated dog neurotoxicosis in New Zealand. *Toxicon* 50, 292-301.

Wood, S.A., Hamilton, D.P., Paul, W.J., Safi, K.A., Williamson, W.M. 2009. New Zealand Guidelines for Cyanobacteria in Recreational Fresh Waters– Interim Guidelines. Prepared for the Ministry for the Environment and the Ministry of Health