



Évaluation des risques

liés à la présence de

cyanobactéries et leurs toxines

dans **les eaux** destinées

à l'alimentation, à la baignade
et autres activités récréatives



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS





AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS



agence française de sécurité sanitaire
de l'environnement et du travail

**Rapport sur l'évaluation des risques liés à la présence
de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées
à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives**

- Juillet 2006 -

■ **Coordination scientifique et rédactionnelle**

Yves Levi (Université Paris Sud 11)

Mathilde Harvey (Afsa)

Paulina Cervantès (Afsset)

■ **Secrétariat**

Marie-Claude Deschamps (Afsa)

Anne-Laure Riquier (Afsset)

Composition du groupe de travail « Cyanobactéries et cyanotoxines » de l'Afssa

- **Président**
LEVI Yves - Université Paris Sud 11
- **Coordination scientifique - Afssa**
HARVEY Mathilde
- **Secrétariat administratif – Afssa**
DESCHAMPS Marie-Claude
- **Membres du comité d'experts spécialisé « Eaux » de l'Afssa**
BALEUX Bernard - Retraité du CNRS
BEAUDEAU Pascal - Institut National de Veille Sanitaire
CABILLIC Pierre-Jean - DDASS Morbihan
DELATTRE Jean-Marie - Institut Pasteur de Lille
DUBROU Sylvie - Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris
DUCHEMIN Jean - Agence de l'eau Seine-Normandie
HARTEMANN Philippe - Faculté de médecine de Nancy
JOYEUX Michel - Eau de Paris
LEROY Pierre - Centre de Recherche et de Contrôle des Eaux de la Ville de Paris
MONTIEL Antoine - Eau de Paris
SEUX René - Ecole Nationale de la Santé Publique
- **Membres du comité d'experts spécialisé « Résidus et Contaminants physiques et chimiques » de l'Afssa**
BAERT Alain - Centre antipoison de Rennes
KECK Gérard - Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon
LE BIZEC Bruno - Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes
- **Experts auprès de l'Afssa**
BERNARD Cécile - Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris
BOUAÏCHA Noureddine - Université Paris Sud 11
BRIENT Luc - Université Rennes 1
CODD Geoffrey - Université de Dundee (Royaume Uni)
CROUZET Philippe - Agence Européenne pour l'Environnement
CUN Christine - DDASS Essonne
FESSARD Valérie - Afssa
HUMBERT Jean-François - Institut National de la Recherche Agronomique de Thonon (UMR 42)
ITEMAN Isabelle - Institut Pasteur de Paris
KRYSS Sophie - Afssa
LEITAO Maria - Bi-Eau
MANSOTTE François - DSDS Guyane
MOULY Damien - Institut National de Veille Sanitaire
PEIGNER Patrick - DDASS Maine et Loire
PEIRERA Paulo - Institut national de la santé (Portugal)
QUIBLIER Catherine - Université Paris 7 – Muséum National d'Histoire Naturelle
TANDEAU de MARSAC Nicole - Institut Pasteur de Paris
WELTE Bénédicte - Eau de Paris
- **Participation scientifique - Afssa**
CAAMAÑO Delphine
DANAN Corinne
GALLOTTI Sophie
LOZACH Jérôme
GRIMAULT Laurent
THEBAULT Anne

Composition du groupe de travail de l'Afsset « Cyanobactéries et cyanotoxines dans les eaux de loisirs »

- **Experts auprès de l'Afsset**
ALLIX Sylvie - DDASS Manche
BOUAÏCHA Noureddine - Université Paris Sud 11
BAAN Robert - Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC)

DUCHEMIN Jean - Agence de l'eau Seine-Normandie
HARVEY Mathilde - Afssa
HUMBERT Jean-François - INRA de Thonon
LEGEAS Michèle - Ecole Nationale de la Santé Publique
LEVI Yves - Université Paris Sud 11
MONFORT Patrick - CNRS Montpellier (UMR 5119)
PRAT Maryannick - DRASS Pays de la Loire
RIOU Jeanine - DDASS Gard

• **Participation scientifique – Afsset**

CATASTINI Carole
DUBOUDIN Cédric
LOZACH Jérôme
MAHE Bruno

Personnalités auditionnées par le groupe de travail Afssa

ARAUJO Filomena - Ministère de la santé (Portugal)
MORIN Jean-Pierre - Service des barrages départementaux et des ressources en eau du Conseil général des Côtes d'Armor
NICOLAS Rémy - Service des barrages départementaux et des ressources en eau du Conseil général des Côtes d'Armor

• **Intervenants du Syndicat des producteurs et distributeurs d'eau (SPDE)**

Monsieur HELMER - SAUR
Monsieur JORET - Compagnie Générale des Eaux
Madame LENES - Compagnie Générale des Eaux
Madame RACAUD - SAUR
Monsieur TAUDOU - Lyonnaise des Eaux
Monsieur VILLESSOT - Lyonnaise des Eaux

Bases de données exploitées

• **SISE-Eaux**

Les bases de données SISE-Eaux (*Ministère de la santé, DDASS, DRASS – SISE-Eaux*) et SISE-Baignades (*Ministère de la santé, DDASS, DRASS – SISE-Baignades*) colligeant les résultats du contrôle sanitaire des eaux destinées à la consommation humaine et des eaux de baignade sur le territoire français ont été exploitées dans le cadre du présent rapport. Par la suite, les termes SISE-Eaux ou SISE-Baignades ont été utilisés.

• **Base de données Afssa-Afsset**

Les deux agences ont collaboré pour la création et l'exploitation d'une base de données relatives aux cyanobactéries et cyanotoxines. Elle a pu être créée grâce aux contributeurs suivants :
Direction générale de la Santé, DRASS et DDASS (notamment des données extraites de la base SISE-Eaux)/
Agences de l'eau Adour Garonne, Artois Picardie, Rhin-Meuse, Seine-Normandie, Rhône Méditerranée Corse/Institut interdépartemental des barrages et réservoirs du bassin de la Seine/DIREN Bretagne/EDF/
Syndicat des producteurs et distributeurs d'eau (SPDE) / Université de Rennes 1.
Elle est référencée « base Afssa / Afsset » dans la suite du présent rapport.

Toute référence par des tiers doit comporter la mention suivante :

Source Afssa Afsset / Direction générale de la Santé-DRASS DDASS / Agences de l'eau Adour Garonne, Artois Picardie, Rhin-Meuse, Seine-Normandie, Rhône Méditerranée Corse / l'Institution interdépartementale des barrages et réservoirs du bassin de la Seine / DIREN Bretagne / EDF / Syndicat des producteurs et distributeurs d'eau (SPDE) / Université de Rennes 1.

• **Base CIBLEX**

La base CIBLEX [(Beaugelin-Seiller *et al.* 2004) ; <http://www.ademe.fr/htdocs/publications/cataloguedeseditions/cato13.htm> ou www.irsn.org/scripts/net-science/publigen/content/templates/show.asp?L=FR&P=2144] a été développée par l'ADEME et l'IRSN sur la base d'une étude de suivi médical de 4769 enfants de moins de 4 ans et 13700 individus de 4 à 20 ans. Cette base est considérée comme représentative de l'évolution du poids corporel et de la taille des individus en fonction de l'âge pour la totalité du territoire français. Ce sont ces relations qui ont été utilisés par les experts de l'Afsset pour estimer la concentration maximale tolérable de microcystines dans les eaux de baignade.

Le programme EFFLOCYA initié en 1998 par le ministère chargé de la santé et le ministère chargé de l'environnement a permis de mettre en évidence qu'en France, la prolifération des cyanobactéries, capables de produire et de libérer des toxines, dans les eaux de baignade ou dans les eaux brutes utilisées pour la production d'eau potable constituait un risque sanitaire émergent en raison de la présence potentielle de cyanotoxines.

Le 22 janvier 2001, le ministère chargé de la santé faisant suite aux données issues du programme EFFLOCYA, a saisi l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) afin d'effectuer une évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries dans les eaux destinées à la consommation humaine (annexe 1).

La même année, le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF) était saisi afin d'élaborer des recommandations de gestion du risque lié à la présence de cyanobactéries dans les eaux de baignade. Le 6 mai 2003, le CSHPF a publié des recommandations de gestion des risques sanitaires liés aux proliférations de ces microorganismes dans les eaux (annexe 2).

Le 30 mars 2004, le ministère chargé de l'environnement et le ministère chargé de la santé ont saisi l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset) afin de procéder à l'évaluation des risques sanitaires encourus par les baigneurs et les autres usagers des plans et cours d'eau, notamment après analyse des données recueillies par les services déconcentrés du ministère de la santé, et de proposer des valeurs limites de qualité relatives à la concentration de cellules et/ou de toxines dans les eaux de baignade (annexe 3).

Les agences ont créé chacune un groupe de travail composé d'experts rassemblant des compétences dans les domaines scientifiques concernés (toxicologues, écotoxicologues, ingénieurs sanitaires, limnologues, analystes, vétérinaires, épidémiologistes, ...). L'installation du groupe de travail de l'Afssa a eu lieu le 3 octobre 2003 et celui de l'Afsset le 6 octobre 2004. Les décisions successives décrivant la composition de ces groupes figurent à l'annexe 4.

Les deux agences ont identifié plusieurs sujets d'étude communs aux deux saisines (en particulier l'identification et la caractérisation du danger, la toxicité des cyanotoxines pour l'homme et les valeurs toxicologiques de référence, les méthodes de dosage des cyanotoxines et celles permettant le suivi direct ou indirect des dangers, la collecte et le traitement des données d'analyses des eaux continentales, tous usages confondus, (baignade, pratique de sports nautiques et production d'eau de boisson), et les questions qui, du fait de la définition du champ de compétence respectif de l'Afssa et de l'Afsset, ont fait l'objet d'une évaluation spécifique au sein de chaque agence. Il a été convenu, sur proposition et en accord avec les experts, de répondre aux deux saisines sous la forme d'un rapport commun.

Ainsi, l'Afssa a assuré la coordination scientifique des parties ci-dessous :

- chapitre I « Identification des dangers liés aux cyanobactéries » ;
- chapitre II « Détection et quantification des cyanobactéries et de leurs toxines » ;
- chapitre V « Maîtrise de la contamination de l'eau destinée à la consommation humaine par les cyanotoxines » ;
- chapitre VI « État des lieux de recommandations et des réglementations - 2. » ;
- chapitre VII « Exposition des populations et appréciation des risques - 1. et 2. » ;
- chapitre VIII « Synthèse et recommandations - 1, 2.1 et 2.2 ».

L'Afsset a assuré la coordination scientifique des parties ci-dessous :

- chapitre III « Caractérisation des dangers » ;
- chapitre IV « État des lieux de la situation française » ;
- chapitre VI « État des lieux de recommandations et des réglementations - 1. » ;
- chapitre VII « Exposition des populations et appréciation des risques - 3. » ;
- chapitre VIII « Synthèse et recommandations - 2.3 ».

L'Afssa et l'Afsset ont conjointement construit une base de données à partir d'un recueil actif des données relatives à la présence de cyanobactéries et de cyanotoxines sur les cours et plans d'eau en France et réalisé son exploitation dans le cadre du présent travail.

La démarche retenue pour cette évaluation est la suivante :

- examen critique des études et rapports d'évaluation disponibles et identification des points nécessitant une analyse approfondie ;
- collecte et traitement statistique des données françaises disponibles concernant la contamination des eaux destinées aux différents usages ;
- mise en place par l'Afssa d'auditions de professionnels du traitement de l'eau et de scientifiques pouvant apporter des éléments d'éclairage.

Les groupes de travail de l'Afssa et de l'Afsset se sont réunis respectivement 13 et 4 fois en séances plénières consacrées, notamment, à la discussion des points du domaine spécifique d'expertise de chacun des groupes. Deux séances plénières communes aux deux groupes de travail, le 4 juillet et le 4 novembre 2005, ont été dédiées à l'examen du rapport final.

Les parties communes du rapport et spécifiques aux eaux d'alimentation ont fait l'objet d'une validation :

- par le CES « Résidus et contaminants chimiques et physico-chimiques » de l'Afssa dans sa séance du 21 septembre 2005 pour le chapitre III « Caractérisation des dangers »,
- par le CES « Eaux » de l'Afssa dans sa séance du 15 mai 2006.

Dans l'attente de l'installation du CES-Eaux au sein de l'Afsset et du rattachement du groupe de travail « cyanobactéries-Eaux de baignade », les parties du rapport relatives aux baignades et autres loisirs ont été validées par le groupe ad-hoc de l'agence.

1. Contexte réglementaire en France

1.1. Les cyanobactéries et cyanotoxines

Les cyanotoxines sont des toxines pouvant être libérées dans les eaux par les cyanobactéries, connues aussi sous le nom d'algues bleues-vertes. Ces microorganismes trouvent un terrain de prolifération particulièrement favorable dans les eaux continentales moyennement ou fortement eutrophisées. La prolifération massive et rapide de ces bactéries est, dans certains cas, facilement observable par un changement de couleur de l'eau et la formation d'écume ou mousse. Cependant, l'absence d'écume ne constitue pas un critère permettant d'écarter la présence éventuelle des cyanobactéries et/ou de cyanotoxines. Leur présence est signalée sur tous les continents et la préoccupation internationale est croissante vis-à-vis des risques sanitaires associés. L'augmentation du nombre de barrages réservoirs dans les zones en manque d'eau et celle des apports nutritifs liés à la pollution des eaux de surface contribuent à amplifier cette problématique.

1.2. Contexte réglementaire des eaux de baignade ou de loisirs nautiques

La qualité de l'eau de zones de baignade et sports nautiques est régie par la directive européenne 76/160/CEE adoptée en 1976. Celle-ci a été transposée en droit français par le Code de la santé publique (Loi n° 2001-398 du 9 mai 2001, Livre III Titre III, chapitre II : Piscines et eaux de baignade (art. L1332-1 à L1332-4)). On entend par « eaux de baignade » les cours et plans d'eau aménagés pour la baignade et/ou la pratique de loisirs aquatiques fréquentés de manière répétitive par au moins 10 baigneurs au même instant. Les normes auxquelles les eaux de baignade doivent obéir ont été fixées par décret pris en Conseil d'état. Ces décrets ne fixent pas de cadre réglementaire pour la surveillance sanitaire des proliférations de cyanobactéries ou de la contamination des eaux par les cyanotoxines.

L'article 8 de la nouvelle directive eaux de baignade, directive 2006-7 CE du Parlement et du Conseil européen du 15 février 2006, insiste sur le risque potentiel lié à la présence de cyanobactéries et demande à ce que des mesures de gestion immédiates soient prises afin de réduire l'exposition de la population (Journal Officiel de l'union européenne L 64 du 4 mars 2006).

Depuis 2003, la Direction générale de la santé publie chaque année des recommandations de surveillance et de gestion de phénomènes de prolifération de cyanobactéries dans les eaux de baignade (circulaire DGS/SD7A 2003-270, 2004/364, 2005/304) sur la base d'un avis du Conseil supérieur d'hygiène publique de France (avis du 6 mai 2003).

Ces circulaires préconisent le suivi régulier des zones de baignades aménagées avec plusieurs niveaux d'intervention et d'information au public. L'interdiction de la baignade avec restriction de certaines activités nautiques est préconisée lorsque la concentration en microcystine LR dépasse 25 µg.L⁻¹. L'interdiction de la baignade et de la pratique des activités nautiques est préconisée en cas de présence d'écume ou mousse.

1.3. Contexte réglementaire des eaux destinées à la consommation humaine

Le paramètre microcystine-LR a été introduit dans le Code de santé publique (CSP) au titre de l'article R.1321-2 lors de la codification du décret 2001/1220 pris pour la transposition de la Directive 98/83/CE du Conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. Ainsi la limite de qualité aux points de conformité, basée sur les recommandations de l'OMS, inscrite à l'annexe 13.1 du CSP a été fixée à $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Il est précisé en observation pour ce paramètre « À rechercher en cas de prolifération algale dans les eaux brutes ». Ceci entraîne des difficultés d'application liées à la définition d'une « prolifération algale ».

2. Réponse aux saisines

Un état des lieux actualisé des connaissances et les réponses qui peuvent actuellement être apportées aux questions posées par les saisines font l'objet de ce rapport. Il est constitué de 8 chapitres, dont 4 sont dédiés à la présentation de l'état de connaissances, un est consacré à la présentation et à l'analyse de données recueillies en France pendant la période 2002 à 2004, un résume la réglementation française et internationale dans le domaine, un est dédié à l'estimation de l'exposition et du risque, enfin un chapitre récapitule les recommandations communes et spécifiques aux eaux de baignade et autres loisirs nautiques et aux eaux d'alimentation.

Remerciements

L'Afssa et l'Afsset remercient le Pr Yves Lévi d'avoir exercé la présidence du groupe de travail de l'Afssa, et l'ensemble des experts ayant contribué à ce travail et à la rédaction du présent rapport.

I. Identification des dangers liés aux cyanobactéries	21
1. Les cyanobactéries	21
1.1. Position taxonomique	21
1.2. Diversité morphologique et écologique	22
1.3. Multiplication	22
1.4. Les cyanobactéries toxiques	22
2. Les proliférations de cyanobactéries	25
2.1. Définition des proliférations	25
2.2. Hydrosystèmes concernés par des proliférations de cyanobactéries	25
2.3. Effets indésirables des proliférations de cyanobactéries	26
2.4. Facteurs favorisant les proliférations de cyanobactéries	26
2.5. Caractéristiques des cyanobactéries leur conférant une forte valeur sélective	27
3. Les toxines de cyanobactéries ou cyanotoxines	28
3.1. Structures, caractéristiques physico-chimiques et persistance dans le milieu des cyanotoxines	28
3.2. Fonction métabolique et déterminisme de la production des cyanotoxines	32
3.3. Distribution des cyanotoxines	32
II. Détection et quantification des cyanobactéries et de leurs toxines	37
1. Objectifs et mise en œuvre des méthodes de prélèvement	37
1.1. Objectifs des analyses et définition des prélèvements	37
1.2. Nature et modalités du prélèvement	37
1.3. Lieu et profondeur de prélèvement	39
1.4. Conservation et transport	39
2. Détection des proliférations, analyse des cyanobactéries	40
2.1. Détection des proliférations d'algues et de cyanobactéries	40
2.2. Identification et quantification des cyanobactéries dans les eaux	43
3. Détection et analyse des cyanotoxines	47
3.1. Préparation de l'échantillon	47
3.2. Extraction et purification des toxines	48
3.3. Identification et dosage des toxines	50
3.4. Détection de la toxicité	53
III. Caractérisation des dangers	59
1. Toxicologie	59
1.1. Les hépatotoxines	59
1.2. Les neurotoxines	66
1.3. Les molécules à effets irritants	70
2. Epidémiologie des intoxications par les cyanotoxines	73
2.1. Intoxications animales	73
2.2. Intoxications humaines	76
IV. État des lieux de la situation française	83
1. Contexte et mise en place d'une base de données cyanobactéries	83
1.1. Prélèvement	83
1.2. Dénombrement et identification des cyanobactéries	84
1.3. Dosage des microcystines	86
2. La base en quelques chiffres	86
3. Méthode d'analyse statistique des données	88
4. Résultats en eaux brutes	90
4.1. Dénombrement cellulaire	90
4.2. Dosage des microcystines	101
5. Résultats en eaux traitées	105
5.1. Dénombrement cellulaire	105
5.2. Dosage des microcystines	105
6. Conclusions	106

V. Modalités de maîtrise des dangers.....	111
1. Prévention et maîtrise de la croissance des cyanobactéries.....	111
1.1. Actions sur le statut trophique.....	111
1.2. Actions sur le régime hydrologique.....	115
1.3. Traitements algicides des plans d'eau.....	116
2. Maîtrise de la contamination de l'eau destinée à la consommation humaine par les cyanotoxines.....	120
2.1. Actions au niveau des bassins de stockage d'eau brute (de 1 à 3 jours de temps de séjour).....	120
2.2. Actions au sein des filières de traitement.....	121
VI. État des lieux des recommandations et des réglementations.....	129
1. Eau de baignade.....	129
1.1. Pays et instances à l'origine de recommandations.....	129
1.2. Synthèse descriptive des recommandations disponibles.....	129
1.3. Synthèse.....	142
2. Eau d'alimentation et autres aliments.....	145
2.1. Recommandations de l'OMS.....	145
2.2. Déclinaisons nationales des recommandations de l'OMS pour l'eau d'alimentation.....	148
2.3. Autres recommandations.....	153
2.4. Synthèse.....	154
VII. Exposition des populations et appréciation des risques.....	157
1. Les cyanotoxines dans les eaux continentales françaises.....	157
2. Eau et alimentation.....	158
2.1. Sources d'exposition aux cyanotoxines par voie alimentaire.....	158
2.2. Estimation de l'exposition alimentaire aux microcystines et éléments d'évaluation du risque.....	161
2.3. Appréciation des situations de dépassement de la limite de qualité réglementaire.....	163
2.4. Relation entre concentrations en microcystines et présence des cyanobactéries dans les eaux brutes destinées à la production d'eau d'alimentation.....	165
2.5. Synthèse.....	167
3. Eaux de baignade et autres activités aquatiques de type récréatives.....	168
3.1. Modalités de surveillance des eaux de baignade et de loisirs.....	169
3.2. Sources et qualité des données utilisées pour l'estimation des valeurs limites de concentration de cyanotoxines et cyanobactéries dans les eaux de baignade et autres loisirs.....	169
3.3. Éléments de base considérés pour l'estimation des valeurs limites de concentration de cyanotoxines et cyanobactéries dans les eaux de baignade et autres activités récréatives.....	170
3.4. Estimation d'une concentration maximale tolérable de cyanotoxines dans les eaux à usage de baignade et autres activités récréatives.....	175
3.5. Principaux enseignements de l'évaluation de risques.....	177
3.6. Limites de qualité relatives à la concentration en cellules de cyanobactéries définies par une approche probabiliste.....	218
3.7. Conclusions et recommandations.....	179
VIII. Synthèse et recommandations.....	183
1. Synthèse.....	183
1.1. Que sait-on de la présence des cyanobactéries toxigènes et des cyanotoxines en France ?.....	183
1.2. Que sait-on des effets toxiques de ces composés ?.....	184
1.3. De quelle façon peut-on être exposé à ces toxines ? Des intoxications par les cyanotoxines ont-elles été recensées en France ?.....	184
1.4. Que peut-on dire concernant les risques liés aux cyanotoxines en France ?.....	185
1.5. Quelles sont les possibilités de maîtrise de l'exposition aux cyanotoxines ?.....	185
1.6. Quels sont les moyens disponibles pour la surveillance des risques liés aux cyanotoxines ?.....	186
2. Recommandations.....	187
2.1. Permettre l'évaluation des risques liés aux cyanotoxines.....	188
2.2. Renforcer la prévention et la maîtrise des risques.....	190
2.3. Recommandations spécifiques aux eaux de baignade et autres activités aquatiques récréatives.....	192
IX. Annexes.....	195
X. Références bibliographiques.....	205

Table des figures

Figure I-1	: Structure des microcystines (A) et des nodularines (B). X et Z sont des acides aminés variables, R = H ou CH ₃	29
Figure I-2	: Structure de la cylindrospermopsine.....	29
Figure I-3	: Structure des molécules d'anatoxine-a, homoanatoxine-a, anatoxine-a(s), de gauche à droite.....	30
Figure I-4	: Structure générale des saxitoxines	30
Figure I-5	: Structure générale de la β-N-méthylamino-L-alanine ou BMAA (A), agoniste du récepteur du glutamate	31
Figure I-6	: Structure générale de toxines à effets irritants détectées dans les eaux marines : A lyngbyatoxines-a, B aplysiatoxines, C débromoaplysiatoxines	31
Figure II 1	: Schéma de principe illustrant une variation jour-nuit de la saturation en oxygène et du pH en présence d'une prolifération phytoplanctonique (J. Duchemin, AESN).....	41
Figure II 2	: Stratégie analytique suivie pour l'analyse des cyanotoxines dans l'eau et les denrées alimentaires, de la collecte de l'échantillon au rapport d'essai	47
Figure II 3	: Spécificité et sensibilité comparées des principales techniques utilisées pour la mesure des cyanotoxines. L'échelle des sensibilités sur l'axe des abscisses place à son extrémité haute la spectrométrie de masse en particulier en tandem (SM/SM) ou haute résolution (HRSM). L'échelle des spécificités sur l'axe des ordonnées sépare nettement la spectrométrie de masse ou la RMN, et les techniques non spécifiques telles que le bio-essai souris ou encore la CCM	53
Figure IV 1	: Proportions des résultats de dénombrement dans chaque classe d'abondance en fonction du mois sur les trois années 2002-2004 [résultats bruts sans modélisation].....	91
Figure IV 2	: Relation entre nombre de cellules de cyanobactéries par mL et concentration en chlorophylle <i>a</i> en µg.L ⁻¹ , estimée sur 1 585 résultats de prélèvements [résultats bruts sans modélisation]. Les données sur les eaux brutes des trois années 2002 à 2004 et des différents usages ont été agrégées	98
Figure IV 3	: Risque (probabilité) de dépassement de la valeur de 20 000 CC.mL ⁻¹ en fonction de la teneur en chlorophylle <i>a</i> et du pourcentage représenté par les CC par rapport au total algal	99
Figure IV 4	: Risque (probabilité) de dépassement de la valeur de 100 000 CC.mL ⁻¹ en fonction de la teneur en chlorophylle <i>a</i> et du pourcentage représenté par les CC par rapport au total algal.	100
Figure IV 5	: Relation entre le nombre de cellules de cyanobactéries et la concentration en microcystines sur 946 résultats de prélèvements [résultats bruts].....	103
Figure IV 6	: Relation entre le nombre de cellules de cyanobactéries et la probabilité de dépassement d'un seuil sur la concentration en microcystines, élaborée à partir de 946 résultats de prélèvements par régression logistique (IC95 % = intervalle de confiance à 95 %).	103
Figure VI 1	: Arbre de décision pour la classification des sites à risques (d'après NHMRC 2004).....	132
Figure VI 2	: Arbre de décision en Finlande (d'après Rapala <i>et al.</i> 2005)	137
Figure VI 3	: Arbre décisionnel aux Pays-Bas (Ibelings 2005).....	138
Figure VI 4	: Arbre décisionnel en Allemagne (d'après Chorus 2005)	139
Figure VI 5	: Arbre décisionnel en France (d'après l'avis du CSHPF, 6 mai 2003).....	140
Figure VI 6	: Croissance potentielle d'une population de cyanobactéries à partir d'une concentration initiale de 100 ou 1 000 cellules à des taux de croissance (μ) de 0,1 ou 0,3.j ⁻¹ (OMS 1999)	147
Figure VIII 1	: Proposition de stratégie de surveillance des eaux destinées à la consommation humaine vis-à-vis des risques liés aux cyanotoxines. Les fréquences proposées sont maintenues tant que deux résultats consécutifs situés au niveau inférieur n'ont pas été obtenus	191

Table des illustrations couleurs

Figure A : Exemple de cyanobactérie unicellulaire coloniale. Genre *Woronichinia*. (Photo Luc Brient, Université Rennes I).

Figure B : Exemple de cyanobactérie organisée en trichomes. Genre *Aphanizomenon*. (Photo Luc Brient, Université Rennes I).

Figure C : Exemple de cyanobactérie organisée en filament : gaine visible à l'extrémité. Genre *Phormidium*. (Photo Céline Berger, MNHN).

Figure D : Trichome de cyanobactérie (genre *Anabaena*) présentant un hétérocyste (H) et un akinète (A) bien distincts. (Photo Luc Brient, Université Rennes I).

Figure E : Filaments de la cyanobactérie *Cylindrospermopsis raciborskii* présentant des akinètes A et des hétérocystes H (Photo Amandine Caruana INRA).

Figure F : Prolifération de la cyanobactérie *Planktothrix rubescens* dans le lac du Bourget. La couleur « lie de vin » de l'eau est due à la phycoérythrine présente en quantité importante chez cette espèce. (Photo Michel Roux, CSP).

Figure G : Prolifération sous la forme d'écume de la cyanobactérie *Planktothrix agardhii* dans un lac de la région parisienne. (Photo Cécile Bernard, MNHN).

Figure H : Accumulation de cyanobactéries sur la berge d'un plan d'eau. (Photo Luc Brient, Université Rennes).

Figure I : Dispositifs de prélèvement utilisés depuis la berge (filet à plancton et tube échantillonneur) ou depuis un bateau (bouteille de prélèvement de Van Dorn). (Photos Maria Leitao, Bi-Eau).

Figure J : Immersion du disque de Secchi. (Photo Luc Brient, Université Rennes 1).

Figure K : Nombre de prélèvements recensés dans la base par département (cumul des années 2002-2004).

Figure L : Évolution saisonnière des genres de cyanobactéries les plus fréquemment rencontrés dans la base de données (moyenne géométrique du nombre de CC par mL en fonction du mois de l'année). Les données des trois années 2002 à 2004 et des différents usages ont été agrégées [résultats bruts non modélisés].

Table des tableaux

Tableau I-I	: Correspondance entre la classification botanique et la classification bactériologique des cyanobactéries	21
Tableau I-II	: Liste non exhaustive des espèces de cyanobactéries potentiellement toxiques et des toxines ayant déjà été associées à ces espèces en France ou hors de France (N.I.= toxine présente mais non identifiée). Les espèces ayant déjà été observées en France apparaissent en caractères gras	23-24
Tableau I-III	: Synthèse des toxines identifiées en France et distribution dans les autres pays.....	35
Tableau II-I	: Modalités et dispositifs de prélèvements (d'après Leitão & Couté 2005).....	38
Tableau II-II	: Caractéristiques des fixateurs	39
Tableau II-III	: Aptitude des méthodes disponibles à fournir différentes informations. +/- signifie : imparfaitement adapté, +: parfaitement adapté, -: inadapté.....	46
Tableau II-IV	: Exemples de solvants utilisés pour l'extraction des différentes cyanotoxines	48
Tableau II-V	: Limites de détection par différentes techniques (OMS 2004)	51
Tableau II-VI	: Comparaison des méthodes de détection des microcystines et des nodularines.....	52
Tableau II-VII	: Aptitudes des différentes méthodes utilisables en « routine »	57
Tableau II-VIII	: Méthodes d'analyses normalisées	58
Tableau III-I	: Valeurs toxicologiques pour les microcystines pour différentes voies d'administration (orale, IP : intrapéritonéale, IN : intranasale, IT : intratrachéale). MC : Microcystine.....	63
Tableau III-II	: Toxicité (DL_{50} en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) chez la souris pour différentes voies d'administration des toxines de type anatoxine (Mahmood & Carmichael 1986, Matsunaga <i>et al.</i> 1989, Fitzgeorge <i>et al.</i> 1994).....	67
Tableau III-III	: Toxicité spécifique des analogues de saxitoxine, exprimée en unité souris (M.U. : Mouse Unit) par μmole de toxine (Oshima 1995, Batoréu <i>et al.</i> 2005). (* Après ré-examen, ** Estimé par la mesure de GTX1, GTX4 formés par hydrolyse acide)	68
Tableau III-IV	: Toxicité aiguë de la STX chez la souris, par différentes voies d'administration (Wiberg & Stephenson 1960)	69
Tableau III-V	: Toxicités orales (DL_{50} en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) de la STX chez diverses espèces (McFarren <i>et al.</i> 1960, Mons <i>et al.</i> 1998).....	69
Tableau III-VI	: Tableau récapitulatif des valeurs toxicologiques répertoriées. Les valeurs toxicologiques retenues comme valeurs repères sont en gras.....	71
Tableau III-VII	: Intoxications animales en Europe (hors France) documentées dans la littérature scientifique.....	75
Tableau III-VIII	: Cas rapportés ou suspectés d'intoxications par cyanotoxines dans l'eau de distribution	76
Tableau IV-I	: Genres et espèces retrouvés dans la base de données constituée. 24 taxons sont suivis de <i>sp</i> , témoignant du fait qu'une espèce du genre considéré a été trouvée, mais pas identifiée. Les genres et espèces potentiellement toxiques figurent en gras	85
Tableau IV-II	: Distribution des probabilités de présence des cellules de cyanobactéries prédits pour chaque site de prélèvement AEP	92
Tableau IV-III	: Distribution des probabilités de présence des cellules de cyanobactéries prédits pour chaque site de prélèvement BLAN.....	92

> Sommaire

Tableau IV-IV : Distribution des probabilités de présence des cellules de cyanobactéries prédites pour chaque site de prélèvement BLB.....	92
Tableau IV-V : Distribution des abondances moyennes de cellules de cyanobactéries prédites (cellules.mL ⁻¹) pour chaque site de prélèvement lorsqu'elles sont présentes	93
Tableau IV-VI : Distribution des valeurs de risque de dépassement de la valeur de 100 000 CC.mL ⁻¹ prédites pour chaque site de prélèvement AEP.....	94
Tableau IV-VII : Distribution des valeurs de risque de dépassement de la valeur de 100 000 CC.mL ⁻¹ prédites pour chaque site de prélèvement BLAN	94
Tableau IV-VIII : Distribution des valeurs de risque de dépassement de la valeur de 100 000 CC.mL ⁻¹ prédites pour chaque site de prélèvement BLB.....	94
Tableau IV-IX : Relation entre abondance et dominance des cellules de cyanobactéries.....	96
Tableau IV-X : Caractéristiques statistiques de l'abondance des genres de cyanobactéries prépondérants.....	97
Tableau IV-XI : Relation entre concentration en chlorophylle <i>a</i> et probabilité de dépassement d'un seuil (20 000 et 100 000) sur le nombre de cellules de cyanobactéries par mL, estimée à partir de 1 444 résultats de prélèvements. Les données sur les eaux brutes des trois années 2002 à 2004 et des différents usages ont été agrégées.....	98
Tableau IV-XII : Distribution des valeurs de concentration en microcystines dans les eaux traitées.....	106
Tableau V-I : Modalités d'actions sur les proliférations de cyanobactéries.....	119
Tableau V-II : Efficacité des différentes étapes de traitement des eaux sur les cyanobactéries et leurs toxines.....	127
Tableau VI-I : Détermination des catégories de susceptibilité des plans d'eau à usage récréatif (d'après NHRMC 2004).....	132
Tableau VI-II : Détermination de la classe de qualité des plans d'eau à usage récréatif (d'après NHMRC 2004).....	133
Tableau VI-III : Valeurs guides et principales recommandations retenues pour différents pays (MC-LR : Microcystine LR ; MCs somme des microcystines)	144
Tableau VI-IV : Description des niveaux de biomasse (Chorus & Bartram 1999).....	146
Tableau VI-V : Limites de qualité pour les eaux d'alimentation au Brésil.....	148
Tableau VI-VI : Méthodes de détection des cyanotoxines préconisées au Portugal.....	152
Tableau VI-VII : Hypothèses utilisées pour la construction des seuils relatifs aux microcystines.....	154
Tableau VI-VIII : Seuils réglementaires ou valeurs maximales admissibles provisoires recommandés pour l'eau d'alimentation proposées pour certaines cyanotoxines.....	154
Tableau VII-I : Genres potentiellement toxiques de cyanobactéries ayant déjà été observés en France et toxines associées. En gras, les toxines déjà identifiées en France (d'après les chapitres I et IV).....	157
Tableau VII-II : Consommation d'eau totale (froide et chauffée) par classes d'âges en mL.kg ⁻¹ .j ⁻¹	162
Tableau VII-III : Distribution des quotients de danger simulés pour différentes classes d'âge, concernant l'exposition aux microcystines par l'eau d'alimentation de distribution publique.....	163
Tableau VII-IV : Scénarios d'exposition aux microcystines par l'eau d'alimentation et quotients de danger associés.....	164
Tableau VII-V : Distribution du quotient de danger (QD) pour une population ingérant une eau présentant différentes teneurs en microcystine-LR.....	165
Tableau VII-VI : Probabilités de dépassement des concentrations de 1 et 2 µg.L ⁻¹ en eau brute en fonction du nombre de cellules de cyanobactéries dénombrées.....	166

Tableau VII-VII : Valeurs paramétriques de volume d'eau et masse corporelle retenus.....	171
Tableau VII-VIII : Valeurs paramétriques prises en compte par diverses institutions pour l'estimation des risques liés à une exposition à la MC-LR par l'ingestion des eaux de baignade et valeurs retenues pour la présente évaluation de risques	174
Tableau VII-IX : Scénario d'exposition aiguë : Concentrations maximales tolérables (CMTs) de MC-LR pour l'eau à usage récréatif lors d'une ingestion unique.....	175
Tableau VII-X : Scénario d'exposition aiguë : Concentrations maximales tolérables (CMTs) de saxitoxines pour l'eau à usage récréatif lors d'une ingestion unique.....	175
Tableau VII-XI : Scénario d'exposition sub-chronique : Concentrations maximales tolérables (CMTs) de MC-LR pour l'eau à usage récréatif lors d'une ingestion d'eau répétée annuellement...	176
Tableau VII-XII : Scénario d'exposition chronique : Concentrations maximales tolérables de MC-LR pour l'eau à usage récréatif lors d'une ingestion quotidienne d'un adulte de 60 kg	176
Tableau VII-XIII : Scénario d'exposition chronique : répartition arbitraire de la DJT entre l'eau alimentaire et l'eau de baignade et déduction des concentrations maximales tolérables dans l'eau de baignade pour un adulte de 60 kg	176
Tableau VII-XIV : Concentrations maximales tolérables calculées pour les différentes toxines en fonction du type d'exposition	177
Tableau VII-XV : Probabilité de dépassement des limites de qualité relatives aux MCs dans les eaux récréatives préconisées dans cette étude en fonction de l'abondance des cyanobactéries ...	178

AchE : acétylcholine-estérase
ADN : acide désoxyribonucléique
AEP : alimentation en eau potable
AESN : Agence de l'eau Seine-Normandie
AJMT : Apport journalier maximum théorique
AJT : Apport journalier tolérable
AOAC : American Organisation of Analytical Chemists (Organisation américaine de chimie analytique)
ASE : accelerated solvent extraction (extraction accélérée par solvant)
ATX-a : anatoxine-a
B1 : toxine B1
BLB : eau de baignade contrôlée
BLAN : eau associée à différentes activités nautiques
BMAA : β -N-méthylamino-L-alanine
C1 : toxine C1
C2 : toxine C2
CAG : charbon actif en grain
CAP : charbon actif en poudre
CC : cellules de cyanobactéries
CEE : Communauté économique européenne
CEN : Comité européen de normalisation
CG ou CPG : chromatographie phase gazeuse
CCM : chromatographie sur couche mince
CLHP : chromatographie liquide haute performance
COT : carbone organique total
CREDOC : Centre de recherche pour l'étude et l'observation des conditions de vie
CSHPF : Conseil supérieur d'hygiène publique de France
CYN : cylindrospermopsine
Da : Dalton
DAD : diode array detector (détecteur à barrette de diodes)
DBO : demande biologique en oxygène
DL₅₀ : dose létale 50 %
DcSTX : décarbamoylsaxitoxine
DGS : Direction générale de la santé
DHS : Department of Human Services
DIPNR : Department of Infrastructure, Planning and Natural Resources
DPIWE : Department of Primary Industries, Water & Environment

DJT : Dose journalière tolérable

DLM : dose létale minimale

DMENO : dose minimale avec effets nocifs observés

DoCYN : désoxycylindrospermopsine

DSENO : dose minimale sans effet nocif observé

DSEIO : dose sans effet indésirable observé

DSV : Direction des services vétérinaires

ELISA : enzyme-linked immuno-sorbent assay (Test immuno-enzymatique)

FAO : Food and Agriculture Organisation

GTX : gonyautoxine

HILIC : chromatographie liquide par interaction hydrophile

HR-SDM : spectrométrie de masse haute résolution

i.p. : intrapéritonéale

i.v. : intraveineuse

i.t. : intratrachéale

ICBN : International code of botanical nomenclature (Code international de nomenclature botanique)

ICNB : International code of nomenclature of bacteria (Nomenclature Internationale des bactéries)

INSPQ : Institut National de Santé Publique du Québec

INCA : Enquête individuelle et nationale sur les consommations alimentaires

IPFM : intoxication paralysante par les fruits de mer

J.O. : Journal officiel

K_{ow} : coefficient de partage octanol eau

LLE : extraction liquide / liquide

LPS : lipopolysaccharides

MC(s) : microcystine(s)

MC-LR : microcystine-LR

MU : mouse unit (unité souris)

NEO ou Néo STX : néosaxitoxine

NFU : Nephelometric Formazine Unit (unité néphélométrique)

NHMRC : National Health and Medical Research Council

NOD : nodularine

OMS : Organisation mondiale de la santé

pc : poids corporel

PCC : Pasteur culture collection of *Cyanobacteria*

PCR : polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

PMPOA : programme de maîtrise des pollutions d'origine agricole

PP1 : protéines phosphatase de type 1

PP2A : protéines phosphatase de type 2

PSP : paralytic shellfish poisoning (intoxication paralysante par les fruits de mer)

QD : quotient de danger

RMN : résonance magnétique nucléaire

SEHD : Scottish Executive Health Department (Ministère de la santé écossais)

SDM : spectrométrie de masse

SFE : extraction par fluide supercritique

SISE : système d'information santé environnement

SM : spectrométrie de masse

SNC : Système nerveux central

SPE : extraction sur phase solide

STX : saxitoxine

UE : Union européenne

UV : Ultra-violet

US-EPA : United States Environmental Protection Agency (Agence américaine pour la protection de l'environnement)

VTR : valeur toxicologique de référence

WHO : World Health Organisation (Organisation Mondiale de la Santé - OMS)

Analyte	Composé ou mélange de composés soumis à l'analyse.
Dinophycées	Phytoflagellés très importants dans le phytoplancton des milieux marins, mais également bien représenté en eau douce.
Eutrophe	Un plan d'eau eutrophe se caractérise par une charge élevée en éléments nutritifs (en particulier en composés d'azote et de phosphore) et par une forte production primaire. Ce terme s'oppose à oligotrophe qui caractérise des plans d'eau pauvres en nutriments et à faible production primaire. La mésotrophie constitue un état intermédiaire entre l'oligotrophie et l'eutrophie.
Gaine	Membrane enveloppant chez certaines espèces de cyanobactéries les trichomes de cellules. Ainsi, on parle de trichome quand les cellules sont réunies en colonies linéaires dépourvues de gaine (ex : genre <i>Planktothrix</i>) et on utilise le terme de filament quand l'association linéaire de cellules est enveloppée d'une gaine (ex : genre <i>Lyngbya</i>).
Métalimnion	Couche d'eau intermédiaire entre la couche chaude de surface et la couche froide en profondeur dans les lacs stratifiés.
Oligo-mésotrophe	Désigne, dans un plan d'eau, un niveau trophique intermédiaire entre l'oligotrophie et la mesotrophie.
Phycobiliprotéines	Pigments accessoires à la photosynthèse, de couleur bleu-vert comme la phycocyanine ou rouge comme la phycoérythrine.
Procaryote	Organisme unicellulaire dépourvu de vrai noyau et d'organites intracytoplasmiques. Le matériel nucléaire est diffus dans le cytoplasme et non délimité par une membrane. Les bactéries et les cyanobactéries sont les principaux groupes de procaryotes existant dans la biosphère.
Thylacoïdes	Membranes où se réalisent les réactions de photosynthèse.
Zone euphotique	La zone euphotique est définie par la profondeur maximale jusqu'à laquelle la lumière solaire peut pénétrer dans l'eau pour permettre la photosynthèse chez les organismes et microorganismes autotrophes.

Figure A : Exemple de cyanobactérie unicellulaire coloniale. *Woronichinia naegeliana* (Photo Luc Brient, Université Rennes I).

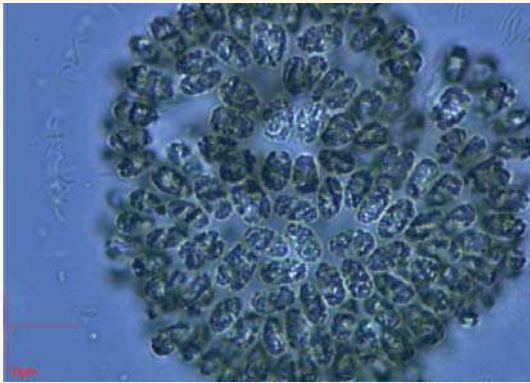


Figure B : Exemple de cyanobactérie organisée en trichomes : *Aphanizomenon flos aquae* (Photo Luc Brient, Université Rennes I).

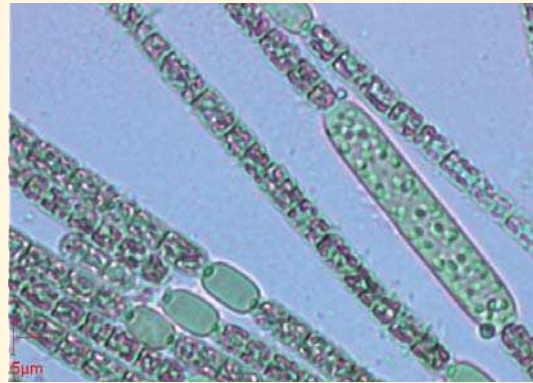


Figure C : Exemple de cyanobactérie organisée en filament : gaine visible à l'extrémité. Genre *Phormidium*. (Photo Céline Berger, MNHN).



Figure D : Trichome de cyanobactérie (*Anabaena smithii*) présentant un hétérocyste (H) et un akinète (A) bien distincts. (Photo Luc Brient, Université Rennes I).

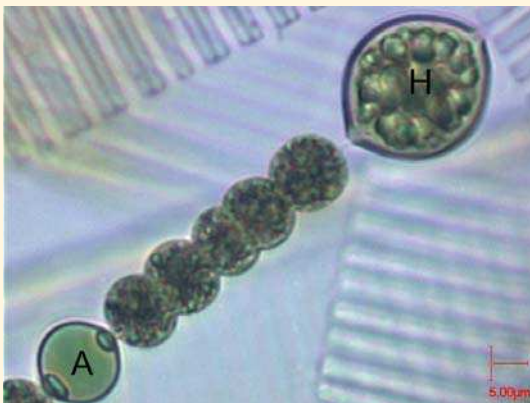


Figure E : Filaments de la cyanobactérie *Cylindrospermopsis raciborskii* présentant des akinètes A et des hétérocystes H (Photo Amandine Caruana INRA).

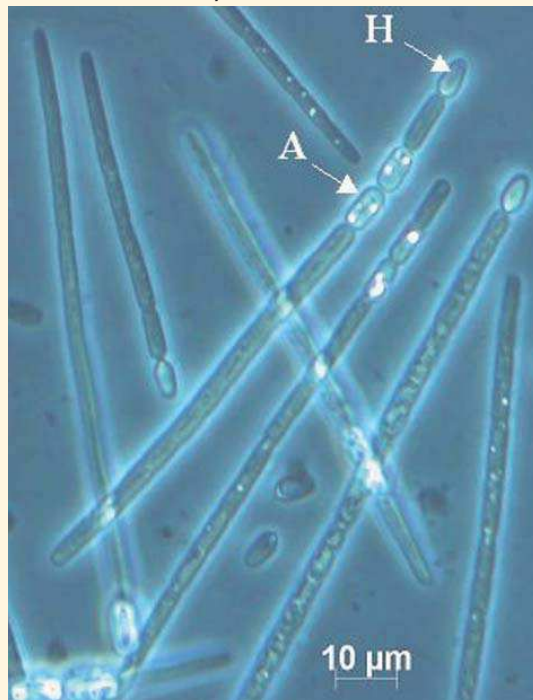


Figure F : Prolifération de la cyanobactérie *Planktothrix rubescens* dans le lac du Bourget. La couleur « lie de vin » de l'eau est due à la phycoérythrine présente en quantité importante chez cette espèce. (Photo Michel Roux, CSP).



Figure H : Accumulation de cyanobactéries sur la berge d'un plan d'eau breton. (Photo Luc Brient, Université Rennes).



Figure G : Prolifération sous la forme d'écume de la cyanobactérie *Planktothrix agardhii* dans un lac de la région parisienne. (Photo Cécile Bernard, MNHN).

Figure I : Dispositifs de prélèvement utilisés depuis la berge (de gauche à droite ci-dessous, filet à plancton et tube échantillonneur) ou depuis un bateau (en bas à gauche, bouteille de prélèvement de Van Dorn). (Photos Maria Leitao, Bi-Eau).



Figure J : Immersion du disque de Secchi. (Photo Luc Briant, Université Rennes 1).



Figure K : Nombre de prélèvements recensés dans la base par département (cumul des années 2002-2004).

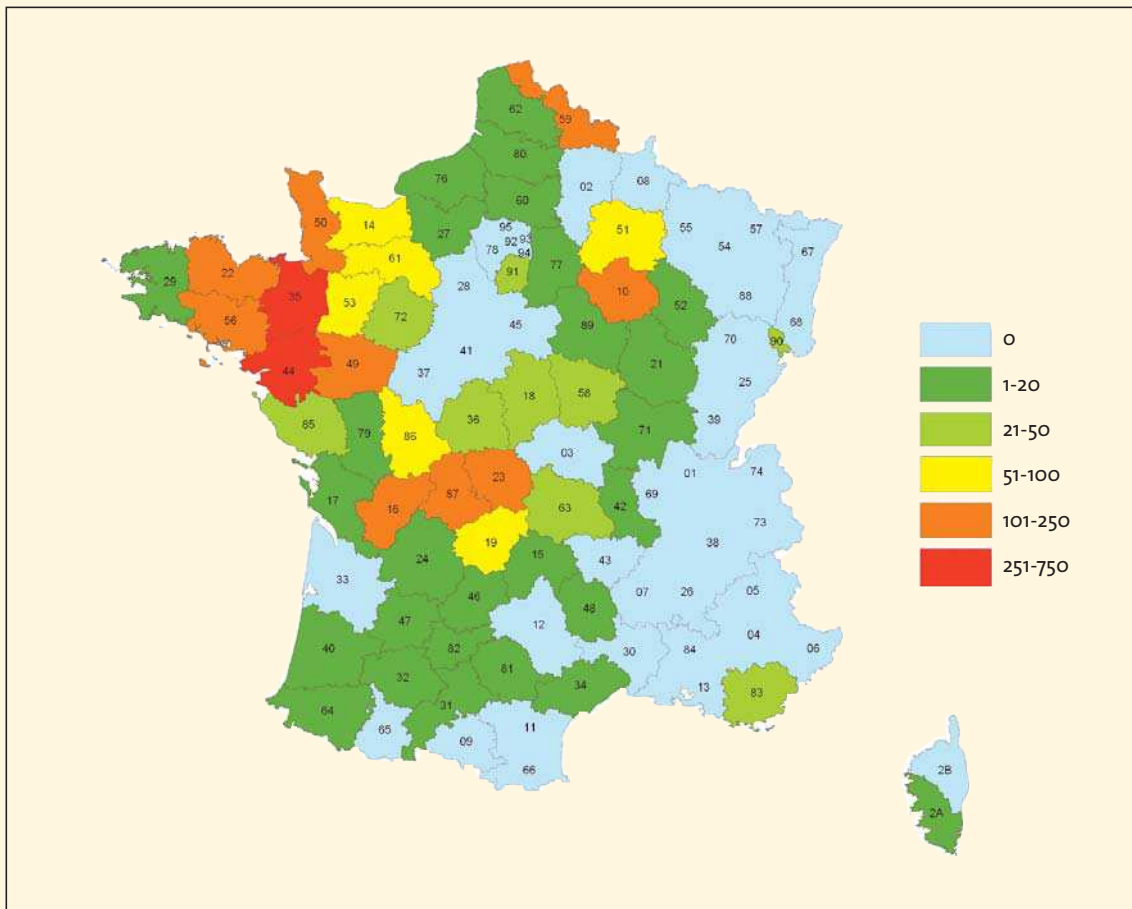
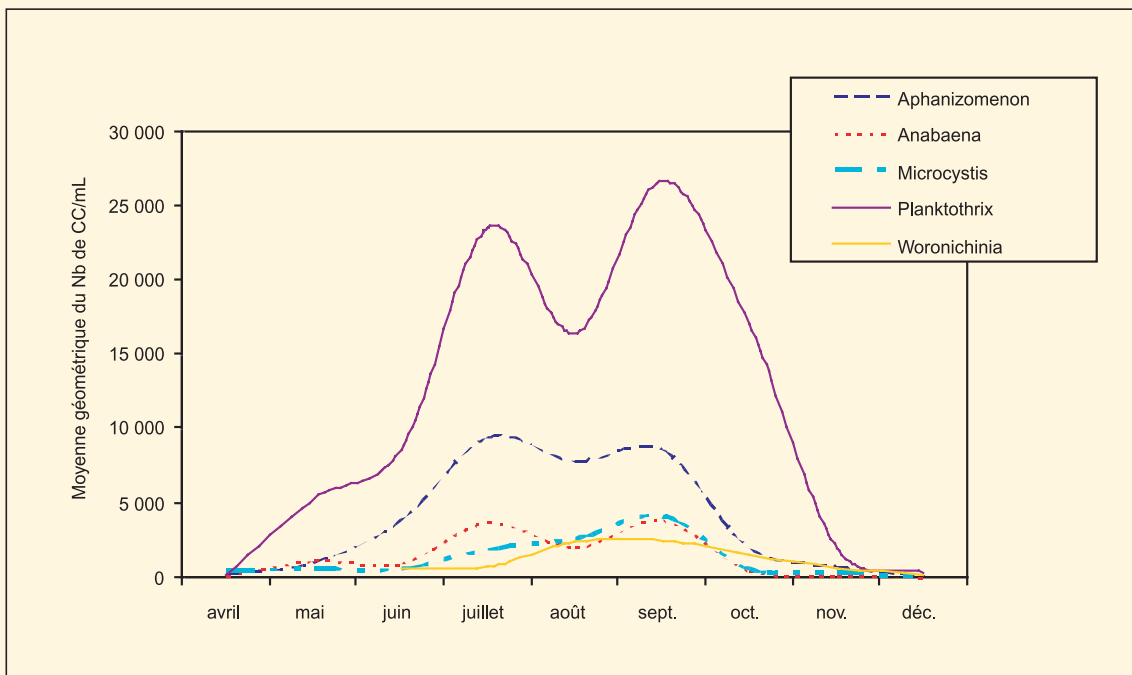


Figure L : Évolution saisonnière des genres de cyanobactéries les plus fréquemment rencontrés dans la base de données (moyenne géométrique du nombre de CC par mL en fonction du mois de l'année). Les données des trois années 2002 à 2004 et des différents usages ont été agrégées [résultats bruts non modélisés].



I. Identification des dangers liés aux cyanobactéries

1. Les cyanobactéries

Le terme cyanobactéries désigne des micro-organismes procaryotes à Gram négatif dont la pigmentation peut varier du bleu-vert au rouge.

Les cyanobactéries sont des procaryotes photosynthétiques, classés du point de vue systématique dans le règne des Eubactéries. Ces microorganismes ont longtemps été rangés dans le règne végétal car ils présentent, outre des propriétés spécifiques des bactéries, des caractéristiques propres aux algues :

- la structure cellulaire est similaire à celle des bactéries et caractérisée en particulier par l'absence de noyau et d'organites intracellulaires ;
- comme les algues, la plupart des cyanobactéries des eaux continentales possèdent de la chlorophylle *a*, et non de la bactériochlorophylle comme certaines bactéries. Elles renferment généralement, comme autres pigments photosynthétiques, des phycobiliprotéines et réalisent une photosynthèse productrice d'oxygène en utilisant l'eau comme donneur d'électrons.

Le terme cyanobactéries est actuellement le plus usité, et c'est celui qui sera adopté dans ce rapport, mais ces micro-organismes sont également dénommés, selon des termes plus anciens, algues bleues (blue-green algae des anglo-saxons), cyanophytes ou cyanophycées.

1.1. Position taxonomique

La correspondance entre la classification de ces organismes dans le code international de nomenclature botanique ICBN⁽¹⁾ (Greuter et al. 1994) et celle du code international de nomenclature des bactéries ICNB (Sneath 1992), est représentée dans le tableau I-I.

Tableau I-I : Correspondance entre la classification botanique et la classification bactériologique des cyanobactéries.

	Classification botanique	Classification bactériologique
	Cryptogames Thallophytes Algues Procaryotes	
Division	Cyanophytes	Procaryotes
Classe	Cyanophycées	Eubactéries Gracilicutes Cyanobactéries

À l'intérieur de la classe des cyanophycées, la classification botanique distingue différents ordres (ex : ordre des Nostocales, ordre des Oscillatoriales...) et différentes familles (ex : l'ordre des Nostocales comprend les familles des Nostocacées, des Scytonematacées et des Rivulariacées). Environ 150 genres se distinguent, dans lesquels sont réparties plus de 2000 espèces. Cette nomenclature correspond globalement à la classification en sous-sections des souches pures de la collection de l'Institut Pasteur (PCC⁽²⁾) publiée par Castenholz (2001). Dans tous les cas, les noms de genres et d'espèces actuellement utilisés pour l'identification et la systématique sont ceux empruntés à la botanique.

La classification suivant le code de nomenclature botanique repose sur des critères morphologiques, qui permettent une identification relativement aisée des genres les plus fréquemment rencontrés. En revanche, la détermination de l'espèce, délicate et entachée d'incertitude, reste l'apanage de spécialistes.

(1) <http://www.bgbm.org/iapt/nomenclature/code/tokyo-e/Contents.htm>

(2) <http://www.pasteur.fr/recherche/banques/PCC>

Selon la nomenclature bactériologique, la classification en espèce requiert, en complément, la prise en compte de caractéristiques physiologiques, biochimiques et génétiques déterminées sur des souches pures en culture. Les apports de la biologie moléculaire à la systématique et à la phylogénie devraient permettre à terme la définition d'une taxonomie des cyanobactéries stable et universelle.

1.2. Diversité morphologique et écologique

Les cyanobactéries peuvent être :

- soit unicellulaires, vivant solitaires ou en colonies (figure A – livret couleur),
- soit organisées en trichomes, quand le thalle est composé d'une série de cellules sans gaine (figure B – livret couleur),
- soit organisées en filaments, quand le thalle est composé d'une série de cellules enveloppées d'une gaine (figure C – livret couleur).

Dans certains genres (ex : *Microcystis*, *Planktothrix*...), la présence dans les cellules végétatives de vacuoles à gaz permet à ces microorganismes de se positionner à différents niveaux dans la colonne d'eau, voire de s'accumuler à la surface des plans d'eau, selon leurs besoins en lumière et en nutriments.

Deux types de cellules différenciées présentant des fonctions particulières sont aussi parfois observées :

- les akinètes (figure D et E – livret couleur) sont des cellules de grande taille, à paroi épaisse, riches en réserves. Ce sont des formes de résistance qui permettent la survie des cyanobactéries sur les sédiments, lorsque les conditions environnementales sont défavorables à leur maintien dans la colonne d'eau ;
- les hétérocystes (figure D et E – livret couleur) sont des cellules à paroi épaisse, qui sont spécialisées dans la fixation de l'azote atmosphérique. Les espèces qui possèdent ces structures sont capables d'une autotrophie vis-à-vis de l'azote.

Les cyanobactéries présentent des caractéristiques écologiques très variées qui leur ont permis de coloniser la plupart des habitats, aquatiques ou terrestres. Elles sont libres ou vivent en symbiose avec d'autres organismes. Un grand nombre d'entre elles sont adaptées à des environnements extrêmes (glaciers, sources chaudes, cendres volcaniques), grâce à des capacités qui leur permettent de supporter des températures élevées (genre *Synechococcus* observé dans des sources thermales à plus de 70°C), des pH faibles (certaines picocyanobactéries sont observées à des pH de l'ordre de 4) ou encore une large gamme d'éclairements (genre *Prochlorococcus* pouvant faire de la photosynthèse sous des éclairements de moins de 1 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et jusqu'à environ 2000 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). En milieu aquatique, les cyanobactéries sont planctoniques, c'est-à-dire en suspension dans la colonne d'eau, ou benthiques quand elles se développent fixées sur les sédiments.

1.3. Multiplication

La multiplication des cyanobactéries est végétative, c'est-à-dire asexuée, et 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.

Les genres unicellulaires peuvent produire des baeocytes (minicellules) à l'intérieur de la cellule maternelle. Les individus coloniaux se multiplient également par fragmentation. Ainsi, les formes filamenteuses produisent des hormogonies (minifilaments mobiles) qui, après détachement du filament, participent à la colonisation.

1.4. Les cyanobactéries toxiques

Les cyanobactéries peuvent produire plusieurs types de toxines agissant sur différents organes cibles (foie, système nerveux).

Ces toxines sont intracellulaires et synthétisées par les cellules en croissance et sont le plus souvent libérées dans le milieu à l'occasion de la sénescence, de la mort ou de la lyse cellulaire. En phase de croissance, les toxines sont essentiellement intracellulaires, moins de 10 à 20 % de la teneur totale en toxine est extracellulaire (Jones & Orr 1994). Cependant dans certains cas, comme celui de la cylindrospermopsine, une proportion importante de la toxine peut être libérée dans le milieu par les cellules en croissance (Chiswell *et al.* 1999).

Une liste non exhaustive des espèces observées en France et susceptibles de produire des toxines est présentée dans le tableau I-II. Une même toxine peut être produite par des espèces différentes. Ainsi, les microcystines ont déjà été observées chez des espèces du genre *Microcystis*, mais également chez des espèces des genres *Anabaena*, *Planktothrix* ou encore *Nostoc*. Une même espèce peut produire différentes toxines. C'est ainsi qu'*Anabaena spiroides* peut produire de l'anatoxine-a mais également des microcystines. Enfin, la quantité de toxine produite par unité de biomasse est très variable au sein même d'une espèce, en fonction des conditions environnementales, de la phase de croissance ou du clone considéré.

Tableau I-II : Liste non exhaustive des espèces de cyanobactéries potentiellement toxiques et des toxines ayant déjà été associées à ces espèces en France ou hors de France (N.I.= toxine présente mais non identifiée). Les espèces ayant déjà été observées en France apparaissent en caractères gras.

Cyanobactéries toxiques	Toxines
<i>Anabaena affinis</i>	N.I.
<i>Anabaena circinalis</i>	Anatoxine-a, Saxitoxines, Microcystines
<i>Anabaena flos-aquae</i>	Anatoxines (-a, -a(s), -b, -b(s), -c, -d), Microcystines
<i>Anabaena hassallii</i>	N.I.
<i>Anabaena lemmerman</i>	Microcystines, Anatoxine-a(s)
<i>Anabaena planctonica</i>	Anatoxine-a
<i>Anabaena spiroides</i>	Anatoxine-a, Microcystines
<i>Anabaena torulosa</i>	N.I.
<i>Anabaena variabilis</i>	N.I.
<i>Anabaena sp.</i>	Anatoxine-a
<i>Anabaenopsis milleri</i>	Microcystines
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Anatoxine-a, Saxitoxines
<i>Aphanizomenon ovalisporum</i>	Cylindrospermopsine
<i>Aphanizomenon sp.</i>	Anatoxine-a
<i>Coelosphaerium naegelianum</i>	Hépatotoxine
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Cylindrospermopsine, Saxitoxines
<i>Cylindrospermum sp.</i>	Anatoxine-a
<i>Fischerella epiphytica</i>	N.I.
<i>Gloeotrichia echinulata</i>	N.I.
<i>Gloeotrichia pisum</i>	N.I.
<i>Hapalosiphon hibernicus</i>	Microcystines
<i>Lyngbya birgei</i>	N.I.
<i>Lyngbya gracilis</i>	Debromoaplysiatoxine
<i>Lyngbya major</i>	N.I.
<i>Lyngbya majuscula</i>	Lyngbyatoxine-a
<i>Lyngbya wollei</i>	Saxitoxines
<i>Microcoleus lyngbyaceus</i>	N.I.
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Microcystines
<i>Microcystis botrys</i>	Microcystines
<i>Microcystis farlowian</i>	Ichtyotoxine
<i>Microcystis flos-aquae</i>	Microcystines
<i>Microcystis panniformis</i>	Microcystines
<i>Microcystis toxica</i>	N.I.
<i>Microcystis viridis</i>	Microcystines, Microviridine
<i>Microcystis wesenbergii</i>	Microcystines
<i>Microcystis sp.</i>	Anatoxine-a
<i>Nodularia spumigena</i>	Nodularines
<i>Nostoc paludosum</i>	N.I.
<i>Nostoc rivulare</i>	N.I.
<i>Nostoc sp.</i>	Microcystines

Tableau I-II (suite) : Liste non exhaustive des espèces de cyanobactéries potentiellement toxiques et des toxines ayant déjà été associées à ces espèces en France ou hors de France (N.I.= toxine présente mais non identifiée). Les espèces ayant déjà été observées en France apparaissent en caractères gras.

Cyanobactéries toxiques	Toxines
<i>Oscillatoria formosa</i>	Homoanatoxine-a
<i>Oscillatoria lacustris</i>	N.I.
<i>Oscillatoria limosa</i>	Microcystines
<i>Oscillatoria tenuis</i>	Microcystines
<i>Oscillatoria nigroviridis</i>	Oscillatoxine-a
<i>Oscillatoria sp.</i>	Anatoxine-a
<i>Phormidium favosum</i>	Anatoxine-a
<i>Planktothrix agardhii</i>	Microcystines
<i>Planktothrix mougeotii</i>	Microcystines
<i>Planktothrix rubescens</i>	Microcystines
<i>Planktothrix sp.</i>	Anatoxine-a
<i>Pseudanabaena sp.</i>	Neurotoxine
<i>Raphidiopsis sp.</i>	Cylindrospermopsine
<i>Schizothrix calcicola</i>	Aplysiatoxines
<i>Scytonema hofmanni</i>	Scytophycines a et b
<i>Scytonema pseudohofmanni</i>	Scytophycines a et b
<i>Spirulina subsalsa</i>	N.I.
<i>Symploca hydnoides</i>	N.I.
<i>Symploca muscorum</i>	Aplysiatoxine
<i>Synechococcus sp.</i>	N.I.
<i>Trichodesmium erythraeum</i>	Neurotoxine
<i>Umezakia natans</i>	Cylindrospermopsine
<i>Woronichinia naegeliana</i> anciennement <i>Gomphosphaeria naegelianum</i>	Anatoxine-a

Points à retenir

- Les cyanobactéries sont des microorganismes procaryotes photosynthétiques possédant, entre autres pigments, de la chlorophylle *a*, comme les végétaux.
- Elles sont présentes dans la plupart des écosystèmes. Dans les milieux aquatiques, elles sont benthiques ou planctoniques.
- Bien que référencées dans la classification bactériologique, elles sont toujours intégrées dans le code de nomenclature de botanique et leur identification au niveau de l'espèce est difficile.
- Elles présentent une grande variété de formes et d'organisations et sont capables de différencier des cellules spécialisées.
- Certains genres produisent des toxines, qui sont intracellulaires.
- Certains genres produisent des métabolites très odorants.

2. Les proliférations de cyanobactéries

2.1. Définition des proliférations

Dans les conditions environnementales qui leur sont favorables, les cyanobactéries connaissent des phases de prolifération massive, aussi qualifiée d'efflorescence ou de bloom. Ces proliférations se traduisent par la production, sur une courte période de temps (quelques jours), d'une biomasse importante et par une forte diminution de la diversité spécifique dans le compartiment phytoplanctonique puisqu'une ou deux espèces deviennent alors très largement dominantes.

Elles peuvent provoquer une coloration de l'eau qui dépendra des pigments majoritairement présents dans l'espèce dominante (figure F – livret couleur).

Les espèces planctoniques se développent dans l'ensemble de la colonne d'eau ou à un niveau bien précis. Dans ce dernier cas, les proliférations sont le plus souvent observées à la surface où elles forment des agrégats flottants appelés « fleurs d'eau », « écumes » ou « mousses » (figures G – livret couleur et H – livret couleur). De façon moins fréquente, ces phénomènes surviennent en profondeur (entre 10 et 15 mètres) en fonction des disponibilités en nutriments et en énergie lumineuse.

Il est très difficile de définir un seuil de biomasse caractérisant l'apparition d'une prolifération. En effet, celui-ci devrait dépendre du statut trophique de l'écosystème aquatique concerné. Ainsi, dans les milieux oligo-mésotrophes comme les grands lacs alpins, des concentrations en chlorophylle-*a* de 30 à 50 µg.L⁻¹ représentent des valeurs très élevées de biomasse. En revanche ces mêmes valeurs sont considérées comme faibles ou moyennes dans les milieux eutrophes. Il faudrait donc prendre également en compte l'évolution temporelle de la biomasse pour définir une situation de prolifération. À titre d'exemple un doublement du nombre de cellules se produisant en une semaine est considéré par certains observateurs comme une situation d'alerte nécessitant le démarrage d'une surveillance confirmant ou infirmant la poursuite du phénomène. De plus, la disparition des proliférations peut se produire très rapidement.

Bien que ce terme soit indiqué dans la réglementation, il n'existe pas de définition internationale de la « prolifération de cyanobactéries ».

Les proliférations de cyanobactéries apparaissent comme des phénomènes de nature dynamique qu'il n'est pas possible, en l'état des connaissances scientifiques, de caractériser avec précision par des valeurs seuils de nombre de cellules ou de temps de doublement.

Les phénomènes étant généralement très rapides, l'observation de la dynamique des populations se fait par la mise en œuvre d'un programme d'échantillonnage et de dénombrements dont la fréquence permet de constater le début de la cinétique de croissance.

La meilleure connaissance possible de l'historique et de l'évolution de la qualité et du comportement de la ressource permet de mieux définir les périodes critiques.

2.2. Hydrosystèmes concernés par des proliférations de cyanobactéries

Des proliférations de cyanobactéries ont été répertoriées dans le monde entier, sous toutes les latitudes et jusqu'en moyenne altitude. Des proliférations d'espèces benthiques sont observées dans des rivières lentes et dans des lacs. Dans ce cas, elles ne surviennent que dans la zone euphotique, c'est-à-dire en général le long des berges.

Les eaux souterraines non influencées par des eaux de surface ne sont pas concernées en raison de l'absence de lumière. Il en est de même pour les réservoirs d'eau potable totalement obscurs. Dans le cas où ils seraient éclairés, un risque ponctuel de prolifération ne peut pas être exclu si du phosphore biodisponible est présent.

Les bassins de traitement des stations d'épuration des eaux usées par lagunage sont parfois l'objet de proliférations et peuvent contribuer à l'ensemencement des hydrosystèmes récepteurs en cyanobactéries ainsi qu'en toxines. Vasconcelos et Peirera (2001) ont observé au Portugal la dynamique d'une telle prolifération et mesuré dans le bassin des concentrations en hépatotoxines de l'ordre de 50 µg équiv. MC-LR.L⁻¹.

2.3. Effets indésirables des proliférations de cyanobactéries

Les effets de ces proliférations, quand elles sont particulièrement massives, sont multiples :

Sur l'environnement et le cadre de vie :

- modification de l'aspect de la ressource par une coloration inhabituelle (bleue, rouge ou verte), des irisations en surface et/ou des masses d'écume se déplaçant au gré des vents ;
- nuisance olfactive lors de la décomposition de la prolifération.

Sur les organismes du milieu :

- perturbation de la biodiversité de l'écosystème aquatique ;
- perturbation des réseaux trophiques aquatiques car les cyanobactéries sont peu ou pas consommées par le zooplancton et leur prolifération s'effectue le plus souvent au détriment du développement des autres microorganismes photosynthétiques (compétition pour les nutriments et la lumière) ;
- mortalités de poissons, par intoxication ou diminution de la teneur en oxygène de l'eau ;
- mortalités d'oiseaux, par intoxication directe ou *via* leur alimentation (mollusques, poissons,...) ;
- intoxication d'animaux domestiques ou sauvages par abreuvement à proximité d'écumes toxiques (Briand *et al.* 2003).

Sur les usages anthropiques de l'eau :

- coloration, odeur et texture de l'eau pouvant décourager la baignade ;
- troubles cutanés ou des muqueuses suite à des baignades dans des eaux affectées par des efflorescences ;
- perturbation du fonctionnement des procédés de traitement des eaux d'alimentation, notamment mécaniquement par colmatage des filtres ou des membranes, ou par consommation accrue en réactifs de traitement et génération de sous-produits de désinfection et par dérèglement des réactions de floculation par suite des changements rapides de pH des eaux entrant dans la filière ;
- dégradation, par la présence de métabolites odorants, de la qualité organoleptique des eaux d'alimentation mal traitées ;
- induction de risques sanitaires par ingestion, inhalation ou exposition par dialyse si les toxines sont mal éliminées ;
- perturbation des appareillages de dialyse par colmatage accéléré, si le traitement en amont est insuffisant.

2.4. Facteurs favorisant les proliférations de cyanobactéries

Les proliférations de cyanobactéries sont le plus souvent associées, selon la communauté scientifique, à trois facteurs principaux :

- des concentrations élevées en nutriments dont le phosphore et/ou l'azote qui sont souvent les éléments nutritifs limitants dans les plans d'eau (Chorus & Mur 1999, Deppe *et al.* 1999) ;
- une stabilité élevée de la colonne d'eau au moment du développement de l'efflorescence et dans la période précédant cet événement ;
- des conditions météorologiques favorables : luminosité, température.

Concernant le premier facteur, la théorie développée par Tilman (1982) puis reprise par beaucoup d'autres auteurs (Interlandi & Kilham 2001), prédit que la diversité d'une communauté est positivement corrélée au nombre de nutriments à niveaux limitants dans le système où se trouve cette communauté. Huisman *et al.* (2001) ont montré que la compétition pour les nutriments mais aussi pour la lumière pouvait générer des oscillations et des fluctuations chaotiques dans l'abondance, qui permettent la coexistence de nombreuses espèces.

En revanche, en situation de ressources non limitantes, la sélection de l'espèce la plus adaptée aux conditions du milieu se traduira par sa dominance au sein de la communauté.

Concernant la stabilité de la colonne d'eau, le même type de mécanisme peut être évoqué et une forte stabilité permet la sélection des espèces les plus compétitives. En revanche, des perturbations intermédiaires génèrent des changements dans la dominance des espèces et favorisent ainsi la richesse et la diversité spécifique (Barbiero *et al.* 1999, Flöder & Sommer 1999).

Concernant les concentrations en nutriments, la plupart des proliférations de cyanobactéries surviennent dans des milieux eutrophes dont les charges en phosphore, principalement sous forme orthophosphates sont élevées (> 50 µg.L⁻¹ en P). C'est pourquoi la réduction des charges en nutriments, et surtout des apports en phosphore,

est considérée comme une priorité pour prévenir le développement de proliférations de cyanobactéries (Chorus & Mur 1999, Deppe *et al.* 1999). Cependant un état oligotrophe ne met pas systématiquement à l'abri de proliférations de cyanobactéries, comme le montrent les travaux de Mez *et al.* (1997) en Suisse. De même, malgré une forte diminution amenant les concentrations en phosphore dans le lac du Bourget de 120 à 30 µg.L⁻¹, celui-ci connaît depuis quelques années des perturbations importantes liées à une cyanobactérie toxique, *Planktothrix rubescens*. Celle-ci se développe chaque année dans le métalimnion où elle bénéficie de suffisamment de lumière et d'apports en nutriments depuis les couches plus profondes (Humbert *et al.* 2001b, Jacquet *et al.* 2005).

Concernant la stabilité de la colonne d'eau, de nombreux travaux d'écologie comparative ont souligné le rôle fondamental de ce facteur dans le développement des proliférations de cyanobactéries (Jacoby *et al.* 2000). Visser *et al.* (1996) ont montré que le brassage artificiel des plans d'eau peut permettre de prévenir la prolifération de certaines espèces de cyanobactéries et d'augmenter la diversité spécifique des communautés phytoplanctoniques dans la colonne d'eau. Elle peut aussi tout simplement homogénéiser la composition de l'eau, réduisant ainsi une partie des problèmes rencontrés dans la préparation d'eau de distribution. Néanmoins, la déstratification peut aussi, dans certaines conditions, favoriser certaines espèces de cyanobactéries comme *Planktothrix agardhii* qui semble peu sensible à ce facteur.

2.5. Caractéristiques des cyanobactéries leur conférant une forte valeur sélective

Certaines conditions environnementales conduisent à des situations de fortes compétitions entre microorganismes autotrophes. Ces situations provoquent, par exclusion compétitive, la sélection de l'espèce la plus performante dans les conditions du milieu.

Concernant les compétitions pour l'utilisation des nutriments et de la lumière, trois aptitudes semblent plus particulièrement conférer un avantage sélectif important aux cyanobactéries :

- la régulation de la flottaison permet à certaines espèces d'ajuster leur position dans la colonne d'eau grâce à des mécanismes physiologiques particuliers tels que la présence de vésicules à gaz et la présence de réserves qui servent de ballast. Ainsi, les cellules peuvent se déplacer de la surface, où elles profitent au mieux de l'énergie lumineuse, vers des couches d'eau plus profondes, jusqu'au niveau des sédiments si les concentrations en nutriments y sont plus élevées du fait de relargages en conditions réductrices voire anoxiques. Elles peuvent aussi occuper, pendant plusieurs mois, une couche bien précise dans la colonne d'eau, à l'exemple de *P. rubescens* qui occupe préférentiellement le métalimnion. Dans certains cas, elles s'accumulent en surface pour former une écume. Cette stratégie permet alors à ces espèces d'éliminer leurs compétitrices en leur interdisant l'accès à la lumière (exemple de *Microcystis*). Enfin, ce contrôle de la flottaison limite les processus de sédimentation ;
- la différenciation des hétérocystes (figure D et E – livret couleur) confère à certaines cyanobactéries filamenteuses (par exemple *Aphanizomenon*, *Anabaena* ou *Cylindrospermopsis*) la possibilité de se développer dans des milieux très appauvris en azote inorganique (Mur *et al.* 1999). C'est pourquoi la diminution des concentrations en nitrates, contrairement à la maîtrise des apports de phosphates, n'est pas nécessairement la bonne stratégie de prévention des proliférations de cyanobactéries. Il a même été montré que la réduction des concentrations en nitrates pouvait favoriser la sélection dans une communauté phytoplanctonique de cyanobactéries hétérocystées (Tilman *et al.* 1982) ;
- la possession de certains pigments accessoires (phycocyanine, allophycocyanine et phycoérythrine) localisés à la surface des thylacoïdes permet à certaines espèces d'utiliser comme source d'énergie lumineuse pour la photosynthèse, les longueurs d'onde encore présentes en profondeur. D'autres espèces sont capables d'exploiter les faibles niveaux d'énergie lumineuse des eaux très turbides. L'intérêt de pouvoir coloniser cette zone profonde (supérieure à 15 mètres dans les lacs alpins par exemple) est que les concentrations en nutriments y sont en général plus élevées qu'en surface.

Certaines espèces de cyanobactéries ont des capacités importantes de stockage du phosphore (réserves de polyphosphate) et de l'azote (sous forme de cyanophycine et de phycocyanine) dans les cellules. D'autres sont capables d'utiliser des formes très variées du carbone (Oliver & Gant 2000). Ces aptitudes ne sont pas développées de façon égale chez toutes les espèces de cyanobactéries, les stratégies que peuvent sélectionner ces organismes pour s'adapter sont multiples. Ainsi la faculté des cyanobactéries à mieux échapper à la prédation que les microalgues semble liée à l'organisation cellulaire particulière de ces organismes et à leur capacité à synthétiser des toxines :

- de nombreux genres de cyanobactéries sont organisés sous forme de filaments ou de trichomes (exemple : *Anabaena*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*...) qui peuvent être assemblés en faisceaux (exemple : *Aphanizomenon*), ou sous forme de colonies (exemple : *Microcystis*, *Aphanothece*...) (Couté & Bernard 2001). Cette organisation les rend plus difficiles à consommer par la plupart des organismes brouteurs du zooplancton. Cependant, si ces derniers sont présents avant que les filaments ou les colonies aient atteint une taille qui les protège de la prédation, ils peuvent quand même exercer un contrôle sur ces populations (Oliver & Gant 2000) ;

- la capacité à synthétiser des toxines pourrait conférer un avantage sélectif aux cyanobactéries par rapport aux autres microorganismes autotrophes. Bien que le rôle exact de ces toxines ne soit pas encore clairement établi, il a été montré que ces métabolites, notamment les microcystines, peuvent avoir un impact direct (mortalité, baisse de fécondité...) sur le zooplancton (Humbert *et al.* 2001a). D'autres métabolites secondaires peuvent aussi inhiber la croissance des microalgues (Smith & Doan 1999) et l'activité de certains consommateurs (Sellner 1997).

De plus, certaines espèces de cyanobactéries sont dotées d'une bonne capacité de résistance aux infections virales par les cyanophages. Chez *Synechococcus*, Waterbury et Valois (1993) ont montré que les populations de cyanobactéries étaient dominées par des cellules résistantes aux phages capables de les infecter alors que les populations de microalgues sont très sensibles aux infections virales (Tarutani *et al.* 2000). Dans le lac du Bourget, Dorigo *et al.* (2004) ont constaté que la dynamique des cyanophages n'était pas corrélée à la dynamique de *P. rubescens* ce qui suggère un faible contrôle de cette communauté par les virus. Cette question fait l'objet d'une attention croissante de la part de la communauté scientifique, notamment par rapport aux perspectives offertes dans la lutte contre les proliférations de cyanobactéries.

Les akinètes générés par certaines cyanobactéries (par exemple *Anabaena* et *Aphanizomenon*) en conditions environnementales particulièrement défavorables, leur permettent de résister, par exemple, au gel ou à la sécheresse. Lorsque les conditions environnementales redeviennent propices au développement du phytoplancton, des filaments cyanobactériens sont très rapidement générés à partir de ces cellules, ce qui peut être considéré comme un avantage sélectif pour la « recolonisation » d'un milieu. Une autre stratégie permettant la survie consiste à s'installer dans les sédiments pendant l'hiver. Plusieurs études ont montré que *Microcystis*, par exemple, avait un cycle de vie comportant une phase benthique de la fin de l'automne au printemps, puis une phase pélagique de l'été jusqu'à l'automne (Brunberg & Blomqvist 2002, 2003).

En résumé, dans l'état actuel des connaissances, il est encore extrêmement difficile de prédire le développement d'une prolifération de cyanobactéries dans un plan d'eau ou dans certains cours d'eau. Le développement des outils de modélisation devrait permettre, à terme, de mieux cerner les paramètres environnementaux essentiels déterminant le déclenchement d'une prolifération de cyanobactéries. Cependant, dans certains cas, une bonne connaissance des sites, reposant sur de longues séries chronologiques, peut permettre d'anticiper les problèmes liés aux proliférations de cyanobactéries.

Points à retenir

- Une prolifération est un phénomène caractérisé par sa dynamique, la production d'une forte biomasse et la dominance de la communauté phytoplanctonique par un ou deux genres.
- Il n'existe pas de définition précise ni de consensus sur un niveau seuil caractérisant une prolifération.
- Les proliférations de cyanobactéries peuvent perturber le fonctionnement des écosystèmes aquatiques et les usages de l'eau.
- L'abondance des nutriments (phosphore et secondairement azote, voire manque d'azote) et la stabilité de la colonne d'eau sont des facteurs favorisant les proliférations essentiellement en période estivale et début d'automne.
- Selon les sites et les conditions, les proliférations peuvent être quasiment permanentes ou ponctuelles, rares ou fréquentes, c'est-à-dire largement imprévisibles dans l'état actuel des connaissances.
- Les cyanobactéries présentent de grandes capacités d'adaptation aux variations des caractéristiques environnementales.

3. Les toxines de cyanobactéries ou cyanotoxines

3.1. Structures, caractéristiques physico-chimiques et persistance dans le milieu des cyanotoxines

Les toxines de cyanobactéries ou cyanotoxines recouvrent une grande variété de structures chimiques et de mécanismes de toxicité (Sivonen & Jones 1999). En fonction de leur mode d'action, les cyanotoxines sont classées en hépatotoxines (organe cible principal : le foie), en neurotoxines (organe cible : le système nerveux) ou en dermatotoxines (organe cible : la peau). Elles sont également classées suivant leur structure chimique. Ce sont en majorité des peptides cycliques ou des alcaloïdes.

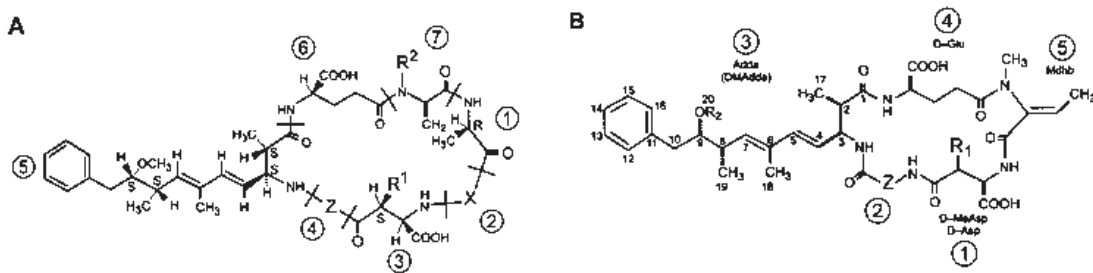
3.1.1. Les hépatotoxines

Ce sont les toxines de cyanobactéries qui sont le plus fréquemment rencontrées lors de proliférations. Elles sont impliquées dans de nombreux épisodes d'intoxication. Chez les vertébrés, l'organe cible est essentiellement le foie. D'autres organes tels que les reins ou les intestins peuvent être également altérés.

3.1.1.2. Les microcystines et les nodularines

Ce sont des peptides cycliques à sept acides aminés pour les microcystines (formule générale : cyclo-[D-alanine¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-glutamate⁶-Mdha⁷]) et à cinq acides aminés pour les nodularines (formule générale : cyclo-[D-MeAsp¹-L-arginine²-Adda³-D-glutamate⁴-Mdhb⁵], figure I-1). Leur masse moléculaire est comprise entre 800 et 1100 daltons (Da). Il existe de nombreux variants structuraux de ces molécules et l'on compte à l'heure actuelle neuf variants de la nodularine (Codd *et al.* 2005) et plus de 70 variants de microcystines (Sivonen & Jones 1999). Leur toxicité sur souris exprimée en DL₅₀ à 24 h en i.p. est de 50 à plus de 1200 µg.kg⁻¹. Ces toxines sont solubles dans l'eau et très stables : 90 % de dégradation en 2 à 6 semaines à la lumière. Les toxines de ces deux familles restent stables et résistantes à l'hydrolyse chimique ou à l'oxydation à pH neutre (≈ 7). Les microcystines et les nodularines restent actives après ébullition. Dans les échantillons naturels et à l'obscurité, les microcystines peuvent persister plusieurs mois voir des années (Sivonen & Jones 1999). Les microcystines peuvent être oxydées par ozonation ou par des agents oxydants forts, ou dégradées par d'intenses radiations ultraviolettes (UV) (Sivonen & Jones 1999).

Figure I-1 : Structure des microcystines (A) et des nodularines (B). X et Z sont des acides aminés variables, R = H ou CH₃.

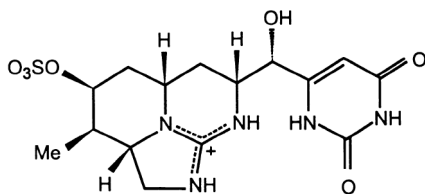


3.1.1.3. La cylindrospermopsine et ses analogues

La cylindrospermopsine est un alcaloïde de 415 Da possédant une unité guanidine tricyclique (figure I-2). C'est une molécule avec une structure de zwitterion, très polaire et très soluble dans l'eau (Chiswell *et al.* 1999), dont la toxicité exprimée en DL₅₀ à 24 h en injection intrapéritonéale sur souris est de 2,1 mg.kg⁻¹ (Ohtani *et al.* 1992). Cette molécule est peu stable dans un extrait algal (90 % de dégradation en 2-3 jours à la lumière du soleil), mais seule en solution sa demi-vie est supérieure à 10 jours (Chiswell *et al.* 1999).

À ce jour, deux variants de la cylindrospermopsine sont répertoriés, un toxique, la 7 épicylindrospermopsine et un non toxique, la désoxycylindrospermopsine (Briand *et al.* 2003).

Figure I-2 : Structure de la cylindrospermopsine.



3.1.2. Les neurotoxines

Les neurotoxines produites par les cyanobactéries sont regroupées en deux familles :

- les anatoxines ;
- la saxitoxine et ses dérivés.

Leur cible est la jonction neuro-musculaire avec un mode d'action spécifique à chacune des familles de neurotoxines.

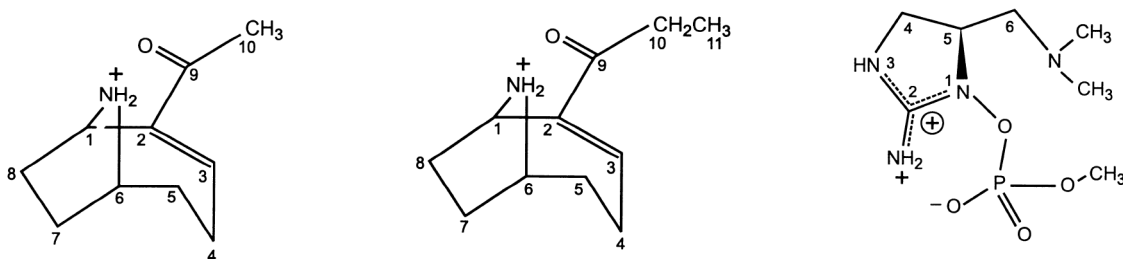
3.1.2.1. Les anatoxines

Les anatoxines sont des alcaloïdes synthétisés uniquement par des cyanobactéries (figure I-3).

L'anatoxine-a est une amine secondaire de 165 Da, soluble dans l'eau. Son homologue, l'homoanatoxine-a (179 Da), possède des propriétés physico-chimiques et toxicologiques très voisines. Leur toxicité sur souris exprimée en DL₅₀ i.p. est de 200 à 250 µg.kg⁻¹ (Sivonen & Jones 1999). Ces molécules sont peu stables et se dégradent rapidement en milieu naturel (Duy *et al.* 2000).

L'anatoxine-a(s) est un ester phosphate d'une N-hydroxyguanine cyclique de 252 Da. Sa toxicité sur souris exprimée en DL₅₀ à 24 h en i.p. est de 20 µg.kg⁻¹ (Sivonen & Jones 1999). Cette molécule est instable aux pH alcalins et à la chaleur (Carmichael *et al.* 1997).

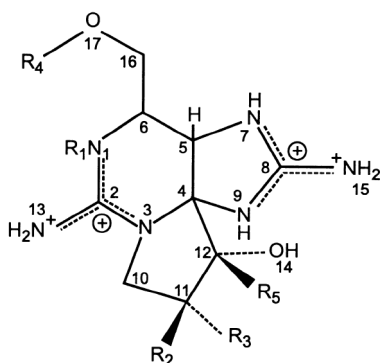
Figure I-3 : Structure des molécules d'anatoxine-a, homoanatoxine-a, anatoxine-a(s), de gauche à droite.



3.1.2.2. La saxitoxine et ses dérivés

Elles sont également produites, outre par les cyanobactéries, par certaines espèces de dinoflagellés marins (Robillot & Hennion 2001) et sont responsables, en milieu marin, d'intoxications neurologiques parfois mortelles connues sous le nom d'intoxication paralysante par les fruits de mer (IPFM) ou de « paralytic shellfish poisoning » (PSP) des anglo-saxons. Ce sont des alcaloïdes à un noyau tétrahydropurique (figure I-4). Vingt-cinq variants moléculaires de 241 à 491 Da sont connus à ce jour. Certains de ces variants sont non sulfatés tels que la saxitoxine, mono-sulfatés tels que les gonyautoxines (GTXs) ou doublement sulfatés tels que les C-toxines. Des études en laboratoire ont montré une grande stabilité de ces molécules, elles peuvent persister plusieurs mois dans l'eau. Des métabolites plus toxiques peuvent se former. Par exemple, l'évolution de C-toxines en GTXs par ébullition peut conduire à une augmentation transitoire de la toxicité d'un extrait, avant que ces dernières ne se dégradent (Negri & Jones 1995, Jones & Negri 1997, Negri *et al.* 1997, Sivonen & Jones 1999).

Figure I-4 : Structure générale des saxitoxines.

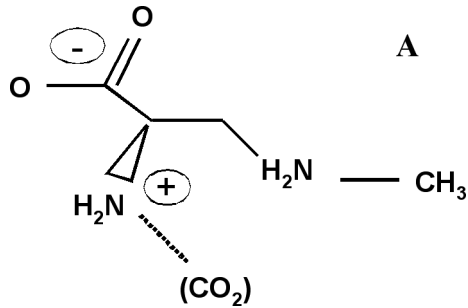


3.1.2.4. La β -N-méthylamino-L-alanine ou BMAA

La β -N-méthylamino-L-alanine (BMAA) est une molécule de type acide aminé non impliquée dans la synthèse ribosomale de protéine (figure I-5).

La BMAA est une neurotoxine qui provoque une excitation des neurones. Elle agit comme un agoniste du récepteur glutamate en mimant les effets de ce neurotransmetteur naturellement présent dans le cerveau.

Figure I-5 : Structure générale de la β -N-méthylamino-L-alanine ou BMAA (A), agoniste du récepteur du glutamate.



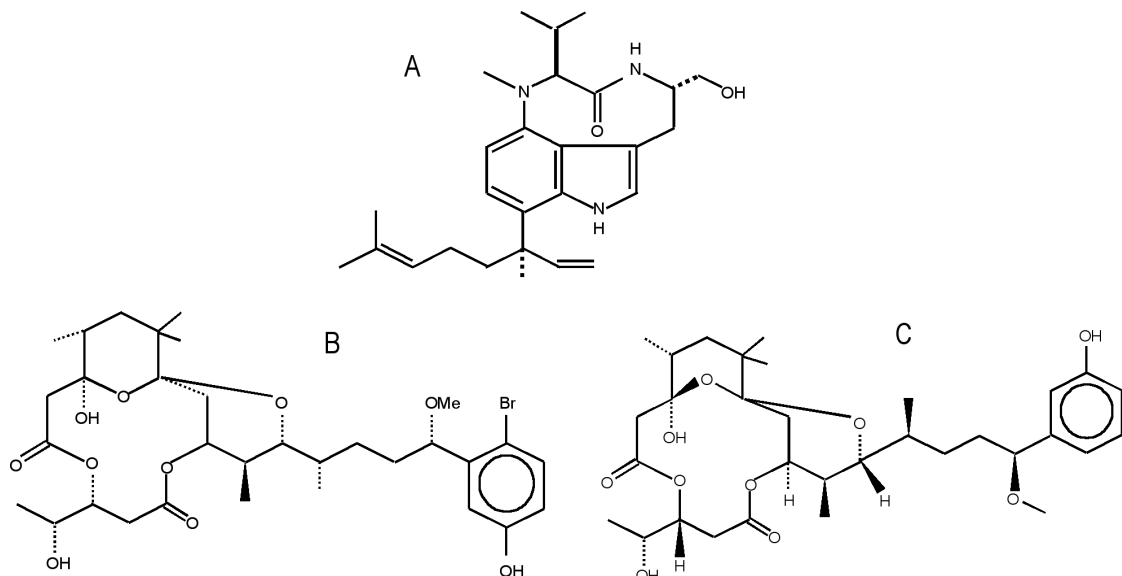
3.1.3. Les molécules à effets irritants

Des molécules à effets irritants, secrétées ou libérées par les cyanobactéries ont été identifiées dans les eaux de mer. Il s'agit de l'aplysiatoxine, la debromoaplysiatoxine (Mynderse *et al.* 1977) et la lyngbyatoxine-a (Cardellina *et al.* 1979). La structure générale de ces alcaloïdes dermatotoxiques est présentée en figure I-6.

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

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

Figure I-6 : Structure générale de toxines à effets irritants détectées dans les eaux marines : A lyngbyatoxines-a, B aplysiatoxines, C débromoaplysiatoxines.



3.2. Fonction métabolique et déterminisme de la production des cyanotoxines

La fonction métabolique des cyanotoxines reste à élucider. Cette problématique de recherche se structure autour des questions suivantes :

Pourquoi les cyanobactéries synthétisent-elles des cyanotoxines ?

Quel(s) bénéfice(s) en retirent-elles ?

Ce phénomène est-il la résultante d'une sélection clonale ?

Deux hypothèses peuvent être considérées :

- dans la première, les toxines sont des métabolites secondaires des cyanobactéries, dont la production, régulée au niveau cellulaire, est une réponse au stress. L'une des approches pour tester cette hypothèse est d'étudier le contrôle de la production des toxines en relation avec les variations des facteurs de l'environnement. Des études préliminaires en laboratoire et *in situ* ont montré une régulation de la production de toxines par certains facteurs tels que la température, la lumière, les concentrations en nutriments, la salinité et le pH. Une revue détaillée des travaux réalisés jusqu'en 1998 a été publiée par Sivonen et Jones (1999) ;
- la seconde hypothèse émergente est que les toxines sont des métabolites primaires, dont l'expression est constitutive. Le taux de production de microcystines par cellule dépendrait du taux de croissance des cellules et serait donc indirectement influencée par les facteurs environnementaux (Briand *et al.* 2005). La proportion relative de clones possédant ou non les gènes de synthèse des toxines déterminerait le niveau global de toxicité de la population qui prolifère.

Si l'on considère l'ensemble des derniers travaux recensés par Chorus (2001), il est de plus en plus admis que la production de microcystines est liée au métabolisme primaire et, par conséquent, directement corrélée à la croissance cellulaire des souches productrices de toxines. Toutefois d'autres études montrent que ce processus n'est pas exclusif (Araoz *et al.* 2005). Au vu des données actuelles, les questions citées précédemment restent non élucidées.

Le niveau de toxicité d'une population de cyanobactéries semble donc déterminé par :

- l'équilibre entre les souches toxiques et non toxiques ;
- l'état physiologique des clones toxiques contrôlant le niveau de synthèse des toxines.

Ces deux processus seraient influencés directement ou indirectement par les facteurs environnementaux (biotiques et abiotiques).

3.3. Distribution des cyanotoxines

3.3.1. Les hépatotoxines

3.3.1.1. Les microcystines

Parmi les hépatotoxines de structure cyclique, les microcystines sont les cyanotoxines les plus fréquemment répertoriées dans les phénomènes d'intoxications animales et humaines. Elles sont principalement produites par des espèces appartenant aux genres *Microcystis* et *Planktothrix*. On les retrouve également synthétisées par certaines espèces des genres *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Nostoc*, *Oscillatoria* et *Hapalosiphon* (Sivonen & Jones 1999, Couté & Bernard 2001, Gugger 2001).

Ainsi, elles ont été détectées, entre autres, dans des plans d'eau des pays suivants : Afrique du Sud, Australie, Chine, Japon, Canada, États-Unis d'Amérique, Allemagne, Danemark, Finlande, France, Portugal, Républiques Tchèque et Slovaque et Royaume-Uni.

La large distribution géographique des microcystines tient en partie au fait que les espèces appartenant au genre *Microcystis* prolifèrent dans les conditions les plus variées. Elles sont retrouvées sous les latitudes les plus septentrionales jusqu'aux régions les plus chaudes, dans des plans d'eau dont les caractéristiques physico-chimiques sont variables. La liste des pays précités est non exhaustive. En effet, de nombreuses efflorescences à *Microcystis* ont été observées dans d'autres pays, sans qu'il y ait eu systématiquement recherche de toxicité ou de toxines.

L'espèce *Planktothrix agardhii*, connue comme étant la plus toxique du genre, a une répartition géographique plus septentrionale. Elle produit dans la plupart des cas des microcystines. Les premiers travaux rapportent une hépatotoxicité provoquée chez la souris par des efflorescences à *P. agardhii* provenant des Pays-Bas (Leeuwangh

et al. 1983) et de Scandinavie (Berg et al. 1986). Les microcystines ont ensuite été identifiées comme responsables de cette toxicité (Meriluoto et al. 1989). En Allemagne, les travaux de Fastner et al. (1999) ont montré que de très nombreuses efflorescences à *P. agardhii* synthétisent des microcystines. De plus, il s'avère que cette espèce en produit des quantités aussi importantes que les espèces des genres *Microcystis* ou *Anabaena* (Henriksen 1996, Fastner et al. 1999, Chorus 2001).

Les variants de microcystines produits par les cyanobactéries sont extrêmement divers selon la souche impliquée, le site, les paramètres environnementaux (composition physico-chimique de l'eau, intensité lumineuse, température...), la période de l'année ou tout autre facteur influant sur la croissance cellulaire. L'identification de la ou des espèces de cyanobactéries principalement impliquées dans la prolifération ne permet pas de prédire avec précision le niveau de toxicité.

3.3.1.2. Les nodularines

La nodularine et ses variants sont produits par la cyanobactérie *Nodularia spumigena*. Les efflorescences de cette espèce ont été localisées en mer Baltique, ou dans les eaux saumâtres d'estuaires et de lacs côtiers en Australie, ainsi qu'en Nouvelle-Zélande (Francis 1878, Sivonen et al. 1989, Sivonen & Jones 1999).

3.3.1.3. La cylindrospermopsine

La cylindrospermopsine est principalement synthétisée par *Cylindrospermopsis raciborskii* (Ohtani et al. 1992). Un isomère de toxicité équivalente sur souris, la 7-épicylindrospermopsine, a été mis en évidence chez *Aphanizomenon ovalisporum* (Banker et al. 2000). De plus, un analogue moins toxique de la cylindrospermopsine, la désoxycylindrospermopsine, a été identifiée dans une souche de *C. raciborskii* (Norris et al. 1999).

La présence de cylindrospermopsine a été principalement répertoriée en Australie où de nombreux cas d'intoxication liés à la présence de *C. raciborskii* ont été observés. Récemment des souches de *C. raciborskii* produisant de la cylindrospermopsine ont également été signalées en Floride (États-unis) (Burns et al. 2000), en Thaïlande (Li et al. 2001), en Nouvelle-Zélande (Stirling & Quilliam 2001). Des proliférations de *C. raciborskii* se sont également révélées produire de la cylindrospermopsine en Allemagne (Fastner et al. 2003) et en Italie (Manti et al. 2005). Au Japon, cette toxine est produite par une souche d'*Umezakia natans* (Harada et al. 1994) et en Israël, par *Aphanizomenon ovalisporum* (Banker et al. 1997).

Plusieurs souches de *C. raciborskii* toxiques ont également été décrites en Europe (Underdal et al. 1999, Bernard et al. 2003, Fastner et al. 2003). La recherche de la cylindrospermopsine sur des souches isolées s'est avérée négative, bien qu'un effet toxique chez la souris, localisé au niveau du foie et/ou des poumons, ait été observé un certain temps après l'exposition. Les localisations hongroise et allemande de l'espèce *C. raciborskii* sont les plus septentrionales. En effet, cette espèce a été longtemps considérée comme tropicale ou sub-tropicale. Elle est actuellement signalée sur tous les continents et dans de nombreux pays (Sivonen & Jones 1999). La toxicité de *C. raciborskii* est variable et pas toujours corrélée à la présence de la cylindrospermopsine.

3.3.2. Les neurotoxines

3.3.2.1. Les anatoxines

Les anatoxines sont majoritairement produites par des cyanobactéries planctoniques appartenant aux genres *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Cylindrospermum* et *Aphanizomenon*.

L'anatoxine-a a été décrite pour la première fois chez l'espèce *Anabaena flos-aquae*, au Canada. Depuis, elle a été identifiée dans plusieurs souches d'*Anabaena* provenant de lacs finlandais, dans des souches isolées d'*Oscillatoria* d'origine écossaise, d'*Anabaena* et d'*Oscillatoria* provenant d'Irlande. L'anatoxine-a a également été identifiée dans des prélèvements en Allemagne et au Japon (Sivonen & Jones 1999, Araoz et al. 2005). Elle a été signalée en France, pour la première fois, en 2003, produite par l'espèce benthique *Phormidium favosum*. La synthèse d'anatoxine-a par une souche isolée a été confirmée (Gugger et al. 2005).

L'homoanatoxine-a a été caractérisée chez une souche d'*Oscillatoria formosa* isolée en Suède (Sivonen & Jones 1999). Elle a également été isolée en France, la souche productrice étant probablement du genre *Lyngbya* (A. Méjean et I. Iteman, Institut Pasteur, non publié).

Enfin, à ce jour, l'anatoxine-a(s) a été détectée dans des souches d'*Anabaena flos-aquae* isolées aux États-Unis et en Écosse, et dans une souche d'*Anabaena lemmermanii* du Danemark (Sivonen & Jones 1999).

3.3.2.2. La saxitoxine et ses dérivés

Quatre espèces de cyanobactéries sont connues comme productrices de saxitoxine ou de ses dérivés : *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena circinalis*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Lyngbya wollei* et une espèce du genre *Planktothrix* (Sivonen & Jones 1999). Ces espèces sont rencontrées dans de nombreux pays des deux hémisphères. Elles produisent aussi des cyanotoxines autres que les saxitoxines.

La saxitoxine et ses dérivés sont principalement retrouvés en Australie, aux États-Unis et au Brésil. Comme pour la majorité des toxines de cyanobactéries, l'absence d'étalons commercialisés de la plupart des saxitoxines réduit les possibilités de leur détection, ce qui constitue un élément restrictif à l'acquisition d'une vision globale de leur distribution.

L'espèce *Anabaena circinalis* est largement distribuée dans les rivières, ainsi que dans les réservoirs d'eau en Australie. Seules les souches australiennes sont à ce jour répertoriées comme productrices de saxitoxines. Contrairement au profil toxique des espèces produisant des microcystines, celui des espèces produisant des saxitoxines est relativement constant. Pour les souches d'*A. circinalis*, il est dominé par les C-toxines (Sivonen & Jones 1999).

Deux espèces de cyanobactéries, *Aphanizomenon flos-aquae* sur le continent nord américain et *Cylindrospermopsis raciborskii* au Brésil, sont connues pour produire des saxitoxines. La production de saxitoxines par les cyanobactéries semble donc localisée principalement dans les régions tropicales et sub-tropicales, majoritairement dans l'hémisphère sud et au niveau de l'équateur. Cependant, elles ont été récemment signalées en Europe : au Portugal, produites par l'espèce *Aphanizomenon flos-aquae* (Pereira *et al.* 2000), et en Italie. Dans ce pays elles sont produites par une espèce appartenant au genre *Planktothrix* (Pomati *et al.* 2000) et seraient responsables de la mort de poissons et de coquillages (Giovannardi *et al.* 1999, Pomati *et al.* 2000).

3.3.2.3. La BMAA

Cox *et al.* (2005) ont détecté la BMAA chez 95 % des genres (20/21) et 97 % des souches (29/30) de cyanobactéries étudiées provenant des États-unis d'Amérique, d'Europe, d'Inde, d'Israël ou de différents océans ou mers. La synthèse de la BMAA et son stockage dépendent des conditions de culture. Selon ces auteurs, cette molécule serait produite par toutes les cyanobactéries symbiotiques, planctoniques ou benthiques, qu'elles soient terrestres ou aquatiques (eau douce, eau saumâtre ou milieu marin).

La BMAA est retrouvée non seulement sous forme libre, mais également sous forme complexée, intégrée à des protéines, dont elle peut altérer le fonctionnement ; elle peut alors être libérée par hydrolyse acide. La BMAA peut être bioaccumulée à différents niveaux du réseau trophique après ingestion et incorporation dans des protéines qui fonctionnent comme un « réservoir endogène » de neurotoxine.

3.3.3. Les molécules à effets irritants

Des toxines irritantes, produites par des cyanobactéries benthiques, ont été identifiées en milieu marin, dans des régions tropicales et subtropicales. Elles ont été mises en évidence chez les genres *Lyngbya* (lyngbyatoxine, aplysiatoxine et débromoaplysiatoxine), *Schizothrix* (débromoaplysiatoxine et aplysiatoxine), *Oscillatoria* (débromoaplysiatoxine) et *Symploca* (aplysiatoxine). En revanche aucune de ces toxines n'a été identifiée en eau douce.

Des lipopolysaccharides (LPS) des parois des cyanobactéries sont suspectés d'être à l'origine d'effets d'irritation ou allergisants. Ces effets seraient donc susceptibles d'être observés lors de toute prolifération de cyanobactéries dans les eaux douces.

Tableau I-III : Synthèse des toxines identifiées en France et distribution dans les autres pays.

Toxines	Identification en France	Autres pays européens
Hépatotoxines		
Microcystines	MC-LR, MC-YR, MC-RR, MC-AR, MC-LF, MC-LW, MC-FR, MC-deLR, MC-deRR, MC-deLW, MC-deLF, MC-(O)Y, MC-m[Glu(OCH ₃)]-LR, MC-1030, 8 variants non identifiés.	Allemagne, Danemark, Finlande, Portugal, République Tchèque, République Slovène, Royaume-Uni, Grèce
Nodularines	non	Mer baltique
Cylindrospermopsine	non	Allemagne, Italie
Neurotoxines		
Anatoxine-a	oui	Allemagne, Finlande, Irlande
Homoanatoxine-a	oui	Norvège
Anatoxine-a(s)	non	Danemark, Écosse
Saxitoxines	non	Italie, Portugal
BMAA	Non recherchée	Pays-Bas, Royaume-Uni, mer baltique
Molécules à effets irritants		
Aplysiatoxines	Non recherchée	Non publiée
Debromoaplysiatoxines	Non recherchée	Non publiée
Lyngbyatoxines-a	Non recherchée	Non publiée

Points à retenir

- Les toxines de cyanobactéries ou cyanotoxines recouvrent une grande variété de structures chimiques et de mécanismes de toxicité.
- Leur(s) fonction(s) métabolique(s) reste(nt) à élucider.
- La présence des cyanotoxines est signalée sur tous les continents.
- La difficulté analytique inhérente à l'identification de certaines toxines masque probablement leur incidence sur le territoire français, comme par exemple pour l'anatoxine-a.
- Leur distribution au sein des espèces et des souches est variable et non prédictible.
- Les effets toxiques majeurs sont la neurotoxicité et l'hépatotoxicité.

II. Détection et quantification des cyanobactéries et de leurs toxines

1. Objectifs et mise en œuvre des méthodes de prélèvement

1.1. Objectifs des analyses et définition des prélèvements

Un travail d'identification par des analyses qualitatives est parfaitement adéquat pour obtenir des informations sur :

- la présence des cyanobactéries dans l'échantillon ;
- la proportion relative de cellules qu'elles représentent dans le peuplement ;
- l'identification des genres présents ;
- la toxicité potentielle de certains d'entre eux ;
- la présence de toxines.

En revanche un dénombrement cellulaire ou un dosage de toxines par des analyses quantitatives est nécessaire pour connaître :

- le nombre d'individus ou de cellules par unité de volume d'eau ;
- la concentration en toxines par unité de volume d'eau.

Les résultats analytiques sont le plus souvent rapportés à un volume d'eau. Plus rarement, ils peuvent être reliés à une biomasse, exprimée en matière fraîche ou en matière sèche.

Il est important de se souvenir que l'interprétation des résultats dépend totalement de la nature de l'échantillon (eau, écume, biomasse), de ses modalités de prélèvement (dispositif fermant ou pompe pour l'eau, ramassage au filet, décrochage de biofilm...) du choix de la position et de la profondeur de prélèvement (Leitão & Couté 2005).

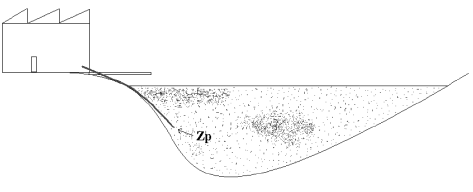
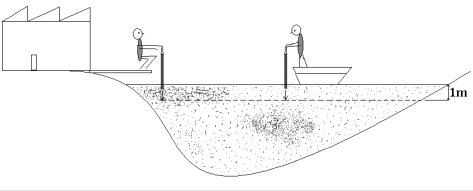
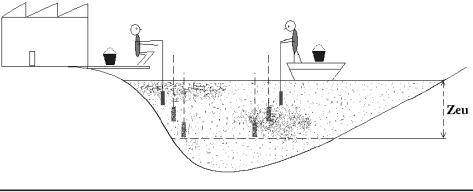
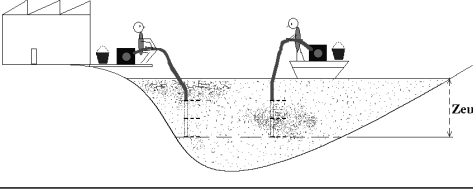
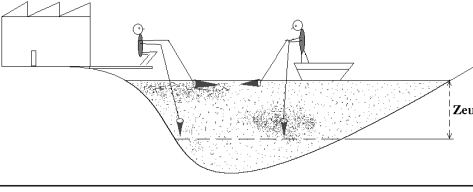
1.2. Nature et modalités du prélèvement

Les quatre premiers instruments de prélèvement présentés dans le tableau II-1 (robinet sur une installation de traitement de l'eau, tube échantillonneur, bouteille de prélèvement, pompe) procurent des échantillons d'eau sur lesquels il est possible de réaliser des analyses qualitatives et/ou quantitatives portant sur l'identification, les numérations des microorganismes et le dosage des toxines intra et extracellulaires.

Le prélèvement au filet à plancton (figure I – Livret couleur, tableau II-1) produit un échantillon de biomasse qui peut suffire pour des analyses qualitatives. Ce type de prélèvement, s'il est complété par un prélèvement d'eau permettant de rapporter les résultats obtenus sur la biomasse à un volume d'eau par la mesure de la masse de matière sèche ou le dosage de la chlorophylle, est parfois employé pour réaliser des analyses quantitatives estimatives. Cependant cette méthode introduit des erreurs et des biais : refoulement lors de la remontée du filet, colmatage, sélection des genres de grande taille... Avec cette méthode de prélèvement, seule la concentration intracellulaire en toxines peut être déterminée. Un prélèvement d'eau en parallèle est indispensable pour déterminer la concentration en toxines extracellulaires. Cette dernière information est importante car, en fonction de l'état physiologique des cellules de l'efflorescence, en phase de croissance ou de sénescence, les toxines, qui sont initialement intracellulaires, peuvent être libérées dans l'eau. Le prélèvement devra être réalisé en perturbant le moins possible le milieu.

Les genres benthiques peuvent également faire l'objet de prélèvements selon les protocoles développés par les équipes de recherche travaillant sur ces organismes.

Tableau II-I : Modalités et dispositifs de prélèvements (d'après Leitão & Couté 2005).

Source	Schéma	Couche d'eau prospectée	Volume d'eau prélevée	Avantages	Inconvénients	Usages suivis
Robinet usine (eau brute au captage ou eau traitée)		Au niveau Z_p correspondant à la profondeur du captage	1 litre	Facile et rapide échantillon identique à ce qui rentre dans l'usine même point d'échantillonnage que pour le contrôle.	Une seule profondeur échantillonnée / pas de prélèvement en surface (écume) / Insuffisant si distribution verticale hétérogène.	Alimentation en eau potable (AEP)
Tube échantillonneur		$Z = 0 - 1 \text{ m}$	1 litre	Assez facile si accès au bord ou barque bien représentatif du risque baignade adapté aux lacs peu profonds ou cours d'eau.	Peu représentatif si forte hétérogénéité verticale.	Baignade Suivis écologiques (avec réserves)
Bouteille de prélèvement		Zone euphotique (entre la surface et Z_{eu})	1 litre x nb de mètres de la Z_{eu}	Bonne représentation de la couche de production algale matériel robuste adapté pour les lacs profonds.	Coût de la bouteille élevé / échantillonnage long.	AEP Suivis écologiques
Pompe (péristaltique ou à turbine)		Zone euphotique (entre la surface et Z_{eu})	1 litre x nb de mètres de la Z_{eu}	Précision de la profondeur d'échantillonnage accès aux efflorescences en profondeur.	Alimentation électrique nécessaire / entretien important / précautions d'usage (espace mort de tuyau).	AEP Suivis écologiques
Filet à phytoplancton		Zone euphotique (entre la surface et Z_{eu})	quelques dizaines à quelques centaines de litres prospectés	Bonne représentation qualitative de la zone de production algale.	Entretien du filet / volume d'eau filtrée inconnu / échantillonnage sélectif (colmatage et refoulement) inadapté pour analyses quantitatives.	AEP Baignade Suivis écologiques

1.3. Lieu et profondeur de prélèvement

La principale difficulté inhérente à l'échantillonnage des cyanobactéries en milieu naturel est liée à l'hétérogénéité de leur distribution dans l'espace et dans le temps. Des proliférations semblent parfois se former subitement, tandis que d'autres, très visibles à un moment donné, disparaissent brutalement. Ceci est dû aussi bien aux migrations circadiennes (chapitre I, 1.2), qu'au cycle de vie des populations, à la prédation, aux conditions climatiques, etc. L'orientation et la force des vents peuvent aussi déplacer significativement les biomasses sur un même site.

Le lieu et la profondeur d'échantillonnage sont idéalement déterminés en fonction des informations souhaitées : évaluation du danger en un point donné (au point où le danger semble maximal) ou obtention d'une valeur moyenne. Les usages de l'eau entrent souvent en ligne de compte pour déterminer ces paramètres : baignade à partir de la rive, activités nautiques sur l'ensemble du plan d'eau, prise d'eau en profondeur pour la production d'eau d'alimentation, eau destinée à la consommation humaine distribuée par réseau.

Des considérations pratiques peuvent contraindre le choix du lieu et de la profondeur de prélèvement en milieu naturel : accessibilité du point de prélèvement souhaité, disponibilité du matériel de prélèvement (tableau II-1).

Les prélèvements effectués au robinet d'une usine de potabilisation ou à l'aide de la bouteille de prélèvement sont des échantillons représentatifs de la qualité de l'eau produite ou de l'eau captée à une certaine profondeur. En revanche les prélèvements réalisés au moyen d'un tube échantillonneur, d'une pompe péristaltique, voire d'un filet à plancton, peuvent fournir une information agrégée sur une hauteur d'eau, par exemple sur la zone euphotique où se développe le phytoplancton (cf. illustration tableau II-1).

Avant de procéder au prélèvement, une reconnaissance visuelle peut être recommandée pour arrêter définitivement le lieu de prélèvement en fonction de la stratégie choisie. Une fiche de terrain permet de consigner, outre les identifiants de la station et de l'échantillon proprement dit, la couleur de l'eau, la direction et l'intensité du vent, la présence ou non de dépôts colorés sur la berge, d'agglomérats en suspension ou en surface, ou toute observation pertinente (présence de poissons morts, mauvaises odeurs, ...). Ceci requiert une formation adéquate du préleveur.

Lorsque l'hétérogénéité de la distribution des cyanobactéries devient trop évidente, il est indispensable d'établir une stratégie de prélèvement statistiquement représentative pour obtenir une information la plus proche possible de la réalité. Ceci nécessite une bonne connaissance du site et un nombre d'échantillons qui devra être pris en compte dans les budgets prévisionnels.

1.4. Conservation et transport

Les prélèvements sont placés dans des flacons de capacité 0,5 L ou 1 L préférentiellement en verre, ce dernier matériau, bien que fragile, étant particulièrement indiqué pour les dosages de toxines qui peuvent s'adsorber sur les matériaux plastiques (Hyenstrand *et al.* 2001a, b). Pour des prélèvements destinés uniquement aux dénombrements cellulaires le matériau est indifférent.

Les échantillons doivent être transportés dans une glacière au frais et à l'obscurité. S'ils ne sont pas analysés immédiatement, les échantillons peuvent être conservés au réfrigérateur jusqu'à 24-48 h après le prélèvement. Il est préférable d'analyser immédiatement la fraction extracellulaire.

Les échantillons destinés à des analyses portant sur l'identification des cyanobactéries ou sur leur représentation dans la communauté phytoplanctonique peuvent également être fixés au lugol ou au formaldéhyde lors du prélèvement et être conservés à température ambiante à l'abri de la lumière. Le formaldéhyde est souvent le fixateur de choix (tableau II-II).

En revanche l'addition de tout fixateur est à proscrire pour les échantillons destinés à la quantification de toxines. Si ces deux types d'analyses sont souhaités, il est nécessaire de dupliquer les échantillons.

Tableau II-II : Caractéristiques des fixateurs.

Conservateur	Avantages	Inconvénients
Lugol 1 à 2 gouttes pour 100 mL d'échantillon	Faibles volumes utilisés. Très peu onéreux. Non toxique. Facilite la sédimentation.	Colore toutes les algues et peut rendre les observations difficiles. Ne permet pas le stockage à long terme. Doit être maintenu à l'obscurité.
Formol (Formaldéhyde) 5% dans l'échantillon	Incolore. Conservation longue durée. Peu onéreux.	Toxique par inhalation et par contact.

Pour les prélèvements d'eau de distribution publique généralement chlorée, il convient de neutraliser le chlore résiduel au moment du prélèvement par un ajout de thiosulfate de sodium afin de limiter la lyse cellulaire et ne pas influencer la répartition entre la fraction particulaire des toxines et la fraction dissoute. Il conviendra ensuite de tenir compte de cet ajout lors du choix du protocole d'analyse.

La congélation peut permettre de différer les analyses de toxines. Cependant, en raison de la rupture des cellules lors de la décongélation, le résultat correspond à la concentration totale de toxines par unité de volume prélevé, sauf si les fractions intracellulaires et extracellulaires ont préalablement été séparées par filtration.

2. Détection des proliférations, analyse des cyanobactéries

2.1. Détection des proliférations d'algues et de cyanobactéries

L'observation directe d'un hydrosystème est le moyen le plus simple de détecter une prolifération de cyanobactéries. La couleur de l'eau (coloration anormale ou variation de la coloration sur une période courte, de l'ordre de quelques jours) et l'aspect de la surface (accumulation de biomasse sous forme d'amas ou de film en surface) peuvent signaler une prolifération phytoplanctonique, éventuellement due à des cyanobactéries. Une coloration rouge ou vert-bleue est souvent assez spécifique du développement de cyanobactéries. Cependant, des proliférations en profondeur peuvent avoir lieu en l'absence de tout changement visible dans l'hydrosystème et la modification significative de couleur ne peut apparaître que très tardivement par rapport à la dynamique des proliférations.

2.1.1. Surveillance de paramètres indirects *in situ*

La significativité de ces paramètres par rapport aux proliférations phytoplanctoniques repose principalement sur l'observation d'une variation du signal mesuré sur une période courte, de l'ordre de quelques jours, ou au cours de la journée, en lien avec la physiologie de ces organismes. Ils impliquent donc, pour être utilisables, des mesures quotidiennes voire pluriquotidiennes. Cette contrainte est compensée, pour certains paramètres, par la disponibilité de capteurs en continu.

Aucun des paramètres décrits ci-dessous ne permet une détection spécifique des cyanobactéries.

2.1.1.1. Paramètres physiques

Ce sont des outils indicateurs de modifications des écosystèmes pouvant être en relation, entre autres, avec des évolutions des biomasses d'algues et de cyanobactéries.

Transparence

Les proliférations algales ou de cyanobactéries peuvent limiter la transparence de l'eau, ce qui constitue un signal d'alerte, en particulier sur un site ayant déjà été l'objet d'une prolifération de cyanobactéries.

La transparence de la colonne d'eau est mesurée à l'aide d'un dispositif intitulé « disque de Secchi » divisé en secteurs blancs et noirs que l'on immerge (figure J – Livret couleur). La transparence est exprimée par la profondeur à laquelle il n'est plus possible de discerner les secteurs blancs des secteurs noirs du disque.

On peut parler de variation de la transparence si une différence de 20 à 30 cm est observée entre deux mesures.

Cette méthode n'est pas normalisée, même si l'outil est largement utilisé en limnologie. D'emploi aisé et très économique, cette méthode est adaptée à une surveillance de routine quotidienne de la transparence.

Cette mesure de la transparence permet aussi d'évaluer la zone euphotique dans laquelle se développe le phytoplancton en multipliant la valeur mesurée par 2 et constitue, de ce fait, un bon indicateur de la zone d'échantillonnage.

Turbidité

La turbidité est basée sur la mesure de la lumière réfléchiée par des particules en suspension dans la colonne d'eau et sa valeur augmente globalement en relation avec le nombre de ces particules. Celles-ci peuvent être minérales ou organiques, et constituées par des microorganismes, dont le phytoplancton.

La mesure de la turbidité est réalisée à l'aide de turbidimètres selon la norme NF EN ISO 7027 et exprimée en NFU (Nephelometric Formazine Unit). Il existe des turbidimètres de terrain, de paillasse ou destinés à la mesure en continu qui nécessitent un entretien et un nettoyage régulier de la cellule de mesure.

En raison de la forte absorption de la lumière par le phytoplancton, le signal obtenu pourrait être faible par rapport à la densité équivalente en particules solides inertes. L'augmentation de la turbidité en présence de

cyanobactéries pourrait donc être limitée. *A contrario*, les phénomènes liés aux variations de l'hydrologie (crue, lessivage des sols, remise en suspension des sédiments) peuvent produire, par apports de particules minérales ou organiques, un signal important de turbidité comme une diminution de la transparence sans lien avec des proliférations de cyanobactéries. Cependant, ces phénomènes sont généralement bien identifiés par les gestionnaires, par corrélation avec d'autres paramètres (débit, pluviométrie...).

Compte tenu de ces interférences possibles, et en cas de prolifération avérée, cette méthode permet d'aider à l'appréciation de la répartition en profondeur du phénomène.

2.1.1.2. Paramètres chimiques

Pour ces paramètres liés au métabolisme basal du phytoplancton, les variations informatives sont celles qui sont observées entre le jour, où la photosynthèse est active, et la nuit, où la respiration est prépondérante (figure II-1). En pratique, la mesure de la situation nocturne peut être réalisée en début de matinée, celle de la période photosynthétique étant réalisée entre 12 h et 18 h.

Ces paramètres sont indicatifs de la présence d'une prolifération, dont les effets dépassent le bruit de fond du milieu. Ils ne sont pas nécessairement assez sensibles pour identifier le début d'une dynamique de prolifération.

Oxygène

L'oxygène produit par les organismes photosynthétiques est un bon indicateur de l'activité métabolique et de la quantité de biomasse présente. Il est produit en quantité importante pendant la journée avant d'être consommé par la respiration des microorganismes, des végétaux et des animaux aquatiques pendant la nuit. Par conséquent, l'amplitude des variations circadiennes de la concentration en oxygène peut donner une indication sur la présence et l'importance d'une prolifération.

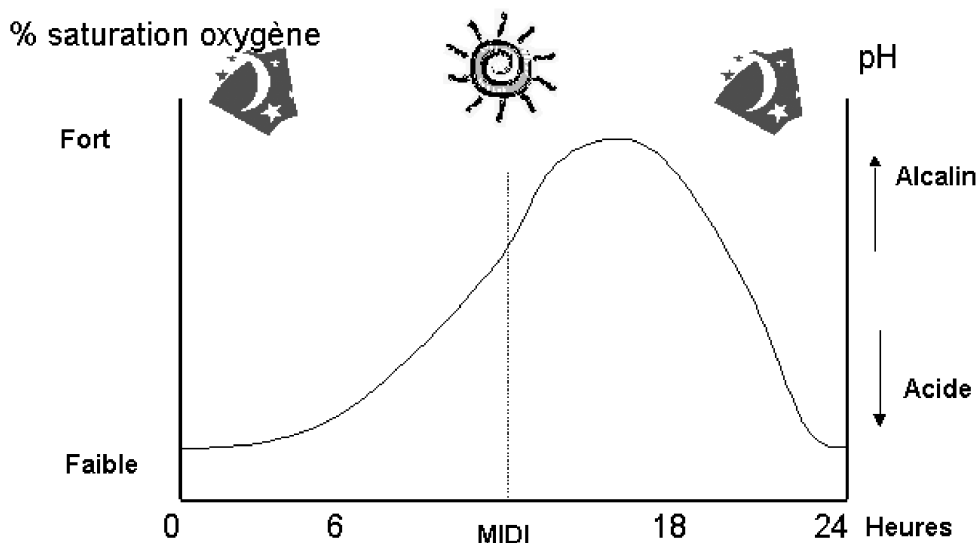
La variable mesurée est soit la concentration en oxygène exprimée en mg.L^{-1} , soit le pourcentage de la saturation en oxygène. La solubilité de l'oxygène dépend principalement de la température de l'eau et doit donc être mesurée sur site à l'aide des oxymètres de terrain manuel ou en continu. Plus les oscillations journalières deviennent amples et plus la production phytoplanctonique est élevée. Toutefois, elle peut être induite par d'autres organismes phytoplanctoniques que les cyanobactéries.

pH

Dans les eaux faiblement minéralisées, le pH peut évoluer de une à parfois plus de 2 unités dans la journée, en relation avec la photosynthèse et la respiration de la biomasse.

La grandeur informative de la présence d'une prolifération est l'amplitude de sa variation circadienne. Elle dépend de l'activité photosynthétique, du pouvoir tampon de l'eau et de son pH naturel. Une règle simple suggère que les variations sont significatives, dans un milieu peu tamponné, à partir de 0,5 unités pH pour des analyses réalisées sur le terrain.

Figure II-1 : Schéma de principe illustrant une variation jour-nuit de la saturation en oxygène et du pH en présence d'une prolifération phytoplanctonique (J. Duchemin, AESN).



2.1.2. Surveillance des populations phytoplanctoniques

Il est aussi possible de surveiller des paramètres plus spécifiquement liés aux communautés des organismes photosynthétiques, voire aux cyanobactéries.

2.1.2.1. Dosage de la chlorophylle *a*

La quantité de chlorophylle *a* est corrélée à la biomasse vivante des organismes photosynthétiques (algues et cyanobactéries). Comme pour d'autres paramètres, la stratégie d'échantillonnage joue un rôle très important pour l'interprétation et l'analyse de la situation d'un site.

Il existe deux méthodes normalisées pour le dosage de la chlorophylle *a* : la spectrophotométrie après extraction à l'acétone à 90 % (Afnor T90-117) et la chromatographie liquide haute performance ou CLHP (Afnor T90-116).

La mesure par spectrophotométrie peut être pratiquée sur site à condition de disposer d'un appareillage spécifique, mais les analyses de référence par CLHP sont menées en laboratoire.

Compte tenu de la sensibilité de ces méthodes, il est possible de les utiliser pour détecter des proliférations phytoplanctoniques à un stade précoce et pour suivre la dynamique de la prolifération. En revanche, la chlorophylle *a* n'est pas spécifique des cyanobactéries et leur teneur cellulaire moyenne est souvent inférieure à celles des microalgues. Une diminution de la concentration de l'eau en chlorophylle *a* peut donc masquer le remplacement d'une communauté algale par une prolifération de cyanobactéries. Ce phénomène écologique de succession saisonnière de communautés est fréquent. Il convient donc de mettre en œuvre des moyens spécifiques aux cyanobactéries pour compléter l'information fournie par la mesure de la chlorophylle *a*.

2.1.2.2. Analyse de la fluorescence pigmentaire

Grâce aux différences existant dans la composition pigmentaire des différents microorganismes photosynthétiques, il est possible de qualifier et de quantifier les cyanobactéries par analyse de la fluorescence émise par les cellules excitées par stimulation lumineuse.

Deux types de sondes submersibles basées sur ce principe sont actuellement commercialisées :

- la première, mise sur le marché en 2002, permet de distinguer les différentes classes de microorganismes photosynthétiques (chlorophycées, diatomées, cyanobactéries, cryptophycées) par la mesure de l'émission de fluorescence à 680 nm, caractéristique de la chlorophylle *a*, après excitation à des longueurs d'onde spécifiques des différents types de pigments accessoires (Beutler *et al.* 2002). L'information recueillie est traitée par un logiciel qui fournit une estimation de la quantité (exprimée en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'équivalent chlorophylle *a*) des différentes classes de microorganismes photosynthétiques présents. Ces estimations sont présentées sous la forme d'un profil vertical de distribution dans la colonne d'eau puisque la sonde est aussi équipée d'un capteur de pression (et également d'un capteur de température). Les avantages, mais aussi les limites de cette sonde, ont fait l'objet de deux publications récentes (Leboulanger *et al.* 2002, Gregor & Marsalek 2004) ;
- la seconde, mise sur le marché en 2004, est dédiée aux cyanobactéries puisqu'elle repose uniquement sur l'excitation de la phycocyanine qui est le pigment bleu des cyanobactéries. Ses résultats sont exprimés en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de phycocyanine. À l'heure actuelle, aucune étude publiée ne permet de connaître les avantages et les limites de cet outil.

Ces méthodes, qui sont encore en cours de validation, sont prometteuses car elles pourraient permettre à terme de s'affranchir des difficultés actuelles rencontrées pour le suivi des cyanobactéries. En effet, à la différence des comptages au microscope, l'estimation de la quantité et de la distribution dans la colonne d'eau des cyanobactéries est très rapide (quelques minutes) ce qui autorise un suivi en plusieurs points d'un plan d'eau lorsque cela est nécessaire (distribution non homogène des cyanobactéries). Enfin ces méthodologies peuvent être utilisées pour le suivi des cyanobactéries benthiques dont l'échantillonnage était jusqu'ici très difficile à réaliser.

Des dispositifs similaires basés sur l'analyse pigmentaire sont aussi actuellement développés sous la forme de stations fixes plus adaptées au suivi de la qualité des eaux en entrée d'usine de traitement des eaux d'alimentation (Beutler *et al.* 2002, Paresys *et al.* 2005).

2.1.3. Détection à distance

Les cellules algales absorbent certaines longueurs d'ondes en réponse à l'excitation par la lumière solaire.

Certains satellites d'observation (SeaWiFS, Envisat) sont équipés de dispositifs d'enregistrement des ondes émises à la surface de la terre et restituent des images dont des processus de traitement adaptés extraient des

informations quantitatives sur les formations végétales aériennes ou aquatiques. L'analyse de séries temporelles d'images peut permettre la détection des proliférations superficielles. Le problème principal est la résolution (1,1 à 4,5 km pour SeaWiFS) qui fait que ces dispositifs sont destinés à évaluer des aires étendues : milieu marin ou grands lacs. Avec l'évolution des technologies, les images pourraient servir à la quantification précoce des proliférations, mais sous réserve d'une organisation de l'achat des images et de leur traitement, inenvisageable au niveau d'un site particulier.

2.2. Identification et quantification des cyanobactéries dans les eaux

Toutes les proliférations phytoplanctoniques ne constituent pas un danger pour la santé, ce qui implique une analyse détaillée du risque sanitaire pour chaque situation.

À quelques exceptions près, qui sont signalées, les méthodes présentées ci-dessous sont pratiquées en laboratoire et imposent donc de recourir à des prélèvements.

2.2.1. Identification des cyanobactéries

2.2.1.1. Observation microscopique sans quantification

L'observation au microscope optique d'un échantillon d'eau conduit à l'identification taxonomique des différentes classes de microalgues présentes ainsi que des cyanobactéries.

Comme pour les méthodes suivantes, les performances sont conditionnées notamment par le type et la qualité de l'échantillonnage et par la conservation du prélèvement. Un grossissement de 200 x à 1 000 x permet de distinguer la plupart des cyanobactéries des autres constituants du phytoplancton.

Il n'existe pas de méthode normalisée. Cette détermination taxonomique est réalisée par des phycologues ou des techniciens formés à cette analyse. Si la détermination au niveau du genre est relativement aisée et peut être mise en oeuvre en routine après formation, celle au niveau de l'espèce, basée sur des critères morphologiques, reste l'apanage de spécialistes. De plus, la détermination au niveau de l'espèce est actuellement remise en cause par les approches moléculaires qui vont sans doute profondément modifier la taxonomie des cyanobactéries dans les prochaines années.

La détermination du genre est essentielle pour identifier une toxicité potentielle tout en sachant que celle-ci pourra varier de façon très importante en fonction du génotype et donc des souches. La formation initiale du personnel chargé de l'identification doit être réalisée par des experts.

2.2.1.2. Méthodes en développement

Les progrès accomplis en biologie moléculaire ont permis le développement de méthodes basées sur des sondes oligonucléotidiques spécifiques d'un genre ou d'un gène et permettant de détecter au sein d'un mélange de populations la cible recherchée. Ces méthodes sont en développement et doivent mettre en oeuvre des protocoles permettant d'éviter les interférences sur les signaux comme par exemple l'auto-fluorescence des cellules ou les effets inhibiteurs des matrices aqueuses. Les mises en oeuvre se font :

- par hybridation *in situ* directement dans la cellule bactérienne. La spécificité des sondes permet d'identifier, dans un échantillon naturel ou un tapis bactérien, des cyanobactéries appartenant aux genres visés par les sondes. Cet outil peut donc permettre de détecter la présence de genres potentiellement toxiques dans une efflorescence (Schönhuber *et al.* 1999) ;
- par amplification par la méthode PCR afin de détecter dans un échantillon d'eau des cellules de genres potentiellement toxiques. En association à l'identification du genre, la présence des gènes responsables de la synthèse des microcystines peut aussi être recherchée et ainsi donner une indication sur le potentiel toxique des cyanobactéries présentes. Des travaux portant sur l'utilisation de la méthode PCR en temps réel ont montré que cette technique permet une approche semi-quantitative en évaluant le nombre de génomes pour un genre donné de cyanobactéries. La proportion du génotype toxique au sein de la population peut également être évaluée grâce à cette approche (Kurmayer & Kutzenberger 2003, Vaitomaa *et al.* 2003) ;
- par l'usage de puces à ADN. Le greffage sur supports solides d'oligonucléotides spécifiques des principales espèces ou principaux genres de cyanobactéries a permis le développement récent de puces à ADN qui permettent de détecter les espèces ou genres présents et de procéder à une semi-quantification (Castiglioni *et al.* 2004).

2.2.2. Dénombrement cellulaire et quantification de la biomasse

Une fois la présence de cyanobactéries potentiellement toxiques avérée, la quantification de la biomasse de cyanobactéries peut permettre d'évaluer l'importance de la prolifération et de sa toxicité potentielle. Elle se situe en amont ou en complément à la recherche de toxines. Si la quantification porte sur tout le phytoplancton, elle informe également sur la dynamique de la prolifération des cyanobactéries (minoritaire, dominante). La quantification de la biomasse de cyanobactéries peut être exprimée par différentes unités selon la méthode retenue.

2.2.2.1. Dénombrement de cellules, de colonies ou de filaments

Le dénombrement est réalisé par observation en microscopie optique d'un échantillon d'eau de volume connu, qui peut avoir fait l'objet d'une pré-concentration ou d'une dilution.

Le nombre de cellules, colonies, filaments ou trichomes de chaque genre ou espèce est déterminé. Pour les cyanobactéries filamenteuses, le comptage peut se faire en nombre de filaments, et pour les coloniales, en nombre de colonies par millilitre. Les recommandations sanitaires internationales font référence à des concentrations exprimées en cellules par millilitre.

L'incertitude de la numération dépend du nombre d'objets comptés (cellules ou colonies). Elle est, pour des spécialistes formés et entraînés, de l'ordre de 20 % pour une centaine d'unités dénombrées et de respectivement 10 % et 5 % pour 400 et 1600 unités dénombrées. Dans une première approximation, l'erreur relative est considérée comme inversement proportionnelle à la racine carrée du nombre d'objets comptés.

Les protocoles opératoires peuvent varier selon les laboratoires et il existe plusieurs méthodes de dénombrement.

En cours de normalisation par le CEN (CEN TC 230/WG 2/TG 3/N73 « Water quality – Guidance standard for the routine analysis of phytoplankton abundance and composition using inverted microscopy (Utermöhl technique) »), le comptage par la technique de Utermöhl (1958) est réalisé avec un microscope inversé et des cuves de sédimentation à fond transparent de volume variable (Sournia 1978). La sédimentation peut prendre quelques heures à une journée.

Le comptage par microscopie directe sur des cellules de numération de Malassez (1 µL), Nageotte (50 µL) ou Neubauer (60 µL). Ces dernières sont préférables à la première en raison de leur plus grand volume. Cette méthode est rapide car elle ne nécessite pas d'attendre la sédimentation des cellules.

Ces deux méthodes considérées comme pouvant être employées en routine sont très chronophages en fonction de la précision requise et du nombre d'espèces à différencier. Il leur est souvent reproché de ne pas prendre en compte la variabilité de la taille des cellules entre espèces. Des procédures de comptage rapide sont souvent développées régionalement dans le cadre de programmes de surveillance. Elles sont adaptées en fonction des caractéristiques des efflorescences locales (prévalence d'un taxon ou grande diversité spécifique, espèce filamenteuse ou coccoïde, formant colonies ou composée de filaments ou de cellules distinctes).

Le dénombrement permet d'évaluer la part des cyanobactéries dans le peuplement phytoplanctonique, tout en identifiant la présence de genres potentiellement producteurs de cyanotoxines.

2.2.2.2. Comptage par utilisation de la cytométrie en flux

Le cytomètre en flux est un appareil qui permet de compter des cellules individuelles entraînées dans un flux liquide. Ces cellules traitées par un colorant fluorescent et alignées les unes derrière les autres dans ce flux sont excitées par une source lumineuse, un laser en général. Elles émettent alors des signaux de fluorescence qui sont captés par un détecteur, permettant ainsi l'obtention d'informations sur leur nombre (que l'on peut rapporter à un volume) mais aussi sur certains paramètres physiologiques (contenu en ADN par exemple). Cette technique est déjà couramment utilisée pour le dénombrement des picocyanobactéries en milieu marin. Elle est en cours de développement pour l'ensemble des cyanobactéries des eaux douces. Son avantage principal réside dans l'obtention, en quelques secondes et avec une très grande précision, d'un dénombrement cellulaire. Cependant cette technique n'est pas actuellement adaptée aux cyanobactéries organisées en trichomes, en filaments ou en colonies.

2.2.2.3. Dosage de la chlorophylle a

Le principe et les caractéristiques de la méthode sont identiques à celles présentées au 2.1.2.1 et ne présente pas de spécificité vis-à-vis des cyanobactéries sauf si l'observation microscopique préalable a révélé que la communauté phytoplanctonique était dominée significativement par des cyanobactéries.

Cette méthode rapide et simple, lorsque la mesure est réalisée par spectrophotométrie, entraîne une surestimation de la biomasse de cyanobactéries, si d'autres populations phytoplanctoniques sont présentes en proportion notable.

Certains travaux ont essayé de proposer des correspondances entre la concentration en chlorophylle *a* et le nombre de cellules pour différentes espèces d'intérêt, afin de faciliter l'application des seuils de gestion proposés par l'OMS (SEHD 2002).

L'équivalence de 10 µg.L⁻¹ de chlorophylle *a* pour 20 000 cellules de cyanobactéries par mL est souvent avancée mais pour l'Ouest de la France après suivi de 26 sites et de plus de 300 échantillons durant presque six mois en 2002, la relation semble davantage être de 30-40 µg.L⁻¹ de chlorophylle *a* pour 20 000 cyanobactéries par mL (DGS *et al.* 2004).

Le rapport entre chlorophylle *a* et phaeophytine *a* donne des indications sur l'état physiologique des algues de l'efflorescence ou de la qualité de la conservation de l'échantillon : un taux important de phaeophytine *a* traduit une sénescence, donc un relargage potentiel de toxines ou une mauvaise conservation de l'échantillon.

2.2.2.4. Mesure de la masse de matière sèche

La grandeur mesurée est la masse de l'échantillon après lyophilisation, rapportée au volume initial de l'échantillon. Cette méthode est assez sensible mais elle ne permet pas d'estimer le peuplement de cyanobactéries si d'autres classes de phytoplancton sont représentées dans la prolifération ou si l'échantillon comprend beaucoup de matières minérales en suspension.

Sur culture pure en laboratoire, la concentration en toxines est mieux corrélée avec la masse de matière sèche d'un échantillon qu'avec le nombre de cellules.

Outre le biais lié à la composition spécifique de l'échantillon, l'incertitude liée aux particules minérales ou organiques présentes dans l'échantillon d'eau atténue encore l'intérêt de cette méthode globale par rapport au dosage de la chlorophylle *a* par exemple. Cette méthode est plutôt utilisée dans le domaine de la recherche. Deux méthodes normalisées peuvent être utilisées pour procéder à ces mesures.

2.2.2.5. Calcul du biovolume

Le biovolume est calculé par estimation du volume cellulaire moyen pour chaque espèce de l'échantillon et multiplication par le nombre de cellules par unité de volume. Chaque cellule est assimilée à une forme géométrique simple, cylindre, sphère... (Lund & Talling 1957, Lund *et al.* 1958, Osmera 1966, Rott 1981).

Cette méthode n'est pas normalisée. Elle exige beaucoup de temps et de précision dans les mesures, et reste plutôt vouée au domaine de la recherche.

Il s'agit d'estimer pour chaque espèce de l'échantillon le volume cellulaire associé, afin de s'affranchir du biais de la concentration cellulaire qui n'intègre pas la différence de taille des cellules selon les espèces. Le biovolume est assimilé à une masse de matière fraîche, en considérant que ces organismes ont la même densité que l'eau.

2.2.3. Étude de l'intégrité des cellules

Cette méthode, qui n'est pas normalisée et dont les applications sont plutôt du domaine de la recherche, peut permettre d'évaluer l'effet d'un traitement sur l'état physiologique des cellules et ainsi d'évaluer le potentiel de relargage de toxines intracellulaires.

L'intégrité de la paroi des cyanobactéries peut être évaluée par des techniques de fluorescence. Les cellules dont les membranes cellulaires sont intactes sont colorées par le diacétate de fluorescéine, tandis que les cellules dont les membranes sont endommagées prennent la coloration de l'iodure de propidium (Drikas *et al.* 2001a).

La capacité de ces méthodes à fournir différentes informations est résumée dans le tableau II-III.

Tableau II-III : Aptitude des méthodes disponibles à fournir différentes informations. +/- signifie : imparfaitement adapté, +: parfaitement adapté, -: inadapté.

Méthodes	Détection des proliférations	Détection des cyanobactéries	Identification des genres toxigènes	Quantification des cyanobactéries	Méthode normalisée
Observation visuelle	+/-	+/- (avec expérience)	-	-	non
Transparence	+/-	-	-	-	non
Turbidité	-	-	-	-	oui
Dosage O ₂ (variation jour/nuit)	+/-	-	-	-	oui
Dosage pH (variation jour/nuit)	+/-	-	-	-	oui
Sonde fluorimétrique	+	+	-	+	non
Observation microscopique	+	+	+	+/-	en cours
Dosage de Chl <i>a</i>	+	-	-	+/- (si classe dominante)	oui

Points à retenir

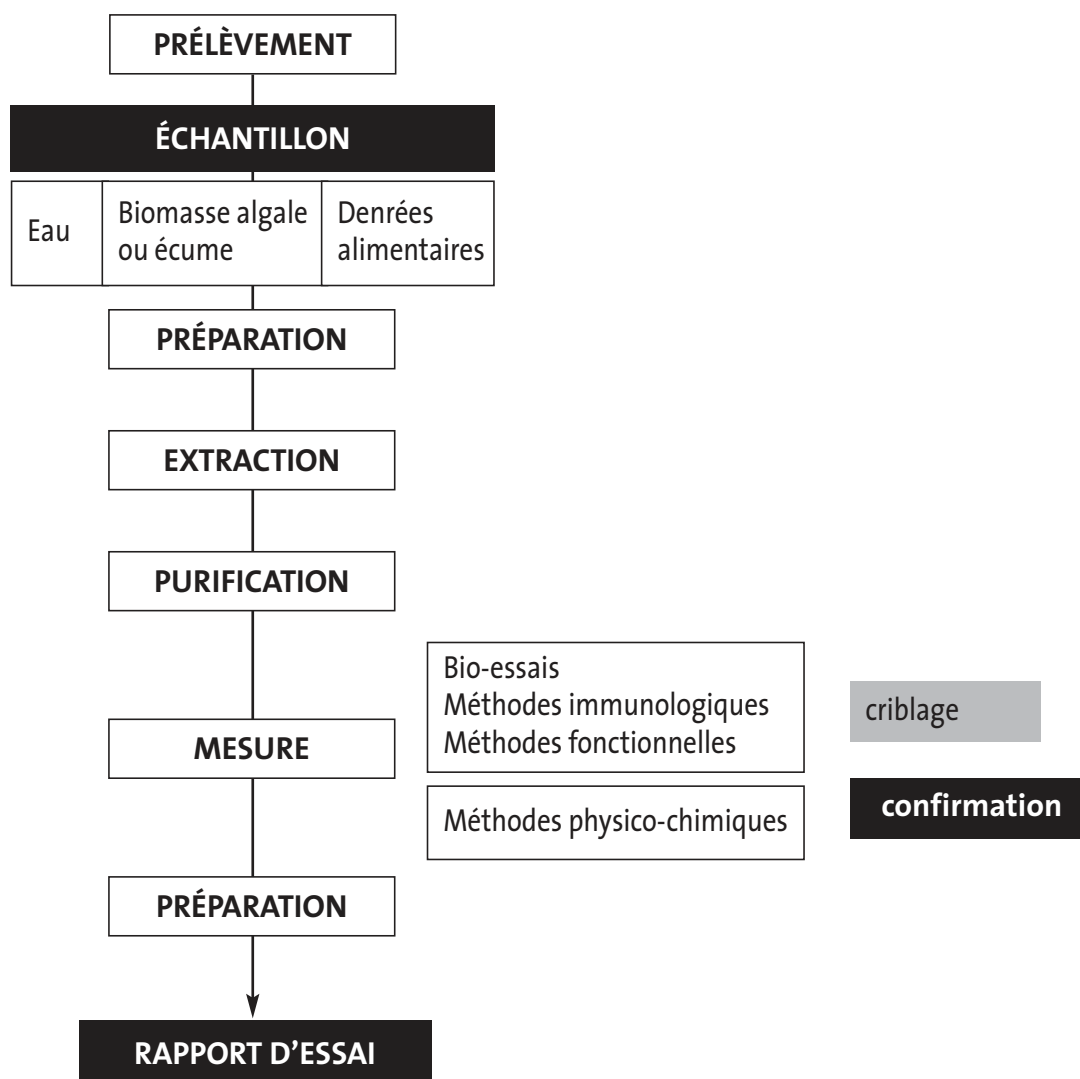
- La grande variabilité temporelle et spatiale des efflorescences de cyanobactéries nécessite que les stratégies et les techniques de prélèvement soient déterminées avec rigueur pour que les résultats soient interprétables.
- En routine, seule l'observation microscopique par un personnel entraîné permet la détermination spécifique et la numération des cyanobactéries. Les méthodes sont en cours de normalisation par le CEN.
- Les méthodes non spécifiques peuvent être des indicateurs utilisables pour le dépistage et pour l'aide à la surveillance des proliférations de cyanobactéries.
- L'historique des suivis phytoplanctoniques sur plusieurs années permet de hiérarchiser les sites à risques.

3. Détection et analyse des cyanotoxines

3.1. Préparation de l'échantillon

Il existe une gamme étendue de méthodes utilisées en laboratoire pour détecter, identifier et quantifier les cyanotoxines dans l'eau, dans la biomasse algale ou dans les denrées alimentaires. Avant toute mesure de l'analyte, il faut procéder à la préparation de l'échantillon pour obtenir un dosage fiable. C'est au niveau des étapes de préparation mais surtout d'extraction et de purification que les différences de protocole entre l'analyse des diverses matont les plus importantes.

Figure II-2 : Stratégie analytique suivie pour l'analyse des cyanotoxines dans l'eau et les denrées alimentaires, de la collecte de l'échantillon au rapport d'essai.



La préparation d'un échantillon d'eau brute comprend en particulier la séparation des fractions solide et liquide. Cette séparation est indispensable pour distinguer les toxines intracellulaires, liées à la fraction solide, des toxines extracellulaires, en solution dans le milieu (fraction liquide). La concentration totale de toxines par unité de volume peut être obtenue par la somme de ces résultats, si l'échantillon permet des analyses quantitatives. Dans le cas d'un échantillon prélevé au filet ou d'un échantillon d'écume, la concentration en toxines doit être rapportée à la biomasse sèche.

3.2. Extraction et purification des toxines

Les échantillons doivent être préparés de façon à optimiser l'extraction des toxines tout en limitant l'extraction concomitante de matières organiques susceptibles d'interférer avec les toxines.

3.2.1. Toxines dissoutes dans les eaux

L'extraction et la concentration, à partir d'échantillons d'eau filtrée, des toxines dont la polarité est nulle (hydrophobes) à importante (hydrophile) repose le plus souvent sur une technique liquide-solide sur cartouche avec différents supports d'adsorption selon la nature des toxines. Ainsi, la silice greffée n-octadécyle (C₁₈) est l'adsorbant le plus utilisé pour les cyanotoxines hydrophobes à modérément hydrophiles. Elle convient parfaitement pour l'extraction des microcystines. En revanche, elle est inutilisable pour les toxines les plus polaires (anatoxine-a, cylindrospermopsine, saxitoxines).

L'extraction de l'anatoxine-a repose sur l'emploi de cartouches remplies de copolymères de styrène divinylbenzène apolaires et de N-vinylpyrrolidone qui présentent un spectre d'extraction beaucoup plus large et qui sont également adaptées à l'extraction des toxines polaires, cylindrospermopsine et saxitoxines.

3.2.1. Biomasse de cyanobactéries

3.2.1.1. Extraction

L'extraction est pratiquée sur la fraction solide de l'échantillon préalablement séparée par filtration sur un support de maille de 1 à 2 µm. Elle est réalisée par un solvant ou un mélange de solvants directement sur le matériel ainsi isolé, conformément à la dernière version du projet de norme ISO/FDIS 20179, ou après lyophilisation. Le choix d'un solvant acidifié permet de limiter la co-extraction de protéines cellulaires (Harada *et al.* 1994). L'efficacité de ces approches dépend bien évidemment de la matrice concernée et du type de cyanotoxine visé. Ainsi, l'acide acétique s'avère plus efficace pour les microcystines les plus polaires, mais très médiocre pour les plus hydrophobes d'entre elles (Lawton *et al.* 1994b). Le méthanol s'avère être un solvant bien adapté, car il présente l'avantage de combiner un bon rendement d'extraction et une moindre difficulté d'évaporation. Cependant, utilisé seul, il ne permet qu'un médiocre recouvrement des microcystines très polaires.

Les connaissances acquises pour les microcystines soulignent qu'il est indispensable de recourir à des extractions successives avec des solvants de polarités différentes pour toute famille de toxines dont les différents analogues sont de polarité variable. Il a aussi été montré que l'extraction à partir d'un lyophilisat nécessite la présence d'eau dans le solvant d'extraction (Fastner *et al.* 1998).

À titre d'exemple, pour les microcystines, l'extraction est réalisée trois fois par un volume de mélange méthanol-eau (75-25 V/V). Les trois extraits sont rassemblés dans un même récipient qui est soumis à sonication sur de la glace. L'extrait sera ensuite purifié sur cartouche.

Tableau II-IV : Exemples de solvants utilisés pour l'extraction des différentes cyanotoxines.

Toxines	Solvants d'extraction	Références ou expertise des membres du groupe
Microcystines	Méthanol - eau	Projet de norme ISO/FDIS 20179
Cylindrospermopsine	Méthanol pur Solution d'acide acétique 5%	(Harada <i>et al.</i> 1994, Eaglesham <i>et al.</i> 1999) (Hawkins <i>et al.</i> 1997)
Anatoxine-a	Milieux aqueux, acidifiés ou non (0,05 M acide acétique par exemple) Mélange eau - méthanol	(Robillot & Hennion, 2001)
Saxitoxines	Acide acétique Solution acide (pH 3) avec 25% de méthanol	(Carmichael <i>et al.</i> 1997)

Il est important de noter qu'en dehors des microcystines les solvants indiqués sont issus de travaux de recherche qui n'ont pas été mis à l'épreuve de validations.

3.2.1.2. Purification des extraits

Les procédures de purification des extraits s'appuient couramment sur l'extraction sur phase solide (SPE) généralement en phase inverse sur support C₁₈.

À titre d'exemple, pour les microcystines, l'extrait est déposé sur une cartouche de résine C₁₈ préalablement conditionnée, le flacon contenant l'extrait est rincé par du mélange méthanol-eau ensuite déposé sur la cartouche. Pour éliminer les matières organiques non retenues, la cartouche est lavée par quelques ml de mélange méthanol-eau (20-80 V/V). Les microcystines retenues sont alors éluées par un mélange méthanol/eau (90-10 V/V) acidifié par 0,1 % d'acide formique. L'éluat est évaporé sous azote puis dissout dans 50 µl d'un mélange méthanol/eau (20-80 V/V) avant d'être mis en flacons d'analyse. L'extrait est prêt pour l'analyse par chromatographie.

3.2.3. Cas des matrices complexes : poissons, légumes et compléments alimentaires

3.2.3.1. Extraction

Dans les matrices complexes comme le poisson, le problème est de réaliser une extraction complète des toxines tout en minimisant la co-extraction d'interférences comme des protéines cellulaires, de la matière grasse, et plus particulièrement les phospholipides, qui pourraient perturber ultérieurement l'analyse par chromatographie.

Dans le cas des microcystines, différents solvants d'extraction similaires à ceux utilisés pour la biomasse des cyanobactéries ont été testés. Comme pour l'extraction de la biomasse des cyanobactéries, les mélanges méthanol-eau peuvent varier majoritairement du solvant pur (Zurawell *et al.* 1999, Magalhaes *et al.* 2003) au méthanol à 75 % dans l'eau (Lawrence & Menard 2001). Le mélange méthanol-eau (75-25 V/V) retenu par le projet de norme ISO/FDIS 20179 présente l'avantage d'extraire à la fois les microcystines hydrophobes et les microcystines les plus polaires. Quel que soit le solvant, l'extraction des toxines reste cependant incomplète. En effet, les microcystines sont majoritairement liées de façon covalente aux protéines phosphatases de la matrice. Seule la fraction libre des microcystines peut donc être extraite. Cette fraction est estimée à 24 % de la teneur totale dans le cas du foie de poisson et peut même descendre jusqu'à 0,1 % lors d'essais sur des larves de crabes (Williams *et al.* 1997).

À ce jour, seule l'oxydation de Lemieux, qui rompt les molécules de microcystines et dégage le groupement ADDA qui est ensuite dosé par CG-SM, permet d'extraire totalement les microcystines. Cependant cette méthode est fastidieuse et ne peut raisonnablement pas être envisagée comme une méthode de routine (Williams *et al.* 1997). Une autre technique est décrite par Robinson *et al.* (1991) pour rompre la liaison covalente des microcystines. Il s'agit d'une dénaturation thermique suivie d'une digestion par de la pronase, une protéase hydrolysant pratiquement n'importe quelle liaison peptidique liant deux acides aminés en configuration L.

À ce stade les microcystines sont quasiment les seules cyanotoxines à avoir fait l'objet d'études dans les poissons et les méthodes actuelles ne permettent pas d'obtenir un dosage fiable.

3.2.3.2. Purification

Si une étape de purification sur SPE C₁₈ peut s'avérer suffisante sur des échantillons d'eau, elle est insuffisante sur la plupart des matrices biologiques solides. C'est pourquoi une seconde SPE doit être appliquée avec une séparation complémentaire, soit par échange d'ions, soit en phase normale ou autre. Pour cela des phases stationnaires de silice pure sont souvent utilisées (Tsuji *et al.* 1994, Tsuji *et al.* 1996). Mais ces cartouches SPE à usage unique, de coût modéré, restent de spécificité modeste, tout particulièrement lorsqu'elles sont comparées à des techniques d'immunoaffinité. Des exemples de production d'anticorps monoclonaux dirigés contre la microcystine-LR (Kondo *et al.* 1996) ont été rapportés. La purification résultante des microcystines et de leurs métabolites, même sur des matrices très complexes (foie de souris et de rat), est d'une efficacité remarquable (Kondo *et al.* 2002, Aranda-Rodriguez *et al.* 2003). Le principal inconvénient de la purification par immunoaffinité reste la spécificité de ces colonnes, l'absence de disponibilité commerciale, leur coût lorsqu'elles existent et le risque de contamination croisée inter-échantillons, la cartouche étant utilisée plusieurs dizaines de fois.

3.3. Identification et dosage des toxines

3.3.1. Méthodes physico-chimiques

• Microcystines

En raison de leurs masses molaires et de leurs structures chimiques, la séparation des microcystines se fait par chromatographie liquide sur des colonnes en phase inverse de type C₁₈. L'élution est réalisée au moyen d'une phase mobile acétonitrile-eau acidifiée à 0,5 % en TFA ou acide formique.

La détection peut être réalisée par spectrophotométrie UV. L'identification des différentes microcystines s'appuie essentiellement sur le temps de rétention de ces analytes dans la colonne chromatographique, leurs spectres UV étant presque parfaitement superposables. Cette identification n'est possible que lorsque des étalons de référence sont accessibles. La détermination précise de la composition et de la nature de ces toxines dans les échantillons analysés n'est donc pas toujours possible avec ce type de détecteur.

Afin de se soustraire aux interférences de détection toujours possibles dans les matrices complexes, il est recommandé d'utiliser une détection par la spectrométrie de masse qui offre une garantie d'identification et qui permet de mettre en évidence la présence des différentes toxines à partir de leurs ions caractéristiques.

Dans l'eau, les appareils d'analyse actuellement disponibles permettent d'atteindre des seuils de quantification de l'ordre 0,1 à 0,2 µg.L⁻¹ en MC-LR lorsque l'extraction porte sur un échantillon de 0,5 L au minimum.

• Cyindrospermopsine (CYN)

Ce composé polaire est faiblement retenu sur la silice greffée nC₁₈ mais peut tout de même être séparé par chromatographie de partage à polarité de phase inversée, avec détection UV. Le spectre d'absorption est maximum à 262 nm.

Codd *et al.* (2001) ont pu mettre en évidence la présence de CYN, dans des cours d'eau où du bétail s'était intoxiqué, par couplage CLHP/SM-SM.

La limite de détection pour une eau brute est approximativement de 3 µg de CYN.L⁻¹.

• Anatoxines

La séparation est réalisée par CLHP en phase inversée sur une colonne de silice greffée C₁₈ et une phase mobile isocratique contenant une faible proportion d'acétonitrile ou de méthanol, avec une détection UV à 227 nm. Les détections par fluorescence ou spectrométrie de masse après dérivation de l'anatoxine-a permettent d'augmenter la sensibilité. La dérivation peut être réalisée par différents réactifs (Codd *et al.* 2001, Robillot & Hennion 2001). Araoz *et al.* (2005) proposent une méthode couplant CPG et SM sans dérivation. Il n'existe pas d'étalon commercial.

• Saxitoxines (Frémy *et al.* 2001)

La séparation des variants de cette famille de toxines est réalisée par CLHP avec appariement d'ions et la détection est principalement réalisée par fluorescence. La détection par spectrométrie de masse pose des difficultés techniques de désolvatation et ne s'est pas révélée très efficace jusqu'à présent.

Une dérivation pré ou post-colonne est réalisée pour rendre les saxitoxines fluorescentes car ces molécules ne fluorescent pas naturellement. Sur la vingtaine d'analogues identifiés, un peu moins d'une dizaine d'étalons sont disponibles commercialement. Plusieurs méthodes de dérivation pré-colonne ont été mises au point dont celle de Lawrence & Niedzwiadek (2001). Cette méthode permet une bonne séparation des différents variants, à l'exception des épimères, sur une colonne de type silice greffée C₁₈ associée à un gradient d'élution. Cette méthode est en cours de validation par l'AOAC. Elle permet l'obtention de profils très détaillés mais est très chronophage.

Différentes méthodes très couramment employées font appel au principe de dérivation en ligne post-colonne : la méthode de Sullivan & Wekell (1987) utilise une colonne à base de polystyrène divinyl-benzène et un gradient d'élution binaire. La méthode d'Oshima (1995) fait appel à une colonne de polarité de phase inversée greffée C₈ et à trois solutions isocratiques de caractéristiques physico-chimiques (composition, pH, température du réacteur post-colonne) différentes pour une séparation complète. Cette dernière méthode est la plus utilisée car c'est elle qui apporte le meilleur compromis entre apport d'information et temps d'analyse.

• **BMAA**

Les principales méthodes d'analyse de la BMAA (β -N-methyl-amino-L-alanine) ayant permis d'obtenir des données de contamination dans différentes matrices sont les suivantes :

- celle de l'équipe de Cox et Murch (2003, 2004, 2005) a été utilisée pour l'analyse de la BMAA sous sa forme libre et sous sa forme liée aux protéines dans des cyanobactéries, des cycades (parties végétales et farine), des roussettes (chauve-souris de l'île de Guam) et des cerveaux humains. La quantification de la BMAA totale nécessite une première étape pour extraire la BMAA libre à l'aide d'une solution acide. La BMAA liée est extraite par hydrolyse acide à chaud puis purifiée sur SPE. Les BMAA (libre et liée) sont ensuite dérivées pour être détectables par fluorescence après une séparation CLHP en phase inverse. L'identification du pic de BMAA peut être réalisée par comparaison avec un étalon commercial ou par couplage chromatographie liquide/ spectrométrie de masse.

Il conviendrait néanmoins de vérifier que cette méthode donne des résultats satisfaisants pour l'ensemble des matrices pour lesquelles elle a été utilisée (végétaux bruts, prélèvements humains, aliments et animaux). Afin de garantir les résultats, il serait notamment nécessaire de déterminer des taux de récupération de la BMAA qui ne sont pas indiqués dans les travaux publiés ;

- celle de l'équipe de Duncan (Duncan *et al.* 1989, Duncan *et al.* 1990, Duncan *et al.* 1992) pour l'analyse des aliments (dont graines et farines de cycades), des tissus et des fluides biologiques (dont l'urine) est basée sur une analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). La BMAA est extraite de la matrice par une solution acide, puis trans-esterifiée et ré-extraite par du dichlorométhane. La BMAA est ensuite quantifiée par CG-SM après dérivation de l'extrait.

Cette méthode utilise une extraction plus douce que l'extraction de la méthode de Cox. Il est raisonnable de penser que, dans ce cas, seule la fraction libre de la BMAA est extraite. Il serait nécessaire de le confirmer ;

- d'autres méthodes sont disponibles dans la littérature mais n'ont pas donné lieu à des études répétées. Comme celle de l'équipe de Duncan, elles sont basées sur une analyse CG-SM (Wang *et al.* 1989, Charlton *et al.* 1992).

• **Molécules à effets irritants**

Il n'existe pas de cible analytique précise.

Dans la troisième édition des « Guidelines for drinking-water quality », l'OMS apporte des éléments sur les limites de détection attendues par différentes techniques (tableau II-V).

Tableau II-V : Limites de détection par différentes techniques (OMS 2004)

Technique	Limite de détection	Méthode associée	Commentaire
CLHP	0,1-1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Extraction des cellules par méthanol aqueux à 75 % ou concentration des microcystines dissoutes sur cartouches C_{18}	Possibilité de distinguer les variants quand les étalons sont disponibles
Immuno-essais (ELISA)	0,1-0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Microcystines dissoutes ou extraites des cellules par extraction aqueuse	Utile pour le criblage mais la quantification est moins précise que la CLHP
PP2a	0,5-1,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Microcystines dissoutes ou extraites des cellules par extraction aqueuse	Utile pour le criblage mais la quantification est moins précise que la CLHP

Le tableau II-VI propose une comparaison des méthodes de détection des microcystines et des nodularines basée sur les revues analytiques de Botana (2000) et de Robillot et Hennion (2001).

La combinaison de la chromatographie liquide (HILIC : Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) avec la spectrométrie de masse permet la détection et le dosage d'un ensemble particulièrement intéressant de toxines dont les saxitoxines, l'anatoxine-a (ATX-a), la cylindrospermopsine (CYN), la désoxycylindrospermopsine (doCYN) et les microcystines -LR et -RR (Dell'Aversano *et al.* 2004).

Tableau II-VI : Comparaison des méthodes de détection des microcystines et des nodularines.

Méthodes et techniques	Avantages	Inconvénients	Limite de détection indicative	Application
Bioessai sur souris	Détection de toutes les substances actives. Effet physiologique Détermination DL ₅₀	Manque de sensibilité et de sélectivité	non précisé	En l'absence d'information disponible et si risque pour la santé publique
Méthodes CLHP	Sélectivité Profil toxinique normalisation en cours pour UV et SM	Pré-concentration, purification nécessaires, coût des équipements		
CLHP/SM	Grande sélectivité Identification des toxines		10-100 ng.L ⁻¹	Routine Confirmation
CLHP/Fluorimétrie		Identification moins sûre que par la SM	50-100 ng.L ⁻¹	Routine possible sur les matrices validées
CLHP / UV-DAD	Identification partielle des toxines grâce aux spectres	Identification moins sûre que par la SM	20-50 ng.L ⁻¹	Routine possible sur les matrices validées
Test phosphatase radiométrique	Sélectivité, méthode la plus sensible	Coût élevé, méthode laborieuse, pas d'identification des toxines	20 ng.L ⁻¹	Recherche
Tests phosphatase colorimétrique	Sensibilité adaptée	Manque de sélectivité, pas d'identification des toxines	100-200 ng.L ⁻¹	Routine si kit commercial validé
fluorimétrie Oxydation de Lemieux/CG/ SM	Spécifique des microcystines et des nodularines	Préconcentration requise Fastidieuse, coût des équipements Détection des variantes non ou peu toxiques	10 µg.g ⁻¹ de foie de poisson	Recherche
Immuno-essai	Spécifique des microcystines et des nodularines	Détection des variantes non ou peu toxiques Détection de 1 à quelques variants : réactivité croisée à connaître	50-150 ng.L ⁻¹	Routine si kit commercial validé et réactivité croisée connue

3.3.2. Méthodes immunologiques ou immunoessais

Ces méthodes sont basées sur le principe de la reconnaissance de motifs structuraux spécifiques de certaines toxines ou familles de toxines par des anticorps. Elles sont en général développées sous la forme d'essai ELISA, mettant en œuvre des anticorps poly- ou monoclonaux dirigés contre une toxine.

• Hépatotoxines

Pour les microcystines et pour un dosage dans l'eau, plusieurs kits ELISA sont commercialisés et leur domaine de linéarité est compris entre 0,5 et 5 µg équivalents MC-LR.L⁻¹ selon les kits. La réactivité croisée avec d'autres microcystines ou la nodularine varie selon les tests, sans relation systématique avec la toxicité réelle des variants. La limite de quantification dans les eaux de surface et les eaux potables se situe à 0,2 µg éq. MC-LR L⁻¹ (Robillot & Hennion 2001).

Ces kits utilisent des anticorps polyclonaux dont la spécificité n'est pas définie et les résultats sont sensibles aux interférences résultant d'effets de matrice : concentration en méthanol, salinité, pH des échantillons (Metcalf *et al.* 2000b). Ils sont destinés à la détection de toxines dissoutes dans l'eau et des précautions doivent être prises en cas d'utilisation sur des extraits cellulaires et des matrices complexes pour éviter les faux positifs.

Leur utilisation pour la surveillance ou la préalerte est envisageable, à condition que leurs performances fassent l'objet d'une validation préalable. Leur extension à la surveillance de sites suppose de connaître le profil toxinique des efflorescences locales et la réactivité croisée des différents variants.

• Neurotoxines

Des anticorps poly- et monoclonaux anti-saxitoxine ont été développés et un kit Elisa a été commercialisé pour doser les toxines paralysantes dans les coquillages. Ce kit ne permet pas de doser la néosaxitoxine en raison d'une faible réactivité croisée avec cette toxine, comme avec d'autres variants. En effet, la famille des saxitoxines compte plus de 20 variants et il est difficile d'en avoir une bonne reconnaissance immunologique complète. Dans le cas des coquillages, les problèmes de spécificité rajoutent à l'incertitude de la mesure conduisant à des risques de faux positifs. Sous conditions de connaître le profil des toxines présentes localement, cela pourrait constituer un outil de dépistage efficace.

Un nouveau kit saxitoxines existe sur le marché mais n'a pas encore été caractérisé par un organisme indépendant.

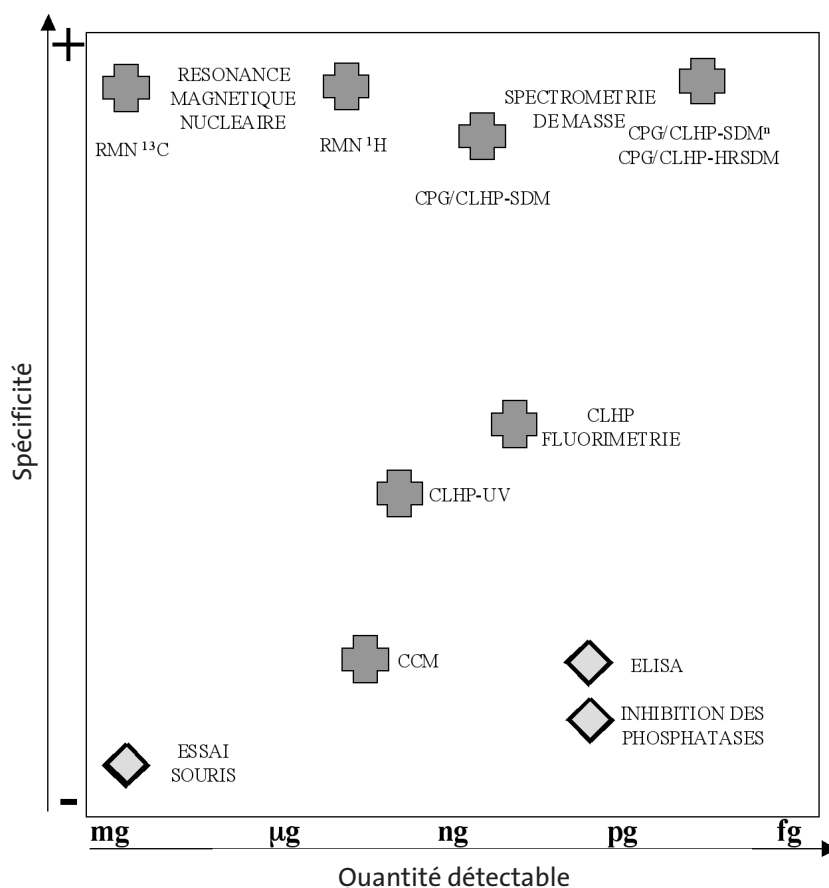
3.4. Détection de la toxicité

Dans un hydrosystème affecté de façon apparemment continue par un développement de phytoplancton peuvent en réalité se succéder des efflorescences dominées par différentes cyanobactéries, susceptibles de produire au cours du temps une grande variété de profils toxiques.

Les connaissances acquises sur l'efflorescence (espèce, historique du site) sont importantes et orientent le choix des tests à mettre en œuvre pour évaluer l'activité toxique de l'échantillon extrait.

Plusieurs méthodes biologiques de détection ont été développées pour les cyanotoxines qui s'appuient sur le caractère toxique et la (les) cible(s) de ces toxines, tels leurs caractères hépatotoxique, neurotoxique, ou encore cytotoxique. Les tests de toxicité aiguë par nature ne répondent que pour des valeurs critiques et ne sont pas très spécifiques.

Figure II-3 : Spécificité et sensibilité comparées des principales techniques utilisées pour la mesure des cyanotoxines. L'échelle des sensibilités sur l'axe des abscisses place à son extrémité haute la spectrométrie de masse en particulier en tandem (SM/SM) ou haute résolution (HRSM). L'échelle des spécificités sur l'axe des ordonnées sépare nettement la spectrométrie de masse ou la RMN, et les techniques non spécifiques telles que le bio-essai souris ou encore la CCM.



3.4.1. Essais *in vivo* (Chorus & Bartram 1999)

En recherche, les bioessais sur vertébrés sont utilisés pour identifier les organes cibles de la toxine en vue de la compréhension de son mécanisme d'action. En surveillance ils pourraient être utilisés pour identifier le caractère toxique d'un échantillon et préciser le type de toxicité, hépatotoxicité ou neurotoxicité.

Les bioessais sur animaux, non spécifiques d'un type de toxine, sont utilisés pour objectiver la toxicité globale d'une efflorescence. Ils reposent tous sur l'injection ou le contact direct d'un animal avec un extrait obtenu à partir de biomasse de cyanobactéries, d'un échantillon d'eau concentré ou d'une matrice complexe.

Cependant, l'extraction conditionne le spectre de toxines qui pourra être détecté. Un minimum de deux séries de tests, associé à une extraction des hépatotoxines d'une part et des neurotoxines d'autre part, est recommandé.

L'injection d'un extrait à des vertébrés (souris, poisson...) permet de reproduire, au moins partiellement, les processus de distribution et de métabolisation des toxines susceptibles d'apparaître chez l'homme. Les toxines nécessitant une bio-activation ou dont le mode d'action implique un composé spécifique des vertébrés supérieurs peuvent ainsi révéler leur activité. Cependant les toxines d'action rapide comme les neurotoxines peuvent masquer la présence concomitante de toxines d'action plus lente comme les hépatotoxines.

3.4.1.1. Essai sur souris

Essai le plus couramment utilisé, il peut être réalisé à partir d'extrait, d'un lysat de cellules ou d'une solution de lyophilisat filtrée. Dans tous ces cas, d'autres composés cellulaires peuvent interférer dans l'expression de la toxicité, qui peut aussi être associée à d'autres toxiques. Ce bioessai peut être utilisé en tant que méthode qualitative (présence/absence) ou semi-quantitative par référence à une cyanotoxine considérée comme représentative d'une famille de cyanotoxines.

L'essai se fait par injection intrapéritonéale à un minimum de trois souris pour au moins deux dilutions de l'extrait à tester. Les souris restent en observation 24 h puis sont sacrifiées (Falconer 1993). La période d'observation doit être prolongée à 7 jours lorsque la présence des cylindrospermopsines est suspectée. Les symptômes observés et les résultats de l'examen post-mortem permettent de diagnostiquer la famille de cyanotoxine (hépatotoxine, neurotoxine) à l'origine de l'intoxication. Les résultats sont exprimés en Dose Létale Minimale (DLM) par mg de poids sec de cellule et par kg de poids corporel.

Dans le cadre de l'évaluation de la salubrité des coquillages, le bioessai sur souris, méthode qualitative et équivalent quantitative, est la méthode de référence réglementaire au niveau communautaire.

Le bioessai sur souris reste la seule approche capable de rallier fiabilité, rapidité, quantification globale de la toxicité et orientation vers l'identité de la (ou des) toxine(s) présente(s) dans un échantillon. Néanmoins, il présente les inconvénients suivants : manque de spécificité, en particulier en présence des substances interférentes et problèmes d'éthique face à l'utilisation des animaux pour les tests de laboratoire.

3.4.1.2. Bioessais sur invertébrés

À ce jour, les bioessais sur invertébrés ne sont ni validés, ni intercalibrés pour la recherche et la quantification d'une ou plusieurs cyanotoxines.

Parmi les bioessais sur invertébrés permettant de mettre en évidence une toxicité globale, le bioessai sur *Artemia salina* est le plus utilisé à ce jour car il ne nécessite pas de haute technicité, ni humaine ni matérielle. Des kits commerciaux standardisés sont aujourd'hui disponibles. Toutefois, la détection de faibles concentrations de cyanotoxines nécessite la purification préalable de l'échantillon.

La comparaison des résultats obtenus pour la microcystine avec ces kits, le bioessai sur souris et la chromatographie liquide haute performance s'est avérée satisfaisante (Lawton *et al.* 1994a).

Le bioessai sur daphnie permet également de mettre en évidence la toxicité des microcystines (Baird *et al.* 1989). À titre expérimental, divers bioessais ont été publiés, utilisant les moustiques adultes ou leurs larves (Turell & Middlebrook 1988, Kiviranta *et al.* 1993), la mouche (*Drosophila melanogaster*) (Ross *et al.* 1985, Swoboda *et al.* 1994), des locustes (criquet, sauterelle) pour la détection des saxitoxines, (McElhiney *et al.* 1998), ces organismes n'étant pas sensibles à la microcystine-LR ou à l'anatoxine-a.

En conclusion, les bioessais sur invertébrés pêchent par leur incapacité à distinguer les différents types de toxicité. Pour certains, la lourdeur des manipulations ou du maintien des populations limite leur emploi.

3.4.2. Essais *in vitro*

3.4.2.1. Essais sur lignées cellulaires

Basés sur le mode d'action des toxines à l'échelle cellulaire, ils présentent les avantages des méthodes quantitatives miniaturisées, tout en évitant les essais sur animaux. Ils ne peuvent cependant simuler qu'en partie les effets du métabolisme d'un animal sur les xénobiotiques absorbés.

Ils présentent donc un spectre de détection étroit et sont spécifiques d'une activité toxique caractéristique d'une classe de cyanotoxines. Ils ne permettent pas d'identifier formellement la (ou les) toxine(s) à l'origine de l'effet observé. Les résultats sont exprimés en équivalent de la toxine qui sert à la calibration du test.

Pour les microcystines, différents essais fondés sur des cultures d'hépatocytes ont été rapportés par Chorus et Bartram (1999), mais aucun n'est utilisé en routine. Les tests de cytotoxicité ou d'agglutination sur des cellules non-cibles (fibroblastes, hématies) ne se sont pas révélés suffisamment fiables.

Pour les saxitoxines, des essais ont été développés pour la surveillance des fruits de mer (Chorus & Bartram 1999). Un test sur neuroblastomes permet de détecter les substances modulatrices de l'activité des canaux sodiques dépendant du potentiel de membrane, ce qui correspond au mode d'action *in vivo* des saxitoxines. Il faut toutefois signaler que la comparaison inter-laboratoire pour validation d'un kit commercial a échoué il y a quelques années pour une application sur coquillages, en partie en raison de la complexité de la matrice et du manque de robustesse du test.

Des modèles de peau reconstituée utilisés pour la recherche cosmétique pourraient être employés pour apprécier les effets irritants des cyanotoxines ou des extraits de cyanobactéries.

3.4.2.2. Les méthodes enzymatiques et moléculaires

En dehors du cas des saxitoxines et de la cylindrospermopsine, ces méthodes sont toutes enzymatiques. Elles mettent en évidence des propriétés communes à un groupe de toxines ou plus spécifiques d'une toxine. Il s'agit de la mise en évidence du pouvoir inhibiteur de l'extrait sur l'activité d'une enzyme, le plus souvent impliquée dans le mode d'action de la toxine *in vivo*. Elles ne constituent cependant pas une identification des toxines en cause, qui doit être réalisée par les techniques chromatographiques.

Ces méthodes ont été développées avec le souci d'aboutir à une quantification de l'activité toxique, par l'étude de dilutions successives.

• Microcystines, nodularines et inhibition des protéines phosphatases

L'inhibition de la protéine phosphatase est un test de dépistage sensible pour les microcystines et les nodularines.

L'essai détecte les microcystines et les nodularines, le résultat est exprimé en équivalent de la toxine étalon, souvent la MC-LR. Les microcystines et la nodularine, tout comme l'acide okadaïque (une phycotoxine marine), inhibent les protéines phosphatases de type 1 et 2A (PP1 et PP2A) *in vitro* et *in vivo* à des concentrations de l'ordre de 0,1 µg MC-LR L⁻¹. Cette propriété a été mise à profit pour développer des tests enzymatiques dans lesquels la transformation d'un substrat par la protéine phosphatase est inhibée par la présence de microcystines.

Une version est basée sur le dosage du ³²P libéré par un substrat radioactif suite à l'action enzymatique de la phosphatase (PP1 et PP2A) (Ortea *et al.* 2004, Robillot & Hennion 2004). La sensibilité est excellente puisque la détection de quelques centaines de picogrammes est assurée ; de plus, ce test est rapide, de l'ordre de quelques heures, et utilisable sur de larges séries d'échantillons. La méthode a été utilisée pour doser des microcystines dans l'environnement marin, des extraits de foie de saumons (Andersen *et al.* 1993), des microcystines hydrophobes extraites de cyanobactéries d'eau douce (Craig *et al.* 1993) ou encore dans l'eau de boisson (Lambert *et al.* 1994). Bien que cette méthode ait été largement utilisée en recherche, son application en routine a été freinée pour des raisons liées à l'utilisation de la radioactivité, qui nécessite l'acquisition de matériels spécifiques, la sensibilisation des personnels et l'agrément du laboratoire. C'est l'une des raisons pour lesquelles des variantes évitant l'utilisation de matériels radioactifs furent également développées. L'inhibition de la phosphatase peut être également assurée par colorimétrie (An & Carmichael 1994) ou bioluminescence (Isobe *et al.* 1995).

Un test utilisant une enzyme PP2A commerciale a été étudié sur des échantillons de cultures et des prélèvements environnementaux (Robillot & Hennion 2001). Sur les eaux de surface, des effets de matrice entraînent quelques faux positifs pour de très faibles concentrations en toxines. Pour les matrices cellulaires, l'extraction au méthanol permet d'éviter la co-extraction d'une activité phosphatase endogène qui tend à sous estimer le contenu en microcystines (Codd *et al.* 2001). La limite de détection de ce test est de 0,1 µg équivalent MC-LR.L⁻¹, lorsque ce variant est utilisé pour l'étalonnage du test.

Ce test est un bon candidat pour la surveillance de la toxicité de sites historiquement sujets à la production de microcystines. Néanmoins, en raison de la toxicité très diverse des variants de microcystines produites par une efflorescence, la présence de microcystines devra être confirmée par des méthodes chromatographiques lors de résultats positifs.

- **Anatoxine-a(s) et inhibition de l'acétylcholine-estérase**

L'inhibition *in vitro* et *in vivo* de l'acétylcholine-estérase (AChE) par l'anatoxine-a(s) a permis le développement d'un test enzymatique qualitatif et quantitatif (Mahmood & Carmichael 1987). Cet essai n'est pas spécifique de l'anatoxine-a(s) et détecte toute activité anticholinestérasique, notamment celle des pesticides organophosphorés et des carbamates. C'est un essai alternatif au bioessai sur souris pour cette toxine et les résultats quantitatifs sont exprimés en équivalents de la toxine étalon. La toxicité réelle de l'échantillon peut être différente en fonction de l'activité biologique des variants présents dans l'échantillon.

- **Cylindrospermopsine**

Des essais d'inhibition de la synthèse protéique à l'aide d'un test utilisant un lysat commercial de réticulocytes de lapin ont été réalisés. Cette technique permet de visualiser l'incorporation de leucine tritiée par la synthèse des protéines. Les premiers résultats ont montré une bonne corrélation avec les quantifications par CLHP (Frosocio *et al.* 2001).

- **Saxitoxines**

Un test de compétition de la liaison au récepteur est en cours de mise au point (Llewellyn & Doyle 2001).

Points à retenir

- Il existe de nombreuses techniques de détection quantitative, semi-quantitative ou qualitative des différentes cyanotoxines, mais l'identification univoque et le dosage individuel des différentes molécules d'une famille de toxines nécessite le recours aux méthodes chromatographiques.
- À la date de rédaction, aucune des méthodes d'identification et de dosage de ces toxines n'est normalisée, même si l'identification et le dosage des microcystines -RR, -YR et -LR par extraction sur phase solide et CLHP est en voie de normalisation à l'ISO.
- Il existe des problèmes pour l'étalonnage des dosages en raison de difficultés d'approvisionnement et/ou de l'absence de certains étalons de toxines.
- Des essais *in vivo* peuvent permettre une évaluation globale d'un effet toxique.
- Des mesures enzymatiques rapides et sensibles sont intéressantes pour assurer un suivi de routine.
- Il n'existe pas de méthodes de dosage fiable des microcystines dans les denrées alimentaire d'origine animale ou les tissus animaux.

Tableau II-VII : Aptitudes des différentes méthodes utilisables en « routine ».

Méthodes	Effets toxiques / toxicité Réponse observée	Quantification des toxines	Identification des toxines	Temps de réponse	Remarque
Essais sur animaux Souris	Toxicité globale (hépatotoxines, neurotoxines)	+ (saxitoxines) - (autres toxines)	-	1-8 jours	- Sensibilité et spécificité limitée - A remplacer dans le cadre de la législation européenne limitant les tests sur animaux
Poissons (Danio renio, Oryzia latipes, ...)	Toxicité globale (hépatotoxines)	-	-	1-15 jours	- Utilisé en écotoxicologie
Micro-crustacés (Artémia, Daphnie, ...)	Toxicité globale	-	-	1-2 jours	- Non spécifique des cyanotoxines - Non recommandé
Essais sur bactéries Microtox	Toxicité globale	-	-	quelques heures	- Non spécifique - Non recommandé
Essais cellulaires	Toxicité cellulaire neuroblastomes hépatocytes	+ (saxitoxines) -	- -	1-3 jours	- Sensible et spécifique - Sensible mais spécificité controversée
Essais immunologiques Monoclonal Polyclonal	Microcystines, Nodularines, Saxitoxines	+ (microcystines et nodularines)	- -	1 jour	- Sensible et spécifique de familles de toxines
Essais enzymatiques Phosphatases (PPA)	Cible moléculaire	+ (microcystines et nodularines)	-	1-2 jours	- Sensible et spécifique de familles de toxines
Acétylcholinestérase	Cible moléculaire	+ anatoxine a(s)	-	1-2 jours	
Analyses chromatographiques CLHP/fluorescence CG/SM CLHP/UV CLHP/SM	Isolement des molécules	+ (si étalon)	+ (si étalon)	1-2 jours	- Spécificité et sensibilité variables - Seules méthodes de quantification de toxines normalisées

PP2A : protéine phosphatase de type 2A ; CLHP : chromatographie en phase liquide à haute performance ; CG : chromatographie en phase gazeuse ; SM : spectrométrie de masse ; UV : ultraviolets.

Tableau II-VIII : Méthodes d'analyses normalisées.

Paramètre recherché	Norme
Turbidité	NF EN ISO 7027 (2000). Qualité de l'eau - Détermination de la turbidité. 24 p.
Oxygène dissous	ISO 5813, 1983. Qualité de l'eau. Dosage de l'oxygène dissous. Méthode iodométrique. 8 p. ISO 5814, 1990. Qualité de l'eau. Dosage de l'oxygène dissous. Méthode électrochimique à la sonde. 12 p.
pH	NF T90-008, 2001. Qualité de l'eau - Détermination du pH. 6 p.
Chlorophylle <i>a</i>	ISO 10260, 1992. Qualité de l'eau - Mesurage des paramètres biochimiques - Dosage spectrométrique de la chlorophylle <i>a</i> . 12 p. NF T90-117, 1999. Qualité de l'eau - Dosage de la chlorophylle <i>a</i> et d'un indice phéopigments - Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire. 12 p.
Détermination de la masse de matière sèche	NF EN 872, 1996. Qualité de l'eau - Dosage des matières en suspension - Méthode par filtration sur filtre en fibres de verre. 12 p. NF T90-105-2, 1997. Qualité de l'eau - Dosage des matières en suspension - Méthode par centrifugation. 8 p.
Microcystines	Projet norme ISO/FDIS 20179, 2005. Water quality - Determination of microcystins - Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection.

1. Toxicologie

Les données toxicologiques concernant les cyanotoxines sont souvent parcellaires à l'exception des données de toxicité aiguë. De plus, les expériences sont réalisées soit avec des toxines purifiées soit avec des extraits de cyanobactéries, ce qui peut conduire à des différences de toxicité car les composés présents dans ces extraits peuvent avoir des effets synergiques ou antagonistes. Il faut donc prendre avec précaution les résultats publiés obtenus avec des extraits bruts.

Par ailleurs, les études toxicologiques suivent des protocoles parfois difficilement comparables en terme de modèle animal, de temps d'exposition, de voie d'administration, d'effets observés et de validité statistique des résultats.

1.1. Les hépatotoxines

1.1.1 Les microcystines (MCs)

À ce jour, plus de 70 variants de microcystine (MC) ont été identifiés. Il est important de signaler que leur structure chimique variable présente des différences de solubilité dans l'eau ce qui peut conduire à des variations dans les organes cibles, le métabolisme et la bioaccumulation (Craig *et al.* 1993, Gupta *et al.* 2003).

La MC-LR, qui présente une toxicité élevée sur souris, est la toxine la plus fréquemment détectée dans les écosystèmes. Elle est de ce fait la plus étudiée et la mieux connue. Peu de données sont disponibles sur les autres variants de la microcystine.

1.1.1.1. Mécanismes de la toxicité

Les MCs se lient à des protéines phosphatases à sérine/thréonine, essentiellement les PP1 et PP2A, en établissant des liaisons covalentes dans le cytoplasme entre leur résidu Mdha (N-méthylidihydroalanine) et les cystéines 273 et 226 des sous-unités catalytiques de ces enzymes (McKintosh *et al.* 1990, Runnegar *et al.* 1995a, Bagu *et al.* 1997).

L'inhibition de ces enzymes entraîne une modification de l'état de phosphorylation de nombreuses protéines. Il en résulte des effets divers et en particulier :

- une perte de l'intégrité du cytosquelette (altération des micro filaments, des filaments intermédiaires et des microtubules), et en conséquence une nécrose ;
- une apoptose des hépatocytes mais aussi des cellules glomérulaires et tubulaires proximales (Eriksson *et al.* 1990, Eriksson *et al.* 1992, Khan *et al.* 1996, McDermott *et al.* 1998, Fischer & Dietrich 2000, Fischer *et al.* 2000, Hooser 2000, Lankoff *et al.* 2003).

Cette atteinte des hépatocytes conduit à une hémorragie hépatique importante pouvant entraîner la mort (Dawson 1998).

Différents travaux ont montré que la MC-LR peut également induire des dommages oxydants sur les macromolécules (ex: protéines, acides nucléiques, lipides) (Gehring *et al.* 2003, Lankoff *et al.* 2003, Zegura *et al.* 2003, Botha *et al.* 2004, Bouaïcha & Maatouk 2004).

1.1.1.2. Absorption, distribution, métabolisme et excrétion

Il n'existe pas d'étude publiée sur la toxicocinétique par voie orale des microcystines.

Les MCs sont des composés plutôt hydrosolubles. Mis à part peut-être certains variants plus hydrophobes, elles ne franchissent pas facilement les membranes cellulaires (Vestervik & Meriluoto 2003). Un système de transport des ions organiques utilisé par les acides biliaires leur permet de traverser les membranes limitant l'organotropisme aux quelques organes (en particulier le foie, l'intestin et le cerveau) exprimant ces transporteurs (Runnegar *et al.* 1991, Falconer *et al.* 1992, Runnegar *et al.* 1995b, Fischer *et al.* 2005).

Après administration orale, elles sont transportées à travers l'iléon dans la circulation sanguine grâce à ces transporteurs. De même les MCs sont activement transportées dans les hépatocytes par ce même mécanisme, les acides biliaires y étant des substrats « naturels » (Runnegar *et al.* 1991, Falconer *et al.* 1992, Runnegar *et al.* 1995b, Fischer *et al.* 2005). Chez les mammifères et les poissons, la MC-LR s'accumule ensuite rapidement dans le foie (Runnegar *et al.* 1981, Fischer & Dietrich 2000, Fischer *et al.* 2000).

Il a par ailleurs été montré que l'administration intratrachéale de MC-LR s'accompagne d'une absorption rapide à partir du poumon et induit une atteinte hépatique (Ito *et al.* 2001).

L'injection intrapéritonéale ou intraveineuse de doses sublétales de MCs chez la souris ou le rat montre qu'environ 70 % de la dose est rapidement localisée au niveau du foie (Falconer *et al.* 1986, Runnegar *et al.* 1986, Brooks & Codd 1987, Robinson *et al.* 1989, Meriluoto *et al.* 1990, Robinson *et al.* 1991, Lin & Chu 1994, Nishiwaki *et al.* 1994).

La métabolisation de la MC-LR se fait principalement dans le foie par conjugaison avec le glutathion (GSH). Elle est réalisée par les glutathion S-transférases. Cette conversion en un composé plus polaire (MC-GSH) est corrélée à une déplétion en glutathion. Ce composé est retrouvé pour différents types d'organismes : chez des végétaux (*Ceratophyllum demersum*), des invertébrés (*Daphnia magna*, *Dreissena polymorpha*, *Artemia salina*), des poissons (*Danio rerio*) et des mammifères (rat et souris) (Kondo *et al.* 1996, Pflugmacher *et al.* 1998, Takenaka 2001, Beattie *et al.* 2003). Des acides mercapturiques ont été également identifiés dans l'urine. De plus, un conjugué à la cystéine a été identifié *in vitro* (Kondo *et al.* 1992) et *in vivo* (Pflugmacher *et al.* 2001).

Ces conjugués se sont révélés considérablement moins toxiques chez la souris que le composé parent. De plus, ils n'induisent pas d'inhibition des protéines phosphatases à sérine/thréonine (Kondo *et al.* 1992, Kondo *et al.* 1996, Metcalf *et al.* 2000a, Ito *et al.* 2002).

L'élimination fécale reste faible mais constante (environ 1 % par jour) tandis que l'excrétion urinaire, plus précoce, prend en charge 9 % de la dose. Cette dernière est limitée en raison de la fixation hépatique qui diminue la quantité de toxine disponible dans le plasma (Robinson *et al.* 1991).

1.1.1.3. Toxicité aiguë⁽³⁾

Chez les mammifères, l'intoxication aiguë par les MCs se caractérise par la destruction de l'architecture hépatique, menant à une hémorragie massive et une mort en quelques heures (Lakshmana Rao & Bhattacharya 1996). Des altérations de l'épithélium bronchique sont observées par voie d'administration intratrachéale. Des signes de néphrotoxicité au niveau vasculaire, glomérulaire et tubulaire ont été également rapportés (Siegelman *et al.* 1984, Bruno *et al.* 1994, Khan *et al.* 1996, Nobre *et al.* 1999, Nobre *et al.* 2001, Gupta *et al.* 2003).

L'instillation intranasale de microcystine-LR à la souris entraîne une nécrose extensive de l'épithélium de la muqueuse nasale, avec de larges destructions des tissus jusqu'aux vaisseaux sanguins (Fitzgeorge *et al.* 1994).

Les variants de microcystines sont, pour la plupart, très toxiques en administration intrapéritonéale chez la souris à des doses comprises entre 50 et 300 µg.kg⁻¹ (Sivonen & Jones 1999).

Pour la MC-LR, les toxicités aiguës par voies intrapéritonéale (ip), intranasale (in) et intratrachéale (it) sont similaires : les DL₅₀ sont respectivement de 25 à 150 µg.kg⁻¹, 36 à 122 µg.kg⁻¹ et 50 à 100 µg.kg⁻¹ (Lovell *et al.* 1989, Miura *et al.* 1991, Fitzgeorge *et al.* 1994, Kuiper-Goodman *et al.* 1999, Sivonen & Jones 1999, Ito *et al.* 2001).

Les DL₅₀ par voie intrapéritonéale de plusieurs microcystines « communes » (-LA, -YR, -YM) sont du même ordre de grandeur que celles de la MC-LR alors que celle de la MC-RR est 10 fois plus élevée.

Par voie orale (en gavage) et selon la souche de souris, la DL₅₀ de la MC-LR, à 24 h, varie entre 5 mg.kg⁻¹ et 10,9 mg.kg⁻¹ (Yoshida *et al.* 1997, Fawell *et al.* 1999a). Elle est plus élevée chez le rat (Fawell *et al.* 1994, Fawell *et al.* 1999a).

La toxicité aiguë des MCs apparaît variable selon que les animaux sont à jeun ou non, y compris lors de l'injection intrapéritonéale (Miura *et al.* 1991).

(3) La toxicité aiguë est généralement exprimée par la dose létale 50 % (DL₅₀).

1.1.1.4. Toxicité sub-chronique⁽⁴⁾

Fawell *et al.* (1994) ont mené une étude de 13 semaines avec administration par gavage à des groupes de 15 souris mâles et femelles de microcystine-LR pure. Les doses étaient de 0, 40, 200 ou 1 000 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Dans le groupe le plus exposé, tous les mâles et la plupart des femelles montrent des altérations hépatiques incluant une inflammation chronique, une dégénérescence focalisée d'hépatocytes et des dépôts d'hémosidérine. Chez les souris mâles, à la dose de 1 000 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$, les transaminases sériques sont élevées, la gamma glutamyl transférase diminuée, les taux des protéines totales sériques et des albumines sériques légèrement diminués. Dans le groupe des femelles exposées à 1 000 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$, seules les transaminases sont élevées.

La dose de 40 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ est considérée comme la dose sans effet nocif observée (DSENO). Dans le groupe exposé à 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ on note une légère atteinte hépatique chez un mâle et deux femelles (Fawell *et al.* 1994).

L'administration d'extraits d'*A. flos-aquae* via l'alimentation chez la souris, pendant 43 jours, a permis d'établir une DSENO, pour la MC-LR, de 333 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour tous les aspects toxicologiques (Schaeffer *et al.* 1999).

Heinze *et al.* (1999) ont mis en évidence des dommages hépatiques permettant de déterminer une DMENO de 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ chez le rat, par voie orale (eau de boisson, 28 jours, MC-LR pure).

Chez le porc, l'exposition orale à des extraits de *Microcystis aeruginosa*, pendant 44 jours, a mis en évidence des dommages dose dépendants, limités au foie, permettant de déterminer une dose minimale avec un effet nocif observable (DMENO) de 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (Falconer 1994).

L'administration en i.p. chez le lapin, d'extraits contenant de la MC-LR et de la MC-RR, pendant trois semaines, provoque une dégénérescence parenchymateuse et une fibrose périportale du foie. Une diminution dose-dépendante de l'activité ALAT hépatique a été observée chez le rat traité par voie i.p. avec 16, 32 et 48 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pendant 28 jours (Solter *et al.* 2000).

Par voie intranasale des lésions hépatiques dose-dépendantes et un effet cumulatif ont été obtenus chez la souris. L'application d'une seule dose de MC-LR de 31,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ n'entraîne pas d'augmentation de poids du foie. Administrée pendant 7 jours, cette dose entraîne une augmentation du poids de l'organe de 75 %. Il faut une dose de 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour obtenir cet effet en une seule administration (Fitzgeorge *et al.* 1994).

1.1.1.5. Toxicité chronique⁽⁵⁾

L'administration orale, par l'eau de boisson pendant un an, d'extraits de *Microcystis* (équivalent à 750-12000 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ de MC-YM) à des souris, provoque des altérations hépatiques ainsi qu'une augmentation des bronchopneumonies (Falconer 1991, 1998). Des atteintes rénales après 8 mois de traitement tous les deux jours, par voie intrapéritonéale, avec de la MC-LR ou de la MC-YR (10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) ont été observées chez le rat (Milutinovic *et al.* 2003). Les effets sont en général plus importants avec la MC-LR qu'avec la MC-YR. Les altérations de la physiologie rénale semblent impliquer les voies de la phospholipase A2 et de l'acide arachidonique (Nobre *et al.* 2003).

Des souris femelles BALB/c âgées de six semaines ont reçu pendant 18 mois 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcystine-LR dans l'eau de boisson. La quantité moyenne ingérée a été estimée à 35,5 μg par souris. Aucun signe de toxicité ou d'accumulation de la toxine n'ont été observés (Ueno *et al.* 1999).

1.1.1.6. Génotoxicité

Chez les procaryotes, les résultats obtenus par les essais de mutation génique (test d'Ames sur *Salmonella typhimurium* et test sur *Bacillus subtilis*) sont négatifs avec la MC-LR pure alors qu'avec des extraits, les résultats se sont révélés contradictoires (Grabow *et al.* 1982, Runnegar & Falconer 1982, Repavich *et al.* 1990, Ding *et al.* 1999).

In vitro et *in vivo*, diverses études rapportent des altérations de l'ADN (mutations ponctuelles, cassures et réarrangements chromosomiques, formation de micronoyaux, mitose aberrantes, adduits d'oxydation) sans que le potentiel génotoxique puisse être défini de façon claire (Repavich *et al.* 1990, Rao & Bhattacharya 1996, Suzuki *et al.* 1998, Ding *et al.* 1999, Lankoff *et al.* 2003, Maatouk *et al.* 2004, Zegura *et al.* 2004, Zhan *et al.* 2004).

(4) Les études de toxicité sub-chronique consistent en l'administration de doses répétées, pendant une durée d'au moins 13 semaines (90 jours). Dans certaines études, les temps d'exposition sont cependant inférieurs. Ces expériences permettent de définir des doses sans effet nocif observé (DSENO) et/ou des doses minimales avec un effet nocif observable (DMENO). Ces valeurs sont définies pour un modèle animal et une voie d'exposition donnée. Les paramètres observés peuvent être : le poids corporel des animaux ou des organes, les modifications histologiques (notamment du foie) et biologiques (Alanine Amino-Transférase : ALAT, Aspartate Amino-Transférase : ASAT, Á-glutamyl transpeptidase, Á-glutamyl transférases et protéines sériques).

(5) La toxicité chronique est évaluée par une exposition répétée durant une grande partie de la vie de l'animal (18 mois pour la souris, 2 ans pour le rat).

1.1.1.7. Cancérogénèse

In vitro

Sur des hépatocytes de rat, la MC-LR s'est montrée capable d'induire des proto-oncogènes⁽⁶⁾ tels que *c-jun* et *c-fos*, impliqués dans la promotion tumorale (Sueoka *et al.* 1997).

In vivo⁽⁷⁾

Les études de promotion à moyen terme, comportant une étape d'initiation préalable, ont montré un effet promoteur de tumeur :

- au niveau hépatique avec l'induction de foyers prénéoplasiques après administration i.p. de MC-LR (10 µg.kg⁻¹) (Nishiwaki-Matsushima *et al.* 1992) ;
- sur la peau et sur le colon de souris avec des extraits de *Microcystis* administrés *via* l'eau de boisson (Falconer 1991, Humpage *et al.* 2000).

Chez la souris, l'administration subchronique par voie i.p. de MC-LR (20 µg.kg⁻¹) provoque l'apparition de nodules hépatiques contrairement à l'administration orale de 80 µg.kg⁻¹ de MC-LR (Ito *et al.* 1997).

L'administration chronique chez la souris *via* l'eau de boisson, pendant un an, d'extraits de *M. aeruginosa* (doses de 750 à 12 000 µg.kg⁻¹.j⁻¹ en équivalent MC-YM), provoque des dommages hépatiques ainsi qu'une augmentation des bronchopneumonies et de la mortalité dans les groupes recevant les plus fortes concentrations. Si aucun cancer du foie n'a été induit, une promotion tumorale a été signalée (Falconer *et al.* 1988).

1.1.1.8. Reprotoxicité

L'étude de Fawell *et al.* (1999) rapporte des retards de poids et d'ossification du squelette sur la descendance des souris traitées par gavage du 6^e au 15^e jour de la gestation avec une dose de MC-LR pure de 2000 µg.kg⁻¹.j⁻¹. Néanmoins, ces effets sont associés à une toxicité maternelle. À la dose de 600 µg.kg⁻¹.j⁻¹, aucun signe de toxicité n'est observé chez les progénitures et les mères (DSENO = 600 µg.kg⁻¹.j⁻¹). Ces résultats sont en accord avec ceux de Falconer *et al.* (1988) qui, hormis des cas de microcéphalie chez les nouveaux nés, ne rapportent aucun signe de tératogénèse, de mortalité embryonnaire ou de diminution de la fertilité chez des souris recevant un extrait de *Microcystis aeruginosa* de concentration en toxine non définie, par l'eau de boisson.

Une autre DSENO de 333 µg.kg⁻¹.j⁻¹ de MC-LR, par consommation d'extraits d'*A. flos-aquae* (pendant 21 à 43 jours) a été obtenue. À cette dose aucun effet néfaste n'est apparu sur la croissance et la reproduction des souris traitées, ni sur le développement fœtal, la survie ou le poids des organes des nouveaux nés (Schaeffer *et al.* 1999).

Aucun effet tératogène n'a été mis en évidence chez la souris et le crapaud par Chernoff *et al.* (2002). Chez le poisson, l'embryotoxicité de la MC-LR est avérée : elle affecte le taux d'éclosion et de survie et augmente la fréquence d'embryons anormaux (Liu *et al.* 2002).

1.1.1.9. Immunotoxicité

Différentes études *in vitro* suggèrent un effet immunosuppresseur des MCs. Il a été observé que ces toxines pouvaient moduler l'adhésion des leucocytes polynucléaires humains, altérer la phagocytose et l'activité de certaines cellules (cellules NK⁽⁸⁾). L'inhibition dose dépendante de la prolifération des lymphocytes B et T a également été observée, dès 1 µM dans certains cas (Hernandez *et al.* 2000, Yea *et al.* 2001, Zhang *et al.* 2001b, Shen *et al.* 2003).

La production d'interleukine IL-2⁽⁹⁾, du TNF-α⁽¹⁰⁾ et la synthèse d'oxyde nitrique dans les macrophages sont également affectées (Nakano *et al.* 1989, Nakano *et al.* 1991, Pahan *et al.* 1998, Rocha *et al.* 2000, Yea *et al.* 2001, Nobre *et al.* 2003).

(6) Gène impliqué dans le contrôle de la division cellulaire et dont la mutation peut être à l'origine de tumeurs.

(7) La cancérogénèse chimique s'effectue en trois étapes :

- une étape d'initiation par application d'une substance mutagène rendant certaines cellules aptes à développer un cancer (cellules initiées) ;
 - une étape de promotion par application d'une substance conduisant à la multiplication des cellules initiées et à l'apparition de cellules cancéreuses. Il y a promotion lorsque le temps écoulé entre l'initiation et l'apparition des tumeurs est réduit par la substance appliquée ;
 - une étape de progression caractérisée par l'acquisition de la malignité.
- Une même substance peut être initiatrice et promotrice.

(8) Les cellules NK (Natural Killer) sont des cellules tueuses naturelles chargées de détruire des cellules infectées par des virus ou des cellules tumorales.

(9) L'IL-2 (interleukine-2) et le TNF-α (facteur nécrosant des tumeurs) sont des cytokines, médiateurs solubles de l'immunité, qui permettent la communication entre différents acteurs du système immunitaire.

1.1.1.10. Tableau des valeurs toxicologiques (tous aspects)

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

Toxicité	Voie administration	Valeurs repères	Toxine	Source
Aiguë	Orale	DL ₅₀ = 5 mg.kg ⁻¹ (souris, gavage)	MC-LR	(Fawell <i>et al.</i> 1994, Fawell <i>et al.</i> 1999a)
		DL ₅₀ = 10,9 mg.kg ⁻¹ (souris, gavage)	MC-LR	(Yoshida <i>et al.</i> 1997)
	IP	25 µg.kg ⁻¹ < DL ₅₀ < 150 µg.kg ⁻¹	MC-LR	(Kuiper-Goodman <i>et al.</i> 1999)
	IN	36 µg.kg ⁻¹ < DL ₅₀ < 122 µg.kg ⁻¹	MC-LR	(Fitzgeorge <i>et al.</i> 1994)
	IT	50 µg.kg ⁻¹ < DL ₅₀ < 100 µg.kg ⁻¹	MC-LR	(Ito <i>et al.</i> 2001)
Subchronique	Orale	DSENO = 40 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ (souris, gavage, 13 semaines)	MC-LR	(Fawell <i>et al.</i> 1994, Fawell <i>et al.</i> 1999a)
		DMENO = 50 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ (rat, eau de boisson, 28 jours)	MC-LR	(Heinze 1999)
		DMENO = 100 µg/kg p.c. j ⁻¹ (porc, eau de boisson, 44 jours)	Extrait de <i>M. aeruginosa</i>	(Falconer 1994)
		DSENO = 333 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ (souris, alimentation, 43 jours)	Extrait d' <i>A. flos-aquae</i>	(Schaeffer <i>et al.</i> 1999)
Embryotoxicité	Orale	DSENO = 600 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ (souris, gavage, 10 jours)	MC-LR	(Fawell <i>et al.</i> 1994, Fawell <i>et al.</i> 1999a)
		DSENO = 333 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ (souris, alimentation, pendant la gestation et la lactation)	Extrait d' <i>A. flos-aquae</i>	(Schaeffer <i>et al.</i> 1999)
Tératogénèse	Orale	DSENO = 333 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ (souris, alimentation, pendant la gestation et la lactation)	Extrait d' <i>A. flos-aquae</i>	(Schaeffer <i>et al.</i> 1999)

1.1.1.11. Conclusions

Par voie orale (en gavage) et selon la souche de souris, la DL₅₀ de la MC-LR, à 24 h, varie entre 5 mg.kg⁻¹ et 10,9 mg.kg⁻¹.

Les toxicités par voies intranasale et intratrachéale sont aussi élevées que par voie intrapéritonéale. Des effets cumulatifs, mesurés par l'augmentation de poids du foie, ont été rapportés par exposition intranasale avec une dose de 31,3 µg.kg⁻¹.j⁻¹ (pendant 7 jours).

La MC-LR est un promoteur tumoral avéré mais il n'est pas clairement établi que cette substance soit génotoxique.

Concernant les effets subchroniques, les conditions expérimentales de l'étude de Fawell *et al.* (1994) avec de la MC-LR pure administrée par gavage à des souris pendant 13 semaines et observation d'effets précoces, permettent de considérer la DSENO de 40 µg.kg⁻¹.j⁻¹ comme pertinente pour rendre compte d'une exposition subchronique.

Cette valeur a été retenue par l'OMS pour établir une dose journalière tolérable (DJT) par voie orale de 0,04 µg.kg⁻¹.j⁻¹ avec application d'un facteur de sécurité de 1 000 : 10 pour la transposition à l'homme, 10 pour la variabilité de la sensibilité au sein de l'espèce humaine, 10 pour tenir compte de la durée de l'étude, de la promotion tumorale, des connaissances réduites dans le domaine de la toxicité de la reproduction (chapitres VI et VII).

En retenant une consommation de 2 L d'eau par jour pour un adulte de 60 kg, si l'eau représente 80 % des apports quotidiens en microcystine, la concentration maximale de microcystine-LR admissible dans l'eau de boisson est de 1 µg.L⁻¹.

Compte tenu de la toxicité aiguë de cette toxine, Dietrich et Hoeger (2005) ont cherché à identifier une valeur de référence aiguë. Ils proposent de s'appuyer sur la plus basse valeur sans effet hépatotoxique de microcystine-LR injectée par voie intra-péritonéale égale à $25 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Kotak *et al.* 1993) à laquelle ils appliquent un facteur de 10 considérant que la toxicité par voie i.p. est 10 fois plus forte que la toxicité par voie orale (soit $250 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) puis un facteur de sécurité de 100 d'extrapolation de l'animal à l'homme et de variabilité intra espèce, soit une valeur toxicologique de référence aiguë de $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

La dose unique sans effet est donc pour un adulte de 60 kg égale à 150 μg ; pour un enfant de 20 kg de 50 μg et un nourrisson de 12,5 μg .

1.1.2. Les nodularines (Nod)

Neuf nodularines ont été isolées à ce jour (Codd *et al.* 2005) et la plus étudiée est la nodularine R. La molécule qui contient une valine à la place de l'arginine est connue sous le nom de motuporine et a été isolée d'une éponge de Papouasie-Nouvelle-Guinée (De Silva *et al.* 1992). La toxicité de la nodularine présente des similitudes avec celle des MCs.

1.1.2.1. Mécanismes de la toxicité

Les études de toxicité ont été menées principalement sur la nodularine-R. Comme les MCs, la nodularine agit en inhibant des phosphatases à sérine/thréonine (PP1 et PP2A essentiellement), même si les potentialités d'inhibition sont différentes (Yoshizawa *et al.* 1990). À la différence des MCs, la toxine n'établit pas de liaison covalente avec les phosphatases (Goldberg *et al.* 1995, Bagu *et al.* 1997).

1.1.2.2. Absorption, distribution, métabolisme et excrétion

Suite à une administration i.p., le transport de la nodularine jusqu'au foie s'effectue *via* la veine porte et les structures du cycle entéro-hépatique (Towner *et al.* 2002). Il est possible que cette toxine soit moins efficacement absorbée que la MC, car le temps de survie après administration d'une dose létale minimale est plus long (2 à 3 h) que celui obtenu avec la MC-LR (1 à 1,5 h) (Carmichael *et al.* 1988).

Un conjugué au glutathion a été détecté dans les moules (Sipiä *et al.* 2001).

1.1.2.3. Toxicité aiguë

Pour la nodularine-R il n'existe que des données de toxicologie aiguë. Comme les MCs, l'intoxication aiguë par cette toxine provoque une nécrose du tissu hépatique avec hémorragie (Runnegar *et al.* 1988). Les DL_{50} i.p. varient, chez la souris, entre 50 et 150 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ et entre 50 et 60 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ chez le rat.

Une valeur de DL_{50} i.p. de 60 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ est généralement mentionnée pour cette toxine (Carmichael 1988, Eriksson *et al.* 1988, Kiviranta *et al.* 1990). Ces valeurs sont proches de celles obtenues avec la MC-LR pour la même voie d'administration, mais le temps de survie est supérieur avec la nodularine.

La toxicité par voie orale (boisson), chez la souris, est beaucoup moins importante que par voie i.p., au moins d'un facteur 200 (Kiviranta *et al.* 1990). Aucun effet toxique, par administration orale d'une efflorescence de *Nodularia*, à des souris et des rats, n'a été mis en évidence, alors qu'une toxicité était obtenue par voie i.p. (Kalbe 1984).

1.1.2.4. Génotoxicité et cancérogénèse

La formation d'adduits d'oxydation sur la guanine (8-oxo dG) a été observée après traitement par la nodularine-R, *in vitro* sur des hépatocytes primaires de rat (à 2 et 10 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) et *in vivo* sur le foie de rat, en i.p., à 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Maatouk *et al.* 2004).

Le potentiel cancérogène de la nodularine a été mis en évidence par des études *in vitro* et *in vivo*. Cette toxine est un promoteur tumoral plus puissant que la MC-LR (Sueoka *et al.* 1997). L'induction de foyers prénéoplasiques a été obtenue même en l'absence d'un traitement préalable avec un initiateur.

En accord avec ces observations, la nodularine s'est montrée capable d'activer plusieurs proto-oncogènes des familles *fos* et *jun* (en i.p., 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) ainsi que le TNF- α (Ohta *et al.* 1994). Cette induction, mesurée *in vitro* sur hépatocytes de rat, s'est révélée légèrement plus importante que celle engendrée par la MC LR.

Dans l'état actuel des connaissances, la nodularine peut-être considérée comme une substance cancérigène. La génotoxicité doit faire l'objet d'études complémentaires.

1.1.2.5. Autres toxicités

Il n'existe pas d'information publiée concernant la tératogenèse ou l'embryotoxicité pour la nodularine. Une étude rapporte l'inhibition de la biosynthèse de la testostérone par un phénomène d'apoptose affectant les cellules de Leydig (Park *et al.* 2002).

Une immunotoxicité affectant la lymphoprolifération de façon dose dépendante, a été mise en évidence *in vitro* et *in vivo* (Yea *et al.* 2001).

1.1.2.6. Conclusions

Il n'existe pas de données publiées de toxicité aiguë concernant la voie orale, pour la nodularine. Elle serait, chez la souris, du même ordre de grandeur (de l'ordre du mg.kg^{-1}) que celle obtenue avec la MC-LR.

Les données de toxicité chronique et subchronique font également défaut. La nodularine est un promoteur tumoral puissant. Il existe de fortes présomptions quant à son potentiel génotoxique.

Aussi, en l'état actuel des données disponibles, il n'est pas possible de déterminer une valeur toxicologique repère qui permette de dériver une valeur toxicologique de référence aiguë ou chronique. Compte tenu des présomptions qui pèsent sur son caractère génotoxique et cancérigène, des études sont nécessaires pour pouvoir mieux cerner le risque de cette famille de toxines.

1.1.3. La cylindrospermopsine (CYN)

1.1.3.1. Mécanismes de la toxicité

La cylindrospermopsine provoque une inhibition irréversible de la synthèse protéique en interagissant avec les ARN de transfert. La partie uracile de la toxine serait en partie responsable de sa toxicité, par inhibition compétitive au niveau d'un site catalytique.

1.1.3.2. Absorption, distribution, métabolisme et excrétion

Des travaux montrent que la cylindrospermopsine pénètre dans les cellules par simple diffusion, du fait de son faible poids moléculaire. Une faible fraction pourrait être prise en charge par les transporteurs des acides biliaires (Chong *et al.* 2002).

L'excrétion s'effectue comme suit : 50 % de la dose sont éliminés en 6 h dans l'urine, environ 10 % sont éliminés dans les fèces et 20 % se retrouvent dans le foie.

La métabolisation de la cylindrospermopsine requiert l'intervention des cytochromes P450⁽¹¹⁾ (Runnegar *et al.* 1995c). L'inhibition de ces cytochromes, par différents composés, offre un certain niveau de protection des souris vis-à-vis d'une dose létale en i.p. (Runnegar *et al.* 1995c, Banker *et al.* 2001, Froscio *et al.* 2001, Norris *et al.* 2002).

1.1.3.3. Toxicité aiguë

Les symptômes rapportés lors d'une intoxication humaine survenue en Australie sont : des malaises, des vomissements, des maux de tête, une perte d'appétit, des troubles du transit intestinal (diarrhée ou constipation), une déshydratation et une augmentation de la taille du foie.

En i.p. chez la souris, les altérations majeures sont rapportées sur le foie, mais le rein, le poumon, le thymus, la rate, le cœur et l'intestin peuvent également subir des dommages (Hawkins *et al.* 1985, Harada *et al.* 1994, Terao *et al.* 1994, Bernard *et al.* 2003). Les mêmes genres de lésions sont observés lors d'une administration orale par gavage (Seawright *et al.* 1999).

Par voie i.p., la mortalité chez la souris est observée au-delà de $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$. La DL_{50} à 24 h est estimée à $2100 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Elle est de 200 et $170 \mu\text{g.kg}^{-1}$ à 5 et 7 jours respectivement (Ohtani *et al.* 1992).

Par voie orale chez la souris, la DL_{50} , obtenue avec des extraits de cultures de *C. raciborskii*, est comprise entre $4,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ et $6,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ en équivalent CYN (Seawright *et al.* 1999, Shaw *et al.* 2000).

(11) Les cytochromes P450 constituent une famille d'enzymes impliquées dans le métabolisme des stéroïdes et la détoxification des xénobiotiques (drogues, médicaments, polluants). Ils sont particulièrement abondant dans le foie.

1.1.3.4. Toxicités chronique et sub-chronique

L'ingestion par gavage chez la souris, pendant 10 et 11 semaines, donne des valeurs de DSENO de $30 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ et de $60 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ selon les effets observés (Humpage & Falconer 2003).

Dans une autre étude, l'exposition à des extraits, par gavage (14 jours) et *via* l'eau de boisson (90 jours), a permis de définir des DSENO de $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ et de $150 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ respectivement. La différence de toxicité obtenue, pourrait s'expliquer par des dommages au niveau du tractus gastro-intestinal, provoqués par les gavages successifs, qui accroîtraient l'absorption de la toxine (Shaw *et al.* 2000).

Aucune étude de toxicité à long terme n'est disponible actuellement pour cette toxine.

1.1.3.5. Génotoxicité et cancérogenèse

Concernant la génotoxicité, des adduits à l'ADN ont été obtenus *in vivo*, dans le foie de souris après injection ip. *In vitro* la formation de micronoyaux est rapportée et des cassures de l'ADN ont été obtenues (Humpage & Falconer 1999, Shaw *et al.* 2000). Les seuls cas d'intoxication humaine par de la CYN ont été signalés à Palm Island (Australie) en 1979. Le suivi de la population aborigène de cette zone exposée à cette toxine sur plusieurs années tend à montrer des taux de cancers hépatiques et gastro-intestinaux à des niveaux environ 5 fois plus élevés mais cette étude n'est pas jugée suffisante pour affirmer l'existence d'une relation causale (Falconer 2004).

1.1.3.6. Conclusions

En toxicité aiguë, par voie orale, la DL_{50} chez la souris se situe entre 4,4 et 6,9 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Une étude réalisée sur 11 semaines, par administration orale à des souris de cylindrospermopsine purifiée, permet de retenir une DSENO de $30 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ (Humpage & Falconer 2003).

Il est possible de retenir cette DSENO pour dériver une valeur toxicologique de référence chronique à **titre provisoire**, en l'attente de données plus robustes pour une telle estimation de risque. En appliquant un facteur de sécurité de 3000 (10 pour la variabilité interspécifique, 10 pour la variabilité intraspécifique, 10 pour le passage d'une étude subchronique à un risque chronique et 3 pour tenir compte du fait que des effets génotoxiques sont suspectés), on obtient une dose journalière tolérable de $0,01 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$.

En retenant l'hypothèse d'une consommation de 2 litres d'eau par jour pour un adulte de 60 kg, si l'eau représente 80 % des apports quotidiens en cylindrospermopsine, la concentration maximale de cylindrospermopsine admissible dans l'eau de boisson est de $0,24 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ arrondie à $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Les données concernant la cancérogenèse sont encore insuffisantes.

1.2. Les neurotoxines

1.2.1. Les anatoxines

Les trois anatoxines les plus étudiées sont l'anatoxine-a, l'anatoxine-a(s) et l'homoanatoxine.

1.2.1.1. Mécanismes de la toxicité

Les anatoxines, dont la cible est la jonction neuromusculaire, provoquent la paralysie des muscles striés squelettiques dont les muscles respiratoires. La mort survient par arrêt respiratoire en quelques minutes à quelques heures. L'anatoxine-a, l'anatoxine-a(s) et l'homoanatoxine ont cependant des modes d'action différents.

L'anatoxine-a est un agoniste nicotinique à acétylcholine des jonctions nerveuses et neuro-musculaires. Cette liaison provoque une dépolarisation locale qui ouvre les canaux Ca^{2+} et Na^{+} voltage dépendant. Suite à une dépolarisation extrême, la transmission électrique est bloquée.

L'anatoxine-a(s) est un inhibiteur irréversible de l'acétylcholinestérase. Elle présente un mécanisme d'action similaire à celui des insecticides organophosphorés. L'hypersalivation est l'un des nombreux symptômes rapportés lors d'intoxications animales. Cette salivation est à l'origine du (s) ajouté au nom de la toxine.

1.2.1.2. Toxicité aiguë

Pour l'anatoxine-a, les différentes voies d'administration ont été explorées. Les valeurs de DL_{50} obtenues chez la souris sont consignées dans le tableau III-II. Les doses toxiques par voies orale et intranasale sont beaucoup plus faibles que par voie intrapéritonéale.

Tableau III-II : Toxicité (DL₅₀ en µg.kg⁻¹) chez la souris pour différentes voies d'administration des toxines de type anatoxine (Mahmood & Carmichael 1986, Matsunaga *et al.* 1989, Fitzgeorge *et al.* 1994).

Toxine	Voie d'administration (dose en µg.kg ⁻¹)			
	Intrapéritonéale	Intraveineuse	Orale	Intranasale
Anatoxine-a	375	< 100	> 5 000	2 000
Homoanatoxine	250			
Anatoxine-a(s)	20			

1.2.1.3. Toxicités chronique et sub-chronique

Les données existantes ne concernent que l'anatoxine-a, en toxicité sub-chronique.

Par voie i.p. chez le rat aucune toxicité n'est rapportée à 80 µg.kg⁻¹.j⁻¹ pendant 21 jours (Astrachan *et al.* 1980).

Par voie orale, aucune toxicité n'est obtenue à 510 µg.kg⁻¹.j⁻¹ pendant 49 jours, chez le rat en ajoutant cette toxine partiellement purifiée à l'eau de boisson (Astrachan *et al.* 1980) tandis qu'une DSENO de 8 µg.kg⁻¹.j⁻¹ (toxine purifiée) est déterminée, chez la souris, par gavage pendant 4 semaines (Fawell *et al.* 1999b). Ces études apparaissent néanmoins insuffisantes pour dériver une valeur toxicologique de référence.

1.2.1.4. Génotoxicité et cancérogenèse

Les seuls résultats concernant cet aspect proviennent de l'étude de Repavich *et al.* (1990), dans laquelle des cassures chromosomiques ont été mises en évidence à partir de 0,8 µg.mL⁻¹ d'anatoxine-a(s), sur lymphocytes humains *in vitro*.

1.2.1.5. Reprotoxicité

Des malformations et des retards de croissance ont été observées, chez le fœtus, après administration i.p. de 125 µg.kg⁻¹ trois fois par jour d'anatoxine-a partiellement purifiée à des hamsters femelles gestantes (Astrachan *et al.* 1980).

Aucun signe de tératogenèse ni de toxicité maternelle n'a été rapporté, chez la souris, par gavage (2,46 mg.kg⁻¹.j) avec cette toxine (Fawell *et al.* 1999b).

1.2.1.6. Conclusion

Les valeurs toxicologiques concernent, pour l'essentiel, l'anatoxine-a. La DL₅₀ en intoxication aiguë par voie orale, pour cette toxine, est comprise entre 5 et 15 mg.kg⁻¹. Concernant les effets subchroniques ou chroniques, aucune valeur toxicologique n'apparaît comme pertinente pour établir une dose journalière tolérable.

Les données de génotoxicité et de cancérogenèse sont insuffisantes.

1.2.2. Les saxitoxines et leurs dérivés

Les saxitoxines et leurs dérivés ont été plus largement étudiés dans le domaine marin où elles sont responsables de l'IPFM (Intoxication Paralysante par les Fruits de Mer). Elles sont connues sous l'acronyme PSP pour « paralytic shellfish poisons ». Les données toxicologiques disponibles proviennent donc majoritairement des études menées dans ce cadre. De nombreux variants, classés en trois groupes, ont été identifiés : les carbamates (STX, neoSTX, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4), les décarbamoyles (dcSTX, dcGTX2, dcGTX3) et les sulfocarbamoyles (B1, B2, C1, C2, C3, C4). Parmi ces variants, la saxitoxine, qui est la plus toxique, est la mieux connue (tableau III-III).

1.2.2.1. Mécanismes de la toxicité

Les saxitoxines (STX) et leurs dérivés ont une action pharmacologique similaire à la tétrodontoxine (TTX) en agissant par blocage de la transmission nerveuse par liaison avec le site 1 des canaux Na⁺ voltage dépendant, qui traversent la membrane plasmique de nombreuses cellules excitables (nerfs, fibres de muscles squelettiques et la plupart des fibres musculaires cardiaques). Lorsqu'une dépolarisation appropriée de la membrane cellulaire a lieu, le canal change de conformation et permet ainsi le passage du sodium du milieu extracellulaire vers l'intérieur de la cellule. La repolarisation s'effectue par transport inverse des ions K⁺. Les saxitoxines et leurs dérivés bloquent les canaux sodium sans affecter les canaux potassium, provoquant un ralentissement ou l'abolition de la propagation du potentiel d'action. Tous les analogues sont considérés occuper le même site du récepteur mais les affinités diffèrent largement selon les structures des toxines et les isoformes des canaux (Shimizu 2000). La fonction 7,8,9-guanidine de la toxine est impliquée dans le blocage du canal.

1.2.2.2. Absorption, distribution, métabolisme et excrétion

En injection i.v., la STX, comme les substances acides, se distribue instantanément dans le compartiment vasculaire puis rapidement dans l'ensemble du corps (demi-vie sérique de 22 minutes). Elle est de plus capable de franchir la barrière hémato-encéphalique. Elle est séquestrée, dans différents tissus, par fixation à des récepteurs membranaires localisés. La demi-vie dans le corps est comprise entre 12 et 18 h.

Des études *in vitro* signalent le rôle d'un système de transport actif, impliqué dans l'absorption intestinale des saxitoxines et de leurs dérivés (Andrinolo *et al.* 2002). L'élimination de la toxine, par excrétion urinaire, n'est possible que lorsqu'elle est libre dans le compartiment intravasculaire. L'affinité des différents variants, avec les récepteurs cités ci-dessus, va donc déterminer l'efficacité de cette excrétion qui peut varier entre 10 et 25 % de la dose totale. Aucune élimination fécale n'a été mise en évidence (Hines *et al.* 1993, Stafford & Hines 1995, Andrinolo *et al.* 1999, Lagos & Andrinolo 2000).

Les expériences réalisées par Hines *et al.* (1993) et Andrinolo *et al.* (1999) concluent à l'absence de métabolisation de la STX. Pourtant, la biotransformation de cette toxine dans les coquillages, et son inactivation par fixation à des protéines dans les fluides circulatoires de différents animaux (amphibiens, poissons, reptiles et arthropodes) ont été mises en évidence (Negri & Jones 1995, Llewellyn 1997).

Les patients qui survivent 24 h à une intoxication par la saxitoxine et ses dérivés ont une excellente chance d'un rétablissement rapide (Long *et al.* 1990, Montebruno 1993). Ces observations suggèrent bien que ces toxines sont rapidement excrétées et/ou sont métabolisées. Si aucune donnée sur le métabolisme chez l'homme n'est disponible, en revanche, ces toxines ont été retrouvées dans le sérum et l'urine de patients intoxiqués en Alaska en 1994. L'élimination de la toxine présente dans le sérum est réalisée dans les 24 h et l'urine a été identifiée comme une route majeure d'excrétion (Gessner *et al.* 1997).

L'hydrolyse des toxines N-sulfocarbamoyles en carbamates plus toxiques ne semble pas être significative pour la santé humaine.

1.2.2.3. Toxicités aiguë et sublétales

En affectant la propagation du potentiel d'action, les saxitoxines et leurs dérivés conduisent à une paralysie, notamment des muscles respiratoires, ce qui provoque la mort en quelques minutes. Les carbamates (STX, neoSTX, GTX1 à GTX4) et les décarbamoyles (dcSTX, dcGTX2 et dcGTX3) sont les plus toxiques. La saxitoxine est le composé le plus puissant chez la souris. La toxicité relative des différentes toxines apparentées à la saxitoxine est présentée dans le tableau III-III.

Tableau III-III : Toxicité spécifique des analogues de saxitoxine, exprimée en unité souris (M.U. : Mouse Unit) par μ mole de toxine (Oshima 1995, Batoréu *et al.* 2005)

(* Après ré-examen, ** Estimé par la mesure de GTX1, GTX4 formés par hydrolyse acide)

Toxine	Toxicité spécifique (MU ⁽¹²⁾ . μ mole ⁻¹)	Toxicité relative
Carbamates		
STX	2 483	1
neoSTX	2 295	0,92
GTX1	2 468	0,99
GTX2	892	0,36
GTX3	1 584	0,64
GTX4	1 803	0,73
Décarbamoyle		
dcSTX	1 274	0,51
dcGTX2	382*	0,15
dcGTX3	935*0,38	
Sulfocarbamoyle		
B1 (GTX5)	160	0,064
B2 (GTX 6)	180	0,072
C1	15	0,006
C2	239	0,096
C3**	33	0,013
C4**	143	0,057

(12) Mouse unit : il s'agit de la quantité de saxitoxine qui fait mourir une souris de 20 g en 15 minutes après administration par voie intrapéritonéale.

Chez la souris, les DL₅₀ pour la saxitoxine sont d'environ 10 µg.kg⁻¹, 3 µg.kg⁻¹ et 260 µg.kg⁻¹ pour les voies i.p., i.v. et orale, respectivement (tableau III-IV).

Tableau III-IV : Toxicité aiguë de la STX chez la souris, par différentes voies d'administration (Wiberg & Stephenson 1960).

Voie d'administration	DL ₅₀ en µg.kg ⁻¹
Orale	260-263
Intraveineuse	2,4-3,4
Intrapéritonéale	9,0-11,6

La comparaison de susceptibilité entre différents animaux (tableau III-V) montre que la toxicité orale varie peu selon les espèces (McFarren *et al.* 1960).

Tableau III-V : Toxicités orales (DL₅₀ en µg.kg⁻¹) de la STX chez diverses espèces (McFarren *et al.* 1960, Mons *et al.* 1998).

Animal	Toxicité orale de la STX (DL ₅₀ en µg.kg ⁻¹)	
	Mons <i>et al.</i> (1998)	McFarren <i>et al.</i> (1960)
Souris	260-263	420
Rat	192-212	212
Singe	277-800	400-800
Chat	254-280	280
Lapin	181-200	200
Chien	180-200	200
Cochon d'Inde	128-135	128
Pigeon	91-100	100

L'exposition préalable à des doses de saxitoxine sublétales diminue la sensibilité des rats à une exposition ultérieure. Si l'on compare la DL₅₀ de rats prétraités et la DL₅₀ de rats non prétraités, celles des premiers est environ 50 % supérieure à celle des seconds (McFarren *et al.* 1960).

Selon Price *et al.* (1991), 200 à 500 µg équivalent-STX provoque chez l'homme des symptômes PSP légers (e.g. paralysie), 500 à 2000 µg des symptômes modérés et des doses supérieures à 2000 µg sont létales.

Une dose minimale de 2 µg.kg⁻¹, pour laquelle on observe des effets non nocifs (DMENO), a été identifiée à partir d'un ensemble de données de la littérature recensant les cas d'intoxications chez l'homme couvrant un large spectre de personnes (âge, sexe, ...), et à partir d'une intoxication à niveau moyen réversible (FAO/IOC/WHO 2004).

1.2.2.4. Autres toxicités

Les données de toxicité chronique, sub-chronique, de reprotoxicité et de cancérogénèse font défaut. L'étude de Repavich *et al.* (1990) signale un effet génotoxique (cassure de chromatides) avec de la néosaxitoxine sur des lymphocytes humains. Cependant la concentration en toxine utilisée n'est pas connue.

1.2.2.5. Conclusions

Une dose minimale, pour laquelle on observe des effets non nocifs, de 2 µg.kg⁻¹ a été identifiée à partir d'un ensemble de données de la littérature recensant les cas d'intoxications chez l'homme. Suite à la récente consultation d'experts FAO/IOC/WHO en septembre 2004 sur les phycotoxines retrouvées dans les mollusques bivalves, une dose de référence aiguë de 0,7 µg.kg⁻¹ d'équivalent-STX a été déterminée pour ce type de composés en appliquant un facteur de sécurité de 3 à la dose de 2 µg.kg⁻¹.

Tous les autres aspects toxicologiques sont insuffisamment documentés, pour ces toxines, notamment les effets chroniques et aucune valeur de référence chronique n'a pu être établie.

1.3. Les molécules à effets irritants

Les effets irritants des molécules provenant de cyanobactéries sont peu documentés.

Des cyanotoxines à effets irritants ou allergiques ont été identifiées en milieu marin et saumâtre : il s'agit de l'aplysiatoxine, de la débromoaplysiatoxine et de la lyngbyatoxine (Mynderse *et al.* 1977, Cardellina *et al.* 1979).

La présence de ces toxines en eau de mer provoque, chez le baigneur, des allergies et des irritations sévères, connues sous le nom de « démangeaison du baigneur ». Ces toxines se sont également révélées être de puissants promoteurs de tumeurs (Fujiki *et al.* 1990). En revanche, en eau douce, aucune de ces toxines n'a été identifiée jusqu'à nos jours.

Néanmoins, des phénomènes d'irritations liés à la baignade dans des plans d'eau douce contaminés par des cyanobactéries ont été rapportés et confirmés par une approche épidémiologique. En effet, l'étude de Pilotto *et al.* (1997) a montré que la fréquence des symptômes d'irritation de la peau et des oreilles survenus chez les individus ayant pratiqué des activités aquatiques dans une eau contaminée par des cyanobactéries (> 5 000 cellules.mL⁻¹) était corrélée à la quantité de cyanobactéries et au temps passé dans l'eau.

Plusieurs études ont cherché à identifier l'agent causal.

Ainsi, Törökné *et al.* (2001) ont mis en évidence, en utilisant des tests toxicologiques de référence, des effets allergiques et d'irritation plus ou moins importants avec des échantillons naturels d'efflorescences monospécifiques (*Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* et *Cylindrospermopsis*). En revanche, des souches axéniques également testées dans cette étude (*Anabaena*, *Oscillatoria* et *Microcystis*), n'étaient pas allergènes.

Dans une étude plus récente, Pilotto *et al.* (2004) n'ont pas pu établir de relation dose dépendante, en appliquant des patchs contenant des cyanobactéries à des volontaires.

De plus, ni les études de Pilotto *et al.* (1997, 2004), ni l'étude de Törökné *et al.* (2001) n'ont permis d'identifier avec certitude l'agent causal.

À l'heure actuelle, trois hypothèses sont avancées pour expliquer les effets irritants ou allergiques observés après la baignade ou la pratique de sports nautiques dans les plans d'eau douce. Il pourrait s'agir :

- de cyanotoxines non identifiées ;
- de LPS de cyanobactéries ;
- d'autres molécules irritantes ou allergéniques associées aux cyanobactéries.

En conclusion, des phénomènes d'irritation et d'allergie ont été observés chez des individus ayant pratiqué la baignade ou des sports aquatiques dans des eaux contaminées par des cyanobactéries. Cependant, en eau douce, le ou les agents responsables de ces phénomènes n'ont pas été identifiés. La mise en place d'un programme de recherche destiné à identifier l'agent causal est donc nécessaire.

Tableau III-VI : Tableau récapitulatif des valeurs toxicologiques répertoriées. Les valeurs toxicologiques retenues comme valeurs repères sont en gras.

Toxines	Toxicité	Valeurs Repères	Toxines	Sources
Microcystines	Subchronique	<p>DSENO = 40 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (souris, gavage, 13 semaines)</p> <p>DMENO = 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (porc, eau de boisson, 44 jours)</p> <p>DMENO = 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (rat, eau de boisson, 28 jours)</p> <p>DSENO = 333 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (souris, alimentation, 43 jours)</p>	<p>MC-LR</p> <p>Extrait de <i>Microcystis aeruginosa</i></p> <p>MC-LR</p> <p>Extrait d'<i>A. flos-aquae</i></p>	<p>Fawell et al. (1994, 1999)</p> <p>Falconer et al. (1994)</p> <p>Heinze (1999)</p> <p>Schaeffer et al. (1999)</p>
	Embryotoxicité Tératogénèse	<p>DSENO = 600 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (souris, gavage, 10 jours)</p> <p>DSENO = 333 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (souris, alimentation, pendant la gestation et la lactation)</p>	<p>MC-LR</p> <p>Extrait d'<i>A. flos-aquae</i></p>	<p>Fawell et al. (1994, 1999)</p> <p>Schaeffer et al. (1999)</p>
Cylindrospermopsine	Subchronique	<p>DSENO = 10 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (souris, gavage, 14 jours)</p> <p>DSENO = 150 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (souris, eau de boisson, 90 jours)</p> <p>DSENO = 30 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (souris, gavage 1 fois/J, 11 semaines)</p>	<p>Culture (<i>C. raciborskii</i>)</p> <p>Extrait acellulaire (<i>C. raciborskii</i>)</p> <p>CYN</p>	<p>Shaw et al. (2000)</p> <p>Shaw et al. (2000)</p> <p>Humpage et Falconer (2003)</p>
Anatoxine-a	Subchronique	<p>DSENO = 98 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (souris, gavage, 28 jours)</p> <p>DSENO = 510 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (rat, eau de boisson, 49 jours)</p>	<p>Anatoxine-a</p> <p>Anatoxine-a partiellement purifiée</p>	<p>Fawell et al. (1999)</p> <p>Astrakan et al. (1980)</p>
	Embryotoxicité Tératogénèse	<p>DSENO = 2,46 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (souris, gavage, 10 jours)</p>	<p>Anatoxine-a</p>	<p>Fawell et al. (1999)</p>
Saxitoxine	Aiguë	<p>DSNEO = 2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (cas d'intoxications chez l'homme)</p>	<p>équivalent-STX</p>	<p>FAO/IOC/WHO (2004)</p>

Points à retenir

- Trois principaux types de toxicité sont associés aux cyanotoxines : l'hépatotoxicité, la neurotoxicité et, de manière moins établie, la dermatotoxicité.
- Des différences de toxicité existent entre les variants d'une même famille de toxines.
- D'une façon générale, la toxicité des cyanotoxines par voie orale est plus faible que par voie intrapéritonéale. Pour la microcystine-LR, la DL₅₀ est comprise entre 5 mg.kg⁻¹ et 10,9 mg.kg⁻¹ par voie orale alors qu'elle est comprise entre 25 µg.kg⁻¹ et 150 µg.kg⁻¹ par voie intrapéritonéale.
- La toxicité aiguë a été évaluée pour les hépatotoxines (microcystines, nodularine-R et cylindrospermopsine) ainsi que pour les neurotoxines (anatoxines, saxitoxines).
- Quelques études chez l'animal ont permis d'identifier des effets subchroniques et chroniques de la microcystine-LR. Pour les nodularines, la cylindrospermopsine et les neurotoxines (anatoxines, saxitoxines), ces effets restent à étudier.
- Pour la microcystine-LR, la dose sans effet nocif observé de 40 µg.kg⁻¹.j⁻¹ en exposition subchronique peut être retenue comme valeur toxicologique repère. L'OMS a défini une DJT pour une exposition chronique de 0,04 µg.kg⁻¹.j⁻¹ à partir de cette valeur.
- La dose sans effet nocif observé de 30 µg.kg⁻¹.j⁻¹ pour la cylindrospermopsine, obtenue en exposition subchronique, peut être retenue comme valeur toxicologique repère.
- Pour les anatoxines, seule l'anatoxine-a a fait l'objet de quelques études de toxicité subchronique. Cependant, compte tenu de la qualité de ces études, aucune valeur toxicologique repère n'a pu être identifiée.
- Pour les saxitoxines, une valeur toxicologique repère de 2 µg.kg⁻¹ a été identifiée à partir d'un ensemble de données de la littérature recensant les cas d'intoxications chez l'homme. Cette valeur a été retenue par un groupe d'experts de la FAO pour dériver une valeur de référence aiguë de 0,7 µg.kg⁻¹ (facteur de sécurité de 3 appliquée à la valeur toxicologique repère).
- La cancérogenèse a été insuffisamment étudiée pour les cyanotoxines. Les études disponibles montrent que la microcystine-LR et la nodularine sont des substances potentiellement cancérogènes par effet de promotion tumorale. Il existe de fortes présomptions quant à la génotoxicité de la nodularine. Pour la microcystine-LR, le potentiel génotoxique n'est pas clairement établi.
- Les composés responsables des effets irritants restent à identifier.
- En conclusion, les connaissances sur le devenir des cyanotoxines dans l'organisme humain et animal (absorption, distribution, métabolisme et excrétion) et leurs propriétés toxiques sont très parcellaires et de nombreuses études seront nécessaires pour caractériser le risque que peuvent présenter ces substances. L'acquisition de données toxicologiques est limitée par l'absence ou le coût élevé des toxines purifiées.

Dans un souci d'aide à la décision pour le gestionnaire, au regard des données disponibles et en l'attente de nouvelles études de toxicologie, des valeurs toxicologiques de référence peuvent être retenues à **titre provisoire**, en plus de la DJT de **0,040 µg.kg⁻¹.j⁻¹** et de la concentration maximale réglementaire dans l'eau de boisson de **1 µg.L⁻¹**, déjà fixée par l'OMS pour la **microcystine-LR** :

Microcystine-LR

Valeur toxicologique de référence aiguë : **2,5 µg.kg⁻¹** (soit 150 µg pour un adulte de 60 kg, 50 µg pour un enfant de 20 kg et 12,5 µg pour un nourrisson de 5 kg).

Cas des mélanges de microcystines : il est conseillé d'additionner les résultats obtenus pour les différentes microcystines et de comparer à la valeur de référence aiguë ou à la DJT.

Cylindrospermopsine

Valeur toxicologique de référence chronique : **0,01 µg.kg⁻¹.j⁻¹**.

Concentration maximale tolérable dans l'eau de boisson : **0,3 µg.L⁻¹** calculée sur la base d'un adulte de 60 kg, consommant 2 litres d'eau par jour et en considérant que l'apport de l'eau représente 80 % des apports totaux en toxine.

Saxitoxines

Valeur toxicologique de référence aiguë : **0,7 µg.kg⁻¹**.

Concentration maximale tolérable dans l'eau de boisson : **3 µg.L⁻¹** en équivalent saxitoxine.

2. Épidémiologie des intoxications par les cyanotoxines

2.1. Intoxications animales

Le premier cas publié d'intoxication animale par les cyanotoxines remonte au XIX^e siècle. Francis (1878) rapporte l'intoxication mortelle d'animaux domestiques (bovins, ovins, chevaux, porcs et chiens) par ingestion d'une écume de *Nodularia spumigena* en Australie. Depuis, de nombreux cas d'intoxications aiguës affectant des animaux domestiques ou sauvages (poissons, canards, foulques et autres oiseaux d'eau, rats musqués, visons, moufettes et rhinocéros) ont été décrits sur tous les continents (Chorus & Bartram 1999, Briand *et al.* 2003). L'apparition de cas d'intoxication par les cyanotoxines en conditions naturelles de production et d'exposition alimente la problématique des risques pour la santé humaine. Ces intoxications signifient que des concentrations environnementales réalistes de cyanotoxines sont susceptibles de produire des effets aigus sur la santé des animaux voire des humains.

2.1.1. Intoxications hépatiques

Les signes de **toxicité hépatique** sont les plus fréquemment décrits lors des autopsies. Dans les cas les plus récents, l'ingestion de cyanobactéries et les lésions caractéristiques du foie ont pu être mises en évidence. Les cyanobactéries qui ont été impliquées le plus fréquemment dans ces épisodes sont les suivantes (Chorus & Bartram 1999) :

- *Microcystis aeruginosa* ;
- *Nodularia spumigena* ;
- *Planktothrix agardhii* (ex-*Oscillatoria agardhii*) ;
- *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Les toxines impliquées de façon certaine dans des cas d'intoxication hépatique sont les suivantes :

- nodularine ;
- microcystines ;
- cylindrospermopsines.

Il serait intéressant d'accorder une importance plus grande aux lésions observées en parallèle du syndrome prédominant lors de telles intoxications. Elles peuvent être indicatives d'activités secondaires des toxines. En particulier, la cylindrospermopsine (Thomas *et al.* 1998, Saker & Eaglesham 1999) présente lors d'intoxication naturelle une activité sur le système cardiovasculaire (hémorragies épocardiques et myocardiques), confirmée lors d'études toxicologiques sur des modèles animaux (Seawright *et al.* 1999).

Mortalité de bovins en estive sur les alpages suisses (Mez *et al.* 1997)

Trois principaux types de toxicité sont associés aux cyanotoxines : l'hépatotoxicité, la neurotoxicité et, de Au cours des deux dernières décades, plus de 100 bovins ont été trouvés morts au pâturage sur un nombre limité d'alpages du comté des Grisons en Suisse. Les mortalités dues à une nécrose aiguë du foie apparaissaient de mi-août à mi-septembre, en général suite à des périodes de temps sec et chaud. La clinique des animaux trouvés en vie comprenait parfois des signes neurologiques. Les autopsies montraient, outre les lésions hépatiques, des atteintes du système cardiovasculaire. Les petits lacs glaciaires oligotrophes reliés par des ruisseaux constituent la seule source d'abreuvement des troupeaux. Des tapis cyanobactériens se forment dans ces points d'eau et tendent à s'accumuler sur la grève. Les auteurs ont mis en évidence la production de microcystines par les souches d'*Oscillatoria limosa* et *O. tenuis* constitutives de ces tapis. Sur des données convergentes, ils concluent à l'intoxication du bétail par ces cyanotoxines, sans écarter la présence concomitante d'une neurotoxine.

2.1.2. Intoxications neurologiques

D'après Chorus et Bartram (1999), les autres mortalités d'animaux fréquemment attribuées à des cyanobactéries correspondent à des intoxications neurologiques aiguës menant à la mort par paralysie respiratoire. Elles ont concerné des animaux domestiques (bovins, ovins, chiens) ou sauvages (oiseaux d'eau). Les toxines impliquées sont :

- anatoxine-a et -a(s) ;
- saxitoxines.

Les cyanobactéries associées comprenaient les espèces suivantes :

- *Anabaena flos-aquae* ;
- *Anabaena circinalis* ;
- *Aphanizomenon flos-aquae* ;
- *Cylindrospermopsis raciborskii* ;
- *Oscillatoria sp.* ;
- *Phormidium favosum*.

Intoxications de chiens par l'anatoxine-a en Écosse (Edwards *et al.* 1992)

En juillet 1990 et 1991 plusieurs chiens sont morts après s'être baignés ou avoir bu près de la berge du Loch Inch. La mort se produisit dans les 30 minutes suivant l'apparition des symptômes, qui évoquaient une neuro-intoxication. Le lac ne présentait pas d'efflorescence flagrante à cette période, mais les abords de la berge étaient recouverts par des tapis de cyanobactéries benthiques du genre *Oscillatoria*. Les extraits obtenus à partir des tapis bactériens et des contenus stomacaux des chiens morts se sont révélés très neurotoxiques lors du test souris et contenaient de l'anatoxine-a. La souche de cyanobactéries isolée du lac et mise en culture produisait également cette toxine. Les auteurs n'ont pas trouvé de microcystines dans ces extraits mais n'écartent cependant pas la présence possible d'autres cyanotoxines masquées par l'effet très rapide de l'anatoxine-a.

2.1.3. Autres intoxications

Si les cas d'intoxications aiguës sont les plus fréquemment rapportés, au moins un épisode de mortalité différée a été signalé. Il concerne des moutons intoxiqués par *Microcystis aeruginosa*. Les signes cliniques sont ceux d'une insuffisance hépatique associée à une photosensibilisation secondaire, qui se manifeste par des réactions semblables à de très sévères coups de soleil (Carbis *et al.* 1995).

Il est remarquable que les ruminants soient victimes de ces intoxications au même titre que les animaux monogastriques. Ceci suggère que l'absorption des cyanotoxines est particulièrement rapide par rapport à leur transformation par les microorganismes du rumen ou que cette transformation n'a pas lieu.

Les mortalités de poissons lors d'efflorescences de cyanobactéries peuvent être dues à la déplétion nocturne en oxygène dissous et ne doivent pas être systématiquement imputées à la présence de toxines.

L'absence d'observations concernant des effets à long terme sur la santé des animaux est à souligner. Cependant ceci ne permet pas de conclure à l'absence d'effets sur la santé lors d'expositions chroniques à de faibles concentrations de toxines. En effet, aucune étude épidémiologique ne semble avoir été conduite sur des populations soumises à une telle exposition.

Codd (1983) rapporte qu'un sondage non publié réalisé par plusieurs scientifiques sur 26 pays d'Europe indique que la moitié d'entre eux ont connu des cas d'intoxications animales avérées ou probables par les cyanotoxines.

Tableau III-VII : Intoxications animales en Europe (hors France) documentées dans la littérature scientifique.

Lieu, année (référence)	Cyanobactérie et/ou toxine impliquée ou suspectée	Cas rapportés	Contexte de l'intoxication
Royaume-Uni, 1989 (Done & Bain 1993)	<i>M. aeruginosa</i>	Mortalités de 15 chiens et 20 moutons. Nécrose hépatique accompagnée d'hémorragies, néphrose tubulaire chez deux moutons autopsiés.	Abreuvement dans le lac affecté par une efflorescence et mort dans les prés à proximité.
Ecosse, 1990 et 1991 (Gunn <i>et al.</i> 1992), Edwards <i>et al.</i> , 1992)	<i>Oscillatoria</i> benthique Anatoxine-a, hépatotoxine ?	3 chiens morts en 1990. 1 chien mort en 1991, 1 chien avec signes neurologiques, hypersalivation guéri après traitement vomitif	Promenade le long de la rive, abreuvement ou baignade selon les cas.
Ecosse, 1992 (Codd <i>et al.</i> 1992)	<i>Oscillatoria</i> benthique Anatoxine-a	Neuro-intoxications avec 2 chiens morts, 2 chiens guéris Identification des cyanobactéries et des toxines dans les échantillons environnementaux et l'estomac des chiens.	Consommation sur la rive de vase et de matelas d'algues décollés du fond.
Suisse, années 70 à 95 (Mez <i>et al.</i> 1994), Mez <i>et al.</i> , 1997, (Naegeli <i>et al.</i> 1997)	<i>Oscillatoria</i> benthique	Mortalités de veaux et de génisses en alpage (plus de 100 sur la période). Clinique mixte incluant des symptômes neurologiques et des signes d'hépatotoxicité après autopsie.	Abreuvement dans des mares ou des petits torrents, caractérisés par la présence de matelas sur le fond ou flottant à la surface.
Italie, 1997 (Giovannardi <i>et al.</i> 1999)	<i>Oscillatoria</i> et <i>Aphanizomenon</i> dominants, <i>Anabaena</i> Saxitoxine.	Mortalités de poissons et de mollusques. Contamination de la chair de ces deux classes d'animaux par la saxitoxine.	Contamination par l'alimentation ou par immersion.

2.1.4. Intoxications animales décrites en France

En France, de rares épisodes de mortalités d'animaux en relation avec une exposition aux cyanobactéries ont été recensés dans le cadre du Rapport final de la Direction des Services vétérinaires (DSV) de Lozère sur les risques induits par les cyanobactéries d'eau douce (Sarazin *et al.* 2000) commandé par le Ministère en charge de l'environnement et la Direction Générale de la Santé (DGS). Selon l'enquête EFFLOCYA, des mortalités de poissons et d'oiseaux sont apparues sur 22 % des sites affectés par une efflorescence. Il n'a pas pu être démontré que ces mortalités étaient spécifiquement dues à des toxines de cyanobactéries. L'évaluation de la toxicité de l'efflorescence n'a pas systématiquement été réalisée et les examens vétérinaires réalisés sur certains sites n'ont pas permis de déterminer la cause des mortalités. Aucune mortalité de bovins ou d'ovins n'a été recensée. Par ailleurs, le rapport regroupe d'autres travaux de suivis d'efflorescences. Au lac de Villerest, affecté en 1992 par une efflorescence à *Microcystis aeruginosa*, un chien est mort d'une nécrose hépatique à la suite d'une baignade. En 1998, les concentrations en microcystine-LR ont atteint 40 µg.L⁻¹ dans les cellules et 2 µg.L⁻¹ pour la fraction dissoute.

Pendant les étés 2002 et 2003 des mortalités suspectes de chiens et de chevreuils ont été observées en Lozère. Ainsi en 2002, des 26 chiens qui ont présenté les signes d'une intoxication neurologique, 20 sont morts. En 2003, ce sont 11 chiens qui ont montré des symptômes d'intoxication et 6 animaux en sont morts. L'hypothèse d'une intoxication par malveillance ou par exposition accidentelle à des produits à usage agricole a été écartée après l'enquête de gendarmerie et la recherche dans l'estomac des animaux des produits toxiques pouvant être incriminés, notamment les organophosphorés et les carbamates. En effet des inhibiteurs des cholinestérases qui n'ont pu être identifiés ont été détectés dans l'estomac de plusieurs chiens. Par ailleurs, des cyanobactéries potentiellement neurotoxiques sont identifiées parfois en très grande quantité sur les sites où les chiens se sont baignés. L'anatoxine-a est identifiée dans un échantillon prélevé plusieurs semaines après les mortalités. Un faisceau de présomptions permet d'incriminer ces organismes, même si l'identification formelle de toxines dans l'estomac des animaux a échoué (Bertrand *et al.* 2004).

Pendant l'été 2003, trois chiens ont présenté des troubles nerveux après s'être baignés dans une rivière du Jura et deux sont morts. Les contenus stomacaux de deux chiens contenaient du phytoplancton dont des genres de cyanobactéries potentiellement toxiques. Les échantillons environnementaux ont révélé la présence majoritaire de cyanobactéries benthiques et périphytiques. La recherche des toxines a montré l'absence de microcystine ou de saxitoxine, mais la présence d'anatoxine-a. L'anatoxine-a a également été identifiée dans le foie d'un des chiens. Une souche de *Phormidium favosum*, isolée des prélèvements environnementaux, a été identifiée comme produisant de l'anatoxine-a (Gugger *et al.* 2005).

L'observation de mortalités d'animaux est parfois proposée comme critère d'alerte pour la surveillance de la toxicité des efflorescences de cyanobactéries. L'examen des données recueillies au cours de l'enquête EFFLOCYA montre que des problèmes ont été signalés chez l'homme (dermatoses, conjonctivites, problèmes respiratoires) en l'absence de mortalités d'animaux. Ce critère ne semble donc pas assez sensible pour assurer la protection des populations. L'observation de mortalités animales reste cependant un indicateur de l'urgence des mesures à prendre et surtout un indicateur de l'existence ou de la persistance de problèmes de toxicité.

2.2. Intoxications humaines

2.2.1. Effets sur la santé à court terme

Les gastro-entérites et les affections hépatiques constituent la pathologie la plus citée parmi les cas d'intoxications humaines par les cyanotoxines (tableau III-VIII).

Tableau III-VIII : Cas rapportés ou suspectés d'intoxications par cyanotoxines dans l'eau de distribution.

Lieu, année (référence)	Cyanobactérie et/ou toxine impliquée ou suspectée	Cas rapportés	Contexte de la contamination
Ohio River, USA, 1931 (Tisdale 1931)	Prolifération de cyanobactéries	Gastro-entérites.	Traitement apporté à l'eau (au moment de l'épidémie sauf si précisé pour la combattre) Développement d'une prolifération sur un bras du fleuve, lors d'une sécheresse exceptionnelle. Préchloration, sédimentation, filtration, chloration, sulfate de cuivre, aération, charbon activé, permanganate, ammonium, déchloration : tous inefficaces pour réduire le goût, l'odeur, ou la teneur en toxines.
Harare, Zimbabwe, 1960-1965 (Zilberg 1966)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Gastro-entérites saisonnières chez l'enfant.	Développement saisonnier d'une prolifération.
USA (Lippy & Erb 1976)	Plus de 100 000 cell.L ⁻¹ des genres <i>Schizotrix</i> , <i>Plectonema</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Lyngbya</i>	Gastro-entérites touchant 62% de la population raccordée sur 5 jours.	Cas survenus dans les 5 jours suivant le traitement de la ressource au CuSO ₄ . Traitement : filtration, chloration.
Palm Island, Australie, 1979 (Bourke <i>et al.</i> 1983)	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> cylindrospermopsine	Hépto-entérites, 148 hospitalisations (enfants surtout).	Cas survenus dans la semaine ayant suivi le traitement de la ressource au CuSO ₄ . Traitement : préchloration, clarification au sulfate de cuivre, filtration, chloration.
Armidale, Australie, 1981 (Falconer <i>et al.</i> 1983a)	<i>Microcystis</i>	Plusieurs gastro-entérites. Affections du foie.	Modification des paramètres biologiques après le traitement de la ressource au CuSO ₄ (1 ppm).
Itaparica Dam, Brésil, 1988 (Teixeira <i>et al.</i> 1993)	<i>Anabaena</i> et <i>Microcystis</i> (eau brute : 1104 - 9755 colonies.mL ⁻¹) ^a	2 000 gastro-entérites sur 42 jours, dont 88 mortelles (surtout des enfants).	Développement d'une immense prolifération dans le réservoir.
Caruaru, Brésil, 1996 (Jochimsen <i>et al.</i> 1998, Pouria <i>et al.</i> 1998)	<i>Aphanizomenon spp.</i> <i>Oscillatoria spp.</i> Microcystines	Unité d'hémodialyse : 166 cas de symptômes neurologiques et des signes d'hépatotoxicité, 60 morts.	Evènement survenu après une période de sécheresse. Traitement municipal de l'eau : décantation, filtration sur sable, chloration. A l'unité de dialyse : filtration sur sable, charbon, résine échangeuse d'ions et filtration « micropore ».

^a la conversion en cellules.mL⁻¹ dépend de la taille des colonies. Dans une telle prolifération, un minimum de 100 cellules par colonie peut être attendu (Chorus & Bartram 1999).

Les intoxications aiguës répertoriées dans la littérature scientifique coïncident toutes soit avec la sénescence naturelle d'une efflorescence, soit avec la destruction d'une efflorescence par application d'un traitement algicide. Ces deux mécanismes ont pour effet la libération des toxines intracellulaires. Ceci peut conduire à des intoxications à caractère épidémique si les dispositifs de traitement de l'eau ne permettent pas d'éliminer les toxines dissoutes.

Il est à noter que la littérature ne rapporte pas de cas d'intoxication individuelle, ceux-ci passent probablement inaperçus dans l'ensemble des gastro-entérites idiopathiques.

Les comptes-rendus de certains épisodes d'intoxication contiennent des informations épidémiologiques précieuses, ils sont développés ci-dessous.

2.2.1.1. Troubles intestinaux suite à une exposition orale

Tisdale (1931) relate le développement d'une épidémie de troubles intestinaux dans la ville de Charleston, USA. Cette épidémie, qui n'a pu être attribuée à aucun agent infectieux, a coïncidé avec l'invasion de la ressource en eau par des cyanobactéries à l'origine d'un goût et d'une odeur très désagréables. Les autorités sanitaires ont pressé les habitants de boire cette eau, dont les paramètres microbiologiques étaient conformes aux critères définis pour l'eau potable, plutôt que d'utiliser des sources ou des puits de qualité douteuse. L'épidémie a touché plusieurs milliers de personnes, soit 10 à 15 % de la population des quartiers alimentés par cette ressource, pendant la semaine où l'odeur et le goût de l'eau potable étaient les plus prononcés. La clinique est celle d'une gastro-entérite d'apparition soudaine et afébrile, touchant plutôt les personnes âgées de plus de 10 ans.

Au Brésil, Teixeira *et al.* (1993) attribuent une épidémie de gastro-entérite à la consommation de l'eau du barrage d'Itaparica dans la région de Bahia. Environ 2000 cas, dont 88 se révélèrent mortels et touchèrent principalement des enfants, ont été enregistrés sur une période de 42 jours dans les seuls quartiers alimentés par cette ressource. Ni agent infectieux, ni métaux lourds n'ont pu être mis en évidence dans l'eau, mais des cyanobactéries appartenant aux genres *Anabaena* et *Microcystis* étaient présentes dans l'eau à des concentrations de l'ordre de 100 à plus de 900 000 cellules par mL.

En Australie, Falconer *et al.* (1983a) ont montré l'apparition de troubles hépatiques suite au traitement algicide appliqué sur une prolifération de *Microcystis* produisant de la microcystine-YM dans le réservoir d'Armidaire. L'étude épidémiologique rétrospective souligne l'augmentation significative des gamma-glutamyl transférases sanguines dans le groupe consommant l'eau du réservoir par rapport au groupe utilisant d'autres ressources en eau potable. Cette enzyme sérique constitue un indicateur sensible des lésions hépatiques. Il est à noter que l'augmentation moyenne de cette enzyme traduisait une atteinte hépatique mineure, mais quelques individus dans la population étudiée ont présenté des augmentations très importantes, indiquant des lésions hépatiques substantielles.

Toujours en Australie, une épidémie plus grave, le « Palm Island Mystery Disease », est apparue en 1979 après le traitement d'un réservoir avec du sulfate de cuivre. Les plaintes des consommateurs pour mauvais goût et odeur désagréable de l'eau ont motivé l'intervention des autorités. Dans la semaine suivant le traitement, de nombreux enfants ont développé une gastro-entérite sévère. Au total 140 enfants et 10 adultes ont dû être hospitalisés. La clinique, outre une atteinte hépatique, indiquait des lésions rénales étendues. La surveillance de ce site a permis d'attribuer cette intoxication à la production de cylindrospermopsine (CYN) par *Cylindrospermopsis raciborskii* (Hawkins *et al.* 1985).

Ces deux derniers incidents soulignent l'importance des suivis environnementaux fins dans le cas de traitements systématiques de retenues eutrophes par des algicides.

Le caractère épidémique de cette série d'intoxication souligne les limites des systèmes de traitement de l'eau concernés pour éliminer les cyanotoxines. La sensibilité individuelle, associée peut-être à une exposition plus importante, semble prédisposer certains individus à développer des formes aggravées d'intoxication. Cependant l'observation d'une incidence des troubles de l'ordre de 10 à 60 % selon les épisodes indique une insuffisance générale des procédés de traitement courants, assurant par ailleurs une bonne conformité aux critères sanitaires alors en vigueur. La spécificité de ces épidémies réside dans l'intoxication par des toxines libres, résultant de la sénescence naturelle ou de la destruction brutale des efflorescences.

L'analyse de ces événements justifie d'accorder une attention particulière aux procédés de traitement capables d'éliminer les cyanotoxines libres ou les cyanobactéries sans provoquer leur lyse.

2.2.1.2. Troubles de santé suite à une exposition parentérale par dialyse

En février 1996, le centre de dialyse rénal de Caruaru au Brésil a été alimenté avec de l'eau brute uniquement chlorée. Ceci a conduit à l'intoxication par voie parentérale de 126 personnes en traitement. Tous les patients ont présenté des symptômes neurologiques d'apparition précoce. Par la suite 108 patients, soit 85 %, ont développé des lésions hépatiques manifestes et 60 personnes sont décédées des suites de cette intoxication. Outre l'atteinte hépatique caractéristique, les patients ont manifesté précocement des symptômes neurologiques graves : malaises, troubles auditifs et visuels, convulsions, ainsi que des désordres hématologiques, biochimiques et cardiovasculaires distincts des complications résultant de l'insuffisance hépatique (Jochimsen *et al.* 1998, Pouria *et al.* 1998). Les toxines en cause, qui ont été identifiées dans les prélèvements de foie et de sang, sont les microcystines -YR, -LR et -AR. La concentration moyenne en microcystine des foies des personnes décédées est de 223 ng.g⁻¹. L'utilisation de données de toxicodynamie expérimentale produit une concentration estimée de l'eau utilisée de 19,5 µg.L⁻¹, soit une valeur 20 fois supérieure au seuil retenu pour l'eau de boisson. Une telle concentration dans le milieu est par ailleurs tout à fait vraisemblable (Carmichael *et al.* 2001). Considérant le potentiel de promotion tumorale des microcystines, les auteurs concluent en outre que les survivants à cette exposition présentent un risque supérieur de développer des cancers du foie.

Cet accident souligne la vulnérabilité particulière des dialysés vis-à-vis de l'exposition aux cyanotoxines par rapport aux consommateurs d'eau d'alimentation. Par ailleurs davantage d'importance devrait être accordée aux symptômes neurologiques et cardiovasculaires observés chez ces patients exposés aux microcystines. Les activités hépatotoxiques et promotrices de cancer de ces molécules ont jusqu'à aujourd'hui focalisé l'attention des chercheurs au détriment de ces autres modes d'action.

2.2.1.3. Troubles de santé liés à la baignade ou à des activités nautiques

Des problèmes de santé liés à la baignade ont été rapportés et sont consignés dans l'encadré suivant.

1959 : Canada - En dépit des avertissements et de la mort de bétail, treize personnes qui s'étaient baignées dans une eau infestée par des cyanobactéries ont été malades (nausée, douleurs musculaires, maux de tête, diarrhée). Les selles des malades contenaient des cellules de *Microcystis* spp. et d'*Anabaena circinalis* (Dillinger & Dehnel 1960).

1989 : Angleterre - Dix soldats présentèrent des symptômes d'intoxication (vomissements, diarrhée, douleurs abdominales, maux de gorge, cloques aux lèvres) après avoir nagé ou fait du canoë dans une eau affectée par une importante efflorescence à *Microcystis* spp. Deux présentèrent une pneumonie sévère et nécessitèrent des soins intensifs (Turner *et al.* 1990).

1991 : Australie - Deux cas de conjonctivite et un cas d'éruption cutanée attribués à la baignade dans une efflorescence d'*Anabaena circinalis* (Christopher *et al.* 1991).

1991 : Australie - Deux adolescentes sont victimes de gastroentérite et de myalgie après s'être baignées dans une eau contaminée par *Anabaena* (Williamson & Corbet 1993).

1995 : Australie - L'étude épidémiologique de Pilotto *et al.* (1997) montre que des problèmes sanitaires tels que des irritations des yeux, de la peau et des oreilles, de la fièvre, des ulcères buccaux, des diarrhées, des vomissements et des états grippaux, sont survenus après des activités aquatiques.

• Voie cutanée

La principale voie d'exposition au cours d'activités aquatiques est le contact cutané. Il a été décrit dans la littérature, ou rapporté, des cas d'irritations cutanées, oculaires ou nasales accompagnées ou non de signes digestifs, voire de fièvre, chez des personnes s'étant baignées ou ayant pratiqué certaines activités nautiques dans des étendues d'eau avec une prolifération algale (Billings 1981, Turner *et al.* 1990, Pilotto *et al.* 1997).

La publication de Törökné *et al.* (2001) qui présente des tests d'irritation cutanée et oculaire réalisés avec des méthodes de référence en toxicologie, sur le cobaye et le lapin, montre un effet irritant et allergène de certaines cyanobactéries, sans que l'on puisse relier ces effets à la quantité de toxine produite. L'effet allergène le plus important a été obtenu avec un échantillon naturel d'*Aphanizomenon* non toxique, alors que les échantillons toxiques de *Microcystis*, étaient moins allergènes. L'application d'une concentration élevée de MC-LR pure (1,5 µg.mL⁻¹), ne provoque que des effets allergènes légers sur 22 % des animaux (Törökné *et al.*, 2001).

Chez l'homme, les travaux de Pilotto *et al.* (2004), basés sur l'application de patch à des volontaires, ont montré qu'une faible proportion d'individus (de 20 à 24 %) exposés à des monocultures non axéniques de cyanobactéries

(*Microcystis aeruginosa*, *Anabaena circinalis*, *Nodularia spumigena*, *Aphanocapsa incerta* et *Cylindrospermopsis raciborskii*), présentait des irritations de la peau à des concentrations couramment rencontrées dans les eaux douces, de l'ordre de 5 000 à 300 000 cellules.mL⁻¹ (Pilotto *et al.* 1997). Il s'agit de manifestations modérées qui se résolvent rapidement sans aucun traitement. Cette étude n'a pas permis d'établir l'existence d'une réponse dose dépendante. De plus, les souches productrices de toxines n'étaient pas plus irritantes que celle qui n'en produisait pas. Les individus allergiques n'étaient pas significativement plus sujets aux irritations de la peau que les autres. Ceci semble en contradiction avec les travaux antérieurs de Heise (1951), Mc Elhenney *et al.* (1962), Mittal *et al.*, (1979), travaux toutefois réalisés avec des tests intradermiques, ce qui correspond moins à l'exposition occasionnée par la baignade.

Ces résultats suggèrent qu'il existe chez certaines cyanobactéries des molécules à action irritative, voire allergique, sans relation avec les cyanotoxines.

Les lipopolysaccharides (LPS), constitutifs de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif, sont suspectés d'être à l'origine de phénomènes d'irritation ou d'allergie (Sivonen & Jones 1999). Les LPS des cyanobactéries semblent cependant moins toxiques que ceux d'autres bactéries à Gram négatif (Keleti & Sykora 1982, Raziuddin *et al.* 1983).

• Ingestion et inhalation

Les deux autres voies d'exposition lors d'activités aquatiques sont l'ingestion accidentelle d'eau et l'inhalation d'aérosols (par exemple lors d'activités comme le ski nautique). Malgré ce risque d'intoxication, aucun cas de décès humain associé à la baignade n'a été rapporté. Des symptômes de diarrhée, de vomissements, de fièvre, de maux de tête et de gorge, de toux sèche ont été rapportés (Carmichael 1995, Rapala *et al.* 2005b). Ces signes sont souvent plus tardifs que les irritations cutanées. Des cas de pneumonie ont été attribués à la pratique du canoë dans une eau contaminée par une efflorescence dominée par *Microcystis aeruginosa* productrice de MC-LR (Turner *et al.* 1990).

En conclusion, s'il est vrai que des effets irritants plus ou moins sévères ont été recensés chez l'homme, en eau douce, l'agent responsable n'a pas pu être mis en évidence. En revanche, de véritables molécules irritantes (aplysiatoxine, débromoaplysiatoxine et lyngbyatoxine) responsables de la « démangeaison du baigneur » ont été identifiées en milieu marin (voir chapitre I).

À l'heure actuelle, concernant l'agent causal des effets irritants, trois hypothèses sont considérées comme possibles : il s'agirait de cyanotoxines non-identifiées, de LPS de cyanobactéries ou d'autres molécules irritantes ou allergéniques associées aux cyanobactéries. La mise en place d'un programme de recherche destiné à confirmer ou infirmer ces hypothèses serait souhaitable.

2.2.2. Effets sur la santé à long terme

Il s'agit ici d'évaluer les effets à long terme : risque chronique ou subchronique.

Concernant l'exposition ponctuelle à une dose sublétales de cyanotoxines, il n'existe actuellement aucune donnée sur les conséquences pour la santé humaine. Carmichael *et al.* (2001) préconisent le suivi attentif des survivants de l'intoxication par dialyse de Caruaru. Ils considèrent que cet accident malheureux pourrait ainsi fournir des informations précieuses sur les effets à long terme d'une exposition ponctuelle à dose sublétales aux microcystines, actuellement suspectées d'être des promoteurs tumoraux.

2.2.2.1. Risque chronique et cancer

Quatre études écologiques spatiales qui traitent du sujet ont été analysées :

- deux études chinoises publiées (Yu *et al.* 1989, Ueno *et al.* 1996), dont l'objectif est d'établir une corrélation entre l'incidence des cancers primitifs du foie (très élevée dans certaines régions de Chine) et les différentes ressources en eau utilisées pour la production d'eau potable ; également de clarifier le rôle possible des microcystines dans cette maladie à étiologie multiple ;
- une étude américaine (Fleming *et al.* 2002) qui cherche à associer grâce à un Système d'Information Géographique, la localisation des cas de cancers primitifs du foie et la nature des ressources en eau ;
- une étude chinoise (Zhou *et al.* 2002) qui étudie l'association entre les cancers colorectaux et le niveau de contamination par les MCs des différentes ressources utilisées pour l'eau de boisson.

La quantification du rôle de l'eau et en particulier des cyanotoxines dans les cancers primitifs du foie est difficilement dissociable d'autres facteurs de risques telles que les aflatoxines.

- L'étude de Yu *et al.* (1989) établit une relation entre la nature des aliments ingérés, les aflatoxines, l'eau de boisson et le cancer primitif du foie. Le rôle des aflatoxines s'appuie sur un protocole d'analyse et d'exposition détaillé (concentration en aflatoxines B1 et M1 mesurées dans les aliments et les urines des consommateurs) et les résultats permettent d'établir une relation dose-réponse linéaire entre aflatoxines et cancer du foie. Le rôle de l'eau est estimé en comparant qualitativement la nature de la ressource en eau et l'incidence des cancers primitifs du foie. Les taux de mortalité de cancers primitifs du foie sont de l'ordre de 100, 91 et 4 cas pour 100 000 personnes dont l'eau d'alimentation provient respectivement de mares / fossés, de rivières ou de puits profonds.
- Devant ce même constat de l'incidence élevée des cancers du foie en Chine, Ueno *et al.* (1996) recherchent à quantifier le rôle de l'eau, facteur de risque supplémentaire présumé (en compléments des facteurs de risques déjà identifiés : aflatoxines et virus de l'hépatite B). Une importante campagne d'analyses visant à estimer la contamination de l'eau en microcystine met en évidence 3 échantillons positifs sur 14 eaux de fossés analysées. Les concentrations en MCs variant de 0,09 à 0,46 µg L⁻¹. Les conclusions de cette étude évoquent une synergie potentielle entre aflatoxines et MCs.
- L'étude américaine (Fleming *et al.* 2002) conclut à une corrélation statistique non significative entre le risque d'avoir un cancer primitif du foie et le fait d'habiter dans une zone alimentée par une eau de surface (versus eau profonde pour le groupe témoin). Les mesures des MCs ont été réalisées à la ressource en eau.

Ces trois études, dont les résultats aboutissent sur plusieurs points à des conclusions différentes, comportent plusieurs sources d'incertitudes. L'exposition des populations aux facteurs de risques est le plus souvent difficile à reconstituer :

- dans les études chinoises, le protocole est peu détaillé. Il est mentionné que les habitudes de consommation (% eau de surface *versus* % eau profonde) évoluent au cours des 15 années qui précèdent ces études, sans que les conséquences n'aient été envisagées sur l'estimation de l'exposition ;
- pour l'étude américaine, la mobilité des populations, la consommation de l'eau du robinet ainsi que les effets des filières de traitement d'eau potable sur les microcystines n'ont pas été renseignés, ce qui engendre un risque important d'erreurs de classement.

Concernant les cancers colorectaux, Zhou *et al.* (2002) mettent en évidence, par une étude épidémiologique sur 408 cas, que l'incidence des cancers colorectaux est significativement plus élevée chez les sujets buvant de l'eau provenant de rivières et de mares (RR respectivement de 7,94 et 7,70) par rapport à ceux approvisionnés par des puits. Ils établissent de plus une corrélation entre l'incidence de ces cancers et la contamination de l'eau de boisson par la microcystine, les rivières et mares étant les plus contaminées. Les auteurs concluent à la nécessité de confirmer l'étiologie par des études complémentaires.

À l'heure actuelle, seules les données issues d'expérimentations animales constituent une source fiable pour conduire une évaluation de risque sanitaire. La parution des résultats d'une étude canadienne d'évaluation des risques présentés par la microcystine-LR dans l'eau d'alimentation est à surveiller de près. Le protocole repose sur l'étude de l'oncogenèse du foie chez le rat, considérant la voie d'ingestion, le pouvoir promoteur de tumeur ayant déjà été prouvé chez l'animal par voie parentérale.

L'absence de données épidémiologiques ou de toxicologie chronique spécifiques de l'homme ne permet pas d'écarter l'existence d'un risque chronique lié à l'ingestion de microcystine.

Le cancer primitif du foie est une pathologie pour laquelle la certification des causes de décès pose des problèmes particuliers de validité pour plusieurs raisons (Remontet *et al.* 2003).

Un certain nombre de cancers secondaires du foie (évolution métastatique hépatique de cancers initiaux localisés dans d'autres tissus) sont certifiés en cancers primitifs du foie,

Un sous-enregistrement des cancers du foie est observé dans certaines régions par manque d'argument histologiques. En effet, seuls 10 départements nationaux disposent de registres du cancer du foie.

Devant le manque d'exhaustivité et de précision dans le recensement des cancers primitifs du foie, conséquence d'un diagnostic difficile (distinction cancer primitif *versus* cancer secondaire) et d'une mortalité élevée de cette pathologie, l'utilisation des registres du cancer primitif du foie ne paraît pas adaptée à la mise en place d'un programme de surveillance des effets à long terme de la microcystine-LR.

En conclusion, cette analyse ne fournit pas de données suffisantes pour conclure à l'existence d'un risque à long terme épidémiologiquement fondé.

2.2.2.2. Risque chronique et maladies neuro-dégénératives

Dans l'île de Guam, la BMAA a été retrouvée concentrée jusqu'à 10 000 fois le long de la chaîne trophique, des cyanobactéries aux chauves-souris (Cox *et al.* 2003, Murch *et al.* 2004). Un taux de maladies neurodégénératives (sclérose amyotrophique latérale, Alzheimer, Parkinson) beaucoup plus élevé que dans d'autres populations et corrélé à la présence de la BMAA dans le cerveau des malades a été observé chez les habitants de cette île. Le réservoir protéique endogène de neurotoxine permet une libération lente de la BMAA, qui pourrait avoir des effets neurologiques chroniques et récurrents à l'échelle de plusieurs années ou dizaines d'années. Cette toxicité chronique pourrait expliquer la période de latence observée pour les maladies neurodégénératives de certaines populations vivant à Guam (e.g. la population Chamorro).

Comme les cyanobactéries sont des producteurs primaires à la base d'un certain nombre de chaînes alimentaires, d'autres populations humaines que celles de Guam pourraient être exposées à cette neurotoxine. La présence de BMAA a été observée dans les tissus de cerveau de patients Canadiens atteints de la maladie d'Alzheimer (Murch *et al.* 2004). Selon ces auteurs, la BMAA jouerait un rôle chez les patients atteints de maladies neurodégénératives. Un plus grand nombre d'étude de patients atteints de ces maladies est à réaliser pour confirmer cette hypothèse.

Points à retenir

- Les intoxications animales par les cyanotoxines sont connues depuis la fin du XIX^e siècle. Elles doivent alerter les autorités sanitaires du développement de proliférations toxiques, mais ne sont pas assez sensibles pour servir d'indicateur de la toxicité des proliférations de cyanobactéries.
- Des intoxications humaines se traduisant par des épidémies de gastro-entérites afebriles d'apparition soudaine ont été attribuées à la présence de cyanotoxines dans l'eau de boisson.
- Les intoxications humaines, *via* les loisirs nautiques, suspectées être d'origine cyanobactérienne, se traduisent également par des cas groupés de troubles digestifs et/ou d'irritation cutanéomuqueuse.
- Lors des loisirs nautiques, elles surviennent suite à l'ingestion de cyanobactéries et/ou de toxines présentes dans les eaux brutes. Lors d'intoxications par l'eau de boisson, elles sont associées à la consommation d'eau contenant des cyanotoxines libres, qui n'ont pas été retenues par le traitement ou qui ont été libérées au cours du traitement par la lyse des cellules.
- À ce jour, aucune intoxication humaine associée aux cyanotoxines n'a été documentée en France. En revanche, des mortalités de chiens ont été attribuées à des cyanotoxines.
- D'après les données épidémiologiques, l'eau serait le vecteur prépondérant d'intoxication de l'homme par les cyanotoxines. Néanmoins d'autres sources d'exposition doivent être investiguées.

IV. État des lieux de la situation française

1. Contexte et mise en place d'une base de données cyanobactéries

Afin d'alimenter le volet exposition de l'évaluation des risques et de fournir aux gestionnaires une image de la situation française concernant les proliférations de cyanobactéries, une base de données numérique rassemblant des résultats de prélèvements effectués dans différentes zones aquatiques en France métropolitaine et en Corse a été mise en place à l'Afssa, puis finalisée et validée lors de l'analyse des données à l'Afsset.

Du fait de l'absence d'un système de recueil systématique de ces données, différents organismes susceptibles de suivre les cyanobactéries ont été sollicités. Parmi les organismes sollicités, la Direction générale de la santé, les Agences de l'eau Adour-Garonne, Artois-Picardie et Rhin-Meuse, Electricité de France (EDF), le Syndicat des producteurs et distributeurs d'eau (SPDE), la DIREN Bretagne, l'Université de Rennes 1 et l'Institut interdépartemental des barrages et réservoirs de la Seine (IIBRS) ont accepté de fournir les données dont ils disposaient. Les informations recueillies se présentaient sous forme de rapports de synthèse ou de résultats bruts sous format papier ou excel.

Cette compilation de données ne peut être considérée comme exhaustive, que ce soit sur le plan géographique, chronologique ou des paramètres visés. Qui plus est, en raison de la variété des producteurs de données, des objectifs poursuivis, des laboratoires impliqués et des méthodes d'analyses mises en œuvre dont aucune n'est normalisée à la date de rédaction du rapport, une grande prudence est de mise pour l'interprétation et la généralisation des résultats des analyses statistiques.

La base regroupe les informations ayant trait à :

- la localisation géographique et temporelle du prélèvement : date, département, commune, zone aquatique et parfois lieu de prélèvement ;
- l'usage de l'eau : adduction d'eau publique [AEP], eau de baignade contrôlée [BLB], eau associée à différentes activités nautiques [BLAN] ou autres : pêche, irrigation, barrages... ;
- le type de l'eau : eau brute ou eau traitée dans le cas des prélèvements en eaux AEP ;
- les résultats du dénombrement des cellules de cyanobactéries ;
- le pourcentage de cyanobactéries par rapport au total des algues (phytoplancton) calculé à partir du nombre de cellules ;
- les résultats de dosage des microcystines ;
- le genre ou l'espèce des cyanobactéries observées ;
- les résultats de dosage de chlorophylle *a* (en $\mu\text{g.L}^{-1}$).

Malheureusement, toutes ces informations ne sont pas disponibles pour chaque prélèvement et peuvent, de plus, être définies de manière différente d'un rapport à l'autre.

L'analyse effectuée n'a pas pour objectif d'identifier les déterminants physiques, biologiques ou écologiques associés au phénomène de prolifération des cyanobactéries ou de production de cyanotoxines, mais d'évaluer le phénomène « cyanobactéries » en France métropolitaine compte tenu des données et des paramètres recueillis.

1.1. Prélèvement

L'usage de l'eau dans laquelle le prélèvement a été effectué était dans la plupart des cas renseigné dans les rapports recueillis. Une vérification de l'usage baignade et de l'usage pour l'alimentation en eau potable (AEP) a été réalisée au travers des noms des communes, grâce aux bases de données SISE-Eaux pour les sites AEP et SISE-Baignades. Certaines zones aquatiques à usage mixte ont alors pu être identifiées et renseignées comme tel dans la base de données. Néanmoins, dans la plupart des analyses statistiques effectuées, chaque résultat de prélèvement est associé à un unique usage de l'eau : celui indiqué dans les rapports. Le type de zone aquatique (rivière, lac, étang, ...) était parfois renseigné et a pu être complété pour les sites de baignade grâce à SISE-Baignades. Ce paramètre a été introduit *a posteriori* et n'a pas été l'objet d'une analyse exhaustive.

L'indication « lieu de prélèvement » mentionnée dans les rapports dépend de l'usage de l'eau. Dans le cas d'une baignade par exemple, il s'agit soit du nom du lieu-dit, soit du nom usuel de la baignade considérée. Au niveau de l'usage AEP, le nom indiqué peut être celui de la station de traitement d'eau, le nom du lieu de captage ou encore le nom du point de surveillance dans le référentiel SISE-Eaux. Une information sur la zone d'échantillonnage (amont, aval, prise d'eau) est parfois disponible ainsi que la profondeur à laquelle le prélèvement a été effectué. Les prélèvements dans les eaux de loisirs (baignades et/ou activités nautiques) sont réalisés dans la majorité des cas à proximité de la berge dans la couche d'eau de 0 à 1 m, alors que les prélèvements associés aux usines de traitement d'eau ont lieu, pour ce qui est des eaux brutes, au point de captage ou au robinet d'arrivée dans l'usine, directement relié au point de captage, qui est la plupart du temps situé en profondeur. Les prélèvements en eaux traitées sont effectués à la fin de la filière de traitement (eau refoulée).

L'information « lieu de prélèvement » en tant que telle est parfois différente d'un rapport à l'autre et n'est pas toujours présente ; elle n'a pu être complétée et validée dans le temps imparti. Les résultats de prélèvements ont donc été agrégés au niveau de la commune en distinguant les différents usages de l'eau. La commune associée à l'information usage de l'eau est ainsi l'unité de lieu minimale avec laquelle les analyses statistiques ont été effectuées. Par abus de langage et par simplicité, l'appellation « site de prélèvement » désignera désormais cette variable commune usage de l'eau. Néanmoins, ce paramètre agrège dans certains cas des données provenant de différentes zones aquatiques ou provenant de différents points de prélèvement au sein d'une même zone aquatique. Il a effectivement été constaté *a posteriori* que neuf sites de prélèvement AEP regroupaient en fait les données provenant de différentes zones aquatiques ; il en est de même pour sept sites de prélèvement en eaux destinées aux loisirs de baignades (BLB) et 13 en eaux classées en diverses activités de loisirs nautiques (BLAN). Dans quelques autres cas, la zone aquatique considérée est la même, mais le point de prélèvement diffère. En tout, ce sont plus de 80 % des prélèvements qui sont néanmoins bien référencés.

1.2. Dénombrement et identification des cyanobactéries

Les résultats numériques du dénombrement des cellules de cyanobactéries (CC) ont tous été exprimés en nombre de cellules par mL. Certains rapports n'indiquent pas le résultat du dénombrement, mais simplement la détection ou l'absence de détection de cellules de cyanobactéries. Ces informations ont été prises en compte dans la base : l'absence de détection de CC a été codée 0 alors que la présence de CC sans résultat numérique a été codée NC (non communiqué). Rappelons que l'absence de détection de cellules de cyanobactéries dans l'échantillon ne signifie pas leur absence certaine dans la zone aquatique considérée. Trois variables ont été créées à partir du résultat du dénombrement :

1. PCC (Présence des CC) qui prend la valeur 1 lorsque des CC ont été détectées dans le prélèvement et 0 dans le cas contraire ;
2. l'abondance correspondant à la quantité de cellules de cyanobactéries dénombrées lorsque celles-ci sont présentes dans le prélèvement ;
3. la classe d'abondance : cinq classes ont été définies, en partie fondées sur les classes proposées par l'OMS : 0–2 000 CC.mL⁻¹ ; >2 000–20 000 CC.mL⁻¹ ; >20 000–100 000 CC.mL⁻¹ ; >100 000–1 million de CC.mL⁻¹ et la classe plus de 1 million de CC.mL⁻¹.

Le pourcentage des cellules de cyanobactéries par rapport au total algal (phytoplanctonique) était parfois précisé et calculé à partir du nombre de cellules. À partir de ce paramètre une variable dominance a été créée : elle vaut 1 lorsque ce pourcentage dépasse 50 % et 0 dans le cas contraire.

L'identification des cyanobactéries dans les données recueillies s'arrête la plupart du temps au niveau du genre et c'est donc à ce niveau de classification que les analyses statistiques ont été effectuées. Qui plus est, la systématique des cyanobactéries subit actuellement des modifications en particulier au niveau de l'espèce. L'identification des cyanobactéries suit la même logique que le dénombrement : ce n'est pas parce qu'un genre n'a pas été identifié dans un prélèvement, qu'il est absent du site de manière certaine.

À partir des genres et/ou espèces de cyanobactéries identifiés dans les prélèvements, il est nécessaire d'évaluer la présence ou l'absence de genres potentiellement toxiques. Pour cela, la liste des espèces et des genres potentiellement toxiques élaborée par le groupe de travail Afssa (chapitre I tableau I-II) à partir de la littérature a été utilisée : un genre de cyanobactéries est considéré comme potentiellement toxique dès qu'une espèce appartenant à ce genre est considérée comme potentiellement toxique. Cette manière de procéder conduit *a priori* à surévaluer la présence de cyanobactéries potentiellement toxiques dans un prélèvement. Les genres et espèces de cyanobactéries retrouvés dans la base de données sont présentés dans le tableau IV-I.

Tableau IV-1 : Genres et espèces retrouvés dans la base de données constituée. 24 taxons sont suivis de *sp*, témoignant du fait qu'une espèce du genre considéré a été trouvée, mais pas identifiée. Les genres et espèces potentiellement toxiques figurent en gras.

Espèces	Genres
Aphanizomenon flos-aquae	Aphanizomenon
<i>Aphanizomenon issatschenkoi</i>	
<i>Aphanizomenon sp.</i>	
Aphanothece sp	Aphanothece
<i>Aphanocapsa sp.</i>	<i>Aphanocapsa</i>
Anabaenopsis sp.	Anabaenopsis
<i>Anabaena sp.</i>	Anabaena
Anabaena affinis	
<i>Anabaena crassa</i>	
Anabaena spiroides	
Anabaena flos-aquae	
<i>Anabaena heterospora</i>	
<i>Anabaena solitaria</i>	
<i>Anabaena smithii</i>	
Anabaena planctonica	
Anabaena circinalis	
<i>Calothrix sp.</i>	<i>Calothrix</i>
Cylindrospermopsis raciborskii	Cylindrospermopsis
<i>Coelomoron sp.</i>	<i>Coelomoron</i>
<i>Coelomoron pusillum</i>	
<i>Coelosphaerium sp.</i>	Coelosphaerium
<i>Chroococcus sp.</i>	<i>Chroococcus</i>
<i>Woronichinia sp.</i>	Woronichinia
Woronichinia naegeliana	
<i>Limnothrix sp.</i>	<i>Limnothrix</i>
<i>Limnotrix planctonica</i>	
<i>Limnotrix redekei</i>	
<i>Merismopedia sp.</i>	<i>Merismopedia</i>
<i>Merismopedia tenuissima</i>	
<i>Lemmermanniella pallida</i>	<i>Lemmermanniella</i>
<i>Lyngbya sp.</i>	Lyngbya
<i>Microcystis sp.</i>	Microcystis
Microcystis flos aquae	
Microcystis aeruginosa	
Microcystis viridis	
Microcystis wesenbergii	
<i>Nostoc sp.</i>	Nostoc
<i>Planktolyngbya subtilis</i>	<i>Planktolyngbya</i>
<i>Planktothrix sp.</i>	Planktothrix
Planktothrix mougeotii	
Planktothrix agardhii	
<i>Phormidium sp.</i>	Phormidium
<i>Rhaphidiopsis sp.</i>	Rhaphidiopsis
<i>Synechococcus sp.</i>	Synechococcus
<i>Snowella sp.</i>	<i>Snowella</i>
<i>Pseudanabaena mucicola</i>	Pseudanabaena
<i>Pseudanabaena limnetica</i>	
<i>Pseudanabaena galeata</i>	
<i>Pseudanabaena sp.</i>	
<i>Gomphospheria sp.</i>	<i>Gomphospheria</i>
<i>Oscillatoria sp.</i>	Oscillatoria
<i>Rhabdoderma sp.</i>	<i>Rhabdoderma</i>

1.3. Dosage des microcystines

Les données recueillies relatives aux cyanotoxines concernent exclusivement les divers variants de microcystines (MC), la microcystine-LR (MC-LR) étant bien souvent prise comme référence.

Les méthodes d'analyse des microcystines recensées dans la base sont au nombre de quatre : méthode enzymatique PP2A (protéine phosphatase 2A), méthode immunologique ELISA (*Enzyme linked Immuno Sorbent Assay*), chromatographie liquide haute performance ultra-violet CLHP-UV et spectrométrie de masse CLHP-SM.

Les méthodes PP2A et ELISA produisent une réponse moléculaire globale, qui ne permet pas de distinguer les quantités des différents variants de MC. Les résultats sont exprimés en microgramme (μg) d'équivalent MC-LR étalon par litre. Cependant, cette réponse peut être entachée d'un biais résultant de l'affinité variable des différents variants de MC avec les enzymes ou les anticorps utilisés.

Les méthodes CLHP-UV et CLHP-SM sont des méthodes séparatives qui permettent de déterminer le profil toxique du mélange, c'est-à-dire la nature et les quantités des différents variants présents. La méthode CLHP-UV, contrairement à la méthode CLHP-SM, ne permet de détecter et de quantifier que les variants pour lesquels les étalons sont disponibles. Les résultats de ces deux méthodes sont exprimés soit en μg de chaque variant par litre, soit en $\mu\text{g.L}^{-1}$ d'équivalent MC-LR (correspondant à la somme des différents variants), soit en $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR mesurant uniquement la quantité de MC-LR.

Compte tenu des différentes méthodes d'analyses rencontrées et de la diversité d'expression des résultats de dosage, il est apparu nécessaire de convertir les résultats dans une seule unité : la quantité totale de microcystines. Les données ainsi harmonisées ont donc tendance *a priori* à maximiser le danger vis-à-vis de la MC, puisque la MC-LR fait partie des variants de microcystines les plus toxiques.

Si pour un même prélèvement, deux résultats de dosage des microcystines provenant de deux méthodes différentes étaient disponibles, la méthode CLHP a été privilégiée et au sein de cette technique analytique, le résultat en spectrométrie de masse (SM) a été retenu. Néanmoins, cette méthode ayant un taux de présence très faible dans la base (de l'ordre de 3 % des données), les résultats des deux approches CLHP-UV et CLHP-SM ont été agrégés sous l'appellation CLHP. Dans tous les cas, un unique résultat de dosage des microcystines exprimé en μg de MC totales par litre a été retenu pour chaque prélèvement.

Par ailleurs, les limites de détection et de quantification étant différentes d'une méthode analytique à une autre et d'un laboratoire à un autre, la limite de quantification la plus élevée ($0,16 \mu\text{g.L}^{-1}$) identifiée dans les rapports a été prise comme référence ; tous les résultats inférieurs à cette limite ont été remplacés par l'indication ND (pour non-détecté). Cela concerne au plus une cinquantaine de valeurs. **Dans la base ainsi constituée, la limite de détection est égale à la limite de quantification des MC et vaut $0,16 \mu\text{g.L}^{-1}$.**

2. La base en quelques chiffres

La base de données cyanobactéries ainsi constituée comprend 4 273 lignes, c'est-à-dire 4 273 résultats de prélèvements effectués dans des zones aquatiques continentales pendant la période 2002-2004⁽¹³⁾. Ces résultats concernent 442 communes et 59 départements. Un résultat de dénombrement (présence/absence et bien souvent comptage) des cellules de cyanobactéries est disponible pour 3 897 de ces prélèvements, mais l'information taxonomique des genres de cyanobactéries observées n'est présente que pour 1 709 seulement⁽¹⁴⁾ de ces prélèvements. Le résultat de dosage des microcystines est disponible pour 1 492 prélèvements et pour 1 116 de ces prélèvements le résultat du dénombrement cellulaire conjoint est également disponible. Environ 61 % des résultats de dosage des MC ont été obtenus par la méthode CLHP⁽¹⁵⁾, 31 % par la méthode ELISA, 3 % par la méthode PP2A et 5 % par une méthode non renseignée dans les rapports. Les méthodes CLHP et ELISA représentent donc la majorité des données (92 %). L'utilisation de la méthode CLHP apparaît en nette décroissance entre l'année 2002 et l'année 2004, au profit de la méthode ELISA.

Seuls 299 des 4 273 prélèvements (*i.e.* 7 %) ont été effectués en eaux traitées⁽¹⁶⁾ : un résultat de dénombrement des CC est disponible pour 102 de ces prélèvements – 12 départements et 23 communes sont concernés – et un résultat de dosage des microcystines pour 226 prélèvements – soit 13 départements et 45 communes –. Une très

(13) L'ensemble des données recueillies initialement concernait les années 2000 à 2004, mais le nombre de données disponibles pour les années 2000 et 2001 était très faible devant celui des années 2002 à 2004 (moins de 3 %). Par souci d'homogénéité, il a été décidé de n'exploiter que les données des années 2002 à 2004.

(14) Ceci provient certainement du fait que l'on a eu accès dans un grand nombre de cas qu'aux rapports de synthèse et non aux résultats bruts complets du dénombrement cellulaire.

(15) Il s'agit dans la quasi-totalité des cas de la méthode CLHP-UV, la méthode CLHP-SM ayant été très peu utilisée.

(16) Quelques données recueillies (10 en tout) concernaient des eaux prélevées à des étapes intermédiaires de traitement ; du fait de leur trop faible nombre, ces données n'ont pas été prises en compte dans la base telle que décrite ici.

nette progression du nombre de prélèvements en eaux traitées est constatée de 2002 à 2004 : 18 prélèvements ont été effectués en 2002, 37 en 2003 et 169 en 2004. Les données sur les eaux traitées proviennent donc très majoritairement de l'année 2004 (74 %) que ce soit pour les dénombrements de CC ou les dosages des MC.

Les prélèvements effectués en eaux brutes (3 974 données) proviennent à peu près à part égale d'eaux AEP (1 249 données, soit 31 % du total), d'eaux de baignade (1 607, *i.e.* 40 %) et d'eaux liées à des activités nautiques (1 073, *i.e.* 27 %). Restent 45 prélèvements effectués dans des zones aquatiques associées uniquement à un usage autre tel que la pêche, l'irrigation, etc. ; du fait de leur faible nombre, ceux-ci n'ont pas été exploités lors des analyses statistiques. De même, les données proviennent à peu près à part égale des trois années prises en compte, avec néanmoins une légère progression de 2002 à 2004 : 1 184 données pour l'année 2002 (*i.e.* 30 % du total), 1 246 pour l'année 2003 (*i.e.* 31 %) et 1 538 pour l'année 2004 (*i.e.* 39 %).

Un résultat de dénombrement cellulaire est disponible pour 95 % des prélèvements en eau brute. En revanche, les dosages de microcystines en eaux brutes ont été effectués avec une fréquence plus importante dans les prélèvements effectués en eaux AEP (639) que dans ceux effectués en eaux BLAN (293) ou en eaux BLB (330). Ils ont été effectués majoritairement l'année 2002 (42 % du total), puis l'année 2004 (37 %) et enfin l'année 2003 (20 %).

De manière générale, la répartition croisée des données par années et usages ne conduit pas à des effectifs de prélèvements homogènes. Ont été constatés par exemple : une progression très nette du nombre de prélèvements effectués en eaux de baignade de 2002 (7 % du total des prélèvements) à 2004 (22 %) ; un nombre de prélèvements effectués en eaux AEP deux fois plus faible en 2003 qu'en 2002 et 2004 ; et une proportion de prélèvements effectués en eaux BLAN 3 à 5 fois plus faible l'année 2004 que durant les deux années précédentes.

Environ 92 % des données de la base proviennent de prélèvements effectués pendant les mois de juin à octobre compris, et 74 % pendant les mois de juillet à septembre uniquement. Cette disproportion dans la répartition mensuelle des données est plus marquée encore pour les résultats de dosage des microcystines et pour les eaux traitées, plus marquée également pour les sites de baignade que pour les eaux AEP ou celles liées aux activités nautiques. En revanche, cette répartition saisonnière des données est peu différente d'une année sur l'autre (2002 à 2004).

Du mois d'avril à septembre, c'est-à-dire lorsque le nombre de données est important, les trois années 2002 à 2004 représentent donc à peu près le même pourcentage de données, de même que les trois principaux usages que sont AEP, BLB et BLAN. En revanche, les données du mois de décembre proviennent essentiellement de l'année 2002 ; les données du mois de mars proviennent presque entièrement de l'année 2004 ; les données du mois de février proviennent majoritairement des eaux BLAN et les données du mois de novembre des eaux AEP...

La répartition géographique des prélèvements est également très contrastée (figure K – livret couleur). Le nombre de départements pour lesquels il existe au moins un résultat de dénombrement des CC est de 57, mais il varie entre 28 et 36 suivant l'année considérée (de 2002 à 2004) et l'usage : il est de 28 pour l'AEP, de 37 pour BLB et de 19 pour BLAN. Le nombre de prélèvements par département – ceux pour lesquels des données ont été fournies – est très variable d'un département à l'autre : il est compris entre 2 et 738 pour les trois années 2002-2004 agrégées ; sa valeur médiane⁽¹⁷⁾ est de 20. Autrement dit, 50 % des départements considérés admettent moins de 20 données sur les trois années cumulées tout usage confondu.

Sont constatées une absence de données pour tout l'est de la France (zone en bleu clair sur la figure K – livret couleur) et une concentration des données disponibles essentiellement dans les régions Bretagne, Pays de la Loire, Basse Normandie et dans une moindre mesure Limousin.

Le nombre de communes pour lesquelles il existe au moins une donnée de dénombrement cellulaire est de 430 sur les trois années 2002-2004, ce qui représente au sein de chaque département concerné entre 1 et 36 communes suivant le département et l'année, soit 5 en valeur médiane. Le nombre de données par commune et par année est compris entre 1 et 93 suivant la commune et l'année considérées ; il est de 5 en valeur médiane. Pour 70 % des communes concernées, il n'y a qu'une année de données, pour 25 % des communes deux années de résultats et pour 5 % trois années de résultats. Autrement dit, il ne peut être évoqué de suivi pluriannuel des dénombrements de cyanobactéries au niveau des communes pour les années 2002 à 2004.

Pour les dosages des microcystines, les nombres de départements, de communes et de prélèvements sont encore plus faibles, mais la répartition géographique concernant la provenance des données est identique. En eaux brutes, ils concernent respectivement 24 départements et 80 communes pour l'usage AEP, 26 départements et 78 communes pour l'usage BLB, 10 départements et 50 communes pour l'usage BLAN.

(17) La médiane d'un échantillon est la valeur qui sépare les 50 % plus faibles valeurs de l'échantillon des 50 % plus fortes.

Un résultat sur la teneur en chlorophylle *a* de l'eau est disponible pour 1 705 prélèvements, dont 10 en eau traitée. Ces résultats concernent 218 communes et 38 départements. La répartition temporelle des résultats de chlorophylle *a* est identique à celle des résultats de dénombrement cellulaire. La répartition géographique est un peu différente : il y a moins de données en provenance du centre de la France.

3. Méthode d'analyse statistique des données

Différents biais liés à l'échantillon des données disponibles sont à craindre :

1. des biais liés au recueil des données : tous les organismes possédant des données de cette nature n'ont pas forcément été contactés et les organismes contactés n'étaient soumis à aucune obligation quant à la communication de leurs données en totalité ou en partie. Il est par conséquent difficile de dire si cet échantillon est ou non représentatif des prélèvements effectués en France pour dénombrement des cellules de cyanobactéries et/ou dosage des microcystines. Il convient de noter que les zones à fort relief en tête de bassin versant sont en général beaucoup moins favorables aux proliférations phytoplanctoniques que celles en aval, où les écoulements sont plus lents et les temps de séjour plus longs. L'absence de données dans certaines régions, en particulier dans l'est de la France, pourrait être liée au fait qu'il y a moins de problème de prolifération de cyanobactéries dans ces régions. Par ailleurs, l'utilisation plus ou moins importante pour la production d'eau de consommation humaine des eaux souterraines, indemnes de cyanobactéries, peut diminuer la vigilance sur les eaux de surface dans certaines régions ;
2. des biais liés aux prélèvements : sur quels sites ont-ils été effectués, pourquoi et quand ? Ces sites font-ils l'objet de traitements par des algicides ? À quel emplacement sur le site ? La répartition des données au sein de l'échantillon apparaît en effet comme très déséquilibrée temporellement (surtout au niveau mensuel) et géographiquement : la majorité des données recensées proviennent de prélèvements effectués dans l'ouest et le centre de la France, sur les mois de juin à octobre. Ceci a-t-il une influence sur les résultats de dénombrement des CC et de dosage des MCs ?
3. des biais liés aux usages (ou réglementations) sur les dosages des microcystines, qui ne sont manifestement pas effectués de manière systématique avec le dénombrement cellulaire. Sont-ils effectués uniquement lorsque le résultat du dénombrement cellulaire est important ?

Ces problèmes d'échantillon sont à l'origine potentiellement de biais dans l'estimation des caractéristiques statistiques du phénomène « cyanobactéries ».

Des méthodes d'analyses statistiques multivariées ont donc été employées afin d'estimer les influences respectives des paramètres mois, année, usage de l'eau et sites de prélèvement sur le résultat du dénombrement cellulaire et celui du dosage des microcystines et ce de manière à fournir une image du phénomène « cyanobactéries » indépendamment des disproportions de données présentes au sein de l'échantillon. L'extrapolation des résultats de cette base à l'ensemble du territoire français métropolitain restera néanmoins délicate du fait de l'absence de données pour l'est de la France en particulier.

Les variations de la présence et de l'abondance des cellules de cyanobactéries ont donc été analysées, au travers des résultats de prélèvements sur eaux brutes, en fonction des paramètres cofacteurs : usage de l'eau, mois et année, en prenant en compte un potentiel effet lié au site⁽¹⁸⁾ ou au département⁽¹⁹⁾ de prélèvement.

L'objectif de cette analyse est double :

1. déterminer l'influence respective de chacun de ces paramètres ;
2. prédire une probabilité de présence, une abondance ou un risque de dépassement d'une valeur seuil sur chaque site de prélèvement à l'échelle mensuelle, indépendamment du nombre de données disponibles.

La méthode d'analyse statistique employée appartient à la classe des régressions linéaires généralisées avec effets mixtes. Cette approche permet de distinguer l'influence des paramètres globaux : saison, usage et année, estimée grâce à l'ensemble des données, d'un effet lié au site de prélèvement. Elle permet par conséquent de s'affranchir en partie des disproportions de données provenant des différents sites de prélèvement pour estimer l'influence des paramètres globaux. Les fonctions linéaires utilisées sont du premier ordre, c'est-à-dire sans interaction entre les paramètres considérés et sans effet quadratique. On fait donc l'hypothèse qu'il n'y a pas d'interaction majeure entre les effets des paramètres mois, usage, année et localisation géographique, hypothèse discutée par la suite.

(18) Rappel : il s'agit du paramètre combiné commune X usage.

(19) Dans ce cas, les données sont agrégées au niveau département.

Suivant les analyses, les données des mois de novembre à avril ont été regroupées du fait de leur faible nombre. Un nouveau paramètre mois a donc été défini : il prend les valeurs « hiver » (agrégant les données de novembre à avril), mai, juin, juillet, août, septembre et octobre.

Les résultats de dénombrement cellulaire ont été analysés séparément des résultats de dosage des microcystines et les résultats en eaux traitées séparément des résultats en eaux brutes. Le nombre de données eaux traitées n'a pas permis l'utilisation d'une telle approche ; ces données ont uniquement fait l'objet d'une analyse descriptive simple.

Description des modèles utilisés

<p><i>Régression linéaire généralisée logistique avec prise en compte d'effets mixtes</i></p>
<p>Soit P_{ijkl} la probabilité de présence des cellules de cyanobactéries le mois i, dans une eau ayant un usage j, l'année k sur le site de prélèvement l ; celle-ci est exprimée au travers du modèle suivant :</p> $\text{logit}(P_{ijkl}) = \text{const} + \alpha_{\text{mois } i} + \beta_{\text{usage } j} + \gamma_{\text{année } k} + \varepsilon_{\text{lieu } l}$ <p>où :</p> <ul style="list-style-type: none"> • $\text{logit}(P) = \log(P/(1 - P))$; • const est la constante générale ; • $\alpha_{\text{mois } i}, \beta_{\text{usage } j}, \gamma_{\text{année } k}$ correspondent respectivement aux effets fixes du mois i, de l'usage j et de l'année k, estimés sur l'ensemble des données ; • $\varepsilon_{\text{lieu } l}$ est un effet aléatoire lié au site de prélèvement. <p>Les coefficients de ce modèle sont estimés par ajustement sur les résultats des prélèvements au travers de la variable PCC qui prend pour chaque prélèvement la valeur 1 lorsque le résultat du dénombrement est positif (présence de CC) et 0 dans le cas contraire.</p> <p>Les coefficients du modèle étant estimés, la probabilité de présence des CC peut être prédite chaque mois, pour chaque usage, chaque année et chaque site, quel que soit le nombre de données présentes dans chaque cas, grâce à la formule suivante :</p> $P_{ijkl} = \frac{\exp(\text{const} + \alpha_{\text{mois } i} + \beta_{\text{usage } j} + \gamma_{\text{année } k} + \varepsilon_{\text{lieu } l})}{1 + \exp(\text{const} + \alpha_{\text{mois } i} + \beta_{\text{usage } j} + \gamma_{\text{année } k} + \varepsilon_{\text{lieu } l})}$ <p>Un modèle dans lequel l'effet site est remplacé par un effet département de prélèvement a également été testé. Cette approche a de plus été utilisée pour modéliser le risque de dépassement de la valeur de 100 000 CC.mL⁻¹, à partir d'une variable PCC100m qui vaut 1 pour un prélèvement sur lequel le nombre de CC observées dépasse 100 000 CC.mL⁻¹ et 0 dans le cas contraire.</p>
<p><i>Régression linéaire généralisée lognormale avec prise en compte d'effets mixtes</i></p>
<p>Soit $NbCC_{ijkl}$ le nombre de cellules de cyanobactéries dénombrées le mois i, dans une eau ayant un usage j, l'année k sur le site de prélèvement l, le modèle ci-dessous est alors ajusté sur les résultats de dénombrement :</p> $\log_{10}(NnCC_{ijkl}) = \text{const} + \alpha_{\text{mois } i} + \beta_{\text{usage } j} + \gamma_{\text{année } k} + \varepsilon_{\text{lieu } l}$ <p>où :</p> <ul style="list-style-type: none"> • $\alpha_{\text{mois } i}, \beta_{\text{usage } j}, \gamma_{\text{année } k}$ sont respectivement les effets du mois i, de l'usage j et de l'année k ; • $\varepsilon_{\text{lieu } l}$ est un effet aléatoire lié au site de prélèvement. <p>Les coefficients des différents paramètres étant estimés à partir des résultats de prélèvements, il est ensuite possible de prédire le nombre moyen de cellules de cyanobactéries attendu dans chaque cas à partir de la formule suivante :</p> $NnCC_{ijkl} = 10^{\text{const} + \alpha_{\text{mois } i} + \beta_{\text{usage } j} + \gamma_{\text{année } k} + \varepsilon_{\text{lieu } l}}$ <p>Un modèle remplaçant l'effet site de prélèvement par un effet département a également été testé.</p> <p>Des démarches similaires ont été employées pour l'analyse des résultats de dosage des microcystines.</p> <p>Afin de garantir une certaine robustesse dans l'analyse des résultats, le ou les modèles ont été ajustés sur : (1) l'ensemble des données disponibles et exploitables pour chaque analyse et (2) les sites de prélèvement pour lesquels il y a au moins quatre résultats de prélèvements. Ce faisant, environ 90 % des résultats de prélèvements disponibles et exploitables ont été utilisés pour cette deuxième analyse, mais moins de 60 % des sites de prélèvement potentiels sont concernés.</p>

4. Résultats en eaux brutes

4.1. Dénombrement cellulaire

4.1.1. Influence des paramètres sites, mois, année et usage

Ont été analysés de manière séparée : (1) la probabilité de présence des cellules de cyanobactéries dans un prélèvement effectué sur un site, (2) l'abondance moyenne des CC lorsqu'elles sont présentes et (3) la probabilité (appelée « risque 100 000 ») que l'abondance dépasse 100 000 cellules par mL. Ces analyses statistiques reposent suivant les cas sur 2 400 à 3 700 données. Dans chaque cas, l'influence des variables cofacteurs mois, usage, année et sites de prélèvement a été étudiée. Les résultats sont présentés ci-dessous de manière synthétique.

L'ordre d'influence des variables précédemment citées apparaît identique sur la probabilité de présence des CC, l'abondance et le « risque 100 000 » ; il s'agit dans l'ordre décroissant : du site de prélèvement, du mois (saison), de l'usage et de l'année, dont l'influence, contrairement aux autres paramètres, n'apparaît pas systématiquement statistiquement significative.

L'influence prépondérante du paramètre site de prélèvement (commune X usage) montre que la prolifération de cyanobactéries est d'abord liée à la nature et aux caractéristiques propres à chaque zone aquatique. Néanmoins, le type de zone aquatique (rivière, lac, étang, ...), tel que référencé dans la base, semble n'avoir aucune influence sur la présence et l'abondance des cellules de cyanobactéries. Si la présence de cyanobactéries apparaît comme un phénomène très largement observé sur les sites de prélèvement pour lesquels des données sont disponibles (tableau IV-II), les très fortes valeurs d'abondance et les forts risques de dépassement de la valeur de 100 000 CC.mL⁻¹ sont le fait d'un nombre de sites réduit. La vulnérabilité ou non-vulnérabilité d'un site vis-à-vis des proliférations de cyanobactéries semble, qui plus est, se reproduire d'années en années. Une analyse portant sur 82 sites pour lesquels au moins deux années de données et au moins trois données par an étaient disponibles a fait apparaître une corrélation interannuelle moyenne de 0,63 sur l'abondance moyenne des CC et de 0,53 sur l'abondance maximale de chaque site (valeurs estimées sur 1 632 résultats de dénombrement cellulaire).

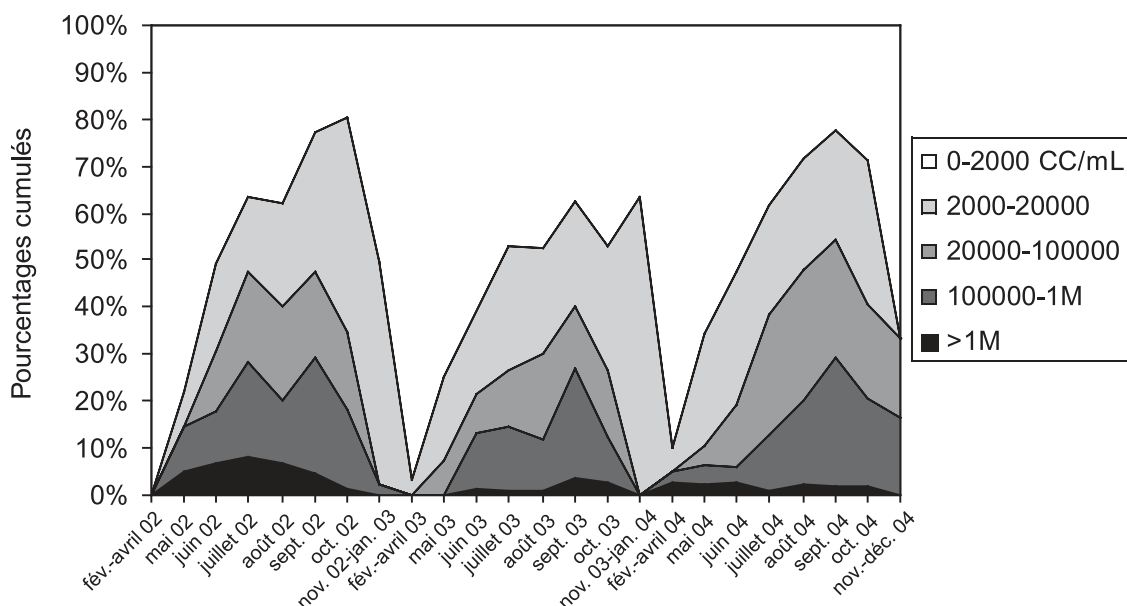
L'agrégation des données au niveau département, à la place du « site de prélèvement », modifie peu les résultats : bien qu'inférieur à l'effet site, l'effet du département est encore supérieur à ceux des paramètres mois et usage. Autrement dit les sites qui admettent les plus fortes proliférations de cyanobactéries sont regroupés dans certains départements sans que les données disponibles dans la base ne permettent d'expliquer ou d'interpréter ce phénomène. Le « risque 100 000 » est plus important dans les régions Pays de la Loire et Bretagne, ainsi que dans les départements Vienne, Indre, Cher et Creuse. À noter qu'il s'agit également des zones géographiques pour lesquelles le nombre de données est le plus élevé.

Les mois à plus forte probabilité de présence des CC sont les mois de septembre et d'octobre, mais l'abondance et le « risque 100 000 » sont supérieurs aux mois d'août et septembre. Les mois à plus faible probabilité de présence et plus faible abondance sont les mois de novembre à avril⁽²⁰⁾. La saisonnalité de la prolifération des cyanobactéries est particulièrement bien mise en évidence par la figure IV-1 (évolution saisonnière et pluriannuelle des classes d'abondance⁽²¹⁾).

(20) Rappel : les données de novembre à avril sont agrégées.

(21) Rappel : cinq classes d'abondance ont été définies, en partie fondées sur les classes proposées par l'OMS : 0–2 000 CC.mL⁻¹ ; > 2 000–20 000 CC.mL⁻¹ ; >20 000–100 000 CC.mL⁻¹ ; >100 000–1 million de CC.mL⁻¹ et la classe plus de 1 million de CC.mL⁻¹.

Figure IV-1 : Proportions des résultats de dénombrement dans chaque classe d'abondance en fonction du mois sur les trois années 2002-2004 [résultats bruts sans modélisation].



Indépendamment de l'effet mois, la probabilité de présence des CC dans les prélèvements associés aux eaux BLB est supérieure à celui des prélèvements en eaux AEP, celui des prélèvements en eaux BLAN étant intermédiaire. De même, le « risque 100 000 » est significativement plus faible dans les prélèvements en eaux AEP que dans ceux effectués dans les eaux BLB et BLAN. Il s'agit probablement bien plus d'un effet lié au prélèvement, c'est-à-dire à son emplacement et à sa profondeur (effet de bordure et de surface), que d'un effet lié à la nature de la zone aquatique considérée : dans les eaux BLB et BLAN, les prélèvements sont effectués en surface (0-1 m) et au bord (i.e. où se développent principalement les cyanobactéries), alors que les prélèvements en zone AEP correspondent à des eaux plus profondes plus éloignées des bords.

Connaître la typologie et les caractéristiques de chaque site de prélèvement serait indispensable afin d'expliquer cette prépondérance du paramètre site et de confirmer l'influence du paramètre usage de l'eau.

Le modèle utilisé ne prend pas en compte d'éventuelles interactions entre les effets des paramètres mois, année, usage et localisation géographique du site de prélèvement : l'effet de chaque mois est considéré à peu près le même chaque année et sensiblement identique également du nord au sud de la métropole. La faible interaction entre la saison et la localisation géographique (département) a pu être confirmée sur l'abondance. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la majorité des données proviennent à peu près de la même latitude. Le nombre de données n'a pas permis de le vérifier sur la probabilité de présence des CC et le « risque 100 000 ».

4.1.2. Prédiction de valeurs

4.1.2.1. Probabilité de présence des cellules de cyanobactéries

Le modèle considéré pour l'estimation de la probabilité de présence des CC dans un prélèvement prend en compte les effets des paramètres mois, usage (AEP, BLB et BLAN) et site de prélèvement. Sont concernés 3 743 données et 427 sites de prélèvement. Il s'agit d'une régression logistique de la variable PCC, qui prend la valeur 1 en présence de CC dans un prélèvement et 0 dans le cas contraire. Le coefficient de détermination⁽²²⁾ de l'ajustement est de 0,47, témoignant de l'existence d'une certaine variabilité non expliquée par le modèle, en particulier au sein de chaque site de prélèvement. Une fois ajusté, le modèle permet la prédiction des probabilités de présence des CC pour chaque site de prélèvement, chaque mois, en distinguant les différents usages. La distribution des valeurs prédites pour chaque site de prélèvement associé à un usage AEP est décrite dans le tableau IV-II.

(22) Le coefficient de détermination d'un modèle est égal à 1 moins la variance des résidus sur la variance des valeurs expérimentales. Attention, le coefficient de détermination calculé sur un modèle logistique ne peut être comparé à celui obtenu dans une régression avec la loi normale (moindres carrés) car dans le cas de la régression logistique, sont comparés des valeurs réelles nécessairement égales à 0 ou à 1 (présence ou absence des CC) à des valeurs prédites intermédiaires entre 0 et 1 (probabilité de présence des CC).

Tableau IV-II : Distribution des probabilités de présence des cellules de cyanobactéries prédits pour chaque site de prélèvement AEP.

AEP (93 sites de prélèvement)	hiver*	mai	juin	juillet	août	sept.	oct.
moyenne	0,47	0,53	0,61	0,63	0,67	0,76	0,75
min	0,03	0,04	0,06	0,07	0,09	0,16	0,16
quantile 5 %	0,04	0,06	0,10	0,11	0,15	0,25	0,24
quantile 25 %	0,15	0,20	0,30	0,33	0,40	0,55	0,54
médiane	0,56	0,65	0,76	0,78	0,83	0,90	0,90
quantile 75 %	0,72	0,79	0,86	0,88	0,91	0,95	0,95
quantile 95 %	0,89	0,93	0,95	0,96	0,97	0,98	0,98
max	0,97	0,98	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00

* La modalité hiver regroupe les mois de novembre à avril.

Le tableau IV-II se lit de la manière suivante : au mois d'août, par exemple, sur les 93 sites de prélèvement associés à l'usage AEP, la moitié admettrait une probabilité de présence des CC supérieur à 83 % (médiane) ; 25 % admettent une probabilité de présence des CC inférieur à 40 % (quantile⁽²³⁾ 25 %) et 25 % supérieur à 91 % (quantile 75 %). La moyenne de la probabilité de présence des CC est de 67 % pour ce même mois sur les 93 sites de prélèvement AEP. Dans cette moyenne, chaque site de prélèvement a le même poids quel que soit le nombre de données disponibles pour chacun.

Tableau IV-III : Distribution des probabilités de présence des cellules de cyanobactéries prédits pour chaque site de prélèvement BLAN.

BLAN (102 sites)	hiver*	mai	juin	juillet	août	sept.	oct.
moyenne	0,53	0,59	0,68	0,69	0,74	0,81	0,81
min	0,05	0,07	0,12	0,13	0,17	0,27	0,26
quantile 5 %	0,08	0,11	0,18	0,20	0,25	0,38	0,38
quantile 25 %	0,31	0,39	0,52	0,55	0,63	0,75	0,75
médiane	0,56	0,65	0,76	0,78	0,83	0,90	0,90
quantile 75 %	0,78	0,83	0,90	0,91	0,93	0,96	0,96
quantile 95 %	0,92	0,95	0,97	0,97	0,98	0,99	0,99
max	0,95	0,97	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99

* La modalité hiver regroupe les mois de novembre à avril.

Tableau IV-IV : Distribution des probabilités de présence des cellules de cyanobactéries prédits pour chaque site de prélèvement BLB.

BLB (232 sites)	hiver*	mai	juin	juillet	août	sept.	oct.
moyenne	0,63	0,68	0,75	0,76	0,80	0,86	0,86
min	0,03	0,04	0,06	0,07	0,09	0,16	0,16
quantile 5 %	0,16	0,22	0,32	0,34	0,42	0,57	0,56
quantile 25 %	0,34	0,43	0,56	0,58	0,66	0,78	0,77
médiane	0,75	0,81	0,88	0,89	0,92	0,95	0,95
quantile 75 %	0,86	0,90	0,94	0,94	0,96	0,98	0,98
quantile 95 %	0,93	0,95	0,97	0,97	0,98	0,99	0,99
max	0,96	0,97	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99

* La modalité hiver regroupe les mois de novembre à avril.

(23) Le quantile 5 % d'un échantillon est la valeur qui sépare les 5 % plus faibles valeurs de cet échantillon des 95 % plus fortes. Entre le quantile 5 % et le quantile 95 %, par exemple, se trouvent 90 % des valeurs.

La présence de cellules de cyanobactéries apparaît comme un phénomène largement répandu quels que soient l'usage de l'eau et la période de l'année : la probabilité de présence moyenne des CC dans un prélèvement est comprise entre 47 % en hiver pour l'usage AEP et 86 % au mois de septembre pour l'usage BLB. Néanmoins, les plus fortes probabilités de présence des CC sont observées au mois de septembre et d'octobre (entre 75 et 86 % en moyenne) ; elles sont plus importantes pour les prélèvements en eaux BLB et BLAN que pour ceux en eaux AEP.

4.1.2.2. Abondance moyenne des cellules de cyanobactéries

Pour l'abondance, un modèle avec effet mois et effet site de prélèvement est ajusté sur l'ensemble des données disponibles correspondant aux usages AEP, BLAN et BLB agrégées⁽²⁴⁾. Ce faisant 2 629 résultats d'abondance non nulle et 327 sites de prélèvement sont pris en compte. Le nombre de CC, lorsqu'il est non nul, est censé suivre une loi lognormale, ce qui a pu être vérifié. Le coefficient de détermination du modèle est de 0,62.

Les valeurs prédites à partir de ce modèle sont les moyennes géométriques⁽²⁵⁾ de l'abondance des CC – lorsqu'elles sont présentes – associées à chaque site de prélèvement pour chaque mois. La distribution de ces valeurs associées aux 327 sites de prélèvement concernés est décrite dans le tableau IV-V.

Tableau IV-V : Distribution des abondances moyennes de cellules de cyanobactéries prédites (cellules.mL⁻¹) pour chaque site de prélèvement lorsqu'elles sont présentes.

Sur 327 sites de prélèvement (tous usages confondus)	hiver*	mai	juin	juillet	août	sept.	oct.
min	1	4	3	8	11	15	6
quantile 5 %	21	98	86	210	280	380	150
quantile 25 %	190	840	740	1 810	2 410	3 300	1 290
médiane	900	3 900	3 400	8 400	11 200	15 300	6 000
quantile 75 %	2 900	13 000	11 400	27 800	37 100	50 800	19 900
quantile 95 %	18 000	80 000	71 000	172 000	229 000	313 000	123 000
max	110 000	510 000	450 000	1 090 000	1 450 000	2 000 000	780 000

* La modalité hiver regroupe les mois de novembre à avril.

Le tableau IV-V se lit de la manière suivante : 75 % des sites de prélèvement, sur lesquels il y a apparition de CC, admettraient, lorsqu'elles apparaissent, une abondance moyenne (géométrique) inférieure à 3 000 cellules par mL en hiver et inférieure à 50 000 cellules par mL en septembre. Néanmoins 5 % des sites de prélèvement admettent des valeurs d'abondance moyenne bien supérieures (entre 300 000 et 2 millions de cellules par mL) pour ce même mois. Ces sites admettent également de très fortes valeurs d'abondance le reste de l'année.

Il ne s'agit en aucun cas des valeurs maximales qui peuvent apparaître chaque mois sur chaque site de prélèvement ; celles-ci sont naturellement bien supérieures, mais elles n'ont pas été modélisées.

4.1.2.3. Risque de dépassement de la valeur de 100 000 CC.mL⁻¹

Pour le risque de dépassement de la valeur de 100 000 CC.mL⁻¹, un modèle avec prise en compte des effets mois, usage et site de prélèvement est ajusté sur l'ensemble des données disponibles. Ce faisant, 3 544 données et 417 sites de prélèvement sont concernés. Le coefficient de détermination de l'ajustement est de 0,46. Une fois ajusté, le modèle permet de prédire les probabilités de dépassement de la valeur de 100 000 CC.mL⁻¹ associées à chaque site de prélèvement pour chaque mois et chaque usage. La distribution de ces valeurs pour les 89 sites de prélèvement associés à l'usage AEP est décrite dans le tableau IV-VI.

(24) L'usage de l'eau ne semble pas avoir une influence très significative sur l'abondance moyenne des cellules de cyanobactéries (lorsqu'elles sont présentes) au sein de notre échantillon ; c'est pourquoi les résultats provenant des différents usages ont été agrégés pour cette analyse.

(25) La moyenne géométrique d'un échantillon de taille n est la racine nième du produit des n valeurs de l'échantillon. Elle peut également se calculer à partir de l'exponentielle de la moyenne arithmétique (moyenne usuelle) des valeurs de l'échantillon transformées en log. Cette moyenne est employée quand les données traitées suivent une loi de probabilité lognormale (distribution dissymétrique qui se caractérise par une grande quantité de faibles valeurs et une faible quantité de fortes valeurs, parfois distantes de plusieurs ordres de grandeur). Elle correspond dans ce cas à la médiane des données, c'est-à-dire à la valeur qui sépare les 50 % plus faibles valeurs des 50 % plus fortes.

Tableau IV-VI : Distribution des valeurs de risque de dépassement de la valeur de 100 000 CC.mL⁻¹ prédites pour chaque site de prélèvement AEP.

AEP (89 sites de prélèvement)	hiver*	mai	juin	juillet	août	sept.	oct.
moyenne	0,01	0,04	0,04	0,07	0,07	0,12	0,06
min	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01
quantile 5 %	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01
quantile 25 %	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,01
médiane	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,05	0,02
quantile 75 %	0,00	0,01	0,01	0,03	0,03	0,07	0,02
quantile 95 %	0,06	0,24	0,22	0,38	0,41	0,59	0,32
max	0,11	0,40	0,37	0,56	0,59	0,76	0,50

* La modalité hiver regroupe les mois de novembre à avril.

Au mois de septembre, par exemple, sur les 89 sites de prélèvement associés à l'usage AEP, la moitié aurait un « risque 100 000 » supérieur à 5 %. La moyenne du « risque 100 000 » est de 12 % pour ce même mois sur les 89 sites AEP. Pour cet usage de l'eau, les fortes valeurs de « risques 100 000 » sont vraiment le fait d'une minorité de sites.

Tableau IV-VII : Distribution des valeurs de risque de dépassement de la valeur de 100 000 CC.mL⁻¹ prédites pour chaque site de prélèvement BLAN.

BLAN (97 sites)	hiver*	mai	juin	juillet	août	sept.	oct.
moyenne	0,03	0,12	0,11	0,17	0,19	0,27	0,15
min	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01
Q5 %	0,00	0,01	0,01	0,02	0,02	0,04	0,01
Q25 %	0,00	0,02	0,02	0,05	0,05	0,11	0,04
médiane	0,01	0,04	0,03	0,07	0,08	0,15	0,05
Q75 %	0,02	0,11	0,10	0,19	0,21	0,37	0,16
Q95 %	0,16	0,50	0,48	0,66	0,69	0,83	0,61
max	0,37	0,76	0,74	0,86	0,87	0,94	0,83

* La modalité hiver regroupe les mois de novembre à avril.

Tableau IV-VIII : Distribution des valeurs de risque de dépassement de la valeur de 100 000 CC.mL⁻¹ prédites pour chaque site de prélèvement BLB.

BLB (231 sites)	hiver*	mai	juin	juillet	août	sept.	oct.
moyenne	0,03	0,09	0,09	0,15	0,16	0,24	0,12
min	0,00	0,01	0,01	0,02	0,02	0,04	0,01
Q5	0,00	0,01	0,01	0,03	0,03	0,06	0,02
Q25	0,00	0,02	0,02	0,04	0,05	0,09	0,03
médiane	0,01	0,03	0,03	0,06	0,07	0,13	0,05
Q75	0,02	0,09	0,09	0,17	0,19	0,33	0,14
Q95	0,14	0,45	0,43	0,62	0,65	0,80	0,56
max	0,65	0,91	0,90	0,95	0,96	0,98	0,94

* La modalité hiver regroupe les mois de novembre à avril.

La moyenne du risque de dépassement de la valeur de 100 000 CC.mL⁻¹ de mai à octobre est donc comprise entre 11 et 27 % pour les eaux à activités nautiques, entre 9 et 24 % pour les eaux de baignade et entre 4 et 12 % pour les eaux AEP. Néanmoins, il est très différent d'un site à l'autre et apparaît comme très important sur 5 à 10 % sites, en particulier pour les eaux BLB et BLAN, quelle que soit d'ailleurs la période de l'année. Les plus fortes valeurs de « risques 100 000 » sont le fait d'une minorité de sites. En dehors de ceux-ci, le « risque 100 000 » est pratiquement nul pendant les mois de novembre à avril, quel que soit l'usage de l'eau considéré.

4.1.3. Discussion quant à la représentativité de l'échantillon

Comme cela a déjà été souligné, la représentativité spatiale et temporelle des prélèvements avec dénombrement des CC n'est pas assurée : tous les départements ne sont pas représentés ; le nombre de prélèvements est très différent d'un département à l'autre, d'un site à l'autre, d'un mois à l'autre ; la proportion de données en fonction des usages de l'eau n'est pas la même d'une année sur l'autre... Les effets de la saison et de l'usage ont été précédemment analysés. Trois questions peuvent se poser vis-à-vis du nombre de prélèvements effectués sur chaque site :

1. le nombre de prélèvements est-il plus important dans les zones aquatiques où la prolifération des cyanobactéries est plus importante ?
2. Les sites pour lesquels il existe plusieurs années de données ont-ils une abondance de CC plus importante ?
3. Dans une zone aquatique donnée, les prélèvements sont-ils effectués de manière privilégiée lorsque la présence de cyanobactéries est soupçonnée ?

Les réponses à ces questions sont présentées ci-dessous.

Dans la modélisation, la probabilité de présence et l'abondance des cyanobactéries sont apparues positivement et significativement corrélées au nombre de données disponibles pour chaque site de prélèvement. Les sites sur lesquels plus de prélèvements sont effectués sont également ceux sur lesquels la présence des CC est plus fréquente et l'abondance plus importante. Des sites apparemment identifiés comme vulnérables vis-à-vis de la prolifération de cyanobactéries sont donc l'objet d'une surveillance accrue.

Les prélèvements effectués dans les communes pour lesquelles une seule année de données est disponible ont été comparés à ceux des communes pour lesquelles au moins deux années de données sont disponibles, au travers du pourcentage de présence et de l'abondance des CC. Le premier groupe concerne 299 communes et comprend 1 676 résultats (dénombrements des CC) de prélèvements sur eaux brutes ; le deuxième groupe concerne 129 communes et comprend 2 110 résultats toujours sur eaux brutes.

Les différences observées entre ces groupes des communes sont faibles. Qui plus est, les deux paramètres analysés (pourcentage de présence et abondance des CC) évoluent en sens inverse : le pourcentage de présence des CC est supérieur sur les prélèvements associés aux communes du premier groupe par rapport au second (83 vs 76 %), mais l'abondance moyenne y est inférieure (moyenne géométrique de 10 000 vs 13 500 CC.mL⁻¹) [résultats bruts sans modélisation]. Autrement dit, il n'y a pas vraiment de différence entre les prélèvements effectués dans ces deux groupes de communes.

Après analyse, il apparaît que 67 % des prélèvements ont lieu le lundi ou le mardi. *A contrario*, seuls 4,6 % des prélèvements ont lieu le vendredi, samedi et dimanche. De manière générale, au niveau d'une zone aquatique, les prélèvements ne semblent donc pas être effectués préférentiellement lorsque l'apparition de cyanobactéries est soupçonnée. Ces valeurs sont équivalentes quel que soit l'usage de l'eau considéré.

Le pourcentage de présence des cellules de cyanobactéries dans les prélèvements est compris entre 70 et 84 % [résultats bruts] suivant le jour de la semaine considéré. Les prélèvements correspondant aux jours les moins représentés au niveau du nombre de prélèvements (du vendredi au dimanche) n'admettent pas un pourcentage de présence des CC supérieur à ceux des jours les plus représentés (lundi et mardi). Il en est de même pour l'abondance moyenne. Les prélèvements effectués en dehors du lundi et du mardi, ne sont pas faits spécifiquement parce qu'une prolifération de cyanobactéries est soupçonnée.

L'échantillon des résultats de dénombrements est biaisé du fait des disproportions de données mensuelles d'une part et du nombre de données disponibles pour chaque site de prélèvement d'autre part : un plus grand nombre de prélèvements est effectué pendant les mois et sur les sites où la présence et l'abondance des cellules de cyanobactéries sont plus importantes. L'approche de régression employée permet de corriger en bonne partie ces biais. La représentativité des résultats statistiques obtenus dépend alors de la représentativité de l'échantillon des sites pour lesquels des résultats de prélèvements sont disponibles (biais potentiel lié au recueil des données).

4.1.4. Relation entre abondance et dominance des cyanobactéries

Le pourcentage représenté par les cyanobactéries par rapport au total algal est fourni pour 2 143 prélèvements avec abondance non nulle. La moyenne (géométrique) de l'abondance de ce sous-échantillon est de 11 000 CC.mL⁻¹ et l'écart type (géométrique) de 18. Ces valeurs sont très proches de celles de l'échantillon complet (2 653 valeurs) des résultats de dénombrement avec abondance non nulle (12 400 CC.mL⁻¹ et 16 respectivement pour la moyenne et l'écart type géométriques). Le sous-échantillon des prélèvements pour lesquels l'information sur le pourcentage des CC est disponible est donc représentatif en terme d'abondance de l'échantillon complet des prélèvements avec résultats de dénombrements cellulaires non nuls. La relation entre pourcentage représenté par les cyanobactéries (par rapport au total algal) et abondance des cellules de cyanobactéries a alors été analysée.

Bien que significative, la relation croissante entre abondance des CC et le pourcentage qu'elles représentent par rapport au total algal est peu prédictive du fait d'une très grande dispersion des valeurs. La relation (moins exigeante) entre abondance et dominance des CC, variable qui vaut 1 si le pourcentage représenté par les CC est supérieur à 50 % et 0 dans le cas contraire, a alors été analysée. La probabilité que les cyanobactéries soient dominantes apparaît effectivement comme une fonction significative et prédictive de l'abondance (régression logistique). Le tableau IV-IX fournit la probabilité que les cellules de cyanobactéries soient dominantes en fonction du nombre de cellules de cyanobactéries.

Tableau IV-IX : Relation entre abondance et dominance des cellules de cyanobactéries.

Abondance en nombre de CC par mL	Probabilité que les CC soient dominantes (IC* 95 %)
100	10 % ± 3
1 000	35 % ± 4
2 500	50 % ± 4
10 000	70 % ± 3
100 000	90 % ± 2

* Intervalle de confiance à 95 % autour de la valeur moyenne.

À partir de 2 500 CC.mL⁻¹, il y a plus de 50 % de chance que les cyanobactéries soient dominantes (*i.e.* qu'elles représentent plus de 50 % du total algal) ; à partir de 10 000 CC.mL⁻¹, la probabilité qu'elles soient dominantes est de 70 % environ.

4.1.5. Taxonomie

Les prélèvements avec information taxonomique (1 699 données en eaux brutes) admettent des niveaux d'abondance en CC identiques à ceux de l'ensemble des prélèvements avec résultats de dénombrement non nuls (moyenne géométrique de 15 700 *versus* 12 400 CC.mL⁻¹ ; écart type géométrique de 14 vs 16). Ce sous-échantillon de valeurs est donc représentatif de l'ensemble des données disponibles dans la base en terme d'abondance en CC.

En tout, 27 genres différents de cyanobactéries ont été recensés dans la base (tableau IV-I). Le nombre de genres identifiés par prélèvement est compris entre 1 et 12 ; sa valeur médiane est de 2 sur les trois années considérées, tous usages confondus. Environ 97 % des 1 699 prélèvements avec détermination taxonomique (soit 1 648 prélèvements) présentent au moins un genre potentiellement toxique [résultat brut]. Ce pourcentage de présence de genres potentiellement toxiques dans les prélèvements est pratiquement identique suivant les années et les usages de l'eau. Entre 1 et 3 genres potentiellement toxiques sont retrouvés dans 83 % des prélèvements avec détermination taxonomique. Les différences inter-départements du pourcentage de présence de genres potentiellement toxiques sont faibles.

Une prédominance de la présence de certains genres est constatée : *Planktothrix* identifié dans 46 % des prélèvements et sur 65 % des sites (sur 214), *Microcystis* dans 43 % des prélèvements et 75 % des sites, *Aphanizomenon* respectivement dans 40 % et 64 %, *Anabaena* dans 34 % et 54 %, et *Woronichinia* dans 23 % et 32 %, les autres genres ayant un pourcentage de présence inférieur à 10 %. Il s'agit là de résultats bruts et non de valeurs prédites par modélisation.

Ces genres, considérés comme potentiellement toxiques, sont les plus fréquemment rencontrés dans les prélèvements et, qui plus est, lorsqu'ils sont présents dans un prélèvement, ils ont entre 70 et 80 % de chance d'être le genre dominant. De manière générale les différents genres de cyanobactéries ne semblent pas avoir les mêmes distributions d'abondance (tableau IV-X).

Tableau IV-X : Caractéristiques statistiques de l'abondance des genres de cyanobactéries prépondérants.

Genres de cyanobactéries	Moyenne géométrique en nombre de CC.mL-1	Ecart type géométrique
<i>Aphanizomenon</i>	6 400	12
<i>Anabaena</i>	1 900	21
<i>Woronichinia</i>	1 350	8
<i>Microcystis</i>	1 950	10
<i>Plankthotrix</i>	16 200	15

Plankthotrix admet des niveaux d'abondance nettement supérieurs aux genres *Anabaena*, *Woronichinia*, *Microcystis*, et supérieurs également au genre *Aphanizomenon*. En revanche, c'est chez *Anabaena* que la plus grande variabilité d'abondance est observée.

L'évolution saisonnière des genres de cyanobactéries les plus fréquemment rencontrés dans la base de données est présentée sur la figure L – livret couleur. Le genre *Plankthotrix* apparaît comme le plus représenté (en nombre de cellules) tout au long de l'année. Deux pics d'abondance apparaissent : un au mois de juillet et le deuxième au mois de septembre, pour les genres *Plankthotrix*, *Aphanizomenon* et *Anabaena*. Ceci semble en contradiction avec les résultats de l'analyse de régression sur l'abondance totale des CC. En revanche, un phénomène similaire apparaît l'année 2002 et dans une moindre mesure en 2003 dans de l'analyse pluriannuelle des pourcentages de chaque classe d'abondance [résultats bruts] présentée figure IV-1. Effectivement, la majorité des données avec information taxonomique proviennent des années 2002 et 2003, à part égale. Ce phénomène de double pic, très marqué l'année 2002, mais pas du tout l'année 2004, pourrait être lié à des différences météorologiques interannuelles et ne peut être considéré *a priori* comme une généralité.

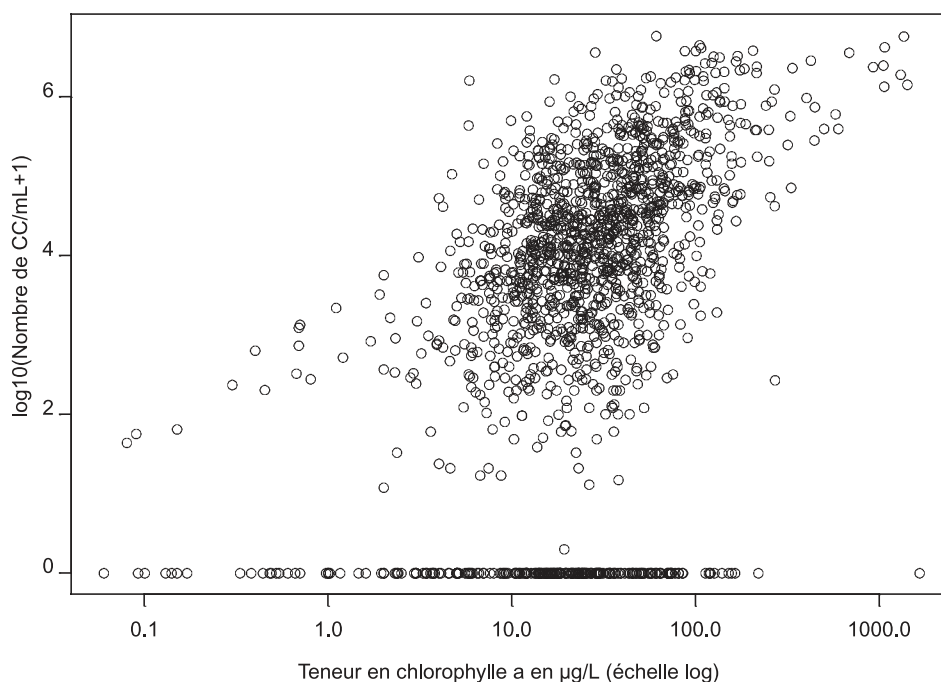
4.1.6. Relation entre abondance des cyanobactéries et teneur en chlorophylle *a*

L'échantillon des résultats de chlorophylle *a* comprend 1 695 valeurs, issues de prélèvements en eaux brutes, comprises entre 0,05 et 1 656 $\mu\text{g.L}^{-1}$. La moyenne géométrique de cet échantillon de valeurs est de 23 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (écart-type géométrique de 3,3) ; 90 % des résultats de chlorophylle *a* sont compris entre 4 et 128 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Valeurs extrêmes mises à part, la distribution des résultats de chlorophylle *a* se rapproche de la distribution lognormale.

Le sous-échantillon des prélèvements pour lesquels un résultat de chlorophylle *a* est disponible n'est pas tout à fait représentatif de l'ensemble des prélèvements quant aux résultats de dénombrement des CC. Le pourcentage de présence des CC dans les prélèvements avec teneur en chlorophylle *a* est significativement supérieur à celui des prélèvements sans résultat de chlorophylle *a* (83 *versus* 72 %). Il est de même pour l'abondance des CC (16 000 *versus* 8 500 CC.mL⁻¹ en moyenne géométrique).

La relation entre nombres de cellules de cyanobactéries et niveaux de chlorophylle *a* est présentée figure IV-2.

Figure IV-2 : Relation entre nombre de cellules de cyanobactéries par mL et concentration en chlorophylle *a* en $\mu\text{g.L}^{-1}$, estimée sur 1 585 résultats de prélèvements [résultats bruts sans modélisation]. Les données sur les eaux brutes des trois années 2002 à 2004 et des différents usages ont été agrégées.



En dehors des valeurs extrêmes –autrement dit, entre 5 et 130 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de chlorophylle *a*, ce qui représente plus de 90 % des valeurs–, aucune relation exploitable n'est observée entre résultats de dénombrement des CC et teneur en chlorophylle *a* telle que mesurée par le protocole en vigueur. À partir de 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de chlorophylle *a*, des résultats de dénombrement supérieurs à 10 000 CC.mL^{-1} peuvent apparaître et, inversement, à 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de chlorophylle *a*, les cellules de cyanobactéries ne sont pas nécessairement présentes. Le fait de ne travailler que sur les cas où les cyanobactéries sont dominantes ou très dominantes (*i.e.* où elles représentent plus de 50 % ou plus de 75 % du total algal) modifie peu ce qui vient d'être dit.

En revanche, une relation entre concentration en chlorophylle *a* et probabilité de dépassement de valeurs seuils sur le nombre de CC peut être établie. La probabilité que le nombre de CC d'un prélèvement dépasse 20 000 par mL (respectivement 100 000 CC.mL^{-1}) apparaît comme une fonction significative et prédictive de la teneur en chlorophylle *a* entre 5 et 130 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (régression logistique). Le tableau IV-XI fournit les probabilités de dépassement de la valeur de 20 000 CC.mL^{-1} (resp. 100 000 CC.mL^{-1}) en fonction de la concentration en chlorophylle *a*.

Tableau IV-XI : Relation entre concentration en chlorophylle *a* et probabilité de dépassement d'un seuil (20 000 et 100 000) sur le nombre de cellules de cyanobactéries par mL, estimée à partir de 1 444 résultats de prélèvements. Les données sur les eaux brutes des trois années 2002 à 2004 et des différents usages ont été agrégées.

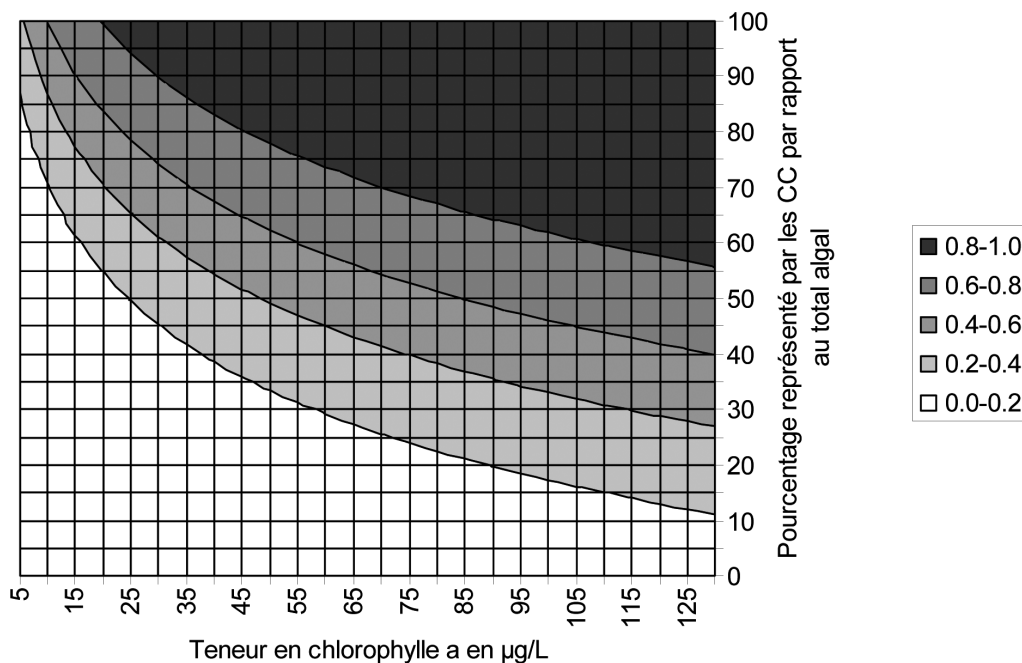
Concentration en chlorophylle <i>a</i> en $\mu\text{g.L}^{-1}$	Probabilité que le nombre de CC dépasse 20 000 par mL (IC* 95 %)	Probabilité que le nombre de CC dépasse 100 000 par mL (IC* 95 %)
10	20 % \pm 3	6 % \pm 3
25	38 % \pm 3	15 % \pm 3
50	55 % \pm 4	29 % \pm 4
75	66 % \pm 5	40 % \pm 5
100	72 % \pm 5	47 % \pm 5
125	77 % \pm 5	54 % \pm 5

* Intervalle de confiance à 95 %.

Il se confirme bien que même pour de faibles teneurs en chlorophylle *a*, une abondance de CC importante peut être observée : à partir de 10 µg.L⁻¹ de chlorophylle *a*, il y a 20 % de chance que le nombre de CC dépasse 20 000 par mL et 6 % de chance qu'il dépasse 100 000 par mL...

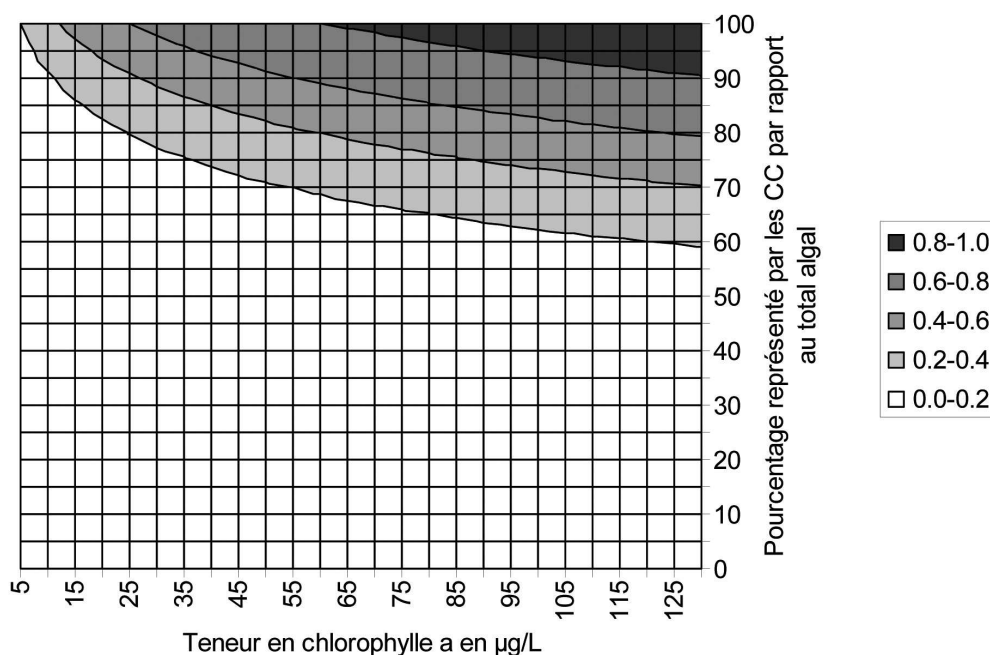
La prise en compte du pourcentage que les cyanobactéries représentent par rapport au total algal dans la relation entre chlorophylle *a* et risque de dépassement des valeurs de 20 000 et 100 000 CC.mL⁻¹ améliore de manière significative le caractère prédictif de cette relation (régression logistique). Autrement dit, si le niveau de chlorophylle *a* et le pourcentage que les cyanobactéries représentent par rapport au total algal sont connus, la probabilité de dépasser 20 000 CC.mL⁻¹ (resp. 100 000 CC.mL⁻¹) peut être prédite avec une relative bonne précision, ± 3,5 % pour l'intervalle de confiance à 95 % (figures IV-3 et IV-4). Néanmoins, cette relation ne fournit pas le nombre de CC, mais seulement le risque de dépassement d'une valeur ; cette information est pertinente en terme de gestion si ce risque est faible ou fort, mais pas s'il est entre les deux.

Figure IV-3 : Risque (probabilité) de dépassement de la valeur de 20 000 CC.mL⁻¹ en fonction de la teneur en chlorophylle *a* et du pourcentage représenté par les CC par rapport au total algal.



La figure IV-3 se lit de la manière suivante : le risque de dépassement de la valeur de 20 000 CC.mL⁻¹ est une fonction croissante à la fois de la teneur en chlorophylle *a* et du pourcentage relatif des CC par rapport au total algal. Pour une teneur en chlorophylle *a* de 50 µg.L⁻¹, le risque de dépasser 20 000 CC.mL⁻¹ est inférieur à 0,2 si les CC représentent moins de 30 % du total algal ; il est supérieur à 0,8 si les CC représentent plus de 80 % du total algal.

Figure IV-4 : Risque (probabilité) de dépassement de la valeur de 100 000 CC.mL⁻¹ en fonction de la teneur en chlorophylle *a* et du pourcentage représenté par les CC par rapport au total algal.



L'OMS a établi une relation entre teneur en chlorophylle *a* et nombre de CC à partir de mesures en laboratoire sur des cyanobactéries. Elle est *a priori* exploitable sur le terrain, si les cyanobactéries sont les seules algues présentes ou si elles sont très majoritaires. Dans notre analyse, aucune relation prédictive entre chlorophylle *a* et nombre de CC n'est observée ; seule une relation probabiliste a pu être estimée. Cinq facteurs intervenant sur la relation entre nombre de CC et teneur en chlorophylle *a* d'un prélèvement peuvent expliquer ce phénomène :

1. la proportion plus ou moins importante que les cyanobactéries représentent par rapport aux autres algues phytoplanctoniques ;
2. la taille des cellules de cyanobactéries qui peut être très différente d'un genre ou d'une espèce à l'autre ;
3. la quantité de pigment chlorophyllien par unité de volume cellulaire qui diffère également d'une espèce de cyanobactéries à l'autre mais également entre les différents types d'algues ;
4. la plus ou moins grande facilité d'extraction de la chlorophylle *a* à partir des cellules de cyanobactéries et sa dégradation rapide dans le temps ;
5. les erreurs dues aux difficultés de dénombrement cellulaire chez certains genres de cyanobactéries.

L'étude Grand Ouest (DGS *et al.* 2004) avait établi une relation significative et positive entre nombre moyen de cellules de cyanobactéries et teneur moyenne en chlorophylle *a* à partir de résultats de prélèvements sur le terrain. Par comparaison avec la présente analyse, il est à noter que dans l'étude Grand Ouest :

1. le nombre de sites de prélèvement est beaucoup plus faible (26 vs 200) et ceux-ci avaient été choisis pour leur forte abondance en CC ;
2. la période d'étude est plus courte et ne concerne qu'une seule année de prélèvements ;
3. les méthodes de prélèvement, de dénombrement des CC et de mesure de la chlorophylle *a* sont beaucoup plus homogènes.

La diversité des sites de prélèvement et par conséquent des peuplements phytoplanctoniques, les évolutions saisonnières et écologiques, font qu'aucune relation prédictive n'apparaît entre chlorophylle *a* et dénombrement des cellules de cyanobactéries dans notre étude. Au vu de notre analyse et tous sites confondus, la mesure de la teneur en chlorophylle *a* ne peut pas être un indicateur exploitable en terme de gestion de la présence ou de l'abondance des cellules de cyanobactéries et se substituer au dénombrement de ces dernières. Elle reste pour autant un indicateur du peuplement phytoplanctonique total.

4.2. Dosage des microcystines

Le sous-échantillon des prélèvements avec un résultat de dosage des microcystines apparaît clairement biaisé par rapport à l'échantillon total des prélèvements en ce qui concerne l'abondance des cellules de cyanobactéries. Les prélèvements avec dénombrement cellulaire et dosage des microcystines admettent un pourcentage de présence des CC et une abondance très significativement ($p \ll 10^{-3}$) supérieures aux prélèvements avec uniquement un dénombrement cellulaire (95 % vs 71 % pour le pourcentage de présence des CC et 70 000 vs 5 000 CC.mL⁻¹ pour ce qui est de l'abondance en moyenne géométrique). La probabilité, par exemple, d'avoir plus de 20 000 CC.mL⁻¹ est de 36 % sur le total des prélèvements avec dénombrement des CC ; elle est de 72 % sur les prélèvements avec un résultat de dénombrement des CC et dosage des MCs [résultats bruts]. Les dosages de microcystines sont effectués lorsque l'abondance est importante, sans qu'apparaisse pour autant de valeur seuil en-dessous de laquelle aucun dosage de MC ne soit effectué. Fournir, comme pour le dénombrement des CC, le résultat du dosage des microcystines sur chaque site de prélèvement n'est donc pas possible.

Comme pour les dénombrements cellulaires, les prélèvements effectués pour dosage des MCs ont lieu majoritairement le lundi et le mardi. Les caractéristiques des prélèvements le reste de la semaine ne sont pas différentes de celles de ces deux jours.

Près de 63 % des résultats de dosage des microcystines en eaux brutes sont en-dessous du seuil de détection et de quantification (fixé à 0,16 µg.L⁻¹ dans notre base⁽²⁶⁾), et ce quel que soit l'usage de l'eau dans laquelle le prélèvement a été effectué. La distribution des résultats est extrêmement dissymétrique : 88 % des valeurs sont inférieures à 3 µg.L⁻¹, 8 % sont incluses entre 3 et 15 µg.L⁻¹ et les 4 % restants des valeurs sont étalées entre 15 et 1 600 µg.L⁻¹.

Les 17 valeurs supérieures à 100 µg.L⁻¹ ont été analysées séparément en reprenant chaque rapport. Il ressort de cette analyse que :

- trois valeurs correspondent à des erreurs d'unité ;
- neuf concernent le même site de prélèvement : elles sont associées à de très fortes abondances de cyanobactéries (supérieures à 1 million de CC.mL⁻¹ dans 4 cas et à 300 000 CC.mL⁻¹ dans les 5 cas restants) et sont issues de prélèvements en surface au sein d'efflorescences ;
- deux ont été cataloguées comme provenant également d'efflorescences sur un autre site ;
- la plus élevée (1 600 µg.L⁻¹) provient d'un prélèvement effectué au filet à plancton ;
- les deux dernières restent sans explication particulière.

Autrement dit, ces plus fortes valeurs, mises à part deux, trouvent une explication : elles sont issues de prélèvements effectués au sein d'efflorescences.

La proportion de résultats dépassant 1 µg.L⁻¹ est plus faible dans les eaux AEP (13 %) que dans les eaux BLB (25 %) et BLAN (33 %). Environ 95 % des résultats sont inférieurs à 2,5 µg.L⁻¹ dans les eaux AEP, mais inférieurs à 16 µg.L⁻¹ dans les eaux BLB et BLAN [résultats bruts]. Ceci provient probablement en bonne partie des seuils sur le nombre de cellules de cyanobactéries à partir desquels les dosages de microcystines sont effectués, seuils qui sont différents dans les eaux AEP et dans les eaux BLB ou BLAN. L'abondance moyenne (géométrique) des prélèvements AEP avec dosage des MCs est de 23 000 CC.mL⁻¹ environ ; elle est respectivement de 135 000 et 150 000 CC.mL⁻¹ pour les eaux BLB et BLAN [résultats bruts].

Trois analyses ont alors été menées à propos des microcystines ; elles concernent :

1. l'influence du genre des cyanobactéries présentes sur la concentration en microcystines ;
2. la relation entre abondance cellulaire et concentration en MC ;
3. l'influence de cofacteurs (usage, mois, année, méthode analytique) sur cette relation.

Les résultats de ces analyses sont présentés ci-dessous.

(26) Rappel : afin d'homogénéiser les seuils de détection et de quantification liés aux différentes méthodes analytiques et aux différents laboratoires, toute valeur inférieure à 0,16 µg.L⁻¹ a été considérée comme non-détectée (ND). La limite de détection et de quantification des microcystines pour la base de données est donc égale à 0,16 µg.L⁻¹.

4.2.1. Influence du genre des cyanobactéries identifiées sur la concentration en microcystines

Les prélèvements avec dosage des microcystines et détermination taxonomique sont au nombre de 715. La probabilité de dépassement du seuil de quantification des microcystines ($0,16 \mu\text{g.L}^{-1}$) ainsi que celle de dépassement de la valeur de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ont été expliquées en fonction de la présence⁽²⁷⁾ puis de l'abondance des genres les plus fréquemment retrouvés, autrement dit : *Planktothrix* (identifié dans 46 % des prélèvements), *Microcystis* (43 %), *Aphanizomenon* (40 %), *Anabaena* (34 %), *Woronichinia* (23 %), *Aphanocapsa* (10 %), *Coelosphaerium* (9 %), *Oscillatoria* (9 %), *Limnothrix* (8 %) et *Merismopedia* (8 %). Les genres **en gras** sont considérés comme **potentiellement toxiques** et producteurs de microcystines. L'approche employée est la même que pour l'analyse des résultats de dénombrement des CC : il s'agit de la régression logistique sans interaction, avec prise en compte d'effets mixtes (chapitre IV-3).

Il ressort de cette analyse que le genre *Microcystis* a une influence systématiquement significative positive sur les concentrations en MC, que ce soit sur la probabilité de détection ou sur la probabilité de dépassement de la valeur de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$, au travers de sa présence et de son abondance. *Planktothrix*, *Anabaena* et *Aphanocapsa* ont une influence également significative positive par leur abondance sur la probabilité de détection ou sur la probabilité de dépassement de la valeur de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$. Enfin, les genres *Woronichinia*, *Aphanizomenon*, et dans une moindre mesure *Coelosphaerium*, ont une influence significative négative sur les concentrations en MC, mais celle-ci dépend de l'analyse statistique considérée. Ceci pourrait être lié à des aspects écologiques.

L'abondance des *Microcystis* apparaît comme plus explicative que le simple paramètre présence, à la fois sur la probabilité de détection des MCs et sur la probabilité de dépassement de la valeur de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$. Le paramètre présence des *Microcystis* est plus explicatif que l'abondance totale (tous genres confondus) des cyanobactéries ; c'est *a fortiori* vrai pour l'abondance des *Microcystis*. Néanmoins le niveau d'explication de l'abondance totale des CC sur les concentrations en MC reste proche de celui du paramètre *Microcystis*. L'information concernant la taxonomie des cyanobactéries n'étant pas présente à chaque dénombrement, la relation entre concentration en MC et abondance totale des cyanobactéries sera utilisée dans la suite de l'étude.

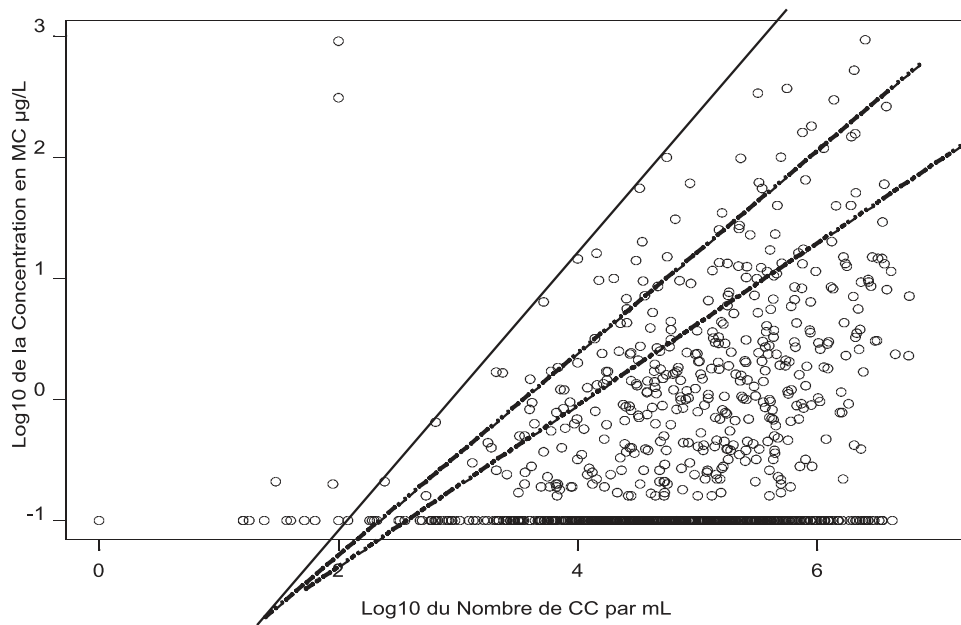
Par ailleurs, le nombre de genres différents observés au sein d'un prélèvement pourrait avoir un effet négatif sur les concentrations en MC : plus le nombre de genres observés est faible, plus les concentrations en MC seraient fortes et inversement. Bien que significative, l'influence de ce paramètre reste limitée. Elle pourrait être liée à l'effet négatif, précédemment constaté, des genres *Woronichinia*, *Aphanizomenon* et *Coelosphaerium* sur la concentration en MC.

4.2.2. Relation entre abondance des cyanobactéries et concentration en microcystines

La figure IV-5 a été construite à partir de 946 résultats de prélèvement comportant un résultat sur l'abondance des CC et un résultat de dosage des MC. Aucune relation bijective et par conséquent prédictive entre l'abondance des CC et la concentration en MC n'est observable : un niveau d'abondance des CC n'engendre pas un niveau défini de concentration en MC, mais une borne supérieure (ligne continue) de concentration en MC peut néanmoins être définie (mise à part deux points *outliers*). Des bornes supérieures correspondant à différents niveaux de confiance peuvent également être estimées : la ligne en pointillé correspond au quantile 95 % (pour une abondance cellulaire donnée, on a 95 % de chance que la concentration en MC soit inférieure à cette valeur) ; la ligne en tiret-point correspond au quantile 90 %.

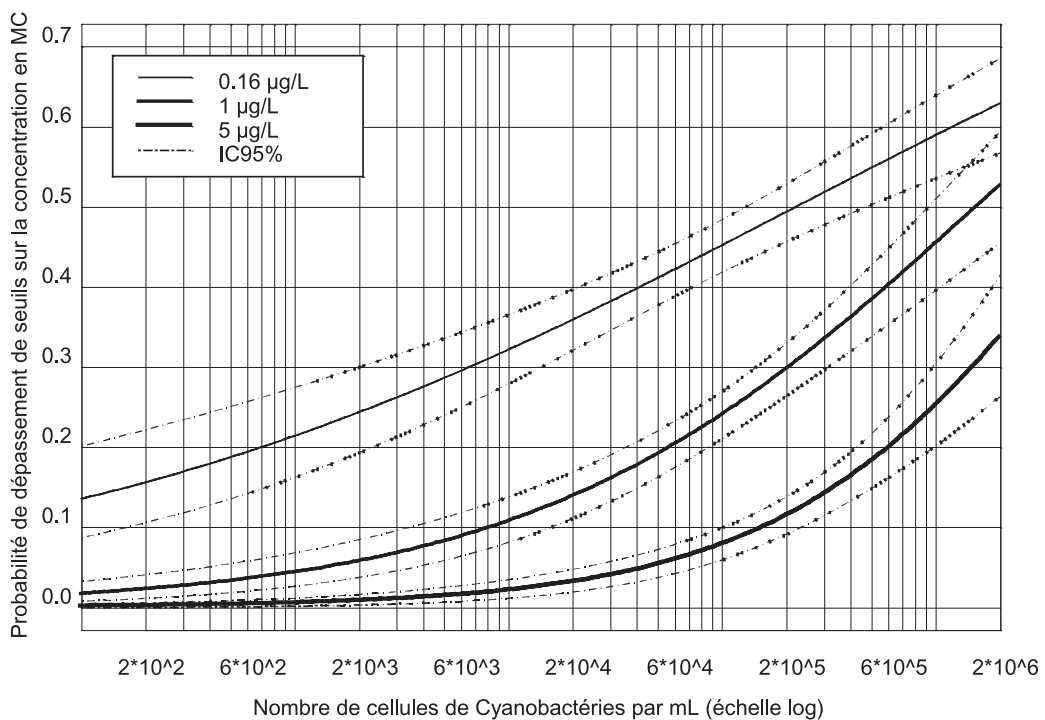
(27) Variable qui vaut 1 lorsque le genre est identifié dans un prélèvement et 0 dans le cas contraire.

Figure IV-5 : Relation entre le nombre de cellules de cyanobactéries et la concentration en microcystines sur 946 résultats de prélèvements [résultats bruts].



S'il n'existe pas de relation bijective entre abondance en CC et concentration en MC, il existe néanmoins une relation en terme de probabilité (figure IV-6) : plus le nombre de cellules de cyanobactéries augmente, plus la probabilité de détecter des microcystines et de mesurer de fortes concentrations est importante.

Figure IV-6 : Relation entre le nombre de cellules de cyanobactéries et la probabilité de dépassement d'un seuil sur la concentration en microcystines, élaborée à partir de 946 résultats de prélèvements par régression logistique (IC95 % = intervalle de confiance à 95 %).



Sur la figure IV-6, à 1 000 CC par mL, la probabilité de détecter des MC (*i.e.* d'avoir une valeur supérieure à 0,16 µg.L⁻¹) est supérieure à 20 % ; la probabilité que la concentration en MC dépasse 1 µg.L⁻¹ est inférieure à 4 % et celle que la concentration en MC dépasse 5 µg.L⁻¹ est pratiquement nulle. En revanche, à partir de 10 000 CC par mL, les probabilités de dépassement des valeurs de 0,16 µg.L⁻¹, 1 µg.L⁻¹ et 5 µg.L⁻¹ sont respectivement de l'ordre de 33 %, 10 % et 2 %... À partir de 100 000 CC.mL⁻¹, elles sont respectivement de l'ordre de 45 %, 25 % et 8 %.

Il faut noter qu'aucun cofacteur n'a été pris en compte dans la relation entre nombre de cellules de cyanobactéries et concentration en microcystines établie précédemment (voir discussion ci-dessous).

4.2.3. Discussion à propos de la relation entre abondance des CC et concentration en MC

La relation précédemment présentée entre abondance cellulaire et probabilité d'observer un certain niveau de concentration en MC doit être relativisée. Une analyse fondée sur 938 résultats de prélèvement, prenant en compte les cofacteurs tels que l'usage de l'eau, la saison, l'année de prélèvement, la méthode analytique de mesure des microcystines ainsi que le site de prélèvement, a été menée. La méthodologie employée est la même que celle précédemment utilisée pour le nombre de cellules de cyanobactéries (chapitre IV.3).

Il ressort de cette analyse que les paramètres : mois, année, méthode analytique et dans une moindre mesure usage ont une influence significative sur la relation entre abondance cellulaire et concentration en microcystines, que ce soit au travers de la probabilité de détection des MC (probabilité de dépassement de la valeur de 0,16 µg.L⁻¹) ou de la probabilité de dépassement de la valeur de 1 µg.L⁻¹. L'influence de ces paramètres reste identique, qu'un effet lié aux sites de prélèvement soit pris en compte ou non. La régression est plus explicative sur la probabilité de dépassement de la valeur de 1 µg.L⁻¹ de MC (coefficient de détermination de 0,48) que sur la probabilité de détection des MC (coefficient de 0,38). L'échantillon n'est pas correctement équilibré suivant les différents paramètres utilisés : en particulier, la méthode ELISA a été très peu utilisée pour les prélèvements BLB et BLAN. Néanmoins, si seuls les résultats issus de la méthode analytique CLHP sont exploités, des résultats similaires sont observés quant à l'influence des paramètres mois, année et usage.

L'effet site de prélèvement reste prépondérant comme dans toutes les analyses effectuées sur les résultats de dénombrement cellulaire.

La méthode analytique a une influence supérieure à celle des paramètres mois, année et usage sur la probabilité de détection des MC. En revanche, sur la probabilité de dépassement de la valeur de 1 µg.L⁻¹, les trois paramètres méthode analytique, mois et année ont une influence similaire, et supérieure à celle du paramètre usage.

La méthode d'analyse ELISA conduit à des niveaux de concentration en MC supérieurs à ceux de la méthode CLHP : à nombre de CC identique, l'écart entre les deux méthodes est de 36 unités de pourcent en moyenne sur la probabilité de détection des microcystines (probabilité de dépassement de la valeur de 0,16 µg.L⁻¹) et de 25 unités de pourcent sur la probabilité de dépassement du seuil de 1 µg.L⁻¹. Bien que théoriquement corrigé au sein de la base, ceci pourrait provenir de différences de seuil de détection entre les deux méthodes.

À abondance en cellules de cyanobactéries équivalente, l'année 2002 a conduit à des niveaux de concentration en MC supérieurs à l'année 2004, l'année 2003 ayant atteint des niveaux intermédiaires. L'écart entre les deux années 2002 et 2004 est en moyenne de 17 unités de pourcent sur la probabilité de détection des microcystines et de 23 unités de pourcent sur la probabilité de dépassement de la valeur de 1 µg.L⁻¹.

À nombre de CC identique, les prélèvements effectués en eaux AEP et BLB admettraient des niveaux en MC inférieurs à ceux des prélèvements effectués en eau BLAN. Les écarts estimés sont en moyenne de 12 unités de pourcent sur la probabilité de détection des MC comme sur la probabilité de dépasser la valeur de 1 µg.L⁻¹.

Indépendamment du nombre de CC, le paramètre saison a également une influence significative sur la concentration en MC. Il ressort systématiquement des analyses qu'à nombre de CC équivalent, la concentration en MC est significativement plus élevée en juillet et plus basse au mois de juin. L'écart moyen entre ces deux mois est de 16 unités de pourcent sur la probabilité de détection des microcystines et de 20 unités de pourcent sur la probabilité de dépassement de la valeur de 1 µg.L⁻¹. Le mois de juillet apparaît alors comme le mois avec le plus fort risque de détection de MC et de dépassement de la valeur de 1 µg.L⁻¹, alors même que ce n'est pas le mois de plus forte abondance cellulaire. Le mois de septembre ressort également comme ayant, à abondance équivalente, une probabilité de dépassement de la valeur de 1 µg.L⁻¹ significativement plus élevée.

Les données du mois de juillet pour les MC proviennent majoritairement de l'année 2002, année pour laquelle est également observé un pic sur le nombre de cellules de cyanobactéries au mois de juillet avec des valeurs d'abondance très élevées (figure IV-1). Les résultats précédents ne peuvent probablement pas être généralisés pour toutes les années. Le risque d'apparition de fortes concentrations en MC sera considéré comme plus important de juillet à septembre inclus.

5. Résultats en eaux traitées

5.1. Dénombrement cellulaire

Le nombre de prélèvements en eaux traitées avec résultat de dénombrement algal est très faible (102) ; qui plus est, sa répartition suivant les années est très déséquilibrée : une donnée pour l'année 2002, 38 pour 2003 et 63 pour 2004.

Le pourcentage de présence des CC dans les prélèvements eaux traitées est de 36 % sur les 102 résultats ; il est donc significativement inférieur à celui des eaux brutes qui est de 76 %. Quand la présence de cellules est relevée, l'abondance en moyenne géométrique est de 100 CC.mL⁻¹ et 75 % des résultats positifs sont inférieurs à 500. Malheureusement, rien ne permet pour l'instant d'évaluer la représentativité de ces statistiques.

Pour 88 des 102 prélèvements effectués en eaux traitées, un résultat de prélèvement sur eau brute correspondant (même lieu de prélèvement, même date) est disponible, rendant possible l'analyse de la relation entre les résultats de dénombrement en eau brute et ceux en eau traitée correspondant. Signalons néanmoins que le délai de transit de l'eau au sein de l'usine de traitement (avec prise en compte ou non de la bêche de stockage) peut être plus ou moins long et différent d'une usine à l'autre⁽²⁸⁾ ; de ce fait, l'eau du prélèvement eau brute n'est pas directement celle du prélèvement eau traitée correspondant.

Le pourcentage de présence des cellules de cyanobactéries ainsi que l'abondance des CC sont plus faibles sur les prélèvements eaux brutes conjoints aux prélèvements eaux traitées que sur l'ensemble des prélèvements effectués sur les eaux brutes AEP disponibles dans la base de données. Les prélèvements eaux traitées disponibles n'ont donc pas été effectués *a priori* lorsqu'une prolifération de cyanobactéries était soupçonnée dans les eaux brutes.

Sur 26 des 88 prélèvements doubles (eau brute/eau traitée), le résultat de dénombrement est nul sur l'eau brute ; pour 6 de ces 26 cas, la présence de cellules de cyanobactéries est néanmoins observée dans le prélèvement en eau traitée correspondant, sans que le résultat du dénombrement ne soit d'ailleurs fourni.

Sur les 88-26 = 62 cas associés à une présence de cellules de cyanobactéries en eau brute, seuls 23 admettent un résultat en eau traitée positif. Autrement dit, dans 37 % des cas, les cyanobactéries présentes dans les eaux brutes le sont également dans les eaux traitées.

La moyenne géométrique de l'abondance en eau brute est de 3 000 CC.mL⁻¹ environ lorsqu'il n'y a pas eu de détection dans l'eau traitée, et de 8 000 CC.mL⁻¹ environ dans le cas contraire. Cette différence est statistiquement significative⁽²⁹⁾. Autrement dit, le niveau d'abondance dans l'eau brute pourrait déterminer la probabilité de détecter des cyanobactéries dans les eaux traitées : plus il y a de cyanobactéries dans l'eau brute, plus il y a de chance d'en retrouver dans l'eau traitée.

Le ratio entre nombre de CC en eau brute et en eau traitée est en moyenne important : le niveau d'abondance moyenne passe de 8 000 CC.mL⁻¹ en eau brute à 40 CC.mL⁻¹ en eau traitée, ce qui correspond à un ratio moyen (moyenne géométrique) de 200 environ entre le nombre de cellules en eau brute et celui en eau traitée. Néanmoins, ce ratio est très variable d'un prélèvement à l'autre : il est compris entre 4 et 20 000 sur 23 valeurs. Son interprétation par rapport à l'efficacité du traitement est délicate du fait du temps de transit de l'eau au sein de l'usine.

5.2. Dosage des microcystines

Dans la base de données, 226 résultats de dosage des microcystines en eau traitée sont disponibles. La distribution de ces résultats se trouve dans le tableau IV-XII. Malheureusement, aucune information ne permet d'évaluer la représentativité de cet échantillon de mesures de microcystines en eau traitée.

(28) Des problèmes de discontinuité dans le pompage de l'eau brute peuvent également apparaître.

(29) $p < 0,05$ par un student t test avec l'hypothèse d'équivalence ou non.

Tableau IV-XII : Distribution des valeurs de concentration en microcystines dans les eaux traitées.

AEP Eaux traitées		
Valeurs de microcystines	Nombre de Données	Pourcentage du total
ND (ou <0,16 µg.L-1)	200	88 %
0,16=< <0,2	15	7,0 %
0,2=< <0,3	9	4,0 %
0,3	1	0,4 %
1,9	1	0,4 %
Total détecté	26	12 %
Total	226	100 %

Sur les 226 prélèvements effectués sur eaux traitées avec dosage des microcystines, 150 sont associés à un prélèvement sur eau brute correspondant avec également un dosage des microcystines (même lieu, même date).

Dans un cas, des microcystines ont été détectées dans l'eau traitée, alors qu'elles ne l'ont pas été dans l'eau brute correspondante (erreur ? différence dans les seuils de détection ? influence du décanteur à boue ? temps de transit ?). Sur 74 cas où des microcystines sont détectées dans l'eau brute, seuls 20 (27 %) sont associés à une détection positive dans l'eau traitée. Paradoxalement, le niveau de microcystines dans les eaux brutes qui conduit à une détection de MC dans les eaux traitées serait inférieur au cas où il n'y a pas de détection en eau traitée.

Le ratio entre concentration en microcystines eau brute/eau traitée est compris entre 0,56 (dans ce cas, la concentration en eau traitée est *a priori* supérieure à celle de l'eau brute) et 14,6 ; il est de 1,6 en moyenne géométrique et de 2,6 en moyenne arithmétique, sur 20 valeurs au-dessus du seuil de quantification. Il apparaît donc relativement faible par rapport à celui constaté précédemment sur le nombre de cellules de cyanobactéries.

6. Conclusions

Les données recueillies – soit 4 273 résultats de dénombrement des cellules de cyanobactéries [CC] et/ou de dosage des microcystines [MC] sur les années 2002-2004, provenant de 442 communes – sont issues majoritairement de plans de surveillance sanitaire des eaux de surface en France métropolitaine concernant des sites d'adduction d'eau publique [AEP], des baignades surveillées [BLB] ou d'autres sites associés à différentes activités nautiques [BLAN]. La base de données mise en place à partir de ces données ne résulte donc pas comme dans l'étude Grand Ouest (DGS *et al.* 2004), par exemple, d'un plan d'expérience élaboré de manière prospective et homogène. En revanche :

1. le nombre de données dans cette base est bien supérieur à celui de l'étude Grand Ouest (DGS *et al.* 2004)⁽³⁰⁾, qui portait sur 350 résultats de prélèvements environ et 26 sites ;
2. la couverture géographique est plus importante, même si la majorité des données proviennent des régions Bretagne, Pays de la Loire, Basse Normandie, Limousin et Poitou-Charentes et qu'il n'y a pas de données pour tout l'est de la France.

La base de données mise en place présente des déséquilibres et des biais certains : le nombre de données disponibles est plus important sur la période de l'année et sur les sites où la prolifération des CC est plus importante, témoignant de l'origine des données présentes dans la base (plans de surveillance). En revanche les prélèvements sont effectués essentiellement le lundi et le mardi et ce de manière plus ou moins régulière suivant les sites et la saison. Ils ne sont donc pas effectués spécifiquement au moment où un développement de CC est soupçonné. Par ailleurs, il n'y a pas de suivi pluriannuel des prélèvements sur les sites pour la période considérée.

Une approche de modélisation fondée sur la régression linéaire généralisée avec prise en compte d'effets liés aux sites de prélèvement a été employée afin de pallier ces inconvénients – autrement dit, pour tenter de donner le même poids à chaque site et à chaque mois – et de présenter une image la plus « représentative possible »

(30) La base de données mise en place comprend les données de l'étude Grand Ouest.

du phénomène de prolifération des cyanobactéries et de production des microcystines. Les principaux résultats prédits à partir de ces analyses sont présentés ci-dessous. Les sites de prélèvement pour lesquels des données sont disponibles étant localisés essentiellement dans l'ouest et le centre de la France, ils ne sont pas nécessairement représentatifs de l'ensemble des milieux aquatiques continentaux métropolitains. L'extrapolation des résultats statistiques à l'ensemble du territoire métropolitain reste délicate : faut-il considérer que là où il n'y a pas de données, il n'y a pas de problème de prolifération de cyanobactéries ou bien au contraire généraliser les résultats statistiques obtenus à l'ensemble des régions ?

La présence de CC est attestée dans la majorité (329/427=77 %) des sites de prélèvement pour lesquels des données en eaux brutes sont disponibles au sein de la base. La probabilité de présence des cyanobactéries est maximale en septembre-octobre et minimale pendant les mois d'hiver ; elle est en moyenne, sur l'ensemble des sites de prélèvement, estimée entre 50 % en hiver et 85 % aux mois de septembre-octobre. Elle est plus faible pour les prélèvements effectués en eaux brutes AEP que pour les prélèvements en eaux BLB ou BLAN. Ceci semble indépendant du type de zone aquatique considéré (rivière, étang, lac...) et doit être principalement lié à la zone et à la profondeur du prélèvement, qui diffèrent entre AEP, et BLB ou BLAN : les CC sont plus présentes en bordure et en surface des zones aquatiques.

Lorsque les cyanobactéries sont présentes, leur abondance moyenne⁽³¹⁾ mensuelle est inférieure à 3 000 CC.mL⁻¹ en hiver et à 50 000 CC.mL⁻¹ au mois de septembre (mois de plus forte abondance) pour 75 % des sites (245 sur 327). Près de 5 % des sites (une vingtaine sur 327) admettent par contre de très fortes valeurs d'abondance moyenne (entre 300 000 et 2 millions de CC par mL).

Le risque de dépassement de 100 000 CC.mL⁻¹ est plus faible dans les prélèvements en eaux brutes AEP que dans les prélèvements en eaux BLB et BLAN ; il est dans tous les cas maximal au mois de septembre et minimal pendant les mois d'hiver. Le risque moyen de dépasser 100 000 CC.mL⁻¹ est compris entre 1 % et 12 % suivant la saison pour les sites AEP (89 sites), et entre 3 % et 25 % environ pour les sites BLB (231) et BLAN (97). Ces valeurs moyennes masquent une variabilité en fait très importante d'un site à l'autre : ce risque apparaît assez limité sur la grande majorité de sites AEP, mais important pour un quart des sites BLB ou BLAN, regroupés en partie dans certains départements en Bretagne et Pays de la Loire, dans le Cher, l'Indre, la Vienne et la Creuse. Connaître la typologie des zones aquatiques serait particulièrement important afin de comprendre ce phénomène.

La présence d'espèces de cyanobactéries potentiellement toxiques est difficile à évaluer car l'identification taxonomique s'arrête au genre pour la plupart des prélèvements. Ont donc été considérés comme potentiellement toxiques tous genres comprenant au moins une espèce potentiellement toxique. Sous cette hypothèse, la quasi-totalité des résultats de prélèvements comporterait au moins un genre potentiellement toxique. Néanmoins, cette hypothèse surévalue *a priori* le danger, car toutes les espèces d'un genre considéré comme potentiellement toxique ne le sont pas nécessairement. Les genres majoritairement retrouvés dans les prélèvements sont : *Planktothrix* identifié dans 46 % des prélèvements et sur 65 % des sites (sur 214), *Microcystis* dans 43 % des prélèvements et 75 % des sites, *Aphanizomenon* respectivement dans 40 % et 64 %, *Anabaena* dans 34 % et 54 %, et *Woronichinia* dans 23 % et 32 %, les autres genres ayant un pourcentage de présence inférieur à 10 %. Ces genres, tous considérés comme potentiellement toxiques, sont également ceux qui ont majoritairement été observés dans l'étude Grand Ouest. *Planktothrix* admet un niveau d'abondance très supérieur aux autres genres quelle que soit la période de l'année.

Le sous-échantillon des prélèvements avec dosage des microcystines apparaît clairement biaisé par rapport à l'échantillon total des prélèvements vis-à-vis de l'abondance des cellules de cyanobactéries : les dosages de microcystines sont effectués lorsque l'abondance est importante en particulier dans les eaux BLB et BLAN.

La détection⁽³²⁾ et la concentration en microcystines ont pu être reliées de manière positive et significative à la présence et/ou à l'abondance des genres *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* et *Aphanocapsa* (dans l'ordre d'influence), et de manière générale au nombre total de cellules de cyanobactéries. Cette relation dépend de la méthode analytique de dosage des microcystines (CLHP ou ELISA), de l'usage de l'eau dans laquelle le prélèvement a été effectué (AEP, BLB et BLAN), du mois de l'année et même du site de prélèvement. La probabilité de détecter des microcystines et d'avoir des concentrations importantes est maximale du mois de juillet au mois de septembre inclus.

(31) Il s'agit de la moyenne géométrique, qui est utilisée lorsqu'un échantillon présente une loi de probabilité de type lognormale (distribution dissymétrique caractérisée par la présence importante de faibles valeurs et l'existence de fortes valeurs en faible effectif). Elle est équivalente dans ce cas à la médiane de l'échantillon, autrement dit à la valeur qui sépare les 50 % plus faibles valeurs des 50 % plus fortes.

(32) Afin d'homogénéiser les seuils de détection et de quantification liés aux différentes méthodes analytiques et aux différents laboratoires, toute valeur indiquée comme telle dans le rapport d'analyse ou inférieure à 0,16 µg.L⁻¹ a été considérée comme non-détectée (ND). La limite de détection et de quantification des microcystines pour la base de données est donc égale à 0,16 µg.L⁻¹.

Aucune relation exploitable en gestion entre teneur en chlorophylle *a* et nombre de CC n'est ressortie d'une analyse effectuée sur 1 585 résultats de prélèvements avec dénombrement cellulaire et mesure de la chlorophylle *a*. La probabilité d'observer une forte valeur d'abondance de CC augmente bien de manière significative avec la teneur en chlorophylle *a*, mais il s'agit bien d'une relation probabiliste et non déterministe. Qui plus est, il n'y a pas de seuil exploitable sur les teneurs en chlorophylle *a* en dessous duquel le nombre de CC observé reste faible : dès 10 µg.L⁻¹ de chlorophylle *a* – ce qui est une faible valeur –, la probabilité d'observer plus de 20 000 CC.mL⁻¹ est déjà de 20 % et celle d'observer plus de 100 000 CC.mL⁻¹ de 6 %. À partir de 25 µg.L⁻¹ de chlorophylle *a*, les probabilités d'observer plus de 20 000 et plus de 100 000 CC.mL⁻¹ sont respectivement de 38 % et 15 %. La prise en compte du pourcentage que les cyanobactéries représentent par rapport au total algal dans les relations entre chlorophylle *a* et risques de dépassement des valeurs de 20 000 et 100 000 CC.mL⁻¹ améliore de manière significative le caractère prédictif de ces relations probabilistes.

Environ 300 prélèvements parmi les 4 273 de l'échantillon total ont été effectués en eaux traitées (sortie d'usine). L'analyse des résultats de ces prélèvements a montré :

- la présence de CC dans 36 % (37/102) des résultats de prélèvements, avec un niveau d'abondance inférieur à 500 CC.mL⁻¹ la plupart du temps ;
- la détection (valeurs supérieures à 0,16 µg.L⁻¹) de MC dans 12 % (26/226) des prélèvements, avec des concentrations inférieures à 0,3 µg.L⁻¹ sauf dans un cas ;
- un ratio moyen entre l'eau brute et l'eau traitée important sur le nombre de cellules de cyanobactéries (200 en moyenne), mais faible sur les concentrations en MC (entre 1 et 2).
- le fait que les prélèvements en eaux traitées ne semblent pas avoir été effectués spécialement lorsqu'une prolifération de cyanobactéries était soupçonnée en eau brute.

Rien ne permet d'évaluer pour l'instant la représentativité de ces résultats.

Cette étude avait pour objectif d'effectuer un état des lieux sur la contamination des zones aquatiques continentales par les cyanobactéries et les microcystines, état des lieux le plus « représentatif possible » compte tenu des biais importants que comporte l'échantillon de données mis en place. Elle n'a pas eu pour objectif d'expliquer la présence ou l'abondance des cellules de cyanobactéries en fonction de déterminants physiques, chimiques, biologiques ou météorologiques, en particulier parce que ces informations n'étaient pas disponibles. L'étude Grand Ouest en revanche avait montré l'influence :

1. de certaines caractéristiques liées à la zone aquatique sur la contamination en cyanobactéries (profondeur et ancienneté par exemple) ;
2. de la météorologie sur le phénomène de prolifération à court terme.

Une étude à plus grande échelle : (1) sur les typologies des zones aquatiques et (2) sur l'influence de la météorologie serait particulièrement pertinente.

Points à retenir

- Une absence de données pour tout l'est de la France est à déplorer dans la base constituée et analysée. La majorité des données provient de l'ouest et du centre de la France.
- La présence de cellules de cyanobactéries est attestée dans la majorité des sites pour lesquels des résultats de prélèvements sont disponibles. Sur certains sites, la présence de cyanobactéries est attestée toute l'année.
- Les prélèvements effectués sur des sites de baignade ou sur des sites liés à des activités nautiques admettent des probabilités de présence de cyanobactéries et des risques de dépassement de la valeur de 100 000 cellules de cyanobactéries par mL supérieures à ceux effectués dans des eaux destinées à la production d'eau potable. Ce phénomène indépendant du type de la zone aquatique considérée : rivière, lac, étang..., est probablement lié à la profondeur et à la zone de prélèvement au sein du milieu aquatique, deux paramètres qui diffèrent suivant l'usage de l'eau (effets de surface et de bord dans la prolifération des cyanobactéries).
- Les très fortes valeurs d'abondance sont le fait d'une minorité de sites regroupés dans certains départements, ceux d'ailleurs pour lesquels il y a le plus de données. Une analyse fine de la typologie de ces sites serait particulièrement intéressante.
- Aucune relation prédictive déterministe entre nombre de cellules de cyanobactéries et concentration en microcystines n'a pu être observée ; seule une relation probabiliste a pu être établie et quantifiée : plus le nombre de cellules est important, plus la probabilité d'observer de fortes valeurs de microcystines est élevée. Cette relation dépend malheureusement de nombreux cofacteurs : genre des cyanobactéries présentes, méthode de dosage des microcystines, période de l'année, année, voire site de prélèvement.
- La probabilité de présence des cyanobactéries est maximale en septembre-octobre ; les plus fortes valeurs d'abondance apparaissent en août-septembre et les plus fortes concentrations en microcystines entre juillet et septembre, mais des variations interannuelles significatives sont observées. L'étude Grand Ouest avait montré à court terme une influence significative de la météorologie sur le phénomène de prolifération des cyanobactéries.
- Aucune relation prédictive déterministe, exploitable en gestion des risques, entre nombre de cellules de cyanobactéries et teneur en chlorophylle *a* n'a pu être observée ; seule une relation probabiliste a pu être établie et quantifiée. La prise en compte du pourcentage que les cellules de cyanobactéries représentent par rapport au total algal améliore la relation précédente : la probabilité d'observer de grandes quantités de cyanobactéries peut être exprimée comme une fonction croissante de la teneur en chlorophylle *a* et de la part relative des cyanobactéries par rapport au total algal.
- Des cellules de cyanobactéries et des microcystines ont été retrouvées dans des prélèvements effectués en eaux traitées. L'abatement eau brute/eau traitée est plus important sur le nombre de cellules de cyanobactéries que sur les concentrations en microcystines.

V. Modalités de maîtrise des dangers

1. Prévention et maîtrise de la croissance des cyanobactéries

Les proliférations de cyanobactéries sont souvent liées à l'état d'eutrophisation des plans et des cours d'eau ce qui implique d'agir sur le statut trophique et le régime hydrologique. La connaissance de l'état et de l'évolution des paramètres caractéristiques de l'état trophique des ressources et de leurs bassins versants est un préalable indispensable à toute action. Il ne saurait se concevoir d'action curative sans mise en œuvre, si nécessaire, d'une réduction des apports en azote et phosphore au sein des ressources.

1.1. Actions sur le statut trophique

Les nutriments importants pour la croissance des cyanobactéries sont l'azote, le phosphore et le carbone.

Le phosphore minéral joue un rôle majeur car les cellules possèdent une compétence de stockage de ce nutriment qui peut être utilisé pour 3 à 4 divisions. Dans les écosystèmes naturels, 1 µg de phosphore peut permettre le développement d'une biomasse atteignant 100 µg de matière organique correspondant approximativement à 1 µg de chlorophylle *a*. Le ratio moléculaire N/P est optimal à 16 mole.mole⁻¹ pour la croissance de presque tous les taxons phytoplanctoniques. Dans des conditions de saturation des nutriments, les populations de *Microcystis* ont des ratios N/P plus élevés proches de 24 (Chorus 2001). D'autre part, les cyanobactéries formant des colonies contiennent plus de phosphore (≈ 0,13 µmole.mm⁻³) que les cellules isolées (≈ 0,07 µmole.mm⁻³).

Le rapport N/P ne semble donc pas être le bon, ou le seul, critère pour définir le risque de prolifération de cyanobactéries.

La concentration en phosphore pourrait, pour certains genres, être un paramètre prédictif. Xie *et al.* (2003) ont montré que le faible rapport N/P n'était pas la cause du développement de *Microcystis* mais en était le résultat et que la concentration en phosphore était la clé de régulation des cyanobactéries ne fixant pas l'azote, tel *Microcystis aeruginosa*. Chorus & Bartram (1999) citent l'exemple d'une ressource avec une concentration en phosphore total de 600 µg.L⁻¹ et des densités de cyanobactéries élevées correspondant à 200 µg.L⁻¹ de chlorophylle *a*.

Dans les lacs, la limitation des proliférations de cyanobactéries passe par la réduction drastique des concentrations en phosphore, la valeur seuil à atteindre dépendant de la profondeur. Kennedy & Cook (1982) ont montré qu'il fallait atteindre des concentrations de 30 à 50 µg.L⁻¹ de phosphore biodisponible (orthophosphate, polyphosphate et phosphore organique dans l'eau). Ces concentrations sont généralement citées pour les lacs mésotrophes de plaines mais dans les lacs mésotrophes alpins et nordiques, sujets à stratification, le seuil à ne pas dépasser est plus faible de l'ordre de 10 à 20 µg.L⁻¹ (Chorus & Bartram 1999).

L'eutrophisation est le plus souvent augmentée par les apports de phosphore provenant des activités anthropiques (eaux usées : métabolisme humain et animal, lessives, ruissellement, érosion et lessivage des sols, déforestation).

1.1.1. Limitation des apports de nutriments et en particulier du phosphore

1.1.1.1. Apport diffus

Les codes de bonnes pratiques et les programmes d'action initiés par la « Directive nitrates » (91/CEE/271) apportent certaines protections vis-à-vis des fuites de phosphore (limitation des épandages de déjections animales, couverture hivernale des sols, bandes enherbées). Le phosphore étant retenu dans les sols par le complexe argilo-humique, contrairement à l'azote, c'est dans les zones où des épandages répétés d'amendements phosphorés ou de déjections animales et humaines ont saturé les sols qu'il conviendrait, en application de la directive 76/464/CEE (substances dangereuses) et de la directive 2000/80/UE (directive cadre sur l'eau), de mettre en œuvre des programmes de lutte contre l'érosion et d'actions spécifiques axées sur le phosphore. Ces mesures s'ajouteraient efficacement à celles relatives aux rejets ponctuels d'eaux usées (interdiction des lessives avec phosphates, déphosphatation sur stations d'épuration importantes, amélioration de l'assainissement non collectif) ou aux effluents d'élevage (PMPOA), pour une nécessaire diminution des flux de phosphore vers les plans d'eau et rivières lentes sensibles aux proliférations de cyanobactéries.

Des techniques de piégeage du phosphore par des pré-retenues en amont des plans d'eau permettent de protéger le plan d'eau final. Un exemple donné par Chorus & Bartram (1999) est celui du lac Kis Balaton en Hongrie qui est un réservoir d'une surface d'environ 60 km² qui retient les apports de phosphore et protège le lac Balaton 10 fois plus grand. Il est montré que l'impact de la réduction de la charge en phosphate sur le développement des algues n'est pas directement visible en raison d'un équilibre chimique qui tend à recharger la colonne d'eau en phosphore par celui contenu dans les sédiments. S'y trouvant piégé sous certaines formes de phosphore biogénique ou lié aux éléments minéraux tels que Fe, Mn, Ca, il redevient disponible pour la biomasse en raison des conditions anoxiques du milieu. Ce nouvel équilibre est fonction dans le temps de la profondeur du plan d'eau. Le phosphore peut être ainsi recyclé plusieurs fois dans l'année. L'activité des vers de vase, les remises en suspension par la navigation ou le vent, pour les rivières ou plans d'eau peu profonds, peuvent aussi favoriser ces relargages.

Dans tous les cas, après réduction et/ou suppression des apports polluants, le retour à un état d'équilibre peut prendre beaucoup de temps (Lafforgue 1998). Il a été estimé que, dans les eaux superficielles, la durée nécessaire pour atteindre 90 % de diminution théorique de la concentration est égale à 3 fois le temps de séjour moyen de l'eau. Une diminution importante des apports de N et P dans des lacs de Norvège a induit une période de transition de 10 ans pendant laquelle l'eutrophisation et les développements d'algues vertes ont fortement chuté alors qu'en parallèle un genre de cyanobactérie avait colonisé ces ressources en utilisant la charge interne en P (Solheim 2002). Le même phénomène a été observé dans le lac du Bourget où une cyanobactérie toxique, *Planktothrix rubescens*, prolifère depuis quelques années alors que les concentrations en phosphore ont diminué de 120 à 30 µg.L⁻¹ dans le lac depuis les années 1980 (Jacquet *et al.* 2005).

1.1.1.2. Apports directs

Dans l'ensemble, les apports directs par les eaux usées représentent la majeure partie des charges en phosphore. Selon les habitudes alimentaires et l'utilisation de produits ménagers, l'apport journalier par personne se situe dans une fourchette de 1,8 à 4 g.j⁻¹ de P, dont 1 g au moins est en relation avec le métabolisme humain et donc incompressible. La part maîtrisable à la source est représentée par les polyphosphates des détergents ménagers pour le lavage du linge et de la vaisselle. Les réglementations, l'évolution du marché et dans certains pays l'interdiction pure et simple des polyphosphates dans les lessives ont permis de diminuer de manière sensible l'apport journalier individuel. Par exemple, en France, en l'absence de réglementation contraignante, la part des lessives dans les apports ménagers de phosphore a chuté de 30 % entre 1990 et 1996, portant son pourcentage de contribution à 27 % de la charge urbaine totale (Lavoux & Rechatin 1998). Les produits de remplacement employés dans les lessives ne doivent pas à leur tour poser d'autres types de problèmes.

Malgré la diminution des apports à la source, le phosphore est le moins bien éliminé des polluants urbains. L'élimination moyenne au plan national du P dans les stations d'épuration publiques de plus de 10 000 équivalents habitants est estimée à 42 %, contre 46 % pour l'azote réduit et 88 % pour la DBO (Juin 2002). Il n'existe pas de source complète donnant la quantité de phosphore, toutes origines confondues, effectivement émise dans l'environnement aquatique en France.

Concernant les eaux usées urbaines, pour une ressource annuelle écoulée de 191 km³ en France et un objectif de 50 µg.L⁻¹, il faut au moins 83 % d'abattement du P en moyenne en comptant des apports de 2,5 g.habitant⁻¹.j⁻¹ de P et une population de 60 millions d'habitants. Cette valeur correspond environ à la suppression totale des phosphates des lessives pour le linge.

Ce résultat indicatif basé sur des hypothèses très simplificatrices donne évidemment une sous-estimation importante du taux d'abattement à atteindre localement puisqu'il ne tient pas compte des apports industriels ni agricoles ni des stocks internes aux cours d'eau et encore moins des ressources hydrologiques locales qui peuvent être inférieures à la moyenne. Un objectif plus sévère de 10 µg.L⁻¹ demande alors 96,5 % d'abattement.

Des tels rendements moyens sur un grand pays sont en pratique inatteignables par les seuls moyens de l'épuration en dehors de toute considération économique, sauf dans des bassins versants petits et très bien contrôlés.

1.1.2. Précipitation in situ du phosphore

1.1.2.1. Utilisation de sels de fer ou d'aluminium

Les produits les plus cités sont les sels de fer ou d'aluminium qui permettent de précipiter les phosphates sous forme de phosphate de fer ou d'aluminium insolubles (Cook, 1993). Une expérience citée par Lafforgue (1998) dans l'Ouest de la France à l'étang du Moulin Neuf a montré un abattement très net en phosphore après l'injection de sulfate d'aluminium sur le cours de la rivière de Pont l'Abbé en aval d'une pisciculture.

Kennedy & Cook (1982) ont utilisé ce traitement avec succès mais insistent sur la quantité d'aluminium (Al) à ajouter : la précipitation/adsorption de P diminue quand le rapport molaire Al/P diminue. Si ce rapport est de 2 à 4, elle disparaît. Dans la pratique, 1 mg d'aluminium peut potentiellement éliminer 0,3 à 0,6 mg de P par litre. Ils concluent que l'utilisation de sulfate d'aluminium est plus appropriée pour limiter le relargage de phosphore des sédiments que pour traiter la colonne d'eau. Le traitement par ces sels provoque une précipitation stable du phosphore dans les sédiments.

L'ajout d'aluminium dans des eaux à faible pouvoir tampon peut provoquer une diminution du pH. Lam *et al.* (1995b) ont montré que le traitement à l'aluminium provoquait dans l'eau une augmentation de microcystine.

Prepas *et al.* (1997) ont utilisé des sels de fer et montré qu'ils pouvaient être utilisés comme nutriments. Dans certains cas, le fer peut stimuler la croissance des cyanobactéries et des algues. De plus, contrairement à l'aluminium, le fer ne bloque pas de manière durable le phosphore et dans des conditions anoxiques qui se produisent souvent en fond de retenue, le fer ferrique est réduit en ion ferreux ce qui s'accompagne alors d'un relargage de phosphore dans la colonne d'eau. L'utilisation de sel de fer au sein même d'une retenue doit donc être accompagnée d'un suivi régulier des concentrations en oxygène dans le profil de la masse d'eau et une aération régulière de la colonne d'eau doit être pratiquée afin d'éviter la redissolution du phosphore piégé dans les sédiments.

1.1.2.2. Utilisation de chaux ou calcite

Ces composés ont été utilisés pour précipiter le phosphore présent dans la colonne d'eau mais ce phénomène est réversible, en particulier quand les couches profondes sont très pauvres en oxygène, un relargage du phosphore peut alors se produire. Ces traitements précipitent également certaines cellules phytoplanctoniques.

L'usage de chaux et de carbonate de calcium a montré son efficacité sur la maîtrise des proliférations phytoplanctoniques (Prepas *et al.* 1990, Babin *et al.* 1994, Zhang & Prepas 1996a, b, Chambers *et al.* 2001, Prepas *et al.* 2001b, Zhang *et al.* 2001a), notamment en limitant le phosphore disponible. Des résultats tout à fait opposés ont été cependant constatés par d'autres auteurs (Reedyk *et al.* 2001).

D'après Prepas *et al.* (2001b) la chaux provoque une saturation de la colonne d'eau en Ca^{++} qui produit alors une précipitation de phosphore sous forme d'hydroxy-apatite qui, une fois dans les sédiments, continue à adsorber le phosphore.

En été, à température élevée, il se produit une précipitation naturelle de CaCO_3 et un piégeage naturel de phosphore. La chaux provoque également une floculation du phytoplancton (Zhang *et al.* 2001a). Ces mêmes auteurs ont constaté un changement important immédiatement (< 20 jours) après une seule application de la chaux dans un lac (eau dure) avec une augmentation de la biomasse des cyanobactéries et un changement dans la composition de la communauté phytoplanctonique. Prepas *et al.* (2001b) ont observé qu'après un seul traitement à la chaux (dose de 74 à 107 mg.L^{-1}), le phosphore de la colonne d'eau n'était pas considérablement réduit mais un abatement important de la chlorophylle *a* était observé ainsi qu'un changement dans la composition des communautés microbiennes photosynthétiques. Par contre, pour des applications répétées annuelles de chaux durant 4 ans à des concentrations comprises entre 5 et 78 mg.L^{-1} , une diminution importante (90 %) de la concentration en phosphore est observée. Prepas *et al.* (2001a) ont montré une efficacité de réduction du phosphore mais avec une réponse limitée dans le temps : le traitement à la chaux doit être répété régulièrement. Prepas *et al.* (2001a, 2001b) et Zhang *et al.* (2001a) concluent que des traitements multiples sont nécessaires pour le contrôle de la biomasse. Ainsi la croissance des cyanobactéries paraît mieux limitée par ces traitements que celle d'autres microalgues telles que les chlorophycées.

Kenefick *et al.* (1993) ont montré que le traitement à la chaux réduisait les concentrations en chlorophylle *a* pendant les deux années qui suivaient le traitement.

La durée de l'inactivation du phosphore contenu dans les sédiments diminue avec le pH et avec la concentration en phosphore de la colonne d'eau. Les expériences faites par Reedyk *et al.* (2001) sur différents lacs canadiens ont montré que la chaux était plus efficace que le carbonate de calcium. Un traitement à la chaux de 107 mg.L^{-1} conduisait à une réduction du phosphore de 85 à 92 % qui n'était apparente que le premier hiver.

Pour Prepas *et al.* (1990) et Babin *et al.* (1994) des traitements multiples sont nécessaires pour la gestion à long terme de la concentration en phosphore. Ces traitements permettent également la floculation des cellules algales et la précipitation de calcium qui réduit les concentrations de nutriments tels que le fer nécessaire à la croissance du phytoplancton.

Le traitement à la chaux contrôle la disponibilité de nutriments et n'agirait pas directement par effet toxique sur les cellules et Kennedy & Cook (1982) n'observent pas de relargage de microcystine lors de ce type de traitement.

1.1.3. Actions physiques

Le relargage du phosphore contenu dans les sédiments peut être limité par différents moyens.

1.1.3.1. Dragage des sédiments

Cette opération a plusieurs objectifs :

- supprimer les apports polluants générés par les sédiments anoxiques ;
- réduire la consommation d'oxygène à l'interface eau-sédiment afin de limiter les risques d'anoxie hypolimnique ;
- augmenter la colonne d'eau et agir sur le développement des macrophytes (de 3 à 10 m).

Le dragage peut s'avérer intéressant pour des lacs peu profonds et envasés dont la charge interne en phosphore est prépondérante. Toutefois, les conséquences sont temporairement importantes en raison de la suppression de la faune et de la flore benthiques et des frayères à poissons, pour les plans d'eau inférieurs à 3 m (Lafforgue 1998).

1.1.3.2. Oxygénation des eaux en profondeur

Cette méthode d'aération par oxygène ou par air est très critiquée et les résultats apparaissent très controversés. Elle est souvent utilisée et commercialisée avec des objectifs contradictoires (Chorus & Bartram 1999) :

- déstratifier la colonne d'eau pour empêcher la multiplication des cyanobactéries ;
- oxyder la surface des sédiments pour diminuer les teneurs en fer, manganèse et ammonium dans l'eau.

La perturbation de la colonne d'eau peut modifier la composition du peuplement phytoplanctonique en sélectionnant des genres plus adaptés à ces conditions hydrodynamiques. Elle peut également générer une distribution du phytoplancton sur toute la colonne d'eau ce qui empêche le producteur d'eau de prélever à une profondeur non colonisée.

La déstratification peut entraîner une augmentation de la température à la surface des sédiments, conduisant à une augmentation du relargage du phosphore. C'est pourquoi le brassage artificiel pour limiter le relargage de phosphore est jugé peu efficace (Hart *et al.* 2002).

1.1.4. Lutte biologique

Trois techniques ont été décrites pour agir sur la chaîne trophique :

- ajout de poissons consommateurs du phytoplancton ;
- réduction des prédateurs du zooplancton ;
- modification des communautés végétales.

Le faible nombre de résultats publiés et les retours d'expériences ne permettent pas de se prononcer sur la validité de ces procédés.

1.1.4.1. Apport de poissons consommateurs du phytoplancton

Il s'agit, en général, des carpes argentées *Hypophthalmichthys molitrix* qui consomment les cyanobactéries. Cette méthode est utilisée depuis longtemps au Maroc (Echihabi *et al.* 2001). Un exemple récent est décrit par Xie *et al.* (2003) qui ont constaté une disparition des proliférations de cyanobactéries suite à l'introduction de carpes argentées durant trois ans dans un lac sur lequel des efflorescences avaient été observées durant les quinze ans précédant l'introduction des poissons.

Les effets liés à l'introduction d'espèces non-indigènes sur l'équilibre écologique et la santé animale devraient faire l'objet d'une évaluation avant tout recours à ce moyen de contrôle. Par ailleurs, l'attention doit être portée sur les risques sanitaires pouvant résulter de la consommation des poissons servant à la lutte biologique et pouvant accumuler des toxines.

1.1.4.2. Réduction des prédateurs du zooplancton

Le principal moyen est la réduction ou la suppression des prédateurs du zooplancton par des pêches spécifiques ou par l'emploi de poissons ichtyophages comme le brochet.

Ceci a été utilisé dans des petites retenues et étangs pour des courtes périodes de temps (Hrbacek *et al.* 1998). Quand ce procédé est utilisé, l'eau devient plus claire en raison d'une diminution du phytoplancton, la population de zooplancton augmente et les macrophytes se développent, rétablissant une compétition pour les phosphates avec le phytoplancton. Ces expérimentations nécessitent de contrôler le développement des poissons en répétant régulièrement l'élimination des poissons zooplanctonophages.

Ces techniques sont cependant onéreuses et peu fiables en raison de la difficulté du maintien de la qualité du zooplancton qui est très hétérogène dans un plan d'eau. Par ces manipulations des prédateurs, certaines cyanobactéries peuvent être privilégiées notamment les formes coloniales de type *Microcystis* ou *Aphanizomenon* (Demelo *et al.* 1992).

1.1.4.3. Modification des communautés végétales

L'introduction de macrophytes a pour objectif d'induire une compétition vis-à-vis du phosphore. Cette technique peut être efficace pour des eaux peu profondes quand la concentration en phosphore n'est pas trop élevée et surtout quand les apports ne sont pas récurrents. Cette technique semble plus efficace pour lutter contre les cyanobactéries que contre les microalgues et elle a été utilisée avec succès par Carpenter (1989) et Shapiro & Wright (1984). Il faut toutefois noter que les végétaux puisent le phosphore par les racines ce qui peut réduire les concentrations dans les sédiments plutôt que dans la colonne d'eau.

Reynolds (1997) considère que la compétition macrophyte/microphyte est très faible si la concentration en phosphore est supérieure à 0,15 mg.L⁻¹.

1.2. Actions sur le régime hydrologique

L'accumulation des cyanobactéries est le résultat de leur flottabilité et des conditions hydrodynamiques. Elle reflète aussi partiellement l'état physiologique des cyanobactéries. Quand les cellules sont viables, certains genres sont capables de migrer verticalement ; les cellules s'accumulent à la surface des plans d'eau généralement lors de la nuit et sont visibles très tôt le matin pour disparaître pendant la journée. Lorsqu'elles se trouvent en situation de flotter en surface, il est possible de les évacuer d'une retenue en réalisant des surverses quand le régime hydrologique le permet, avec l'inconvénient de renvoyer la biomasse dans le cours d'eau et d'éventuelles autres retenues aval.

1.2.1. Procédés de déstratification en aération diffuse et d'aération hypolimnique

Ces procédés ont pour objectifs de créer des courants ascendants déstratifiants ou de réinjecter en profondeur de l'eau ayant été réoxygénée en surface.

Ces techniques sont présentées pour limiter la croissance des cyanobactéries mais leur effet à long terme est souvent contesté et elles ne peuvent, en tout état de cause, être envisagées que comme mesures accessoires à la réduction de nutriments.

Steinberg & Zimmermann (1998) ont montré qu'une technique de brassage intermittente qui permet de modifier régulièrement les conditions de développement du phytoplancton était efficace la première année de mise en place mais qu'à long terme l'effet était plus mitigé. Ils concluent que cette technique est utilisable pour les lacs peu profonds (11 à 12 m de profondeur) et que la déstratification permanente nécessite une profondeur minimum. Si celle-ci est faite dans un lac peu profond, une augmentation importante de la biomasse est observée la première année.

Cette méthode de brassage intermittente a également été mise en application dans le lac d'Hanningfield et a permis d'éviter le développement de prolifération spécifique de cyanobactéries (Simmons 1997). Gächter & Wehrli (1998) ont observé une amélioration de la concentration en oxygène de la colonne d'eau mais aucune efficacité sur le cycle du phosphore dans deux lacs suisses profonds (66 et 87 m de profondeur respectivement). Antenucci *et al.* (2002) ont testé différents systèmes de diffusion de l'eau et estiment que l'impact sur la population algale est limité.

Dans le barrage de Nieuwe Meer en Hollande, Visser *et al.* (1996) ont montré qu'une profondeur de plus de 20 mètres était nécessaire mais que le brassage intermittent favorise le développement de *Microcystis*.

Visser *et al.* (1996) ont montré que la croissance de *M. aeruginosa* était plus élevée dans les zones de brassage inefficace. Ceci est confirmé par Köhler (1992) dans le lac Bautzen où un maintien de la biomasse de *Microcystis* est observé malgré le mélange.

Latour-Duris *et al.* (2002) ont constaté une faible efficacité de cette méthode sur la retenue de Grangent (Loire) avec un système d'aération mis en place en trois endroits différents et à trois profondeurs. Avec une bonne homogénéité de la température et de l'oxygène dans la colonne d'eau, ils observent une faible efficacité sur les développements de cyanobactéries.

L'aération hypolimnique n'est applicable que si le lac est très profond mais n'a été utilisée avec succès que dans le lac Hodgson aux USA (Lafforgue 1998).

1.3. Traitements algicides des plans d'eau

1.3.1. Sulfate de cuivre

Parmi les traitements algicides expérimentés seul l'usage du sulfate de cuivre a été utilisé sur des ressources à un niveau significatif.

Le sulfate de cuivre est utilisé depuis très longtemps sur les plans d'eau. Son usage est signalé pour la première fois en 1880 (Sawyer 1962) en Europe, en 1904 aux USA (Moore & Kellerman 1905) et en 1940 en Australie (Burch *et al.* 1998).

La toxicité du cuivre vis-à-vis du phytoplancton est déterminée par l'activité de l'ion Cu^{2+} . Elle varie entre 0,06 et 6.10-7 mg.L⁻¹ de Cu^{2+} (Mc Knight *et al.* 1983). Son effet est réduit si le pH est élevé ainsi que dans les eaux dures. Pour favoriser sa dispersion, des chélates de cuivre ont donc été utilisés et en particulier le citrate de cuivre dans les eaux dures.

Aux États-Unis, Raman (1995) recommande l'utilisation d'un mélange de sulfate de cuivre : acide citrique dans le rapport 2:1. Les concentrations en cuivre dans l'eau traitée sont comprises entre 0,05 et 0,125 mg.L⁻¹ de Cu. Brient *et al.* (2001) préconisent une utilisation précoce de CuSO_4 à des doses de 50 à 80 mg.m⁻³ dès que le seuil de vigilance de 10 filaments par mL pour *Planktothrix agardhii* ou de 10 colonies par mL pour *M. aeruginosa* est atteint.

Brient *et al.* (2001) ont étudié l'application de sulfate de cuivre et d'acide citrique à 20 % sur trois retenues bretonnes sur des suivis à long terme avec jusqu'à 3 applications annuelles. Les cyanobactéries sont éliminées dans les 48 heures et les milieux sont à nouveau colonisés par les diatomées. Après 3 à 4 semaines, en fonction de la ressource nutritive et des conditions météorologiques, les cyanobactéries réapparaissent nécessitant un nouveau traitement au sulfate de cuivre. Cette technique est également utilisée par Van Hullebush *et al.* (2001).

Les problèmes liés à l'usage du cuivre sont nombreux et conséquents mais les données ne portent que sur la microcystine-LR :

- **Problèmes de santé publique** : l'utilisation d'algicides provoque la lyse des cyanobactéries, ce qui libère les métabolites et composés intra-cellulaires parmi lesquels se rencontrent des toxines et des composés très odorants (methy-isobornéol, géosmine...) (James & Fawell 1991). Ce relargage se produit très rapidement, dans les 3 jours qui suivent le traitement (Gupta *et al.* 2001). Des accidents graves ont montré l'effet potentiel de tels relargages, comme celui de Palm Island en Australie où de nombreuses personnes ont été victimes d'une hépatocentérite suite au traitement d'une retenue avec du sulfate de cuivre (Bourke *et al.* 1983). Jones & Orr (1994) ont mis en évidence des concentrations en toxines supérieures à 1800 µg.L⁻¹ sur des lacs traités avec des algicides à base de cuivre. Ces auteurs font état d'une fluctuation des concentrations en microcystine sur le lac Centenary après un traitement au sulfate de cuivre : 990 µg.L⁻¹ trois heures après le traitement de l'eau du lac, 1230 µg.L⁻¹ quatre jours après et 110 µg.L⁻¹ après douze jours. Gupta *et al.* (2001) ont montré qu'une réduction de 99 % de la concentration en toxines prend environ 3 semaines avec, en général, une phase de latence de 2 à 3 jours voire 2 à 3 semaines en fonction des conditions climatiques. Pour Lam *et al.* (1995b), le sulfate de cuivre ne peut être utilisé, comme une solution à court terme, que si l'eau n'est pas utilisée pour la production d'eau potable pendant 5 à 7 jours. Concernant la cinétique de décroissance des toxines en milieu naturel, la DDASS de la Manche (2003) a observé dans un barrage à l'amont de la Sélune que la concentration en microcystine passait de 100 µg.L⁻¹ à 2 µg.L⁻¹ en 8 à 10 jours.

- **Résistance** : le cuivre peut induire la sélection de souches résistantes : Hanson & Stefan (1984) ont évalué l'impact de l'utilisation pendant 58 ans de sulfate de cuivre sur des lacs du Minnesota et constaté une résistance importante de certaines espèces au cuivre, un changement des espèces dominantes avec évolution d'une prédominance d'algues vertes vers une prédominance d'algues bleues-vertes et une réduction des macro-invertébrés benthiques. Les algues et les cyanobactéries en particulier peuvent développer des mécanismes de résistance intracellulaires et extracellulaires. Le mécanisme de résistance extracellulaire des algues est principalement lié à la présence de 4 types de groupement fonctionnel situés sur la membrane cellulaire (R-NH₂, R-COOH, R-OH et Si-OH) et les ligands secrétés ont des constantes de stabilités élevées avec le cuivre, ce qui permet de réduire la concentration en cuivre libre Cu^{2+} (Kiefer *et al.* 1997). Knauer *et al.* (1998) ont montré que *Scenedesmus subspicatus* pouvait synthétiser des ligands intracellulaires peptidiques qui complexent le cuivre et réduisent sa toxicité. Cette synthèse est induite par une exposition chronique au cuivre. La tolérance au cuivre est fonction des souches. Un traitement répété au sulfate de cuivre conduit à une prolifération d'espèces différentes plus résistantes (Izaguirre 1992, Prepas & Murphy 1998, Soldo & Behra 2000). La résistance a ainsi conduit à augmenter les doses de cuivre dans le lac Matthews où Izaguirre (1992) observe que des traitements répétés au sulfate de cuivre ont conduit au remplacement d'*Oscillatoria* par *Phormidium* à l'origine de mauvais goûts. Les cyanobactéries *Nostoc calcicola* sont capables de se détoxifier

en transportant le cuivre intracellulaire vers le milieu extérieur sous forme de phosphate de cuivre (Verma & Singh 1991, Verma *et al.* 1993).

- **Impact sur la qualité globale des plans d'eau** : l'action du sulfate de cuivre n'est pas spécifique et peut conduire à la mort d'autres algues mais aussi de micro et macro-organismes (poissons,...), entraînant une consommation très importante d'oxygène par l'augmentation de la matière organique en décomposition.

- **Accumulation dans les sédiments** : Brient *et al.* (2001) observent des concentrations en cuivre de 45 à 300 mg.kg⁻¹ dans les sédiments de certaines retenues selon les modalités de traitement au CuSO₄ ce qui est également observé par Schrader *et al.* (2002) et Prepas & Murphy (1998). Prepas *et al.* (1990) montrent que le cuivre peut être relargué des sédiments par anoxie. Dans les réserves d'eaux riches en acides humiques, le cuivre peut être complexé, ce qui nécessite d'apporter des quantités plus importantes (Bourke *et al.* 1983). Ces phénomènes de complexation sont amplifiés en milieu alcalin lorsque le pH de l'eau est élevé (Mc Knight *et al.* 1983). Il convient de ne pas oublier les risques liés à l'accumulation du cuivre dans la chaîne trophique, suite à la consommation d'organismes aquatiques ou de végétaux cultivés sur les parcelles utilisées pour l'épandage du produit des curages.

L'OMS rappelle que la lyse d'une prolifération constituée peut exacerber les problèmes liés aux toxines. Elle considère que les traitements algicides au début du développement d'une prolifération devraient rester une mesure d'urgence qui comporte des risques écologiques et qu'il est préférable de retenir des solutions qui préviennent la croissance des cyanobactéries à la source (Chorus & Bartram 1999 p. 267-268).

Concernant les conditions d'utilisation de ces traitements, l'OMS recommande de ne les utiliser que lorsque les dénombrements cellulaires sont « faibles », pour éviter des excédents de toxines. Ceci devrait être vérifié par des mesures de toxines. L'application de ce traitement en présence de dénombrements cellulaires élevés ne devrait être envisagé que si la ressource peut être exclue de l'alimentation des filières de production d'eau potable ou qu'un traitement d'élimination des toxines fiable est disponible. Dans ce dernier cas, il est rappelé que l'élimination des cellules entières offre une meilleure sécurité. Enfin l'OMS rappelle que l'utilisation d'algicides ne devrait concerner que des eaux pour lesquelles l'impact environnemental est acceptable, après vérification auprès de l'agence de l'environnement local (Chorus & Bartram 1999 p. 282-283).

L'utilisation de sulfate de cuivre, pour lutter contre le développement de cyanobactéries, est pratiquée en France en dehors de tout cadre réglementaire, notamment sur des ressources destinées à la production d'eau d'alimentation. Les utilisateurs sont souvent satisfaits des résultats de ces traitements curatifs du point de vue de la diminution de la biomasse mais suivent rarement le devenir des toxines. L'efficacité préventive souvent invoquée n'est pas prouvée scientifiquement. L'accumulation du cuivre dans les sédiments est avérée sur les sites ayant fait l'objet, en parallèle des traitements réguliers au sulfate de cuivre, d'études adaptées. D'après les quantités appliquées et les concentrations observées dans les sédiments, une partie du flux serait transférée vers l'aval de l'hydrosystème concerné (Morin & Nicolas 2004).

Le classement toxicologique réglementaire du sulfate de cuivre autorisé comme fongicide en agriculture est R50/53 (Agritox⁽³³⁾, mise à jour du 16/06/1999), c'est-à-dire « très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique ».

Dans le cadre de la Directive Biocides 98/8/CE, le sulfate de cuivre a été notifié par un industriel et donc inscrit à l'annexe II du Règlement 2003/2003 de la Commission, du 4 novembre 2003. Ce règlement établit le programme de travail sur les 10 prochaines années pour l'examen systématique de toutes les substances actives qui ont été identifiées (Annexe I) et notifiées (Annexe II). Cette inscription est notamment demandée pour le type de produit 2 (désinfectants utilisés dans le domaine privé et dans le domaine de la santé publique et autres produits biocides) : Produits utilisés pour désinfecter l'air, les surfaces, les matériaux, les équipements et le mobilier et qui ne sont pas utilisés en contact direct avec les denrées alimentaires ou les aliments pour animaux dans les lieux privés, publics et industriels, y compris les hôpitaux, ainsi que produits algicides.

Sont notamment concernés les piscines, les aquariums, les eaux de bassin et les autres eaux ; les systèmes de climatisation ; les murs et sols des établissements sanitaires et autres ; les toilettes chimiques, les eaux usées, les déchets d'hôpitaux, le sol ou les autres substrats (terrains de jeu).

Le sulfate de cuivre fera donc l'objet d'un dépôt de dossier, préparé par les industriels, entre le 1^{er} février 2007 et le 31 juillet 2007 pour une demande d'inscription de la substance à l'annexe I de la Directive 98/8/CE. L'inscription ne sera effective que si les experts en charge du dossier jugent que les preuves apportées sont recevables. Ainsi, les autorisations de mise sur le marché au niveau européen pourront intervenir au plus tôt en 2009.

(33) Agritox. Base de données sur les propriétés physiques et chimiques, la toxicité, l'écotoxicité, le devenir dans l'environnement, les données réglementaires des substances actives phytopharmaceutiques, créée par le département de Phytopharmacie et d'Ecotoxicologie de l'INRA. <http://www.inra.fr/agritox/>

Points à retenir

- La prévention des proliférations passe par une réduction des apports en azote et surtout en phosphore. Ce dernier joue en effet un rôle majeur et son apport provient soit des sources domestiques ou agricoles, soit du relargage dans la colonne d'eau de la charge interne des sédiments.
- Les traitements préventifs efficaces sont ceux qui permettent de réduire les apports en éléments minéraux nutritifs.
- Une fois la prolifération installée, il est déconseillé d'utiliser des agents biocides au risque de libérer les toxines ou les substances odorantes dans l'eau.
- S'ils devaient être utilisés, des recommandations de restriction d'usage et de suivi de qualité de l'eau devraient être associées.

Le tableau V-I résume les différents procédés cités.

Tableau V-I : Modalités d'actions sur les proliférations de cyanobactéries.

Type de procédé	Avantages	Inconvénients	Plan d'eau concerné	Observations
Actions sur le statut trophique				
Réduction des apports de nutriments (phosphore)	Effet durable.	Délai avant obtention des effets souhaités. Possibilité de situation transitoirement aggravée.	Tous plans d'eau.	Seule approche compatible avec Directive Cadre sur l'Eau.
Sel de fer	Précipitation de phosphore	Risque de relargage de PO ₄ à partir des sédiments si conditions anoxiques. Précipitation non durable. Apport de micro-nutriments aux cyanobactéries.	Tous plans d'eau.	Résultats controversés.
Sel d'aluminium	Précipitation de phosphore, si respect des proportions entre P et Al Durabilité	Accumulation d'aluminium dans les sédiments. Augmentation de la concentration en aluminium dans les eaux douces destinées à la consommation humaine. Relargage possible de toxine.	Tous plans d'eau.	Résultats controversés.
Chaux/Calcite	Précipitation de phosphore Floculation du phytoplancton	Traitements à répéter. Effet dépendant dosage et fréquence.	Eaux dures.	Difficile à mettre en application.
Oxygénation/aération en profondeur	Oxydation surface des sédiments Homogénéisation colonne d'eau	Dispersion des algues sur toute la colonne d'eau. Sélection d'autres genres.		Très critiquée.
Dragage des sédiments	Exportation de la charge interne en phosphore	Perturbation ponctuelle de l'écosystème.	Plans d'eau peu profonds.	Intéressant pour les ressources dont la charge interne en P est prépondérante.
Bio manipulation	Régulation des populations de phytoplancton par compétition écologique	Pas de recul sur les effets sur équilibre écologique. Risques pour la santé animale et la santé publique.	Plans d'eau peu profonds.	Effet complémentaire d'actions de réhabilitation. Évaluation des effets écologiques et sanitaires nécessaire.
Déstratification par aération diffuse	Perturbation de la stratification thermique Oxygénation colonne d'eau	Difficultés de mise en œuvre. Possibilité d'effets opposés.	Brassage intermittent pour lacs plaine. Aération permanente pour lacs profonds.	Résultats controversés
Traitements algicides				
Sulfate de cuivre Libre ou chélaté	Maîtrise des proliférations débutantes	Surveillance importante des ressources nécessaire pour déterminer moment d'intervention. Libération importante de toxines si utilisation sur des proliférations déjà importantes. Nécessité d'applications répétées. Risque de sélection d'espèces résistantes au cuivre. Accumulation dans les sédiments. Restrictions d'usages Suivi de la qualité et impact à long terme nécessaires.	Tous plans d'eau.	Destruction des proliférations effectives, après temps de latence variable selon genres impliqués. Approche incompatible avec la Directive Cadre sur l'Eau.

2. Maîtrise de la contamination de l'eau destinée à la consommation humaine par les cyanotoxines

Les traitements des eaux sont de 2 types seuls ou en complément :

- des traitements de rétention ;
- des traitements de transformation.

Le problème des algues, et plus spécialement des cyanobactéries, a déjà été étudié dans les années 70, notamment à cause des produits sapides qu'elles peuvent émettre, principalement la géosmine et le 2-méthylisobornéol (Rebhun *et al.* 1971, Narayan & Nunez 1974, Glare & Hopson 1975). Comme pour les toxines, il est important de prendre en compte les molécules dissoutes dans l'eau et celles qui peuvent être libérées lors de la lyse des cellules.

Sur la quantité totale de toxines mesurée dans un échantillon non filtré, environ 70 % provient des cellules de cyanobactéries, le reste étant dissous dans l'eau (Donati *et al.* 1994). La recommandation de l'OMS reprise dans le Code de la santé publique fixe à 1 µg.L⁻¹ la limite de qualité pour la microcystine-LR sans que ne soit précisé si l'analyse doit porter sur les fractions dissoutes et particulaires isolées ou en addition. Il sera donc important, même pour les traitements de rétention des algues, de s'assurer qu'il ne peut se produire de libération de toxines.

Les principaux effets déjà identifiés de la présence de cyanobactéries dans les filières de traitement destinées à la production d'eau de consommation humaine étaient (Briley & Knappe 2002) :

- une mauvaise coagulation d'autant plus importante que les cyanobactéries comportaient pour certaines des vésicules à gaz qui faisaient remonter le floc en surface (Bernhardt 1984, Bernhardt *et al.* 1985, Bernhardt 1987) ;
- une réduction des cycles de filtration (Baylis 1955, Poston & Garnet 1964, Bernhardt 1984, Janssens *et al.* 1989, Prados & Belotte 2002) ;
- une demande en chlore élevée (Hoehn & al. 1980, Wardlaw *et al.* 1991) ;
- des goûts et des odeurs prononcés (Rashash 1996) ;
- une dégradation microbiologique de la qualité de l'eau dans le réseau de distribution (Schmidt *et al.* 1998).

Ce n'est que depuis le début des années 1990 que les problèmes de toxines ont été signalés (Wardlaw *et al.* 1991, Chorus & Bartram 1999).

Dans ce chapitre, sauf dans les cas où la précision serait spécifiée, les procédés et les résultats de traitement décrits concernent les microcystines, car le nombre de données sur d'autres toxines que les microcystines est faible.

2.1 Actions au niveau des bassins de stockage d'eau brute (de 1 à 3 jours de temps de séjour)

2.1.1. Actions sur les cellules

La prévention des proliférations est la meilleure méthode pour garantir l'absence de toxines dans l'eau d'alimentation (voir paragraphe 1.).

• Les sels de cuivre

Ce type de traitement, bien qu'autorisé dans les ouvrages de traitement de potabilisation, était destiné à la limitation des développements d'algues mais, dès lors que la présence de cyanobactéries est avérée, il est déconseillé, afin d'éviter tout relargage de toxines ou de métabolites odorants par les cellules lysées.

• L'hydroxyde et le carbonate de calcium

Si la précipitation du carbonate de calcium en usine, ou décarbonatation, ne donne pas de résultats intéressants pour l'élimination des algues, la décarbonatation dans les bassins de réserve d'eau brute apparaît efficace (Lam *et al.* 1995a).

• Les rayonnements UV

L'irradiation par rayonnement UV a montré son efficacité lorsqu'elle est appliquée en entrée du bassin de stockage d'eau brute, notamment lorsque les eaux contiennent des acides humiques et que le cuivre s'avère inefficace car complexé (Hessen & Van Donk 1994, Lund & Hongve 1994, Zamir Bin Alam *et al.* 2001). Les effets rémanents observés ont d'abord été attribués à la production de H₂O₂ dont les quantités analysées ne permettent cependant

pas d'expliquer le phénomène. L'action des UV sur l'ADN interdit toute multiplication des algues sans les tuer (Tortora *et al.* 1992). Avec une dose de 370 J.m⁻², les algues restent en surface. Par contre, avec une dose de 750 J.m⁻², les algues meurent et tombent au fond en induisant les mêmes problèmes que le cuivre.

2.1.2. Action sur les toxines

La dégradation naturelle des toxines demande un temps supérieur aux temps de séjour pris en compte dans les filières traditionnelles (Bernhardt & Clasen 1991).

Si les toxines sont réputées stables à la lumière solaire, ces composés peuvent être dégradés en présence de catalyseur que l'on peut éventuellement trouver dans les matières en suspension (Robertson *et al.* 1997, Shephard *et al.* 1998, Feitz *et al.* 1999a, Feitz *et al.* 1999b, Shephard *et al.* 2002). Ces effets sont très dépendant de la qualité de l'eau et surtout de la présence d'acides humiques (Welker & Steinberg 2000).

Cette dégradation est initiée par les radicaux OH (hydroxyl) (Robertson *et al.* 1998, Shephard *et al.* 1998, Robertson *et al.* 1999). On a signalé des temps de vie des toxines de 3 à 4 jours dans les réserves d'eaux brutes, lacs ... (Cousins *et al.* 1996). Il a été noté que si certains composés pouvaient accélérer ces réactions, d'autres peuvent les ralentir : matières organiques, phosphates, nitrates... (Abdullah *et al.* 1990, Tsuji *et al.* 1995, Kano & Sano 1998).

2.2. Actions au sein des filières de traitement

Toutes les méthodes qui piègent la biomasse sans libérer les toxines sont à préférer en raison de l'action de libération de toxines intervenant après oxydation des cellules.

2.2.1. Prétraitements physiques

• Dégrillage, dessablage, débouage, tamisage

Ces traitements ne sont pas adaptés à l'élimination des algues puisque même le tamisage ne concerne qu'une filtration à travers des tamis de 1 à 2 mm de maille. Ces traitements sont donc sans effet sur la rétention des algues et n'ont bien entendu aucune action sur les toxines dissoutes.

• Microtamisage à 35 micromètres

Selon Mouchet et Bonnelye (1998), 40 à 70 % du phytoplancton peut être retenu. Certaines cyanobactéries, notamment *Microcystis aeruginosa*, ne sont retenues qu'à un niveau inférieur à 10 % (Chorus & Bartram 1999). Aucune action n'est possible sur les toxines dissoutes.

• Aération et aération forcée (stripping)

Ces traitements sont sans effet sur la rétention des cyanobactéries et sur les toxines (Chorus & Bartram 1999).

2.2.2. Prétraitements d'oxydation

Ces traitements d'oxydation sont effectués sur les eaux brutes. Ils concernent : le chlore, le bioxyde de chlore, l'ozone, le permanganate de potassium et ont en commun le fait de tuer les algues et de provoquer leur lyse (Suknik *et al.* 1987, Lam *et al.* 1995a, Peterson *et al.* 1995, Hart *et al.* 1997, Hall *et al.* 2000).

• Le chlore et le bioxyde de chlore

Ces deux traitements, et surtout le chlore, sont à déconseiller en tête de traitement à cause des réactions secondaires et des produits de réaction qu'ils génèrent, notamment les trihalométhanes (THM) pour le chlore et les chlorites pour le bioxyde de chlore. Les doses utilisées varient de 0,25 à 2 mg.L⁻¹ et sont généralement fixées en fonction des teneurs en ammoniacque et non pas en fonction des dénombrements en cyanobactéries.

Aux faibles doses, le chlore n'a aucun effet significatif sur les toxines dissoutes étudiées (Hoffmann 1976, Himberg *et al.* 1989, Lahti & Hiisvirta 1989, Fujiki 1992, Izaguirre 1992, Carlile 1994, Rositano *et al.* 1995). Il faut au moins 0,5 mg.L⁻¹ de chlore libre après 30 minutes de contact pour observer une action sur les microcystines (Nicholson *et al.* 1993, Carlile 1994, Nicholson *et al.* 1994, Lahti *et al.* 1995, Nicholson & Rositano 1997, Maatouk *et al.* 2002). À ces doses, la demande en chlore de l'eau doit être totalement satisfaite ce qui conduit généralement à la formation de composés organochlorés secondaires : THM, dérivés halogénés de l'acide acétique, de l'acétonitrile (Bonnelye *et al.* 1995, Graham *et al.* 1998).

Pour le bioxyde de chlore, très peu de données existent. Il a été signalé cependant que l'action sur les toxines ne se faisait que pour des concentrations supérieures ou égales à 6 mg.L⁻¹ (Sherman *et al.* 1995). Ces traitements (chlore, bioxyde de chlore) sont à proscrire.

- Le permanganate de potassium

Ce réactif a été utilisé comme algicide depuis 1935 mais les doses à appliquer vont de 1 à 5 mg.L⁻¹ pour détruire les cellules (Holden 1970). Les éventuels effets sur les toxines dissoutes ne sont pas décrits.

- L'ozone

En pré-ozonation, les doses utilisées sont faibles, de l'ordre de 0,2 à 0,25 mg O₃ par mg de carbone organique total (COT). À ces doses, l'ozone n'est pas algicide mais permet une meilleure clarification de l'eau par déstabilisation des colloïdes (Bonnélye *et al.* 1995, Maatouk *et al.* 2002).

Mouchet et Bonnelye (1998) trouvent que la pré-chloration donne de meilleurs résultats que la pré-ozonation pour la rétention des cellules sur la chaîne de traitement.

À ces doses habituelles, ces toxines ne sont pas dégradées ce qui nécessite des quantités d'ozone beaucoup plus importantes. De plus, de très nombreux auteurs ont signalé pour l'ozone l'interférence négative des matières organiques présentes dans les eaux brutes (Falconer *et al.* 1983a, Keijola *et al.* 1988, Lahti & Hiisvirta 1989, Hart & Stott 1993, Nicholson *et al.* 1993, Bernazeau *et al.* 1995, Rositano 1998, Shawwa & Smith 2001).

2.2.3. Groupes de traitements de clarification physico-chimique

Ces traitements associés en entrée de filière englobent : coagulation – floculation – séparation (décantation – flottation) et la filtration. De nombreuses publications donnent des résultats globaux sur ces ensembles au sein des chaînes de traitement (Mouchet & Bonnelye 1998).

- Coagulation – floculation – décantation – filtration

- Action sur les cellules

Ce groupe de traitements est efficace pour l'élimination des algues (Mouchet & Bonnelye 1998, Chow *et al.* 1999) avec des rendements de 50 à 60 % (Keijola *et al.* 1988). Par contre, les traitements doivent être optimisés à l'aide de paramètres précis et en particulier par la mesure du potentiel zêta ou du courant électro-cinétique. Les algues produisent et libèrent des polysaccharides qui augmentent la demande en coagulant. De plus, lorsque le pH augmente, la coagulation est moins efficace. Il y a tout d'intérêt à avoir un système automatique d'optimisation de la dose de coagulant qui vérifie en continu le potentiel zêta des colloïdes (Tilton *et al.* 1972, Bernhardt & Clasen 1991, Bernhardt & Schell 1993, Clasen *et al.* 2000, Briley & Knappe 2002, Lai *et al.* 2002).

Comme les floccs en période de prolifération algale sont légers, il est recommandé d'utiliser des adjuvants de floculation : polymères anioniques (Bernhardt & Clasen 1991, Knappe *et al.* 1998). Dans certains cas, l'utilisation d'un floculant à base de polymère cationique permet une meilleure élimination des cyanobactéries (Leuschner 1984). Les doses nécessaires pour ce dernier polymère sont cependant supérieures à celles actuellement autorisées en France.

Cette étape de traitement ne conduit normalement pas à la lyse des cyanobactéries (Montgomery 1985, Chow *et al.* 1998, Chow *et al.* 1999). Par contre, si les boues sont conservées plus de 1 à 2 jours, la lyse est possible et il a été observé jusqu'à 100 % de relargage des toxines en 48 heures. Il est donc impératif de prévoir une élimination permanente des boues (Chorus & Bartram 1999). Au niveau de la décantation, les décanteurs statiques horizontaux maintiennent les boues pendant des temps assez longs, alors qu'avec les décanteurs statiques verticaux, l'élimination est très régulière. Pour les décanteurs dynamiques à lit de boues recyclées, ce point devrait impérativement être pris en compte.

Dans ce groupe de traitement, c'est la filtration qui joue le rôle le plus important, en assurant 90 % de la rétention totale (Falconer *et al.* 1983b, Montgomery 1985, Lepisto *et al.* 1994, Steffensen & Nicholson 1994, Hoeger *et al.* 2002). Au niveau de la filtration, on peut constater des colmatages importants avec des pertes d'eau pour les lavages qui peuvent atteindre jusqu'à 20 % (Bernhardt 1984, Lam *et al.* 1995b, Hart *et al.* 1997, Hall *et al.* 2000, Prados & Belotte 2002). Comme dans les boues des décanteurs, les cyanobactéries retenues sur ou dans les filtres peuvent se lyser dès 24 à 48 heures de rétention ce qui implique également une bonne gestion de l'entretien des filtres (Lepisto *et al.* 1994, Chorus & Bartram 1999).

Mouchet et Bonnelye (1998) signalent que la filtration directe sans traitement chimique préalable n'est pas efficace pour la rétention des cyanobactéries.

Une attention particulière devra être accordée au traitement des boues pendant lequel les toxines intracellulaires sont peu à peu libérées. Le recyclage des eaux issues de ces traitements sera donc à proscrire en présence de cyanobactéries toxiques, mais il ne faudra pas pour autant sous estimer leur impact sur le milieu naturel (Chorus & Bartram 1999).

- Action sur les toxines

Ces traitements sont sans action sur les cyanotoxines dissoutes dans les eaux (Bernhardt & Clasen 1991, James & Fawell 1991, Izaguirre 1992, Nicholson *et al.* 1994, Hart *et al.* 1997, Mouchet & Bonnelye 1998). La biodégradation dans les filtres rapides est beaucoup trop faible pour être prise en compte, les temps de traitement ne dépassant pas 10 minutes. Seul l'ajout de charbon actif en poudre permet leur élimination (voir paragraphe 3.2.7.1).

• Coagulation – floculation – flottation – filtration

Dans cette étape de traitement, la flottation remplace la décantation. Tous les auteurs s'accordent pour dire que la flottation donne de meilleurs résultats que la décantation (Welté & Montiel 1995). De plus, l'élimination continue des boues évite toute lyse des cyanobactéries. Suivant les genres, on obtient des résultats différents : 40 à 80 % pour *Microcystis aeruginosa*, 90 à 100 % pour *Anabaena* et seulement 30 % pour *Planktothrix* (Orikas & Hrudey 1994, Mouchet & Bonnelye 1998).

L'ozoflottation est une variante de la flottation qui allie l'action oxydante de l'ozone en pré-traitement à l'action physique de la flottation. Si les doses d'ozone sont faibles, il n'y a pas de lyse des algues et donc de risque de libération de toxines (Favre & Langlais 1991, Benoufella *et al.* 1995). La rétention des algues n'est attribuable qu'à la flottation.

Ces traitements sont sans action sur les cyanotoxines dissoutes dans les eaux.

2.2.4. Procédés de filtration

• Filtration lente

Elle donne de bons résultats pour la rétention des algues en général et des cyanobactéries en particulier (Mouchet & Bonnelye 1998, Hitzfeld *et al.* 2000). Il ne faut cependant pas négliger les risques de relargage de toxines. Il a été signalé des rétentions de 80 % de *Microcystis*, 30 à 60 % de *Planktothrix* et 70 % d'*Anabaena* (Sherman *et al.* 1995).

Des études ont montré que ces traitements pouvaient avoir une certaine efficacité sur la rétention des cyanotoxines avec jusqu'à 80 % de rétention pour les toxines de *Microcystis*, 30 à 65 % pour celles de *Planktothrix* et 70 % pour celles d'*Anabaena* (Keijola *et al.* 1988). Les phénomènes mis en jeu sont la bio-adsorption et la biodégradation pour laquelle il faut une période d'adaptation de plusieurs semaines. La biodégradation se fait ensuite après un délai d'une journée, ce qui peut expliquer les résultats présentés plus haut (Bourne *et al.* 1996).

• Filtration sur berge

- Action sur les cellules

La filtration sur berge est un procédé naturel de traitement des eaux de surface qui consiste à créer un puits dans les nappes alluviales qui, par pompage, conduit à un cône de dépression ré-alimenté en permanence par l'eau de la rivière ou du lac. La bonne efficacité de la filtration sur berge avait déjà été mise en évidence pour la réduction des métabolites odorants de cyanobactéries responsables de goûts indésirables dans les eaux potables (Chorus & Bartram 1999) et la rétention de la turbidité.

- Action sur les toxines libérées

La filtration sur berge a été signalée comme une bonne méthode de rétention des cyanotoxines (Chorus *et al.* 1993, Lahti *et al.* 1998, Chorus & Bartram 1999, Hrudey *et al.* 1999, Kuhn 1999, Miller *et al.* 2001, Miller & Fallowfield 2001, Dillon *et al.* 2002). Ce traitement avait déjà été reconnu comme efficace pour la rétention des micro-polluants organiques et minéraux (Sontheimer 1980, Miettinen *et al.* 1994). Les temps de demi-vie varient de 4 à 7 jours (Lam *et al.* 1995a).

Deux phases sont à prendre en compte : une phase d'adsorption sur les sédiments et une phase de décomposition abiotique et/ou de biodégradation.

Adsorption sur les sédiments

La microcystine-LR possède un pKa de $3,3 \pm 0,3$ (Rivasseau *et al.* 1998). Son K_{ow} est faible (pKow environ 1), ce qui signifie que lorsque le pH augmente, la toxine devient de plus en plus hydrophile donc soluble (Carmichael 1994). Par contre, les sédiments riches en matières organiques sont acides, ce qui permet une bonne rétention de cette microcystine. Lahti *et al.* (1996) signalent des éliminations allant de 97,5 à 99,5 % des toxines, en cumulant adsorption et biodégradation. C'est l'adsorption sur les argiles qui joue un rôle prépondérant (Dillon *et al.* 2002).

Biodégradation

Un temps d'adaptation de la flore bactérienne est nécessaire mais ensuite les dégradations peuvent être rapides. Les essais sur la phosphatase ont montré que les produits de dégradation n'étaient pas toxiques (Jones *et al.* 1994).

2.2.5. Traitements d'affinage en extrémité de filières

Ces traitements n'ont pas pour but essentiel la rétention des cellules de cyanobactéries mais sont tout spécialement mis en place pour l'élimination des micropolluants organiques. Ils comprennent essentiellement : l'adsorption sur charbon actif et les couplages ozonation – charbon actif.

2.2.5.1. Traitements membranaires

Les cellules de cyanobactéries ayant des tailles de l'ordre du micron, les traitements de microfiltration et d'ultrafiltration sont des traitements de choix (Lai *et al.* 2002). Les abattements peuvent atteindre 6 log (Chevalier *et al.* 1995, Mouchet & Bonnelye 1998). Par contre, il a été signalé des phénomènes de colmatage très importants (Tsuji *et al.* 1995). Les risques de relargage de toxines ont été évoqués (Drikas *et al.* 2001b).

Concernant les toxines libérées, les traitements d'ultra- et de micro-filtration n'ont aucun effet sur les composés solubles sauf s'ils sont utilisés conjointement avec du charbon actif en poudre (CAP) (Chorus & Bartram 1999). Par contre, la nanofiltration et l'osmose inverse ont la propriété de retenir des composés dissous, moléculaires ou ioniques. Pour la nanofiltration, il est impératif que le point de coupure soit inférieur à 200 daltons (Miller *et al.* 2001). Pour l'osmose inverse, Neumann & Weckesser (1998) observent des rétentions des toxines de 96,7 à 99,6 %.

2.2.5.2. Traitements de désinfection physiques ou chimiques

Ces traitements ont pour but la réduction du risque microbiologique, donc l'élimination poussée des microorganismes. Si des cellules de cyanobactéries sont arrivées jusqu'à cette étape, elles seront tuées et leur lyse se fera dans le réseau de distribution avec libération éventuelle de toxines.

Concernant les toxines, aux doses normalement utilisées pour la désinfection de l'eau (0,5 mg.L⁻¹ de chlore après 30 minutes de contact pour le chlore et 0,25 mg.L⁻¹ de bioxyde de chlore après 30 minutes de contact), les actions sur les toxines sont faibles voir nulles (Hoffmann 1976, Himberg *et al.* 1989, Nicholson *et al.* 1993, Carlile 1994, Rositano & Nicholson 1994).

- **Pour le chlore**, Nicholson *et al.* (1994) ont signalé qu'à des teneurs supérieures ou égales à 0,5 ppm de résiduel après 30 minutes, une action était observable sur les microcystines. Pour le bioxyde de chlore, les premiers effets signalés l'ont été pour des résiduels de 6 mg.L⁻¹ (Chorus & Bartram 1999).

- **Ozone**

L'ozone est une étape de traitement signalée depuis très longtemps comme pouvant avoir une efficacité sur les toxines (Keijola *et al.* 1988, Himberg *et al.* 1989, Chorus *et al.* 1993, Fawell *et al.* 1993, Rositano *et al.* 1998, Shawwa & Smith 2001). La dose d'ozone joue un rôle important, il faut au moins 1 mg.L⁻¹ d'ozone pour avoir une action rapide. Avec 0,5 mg.L⁻¹, il faut 9 minutes pour détruire la toxine (Geering 1999). À la dose optimum de 1 mg.L⁻¹ d'ozone, les réactions se font en moins d'une minute (Rositano 1998). Il est impératif de satisfaire la demande en ozone de l'eau et d'avoir un résiduel (Carlson 1993, Andrew & Huck 1994, Bose *et al.* 1994, Rositano 1996, Rositano *et al.* 1998). Ce type de traitement risque de conduire à la formation de bromates. Si la demande de l'eau en ozone est élevée, une décomposition incomplète de la microcystine-LR a été observée (Shawwa & Smith 2001). Les produits de décomposition n'ont pas été étudiés. Certains auteurs en ont repéré sur des chromatogrammes CLHP (Lawrence *et al.* 1980, Lahti & Hiisvirta 1989, James & Fawell 1991, Fawell *et al.* 1993). Les études sur la phosphatase ont mis en évidence des toxicités qui disparaissent après passage sur le charbon actif en grains (CAG). À partir des molécules et des mécanismes mis en jeu, certains auteurs ont essayé de prévoir les molécules susceptibles de se former (Rinehart *et al.* 1988, Harada *et al.* 1996). Aucune d'entre elles n'a été réellement identifiée à ce jour.

Le pH influence l'effet de l'ozone. Si celui-ci augmente, l'efficacité augmente ce qui laisse penser que les mécanismes d'action sont plutôt radicalaires (Shawwa & Smith 2001). La présence de matières organiques interfère (Falconer *et al.* 1983a, Falconer *et al.* 1983b, Keijola *et al.* 1988, Lahti & Hiisvirta 1989, Fawell *et al.* 1993, Hart & Stott 1993, Nicholson *et al.* 1993, Rositano & Nicholson 1994, Rositano 1996, Hart *et al.* 1997, Rositano *et al.* 1998, Rositano *et al.* 2001). On compte par exemple 8 moles d'ozone par mole de toxines pour une eau ultra pure et respectivement 14, 25 et 41 moles si le COT est de 1, 3 et 5 mg.L⁻¹ (Shawwa & Smith 2001).

- **Oxydation avancée**

Il s'agit des réactions radicalaires induites par des couplages ozone/UV, ozone/eau oxygénée ou UV/eau oxygénée (Rositano *et al.* 1998). Ce type de traitement permet une bonne élimination des toxines ; par contre, comme pour l'ozone, les produits de réaction n'ont pas été identifiés (Rositano 1998, Cornish *et al.* 2000, Hoeger *et al.* 2002). Les dégradations sont initiées par les radicaux hydroxyles (Robertson *et al.* 1998, Shephard *et al.* 1998, Robertson *et al.* 1999).

- **Photolyse**

La photolyse et la photolyse catalysée ont été signalées comme efficaces vis-à-vis des cyanotoxines. Comme pour l'oxydation avancée, elles font appel à des réactions radicalaires (Tsuji *et al.* 1995, Robertson *et al.* 1997, Feitz *et al.* 1999a, Feitz *et al.* 1999b, Welker & Steinberg 2000, Shephard *et al.* 2002). Des études ont été faites sur la fixation de catalyseurs, notamment TiO₂, sur des particules : fibres de verre, verre, sable, gel de silice, téflon, CAG, acier inoxydable, fibres tissées, membranes céramiques (Bideau *et al.* 1995, Hoffmann *et al.* 1995).

La présence de matières organiques ralentit l'effet des UV (Tsuji *et al.* 1995, Kano & Sano 1998) ainsi que la présence de nitrates ou de phosphates (Abdullah *et al.* 1990). Pour les UV, le pH isoélectrique des toxines donne les meilleurs résultats (Robertson *et al.* 1999). Il faudrait donc effectuer les traitements à des pH de l'ordre de 3 pour qu'il y ait un meilleur contact avec le catalyseur.

2.2.5.3. Adsorption des toxines sur charbon actif

L'adsorption sur charbon actif peut se faire :

- soit en tête de traitement en utilisant du charbon actif en poudre (CAP) dans la phase de coagulation ;
- soit en fin de traitement, par filtration sur charbon actif en grains (CAG) ou utilisation de réacteurs à charbon actif en poudre couplés à des rétentions membranaires de micro ou d'ultra filtration. Le rôle des membranes pour l'élimination des toxines se limite à la rétention du charbon actif en poudre qui adsorbe les toxines.

- **Charbons actifs en poudre**

Plusieurs auteurs ont signalé la capacité des charbons actifs en poudre à adsorber les cyanotoxines (Falconer *et al.* 1989, Himberg *et al.* 1989, Nicholson *et al.* 1994, Bernazeau *et al.* 1995, Maatouk *et al.* 2002). Les quantités nécessaires sont cependant assez élevées, de l'ordre de 20 à 30 mg.L⁻¹ pour éliminer de 90 à 98 % des toxines présentes au niveau de quelques microgrammes par litre (Keijola *et al.* 1988, Donati *et al.* 1993).

Le pH de l'eau joue un rôle important sur le rendement de cette étape. En période de prolifération algale, le pH peut dépasser les conditions d'essais des charbons.

- **Charbons actifs en grains**

Dans bien des cas, ce sont des couplages ozone – CAG qui sont mis en place dans les usines. Les CAG ayant pour but la rétention et/ou la biodégradation soit des molécules n'ayant pas réagi avec l'ozone (Falconer *et al.* 1989, Izaguirre 1992, Chorus & Bartram 1999, Rositano *et al.* 2001, Hoeger *et al.* 2002, Lai *et al.* 2002), soit des molécules formées par l'ozone.

Cette étape est considérée comme très efficace pour la rétention des toxines : rétention supérieure à 90 % pendant la première année d'utilisation des charbons (Falconer *et al.* 1989, Lambert *et al.* 1996). La qualité de l'eau et notamment la quantité de matières organiques joue un rôle très important car la durée d'efficacité de rétention des charbons sera diminuée si la charge organique de l'eau est trop forte (Hitzfeld *et al.* 2000). La biodégradation de toxines adsorbées a été signalée (Fawell *et al.* 1993, Lambert *et al.* 1996, Drikas *et al.* 2001b).

Peu d'auteurs ont étudié les durées de vie des charbons actifs en grains pour ce paramètre spécifique (Bernazeau 1994, Bernazeau *et al.* 1995). Mais il faut signaler qu'en France, avec la prise en compte des métabolites de pesticides dans le Code de la santé Publique articles R.1321-1 à 62, Annexe 13-1-B, les charbons doivent être régénérés à des fréquences de l'ordre de l'année, ce qui garantit contre toute utilisation de charbons saturés qui pourraient relarguer les toxines.

Points à retenir

- La problématique des cyanotoxines impose de considérer d'une part l'élimination des cellules et d'autre part l'élimination des toxines.
- En ce qui concerne l'élimination des cyanobactéries, il faut absolument prendre en compte les risques liés à la lyse des cellules qui n'étaient pas jusqu'à présent pris en considération. Cela devrait conduire à supprimer tous les traitements algicides dans les réservoirs ou les stockages d'eau brute, ainsi que les pré-traitements algicides (sulfate de cuivre, chlore, bioxyde de chlore) en présence de cyanobactéries.
- La pré-ozonation à la dose de 0,20 à 0,25 mg O₃ par mg de COT ne pose pas de problème et améliore la clarification de l'eau. Il est impératif que les boues ne restent pas plus de 24 voire 48 heures au niveau de l'étape de clarification car la lyse des cyanobactéries est possible. Cela concerne aussi les cycles de filtration.
- Pour le traitement des boues, le recyclage des eaux en tête de traitement est à proscrire. L'impact du rejet des eaux dans le milieu naturel après séparation des boues sera à prendre en considération en sachant que le chaulage conduit à une lyse quasi immédiate. La flottation paraît mieux correspondre à cette nouvelle problématique, puisque les cyanobactéries sont éliminées au fur et à mesure sans stockage et risque de lyse.
- En ce qui concerne les toxines elles-mêmes, leur élimination est du domaine des étapes d'affinage : ozone et/ou adsorption. Si ces étapes sont efficaces, peu de données existent sur les produits secondaires de réaction : hydrolyse, photolyse, biodégradation et oxydation. Il serait bon, comme pour les pesticides, de limiter l'usage des traitements de transformation et de favoriser les étapes de rétention. Ceci impose, pour les charbons actifs en grains, de réduire les risques de biodégradation par des régénérations fréquentes annuelles ou tous les deux ans.
- La filtration sur berge est considérée comme efficace tant pour la rétention des cyanobactéries que pour la rétention des toxines, et la filtration lente dans une certaine mesure, mais rien n'a été publié sur les métabolites éventuellement formés
- La micro- et l'ultra-filtration sont très efficaces pour la rétention des cyanobactéries et celle des toxines uniquement lorsqu'elles sont utilisées avec du CAP. La nanofiltration et l'osmose inverse sont très efficaces pour la rétention des toxines et, bien entendu, des cellules.

Tableau V-II : Efficacité des différentes étapes de traitement des eaux sur les cyanobactéries et leurs toxines.

Étapes de traitement	Principaux procédés	Efficacité sur l'élimination des algues	Efficacité sur l'élimination des toxines	Observations
Bassin de stockage	Sels de cuivre	Lyse des cyanobactéries avec libération possible de toxines.	Nulle.	Peut être une zone de prolifération si mal géré.
	Hydroxyde et carbonate de calcium Gypse	Efficacité prouvée selon certaines publications, contestée par une autre.		
	Rayonnements UV	Lyse des algues avec libération possible de toxines à 750 J.m ⁻² .		
Pré-traitements physiques	Dégrillage Dessablage Débourbage Tamisage Aération Stripping	Nulle.	Nulle.	
	Microtamisage à 35 µm	Rétention de l'ordre de 30 à 40 % des cellules, parfois moins pour certains genres.		
Pré-traitements d'oxydation	Chlore et bioxyde de chlore	0,25 à 2 mg.L ⁻¹ : doses classiques.	Chlore : effet à partir de 0,5 mg.L ⁻¹ pendant 30 minutes. Bioxyde de chlore : effet à partir de 6 mg.L ⁻¹ .	À déconseiller, en raison des risques de libération de toxines et de formation de composés indésirables.
	Permanganate de potassium	1 à 5 mg.L ⁻¹ pour obtenir la lyse avec libération possible de toxines.	Absence d'information disponible	
	Ozone	0,2 à 0,25 mg O ₃ par mg de COT favorise la clarification sans lyser les cellules.	Pas d'effet aux doses de traitement habituelles de 0,2 à 0,25 mg O ₃ par mg de COT.	
Traitements de clarification physico-chimique	Coagulation, floculation, décantation, filtration	50 à 60 % d'élimination, principalement lié à la filtration. Risque de lyse si conservation des boues plus de 24 à 48 h.	Nulle.	
	Coagulation, floculation, flottation, filtration	30 à 100 % d'élimination selon les genres. Aucun risque de lyse car élimination des boues en continu.	Nulle.	

Tableau V-II (suite) : Efficacité des différentes étapes de traitement des eaux sur les cyanobactéries et leurs toxines.

Étapes de traitement	Principaux procédés	Efficacité sur l'élimination des algues	Efficacité sur l'élimination des toxines	Observations
Filtration lente		30 à 80 % d'élimination selon les genres. Risque de relargage de toxines.	30 à 80 % de rétention selon les toxines.	
Filtration sur berge		Efficacité démontrée.	Élimination de 97,5 à 99,5 % des toxines, notamment par adsorption sur les argiles. Produits de dégradation non toxiques.	
Affinage	Traitements membranaires	Micro- et ultra-filtration permettent d'atteindre 6 log d'abattement. Risque de colmatage et de relargage de toxines.	Efficacité nulle des ultra- et micro-filtrations seules (sans charbon). Nanofiltration avec seuil de coupure supérieur à 200 Da efficace. Osmose inverse : rétention de 96,7 à 99,6 % des toxines.	
	Traitements de désinfection	Nulle. Risque de relargage de toxines si des cellules sont parvenues jusqu'à cette étape.	Chlore et bioxyde de chlore aux doses courantes d'emploi : effet faible à nul.	
	Adsorption sur charbon actif en poudre		20 à 30 mg.L ⁻¹ pour une élimination de 90 à 98 % des toxines.	
	Adsorption sur charbon actif en grain		90 % de rétention la première année d'utilisation.	Variable selon la qualité globale de l'eau
	Ozone		1 mg.L ⁻¹ pendant une minute ou 0,5 mg.L ⁻¹ pendant 9 minutes sont efficaces si la demande en ozone est satisfaite.	
	Oxydation avancée		Bonne élimination.	

VI. État des lieux des recommandations et des réglementations

1. Eau de baignade

1.1. Pays et instances à l'origine de recommandations

Pour de nombreux pays, la prise en considération du risque « cyanobactérie » lié à la baignade ou aux activités nautiques est récente ou encore inexistante. Les problèmes sanitaires sont parfois sous estimés, car mal définis et peu connus. Ils sont de ce fait diversement pris en considération. Les pays les plus avancés en la matière sont ceux qui connaissent fréquemment des épisodes de prolifération dans les eaux de baignade. C'est le cas par exemple de l'Australie. Les valeurs seuils définies (nombre de cellules, concentration en toxine, biovolume ...) sont indicatives et provisoires et ne constituent pas des obligations légales.

Au niveau international, des recommandations émanant de l'Organisation mondiale de la santé ont été publiées en 2003 (OMS, 2003).

Au niveau de l'union européenne la qualité de l'eau des zones de baignade et sports nautiques est régie par la directive européenne 76/160/CEE adoptée en 1976 et transposée en droit français par le Code de la santé publique (livre III, articles L1332). Sous le terme « eaux de baignade » sont regroupés les cours et plans d'eau aménagés pour la baignade et/ou la pratique de loisirs aquatiques, fréquentés de manière répétitive par au moins 10 baigneurs au même instant. Cette directive ne comporte pas de cadre réglementaire pour la surveillance sanitaire des cyanobactéries ou cyanotoxines. En revanche, l'article 8 de la nouvelle directive eaux de baignade, directive 2006-7 CE du Parlement européen et du Conseil de l'union européenne du 15 février 2006, insiste sur le risque potentiel lié à la présence de cyanobactéries et demande à ce que des mesures de gestion immédiates soient prises afin de réduire l'exposition de la population (Journal Officiel de l'union européenne L 64 du 4 mars 2006).

En l'absence de recommandations communautaires spécifiques à la surveillance et gestion du risque lié à la prolifération de cyanobactéries dans les eaux de baignade, certains états membres, dont la France, l'Ecosse ou la République Tchèque, ont adopté les recommandations de l'OMS. D'autres comme l'Allemagne, le Danemark, les Pays-Bas et la Finlande ont élaboré leurs propres recommandations..

En France, depuis 2003 des recommandations de surveillance et gestion de phénomènes de prolifération de cyanobactéries dans des eaux de baignade ont été publiées par la Direction générale de la santé (circulaire DGS/SD7A 2003/270⁽³⁴⁾, 2004/364⁽³⁵⁾, 2005/304⁽³⁶⁾) sur la base d'un avis du Conseil supérieur d'hygiène publique de France (avis du CSHPF du 6 mai 2003).

Hors Union européenne, l'Australie a été le premier à développer à l'échelle nationale, par le biais du National Health and Medical Research Council (NHMRC 2004), ses propres lignes directrices. Au niveau régional, ce pays a également développé des recommandations propres à certaines provinces: c'est le cas de la région Hunter (DIPNR 2004), de la Tasmanie (DPIWE 2001) et du Queensland (Queensland Health 2001). Ces lignes directrices régionales tiennent compte des particularités locales telles que la période de prolifération ou les espèces cyanobactériennes présentes.

1.2 . Synthèse descriptive des recommandations disponibles

1.2.1. Recommandations de l'OMS

1.2.1.1. Les bases

Après considération des éventuels risques par contact direct (irritations et allergies), inhalation et absorption (intoxication à court et long termes), l'OMS (2003) a estimé que le risque le plus important était lié à l'ingestion d'eau contaminée par des cyanotoxines. Elle a retenu trois seuils à partir desquels les risques sanitaires sont accrus et peuvent changer de nature. L'étude épidémiologique humaine de Pilotto *et al.* (1997), la DJT de 0,04 µg.kg⁻¹.j⁻¹

(34) <http://www.sante.gouv.fr/adm/dagpb/bo/2004/04-36/a0362536.htm>

(35) <http://www.sante.gouv.fr/adm/dagpb/bo/2004/04-36/a0362536.htm>

(36) <http://www.sante.gouv.fr/adm/dagpb/bo/2005/05-08/a0080029.htm>

pour la microcystine-LR et la limite provisoire de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ admise pour cette toxine dans l'eau de boisson, ont été utilisées pour définir les niveaux à risque faible et modéré. Le niveau à haut risque a été défini sur la base des empoisonnements d'animaux et des problèmes sanitaires rapportés chez l'homme, après contact avec de l'écume. L'OMS précise que les neurotoxines constituent un danger moins important que les microcystines ou la cylindrospermopsine, car elles sont moins fréquentes et présentes en plus faibles quantités.

1.2.1.2. Programme de surveillance et de mise en alerte

• Seuil à faible risque sanitaire

À partir de l'étude épidémiologique de Pilotto *et al.* (1997), l'OMS a défini un premier seuil à $20\,000 \text{ cellules.mL}^{-1}$ estimé équivalent à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de chlorophylle-*a*, quand les cyanobactéries dominent pour prévenir les éventuels problèmes d'irritation et d'allergie attribués à des composés cyanobactériens autres que les cyanotoxines. Elle ajoute que des effets irritants ont été observés dans cette étude à partir de $5000 \text{ cellules.mL}^{-1}$, mais que cette valeur n'a pas été retenue car les effets sont légers et concernent un faible nombre d'individus.

Il est précisé qu'à cette densité cellulaire, la concentration potentielle en microcystine serait de l'ordre de 2 à $4 \mu\text{g.L}^{-1}$ (voire $10 \mu\text{g.L}^{-1}$) pour des proliférations dominées par des cyanobactéries productrices de microcystine. L'OMS considère qu'à ce stade, les risques sanitaires tels que des irritations cutanées, oculaires ou nasales et des désordres gastro-intestinaux sont faibles et les risques à long terme sont considérés comme improbables.

• Seuil à risque sanitaire modéré

Ce seuil de $100\,000 \text{ cellules.mL}^{-1}$ ou d'une concentration en chlorophylle *a* de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$, si les cyanobactéries sont dominantes, a été basé sur les considérations suivantes :

- pour un adulte de 60 kg, ingérant 200 mL d'eau en une seule fois ou 100 mL en deux fois au cours de la baignade. Pour une prolifération de *Microcystis aeruginosa* la concentration en cette toxine serait de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ (en prenant $2.10^{-7} \mu\text{g}$ de microcystine par cellule) et de $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ lors d'une prolifération de *Planktothrix agardii*.
- à partir de cette densité cellulaire, différentes espèces (*Microcystis* spp. et *Anabaena* spp. par exemple) sont susceptibles de former très rapidement de l'écume, ce qui peut entraîner localement des concentrations en toxine très élevées si ces espèces sont toxigènes.

À ces seuils, l'OMS considère que les risques à court terme tels que les irritations cutanées sont élevés et qu'il existe un risque modéré à long terme pour les nageurs et les pratiquants d'activités nautiques (ski nautique, planche à voile) susceptibles d'ingérer de l'eau accidentellement.

• Seuil à haut risque sanitaire

La présence d'écume caractérise ce troisième seuil. De nombreux cas d'empoisonnements mortels d'animaux ont été rapportés après ingestion d'écume (Francis 1878, Edwards *et al.* 1992, Mez *et al.* 1997, Mez *et al.* 1998). L'OMS signale que des problèmes sanitaires chez l'homme ont été suspectés après exposition à de l'écume et précise qu'à court terme, des risques d'empoisonnement sévères, voir mortels, sont théoriquement possibles pour des enfants évoluant dans de l'écume pendant une période prolongée et ingérant un volume d'eau important. Des maladies gastro-intestinales, des dommages hépatiques et des phénomènes d'irritation cutanée peuvent également survenir par ingestion d'eau ou par contact, respectivement.

1.2.1.3. Mesures à prendre

• Actions à court terme

L'OMS précise que les actions à mener devront être déterminées en fonction de l'importance de l'utilisation de l'eau et de l'évaluation des risques pour la santé publique.

Seuil à faible risque sanitaire. Il est recommandé d'une part d'apposer sur site des panneaux d'avertissement et d'autre part d'informer les autorités compétentes.

Seuil à risque sanitaire modéré. La surveillance et les mesures de protection doivent être renforcées. Les deux principales actions sont : le contrôle quotidien de la présence d'écume, qui peut se former très rapidement (si des espèces formant de l'écume sont présentes), et la prévention de l'exposition dans les zones propices à la formation d'écume. Il est recommandé également de suivre si les conditions sont favorables à la formation de l'écume. Les autorités compétentes doivent être averties. Des campagnes de sensibilisation du public aux dangers de l'écume doivent être mises en place et des panneaux d'avertissement érigés sur site. Enfin, des mesures de restriction de la baignade ou des activités nautiques peuvent être prises.

Seuil à haut risque sanitaire. Il convient de prendre des mesures immédiates pour éviter tout contact avec l'écume. La baignade pourra être interdite. Il est conseillé de faire également un suivi sanitaire. Les recommandations du seuil précédent peuvent être reprises ici.

L'information du public. En l'absence de mesures de contrôle des proliférations à effet immédiat, seules des dispositions visant à informer le public peuvent être efficaces. Ces informations sont les suivantes :

- Éviter les zones où des concentrations d'algues ou de cyanobactéries et/ou d'écume sont visibles dans l'eau ou sur les rivages, le risque sanitaire le plus important étant le contact direct avec l'eau ou l'ingestion d'eau.
- En l'absence d'écume mais avec une eau turbide et de coloration verdâtre intense, éviter les baignades et au moins ne pas immerger la tête si la transparence est inférieure à la hauteur du genou.
- Dans de telles circonstances, éviter le ski nautique à cause du risque lié à l'inhalation d'aérosol.
- Pour toute activité nautique susceptible de conduire à une immersion accidentelle en présence d'une efflorescence d'algues ou de cyanobactéries, porter des vêtements parfaitement étanches. L'eau qui séjourne longtemps entre la peau et les vêtements de sport nautique constitue un risque important d'éruption cutanée.
- Après les activités nautiques, se laver abondamment pour éliminer tout résidu d'algues ou de cyanobactéries.
- Laver soigneusement les affaires qui ont été en contact avec une efflorescence ou de l'écume d'algues ou de cyanobactéries.

• **Actions immédiates à effet à long terme**

Il s'agit de mesures destinées à réduire l'aptitude des milieux aquatiques à promouvoir les proliférations de cyanobactéries. Cet objectif peut être atteint en maintenant le phosphore total à des concentrations de 0,01-0,03 mg.L⁻¹. Il est à noter que, dans le document de l'OMS (2003), donne des valeurs de 0.01 – 0.03 µg.L⁻¹, probablement dues à une erreur de frappe, il s'agit de mg par litre et non de µg.

Afin de réduire la prolifération des cyanobactéries, l'OMS préconise une réduction ciblée des principales sources d'apport en phosphore, en particulier l'apport de fertilisants agricoles en utilisant, entre autres, des systèmes simples de protection des plans d'eau, tels que la plantation de haies sur des bandes de 20 mètres de large le long des rives permettant de réduire l'érosion et les transferts de phosphore par ruissellements.

1.2.2. Recommandations du National Health and Medical Research Council australien

1.2.2.1. Les bases

Le NHMRC (2004) considère, comme l'OMS, que le risque sanitaire principal est lié à l'ingestion de toxines car les enfants et les adultes peuvent, au cours d'activités récréatives, ingérer des quantités d'eau susceptibles d'engendrer des effets nocifs liés aux cyanotoxines (Chorus & Fastner 2001). Les recommandations australiennes concernent la gestion du risque lié à l'ingestion de microcystines.

La gestion du risque se décline en deux niveaux d'actions :

- 1 - l'identification des cours et plans d'eau à usage récréatif et leur classification en terme de vulnérabilité à présenter des proliférations algales ;
- 2 - l'application d'actions spécifiques en fonction de seuils de gestion.

Les seuils de gestion ont été dérivés à partir d'une concentration limite de microcystines dans l'eau de baignade, elle-même dérivée des données de l'étude de Falconer *et al.* (1994).

Pour la gestion du risque lié aux efflorescences de *M. aeruginosa*, espèce fréquente en Australie, la concentration limite de microcystines a été convertie en une valeur guide exprimée en nombre de cellules de *M. aeruginosa*.

Pour gérer les situations où d'autres espèces sont présentes, des valeurs guides de biovolume, calculées en équivalent *M. aeruginosa*, sont utilisées pour prendre en compte l'ensemble des cyanobactéries.

1.2.2.2. Arbre décisionnel, vulnérabilité des eaux de baignade

Les plans et cours d'eau doivent être classés comme étant ou non des « zones de baignade ou d'activité aquatique ». Dans l'affirmative, leur caractérisation s'ensuit afin d'estimer si le site présente des facteurs de risque de multiplication de cyanobactéries. Si le site est vulnérable, celui-ci doit faire l'objet d'une étude plus approfondie permettant de lui attribuer une classe de qualité à l'aide d'une grille présentant 5 niveaux (figure VI.2).

La classification du plan d'eau est réalisée d'après sa capacité à permettre un développement de cyanobactéries, par attribution d'une catégorie de susceptibilité, et d'après un historique des proliférations de cyanobactéries, lorsque des données sont disponibles. Les catégories de susceptibilité sont définies d'après des données environnementales telles que : la température, la concentration en phosphore total, la stratification thermique et les antécédents de contamination par les cyanobactéries (tableau VI-1). Cependant, le document guide ne présente que quelques combinaisons.

Figure VI-1 : Arbre de décision pour la classification des sites à risques (d'après NHMRC 2004).

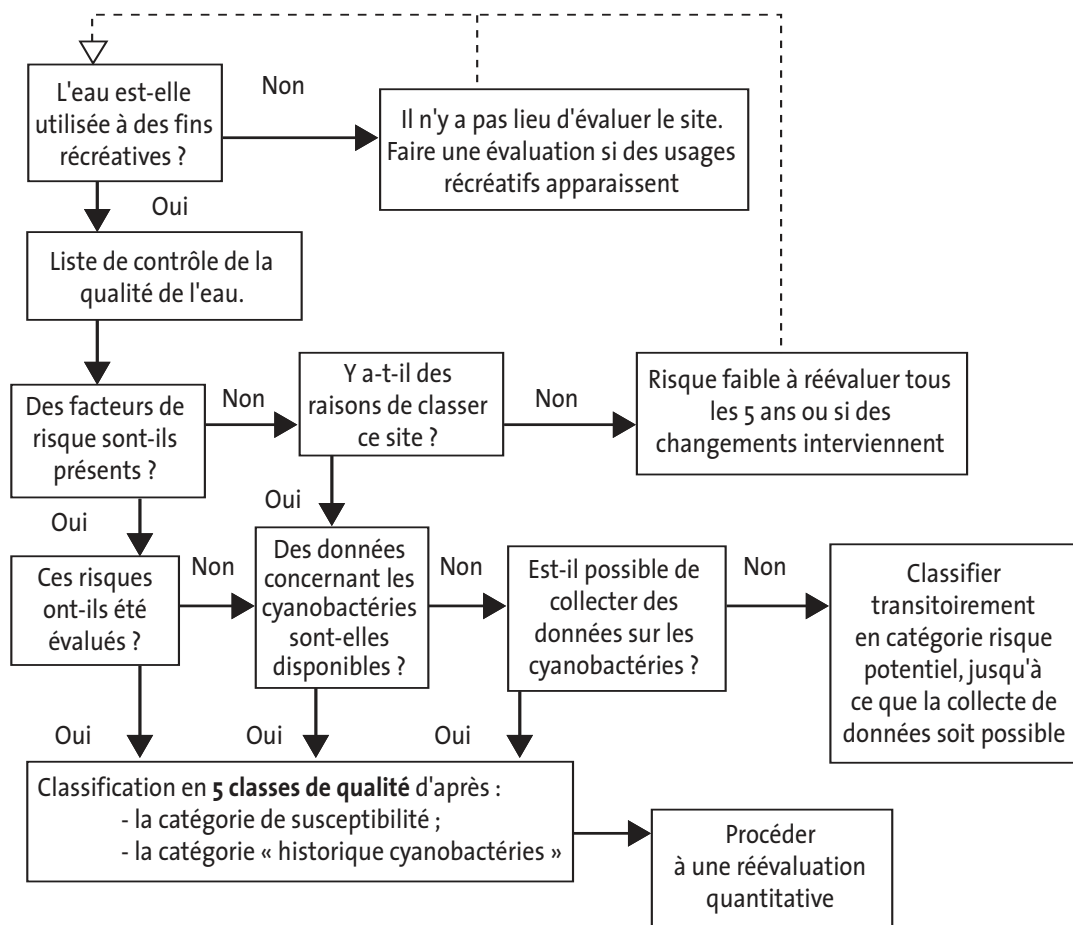


Tableau VI-I : Détermination des catégories de susceptibilité des plans d'eau à usage récréatif (d'après NHRMC 2004).

Facteurs environnementaux				
Historique cyanobactérie	Température de l'eau (°C)	Phosphore total (µg.L ⁻¹)	Stratification thermique	Catégorie de susceptibilité
Non	< 15	< 10	Absente	Très faible
Oui	15-20	< 10	Peu fréquente	Faible
Oui	20-25	10-25	Occasionnelle	Modérée
Oui	> 25	50-100	Fréquente et persistante	Haute
Oui	> 25	> 100	Très fréquente et persistante	Très haute

Cinq classes de qualité ont été définies en combinant les données de susceptibilité et d'historique de cyanobactéries : très bon, bon, passable, mauvais, très mauvais (tableau VI-II).

Pour les catégories « bon, passable, mauvais », il est recommandé de mettre en place un programme de surveillance et de mise en alerte, présenté en section 1.2.2.4. L'application de ce programme n'est pas nécessaire pour la catégorie « très bon » car la probabilité de dépassement des valeurs seuils est faible. Pour la catégorie « très mauvais », les activités récréatives sont déconseillées.

Lorsqu'une discordance est constatée entre la catégorie de susceptibilité et la catégorie « historique cyanobactéries », une réévaluation plus approfondie doit être effectuée (voir tableau VI-II).

Tableau VI-II : Détermination de la classe de qualité des plans d'eau à usage récréatif (d'après NHMRC 2004).

		Catégorie Historique Cyanobactérie			
		A < 500 cellules.mL ⁻¹	B [500 à 5000[cellules.mL ⁻¹ de <i>M. aeruginosa</i> ou biovolume de [0,05 à 0,5[mm ³ .L ⁻¹	C [5000 à 40 000[cellules.mL ⁻¹ de <i>M. aeruginosa</i> ou biovolume de [0,5 à 8[mm ³ .L ⁻¹	D ≥ 40 000 cellules.mL ⁻¹ de <i>M. aeruginosa</i> ou biovolume ≥ 8 mm ³ .L ⁻¹
Catégorie de susceptibilité	Très faible	Très bon	Bon	Passable	À réévaluer
	Faible	Bon	Passable	À réévaluer	À réévaluer
	Modérée	Passable	À réévaluer	Mauvais	Très mauvais
	Haute	À réévaluer	Mauvais	Très mauvais	Très mauvais
	Très haute	À réévaluer	Très mauvais	Très mauvais	Très mauvais

1.2.2.4. Programme de surveillance et de mise en alerte

• Niveau de surveillance (niveau vert)

Ce niveau est défini pour des concentrations en *Microcystis aeruginosa* comprises entre 500 et 5000 cellules mL⁻¹ ou pour un biovolume compris entre 0,05 et 0,5 mm³.L⁻¹ en présence d'autres cyanobactéries. Le NHMRC reconnaît que ces valeurs sont arbitraires mais indique que, dans certains cas, ce nombre de cellules peut constituer un stade précoce d'une prolifération.

• Niveau d'alerte (niveau orange)

Il est défini par une concentration en *Microcystis aeruginosa* supérieure à 5000 cellules.mL⁻¹ et jusqu'à 40 000 cellules.mL⁻¹, ou par un biovolume supérieur ou égal à 0,5 et inférieur à 8 mm³.L⁻¹ en présence d'autres cyanobactéries. Le NHMRC a retenu le seuil de 5 000 cellules.mL⁻¹ d'après les études de Pilotto *et al.* (1997, 2004), qui montrent que des troubles tels qu'irritations, désordres gastro-intestinaux, fièvre, état grippal sont possibles en présence de ce nombre de cellules.

• Niveau d'action (niveau rouge)

Il est atteint au-delà de 40 000 cellules.mL⁻¹ de *Microcystis aeruginosa* ou lorsque le biovolume est égal ou supérieur à 8 mm³.L⁻¹, en présence d'autres cyanobactéries avec dominance d'une espèce toxigène. Le NHMRC indique que ce biovolume doit s'appliquer aux cyanobactéries toxiques mais aussi aux cyanobactéries dont la toxicité n'a pas été testée.

Le seuil de 40 000 cellules.mL⁻¹ correspond, selon le calcul, au nombre de cellules pour le seuil de 8 µg.L⁻¹ de microcystines, considéré par les australiens comme permettant de garantir l'absence d'effets nocifs chez les enfants, lors d'une exposition subchronique liée aux eaux de baignade.

Le seuil pour les microcystines de 8 µg.L⁻¹ a été obtenu selon la formule et les valeurs paramétriques suivantes :

$\frac{100 \times 10 \times 10}{0,25 \times 5\ 000} = 8$
<p>100 µg.kg⁻¹.j⁻¹: DMENO 10 : pour passer de 100 mL (volume ingéré accidentellement) à 1 L. 10 kg : pour la masse corporelle moyenne d'un enfant. 0,25 : le nombre de jours d'exposition retenu (11 jours/an) est le quart du nombre de jours (44 jours) de l'étude dont provient la DMENO. 5 000 : Facteur de sécurité : 10 pour la variabilité interspécifique, 10 pour la variabilité intraspécifique, 10 pour l'incertitude cancérogénèse et 5 pour l'utilisation d'une DMENO à la place d'une DSENO.</p>

1.2.2.5. Mesures à prendre

Niveau vert. Ce seuil de mise en éveil doit permettre d'initier un programme de surveillance du site si celui-ci n'existe pas déjà. Le dénombrement et la caractérisation des espèces doivent être mis en œuvre. Il est recommandé d'être particulièrement attentif à la formation locale d'écume. Lorsque des espèces toxigènes sont présentes (*Microcystis aeruginosa*, *Anabaena circinalis*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Nodularia spumigena*), le dénombrement sera au minimum d'une fois par semaine. Pour les autres espèces, le risque étant considéré plus faible, un échantillonnage tous les 15 jours peut suffire. Le nombre de points de prélèvement représentatifs du site, dépendra de la taille du plan d'eau.

Niveau orange. Ce niveau doit faire, immédiatement, l'objet d'une notification et d'une consultation auprès des autorités sanitaires compétentes afin de statuer sur la nature de la prolifération. L'évaluation de la toxicité et l'analyse des toxines seront réalisées après avis et discussion avec les autorités sanitaires. En particulier, on considérera les espèces présentes et l'historique du site.

L'échantillonnage aura lieu deux fois par semaine, si des cyanobactéries toxigènes sont en forte proportion. Si le risque de toxicité est écarté, une fois par semaine ou tous les 15 jours peut suffire. Il conviendra également de suivre l'étendue et la répartition spatiale de la prolifération, en contrôlant différents points représentatifs du site. Il est recommandé de tester la toxicité de l'écume ou d'en analyser les toxines.

Niveau rouge. Ce niveau fait aussi l'objet d'une notification immédiate auprès des autorités locales et des autorités sanitaires compétentes. Le public est informé par les autorités compétentes (à travers les médias et par des indications sur site) que l'eau n'est pas convenable pour les activités récréatives et qu'il existe un risque sanitaire. Le contrôle de l'efflorescence devra se poursuivre comme pour l'alerte orange, en particulier pour constater le retour à la normale. Ces actions sont mises en place lorsque la présence des cyanobactéries toxigènes ou de cyanobactéries dont la toxicité n'a pas été évaluée est confirmée.

Informations destinées au public. Les recommandations destinées au public sont les mêmes que celles du guide de l'OMS 2003 à l'exception du point supplémentaire suivant: en cas de problème sanitaire, prendre un avis médical et informer les autorités responsables du site.

1.2.3. Recommandations de la région Hunter (Australie)

Quatre niveaux d'alerte ont été définis par le State Algal Coordinating Committee (SACC) sur la base des connaissances scientifiques récentes. Lorsqu'un niveau d'alerte est atteint, il est recommandé de prendre en considération : les conditions météorologiques, la saison, le lieu de l'échantillonnage et le niveau d'eau. Comme dans les guides précédents, la toxicité de la prolifération est à considérer en même temps que la densité de cellules (DIPNR 2004).

1.2.3.1. Programme de surveillance et de mise en alerte

• **Niveau d'alerte zéro**

Pour des concentrations de cyanobactéries inférieures à 500 cellules.mL⁻¹, le guide indique qu'aucun problème de qualité de l'eau n'est rapporté.

• **Niveau d'alerte faible**

Pour des concentrations de 500 à moins de 2000 cellules.mL⁻¹, le guide indique qu'une prolifération rapide de cyanobactéries est possible si les conditions sont favorables, et que le goût et l'odeur de l'eau peuvent être affectés.

• **Niveau d'alerte modérée**

De 2 000 à 15 000 cellules.mL⁻¹, une prolifération est en cours. L'eau peut changer de couleur, d'odeur et de goût. De l'écume peut également se former au-delà de 5 000 cellules.mL⁻¹.

• **Niveau d'alerte élevée**

Pour des concentrations en cyanobactéries potentiellement toxigènes supérieures à 15 000 cellules.mL⁻¹. Dans le cas où des cyanobactéries non toxigènes dominent, ce niveau est maintenu lorsque le biovolume est supérieur à 2 mm₃.L⁻¹. L'eau est considérée comme impropre aux activités récréatives à cause d'une toxicité potentielle. Son goût et son odeur peuvent être très affectés et la formation d'écume est probable.

1.2.3.2. Mesures à prendre

Alerte faible. Un programme de surveillance doit être établi.

Alerte modérée. La surveillance doit se poursuivre et les autorités sanitaires doivent être averties si la ressource est utilisée pour l'eau de consommation. Le programme de suivi doit également permettre de constater le retour en dessous du seuil de 2 000 cellules.mL⁻¹.

Alerte élevée. À ce stade, des informations doivent être diffusées par les médias et des avertissements pour le public seront placés judicieusement sur le site. Une évaluation de la toxicité sera mise en place. Le dénombrement des cellules doit être effectué de façon hebdomadaire, selon l'importance de l'écume. La surveillance et les actions entreprises se poursuivront jusqu'à ce que la concentration en cellules descende sous le seuil de 15 000 cellules.mL⁻¹ dans deux échantillonnages hebdomadaires consécutifs.

1.2.4. Recommandations du Queensland (Australie)

Le guide récapitulant les recommandations du Queensland (Queensland Health 2001) reprend celles de l'OMS et les valeurs seuils publiées en 2003 (OMS 2003).

1.2.5. Recommandations de la Tasmanie (Australie)

Les considérations portent sur l'eau de consommation et l'eau à usage récréatif. Trois niveaux d'alerte croissante, semblables à ceux de la région Hunter, ont été définis à partir des connaissances acquises sur les caractéristiques des proliférations de *Microcystis*. Il est indiqué que l'ingestion d'écume représente le danger le plus important (DPIWE 2001).

1.2.5.1. Programme de surveillance et de mise en alerte

• Niveau d'alerte 1

Ce niveau est défini pour des concentrations comprises entre 500 et 2 000 cellules.mL⁻¹. Il correspond au stade précoce d'une prolifération au cours duquel le goût et l'odeur de l'eau peuvent changer.

• Niveau d'alerte 2

Les concentrations en cellules varient de 2 000 à 15 000 cellules.mL⁻¹, ce qui correspond à une prolifération bien établie. La présence d'écume est de ce fait probable, ce qui constitue un risque sanitaire supérieur.

• Niveau d'alerte 3

Le niveau trois est atteint lorsque l'on dépasse les 15 000 cellules.mL⁻¹. À ce stade, en présence d'une prolifération toxique, les quantités de toxines sont élevées.

1.2.5.2. Mesures à prendre

Niveau 1. Initier un programme de suivi en routine, s'il n'est pas encore en place. Il doit comprendre l'identification des espèces en présence et l'inspection régulière de l'eau afin de détecter un éventuel changement de couleur ou l'apparition d'écume. Si de l'écume est présente, le public doit en être averti. Il sera également informé des mesures entreprises pour identifier les dangers éventuels.

Niveau 2. Les autorités sanitaires doivent être averties et la toxicité de l'efflorescence évaluée. Il est également nécessaire de prévenir le public par voie de presse et par une signalisation. La baignade devra être évitée dans de l'eau ayant changé de couleur ou dans des nappes d'écume, à cause des risques d'irritation des yeux et de la peau.

Niveau 3. Si l'efflorescence est reconnue toxique, les mises en garde des dangers liés aux activités récréatives doivent être renforcées (par voie de presse et par distribution d'avis dans les boîtes aux lettres). Des analyses de toxicité seront conduites deux fois par semaine.

1.2.6. Recommandations aux États-Unis

L'US-EPA (Environmental Protection Agency) n'a pas édité de recommandations sur le sujet. Il semble que tous les états ne sont pas au même stade de considération du risque « cyanobactérie » dans les eaux à usage récréatif. Lorsque cette prise en compte existe, les recommandations varient.

Le DHS (Department of Human Services) de l'Orégon recommandait en 2004 (DHS 2004) le seuil d'alerte de 15 000 cellules.mL⁻¹ pour *Anabaena flos aquae*. Actuellement, ce seuil est placé à 40 000 cellules.mL⁻¹ pour les efflorescences à *Microcystis* ou *Planktothrix* et à 100 000 cellules.mL⁻¹ quand d'autres cyanobactéries potentiellement toxiques sont présentes. Lorsque ces seuils sont atteints, il est recommandé de placer des avis sur site, destinés à prévenir le public (Dave Stone, Department of Human Service, communication personnelle).

Le Department of Health and Family Services de l'état du Wisconsin fait, quant à lui, référence aux recommandations de l'OMS (DHFS 2004).

Au sein d'un même état, on peut observer des différences de traitement selon les sites. Dans le Montana le lac Hebgen, qui est un grand lac populaire de baignade, est soumis à un programme de surveillance en été et en automne. Les sites stratégiques du lac sont régulièrement inspectés. Si une efflorescence est suspectée, un échantillon est envoyé pour une analyse microscopique. Si besoin, un test de toxicité est réalisé (Michael Suplee, Montana Department of Environmental Quality, communication personnelle).

1.2.7. Le réseau de surveillance des cyanobactéries et de leurs toxines en Finlande

1.2.7.1. Les bases

Les problèmes de nuisance liés aux cyanobactéries sont connus en Finlande depuis 1967 (Rapala *et al.* 2005a). La prise en considération de ces problèmes repose sur un réseau national de surveillance et de collecte de données qui permet une bonne connaissance du terrain. Cette longue expérience de suivi des cyanobactéries a mis en évidence que la majorité des proliférations en Finlande sont toxiques. Elle a également permis de révéler les sites à risque.

Le programme de surveillance proposé pour les eaux de baignade est basé essentiellement sur l'observation. Les cyanobactéries ne sont pas distinguées des algues. Les raisons de ce choix sont fondées sur le fait que l'observation permet une réactivité immédiate comparée à l'analyse des toxines, la mise en garde rapide des usagers étant l'objectif prioritaire. Le suivi par observation est d'un bon rapport coût/efficacité.

Rapala *et al.* (2005a) soulignent que la surveillance de certains lacs et l'analyse des toxines ont permis de montrer une bonne corrélation entre la biomasse cyanobactérienne mesurée et la quantité de microcystine. Ils considèrent que l'observation ou l'examen microscopique permettent une bonne estimation du risque lié aux cyanobactéries.

1.2.7.2. Programme de surveillance et de mise en alerte

L'abondance des cyanobactéries est contrôlée, de juin à août, de façon hebdomadaire par les services de santé ou de l'environnement locaux ou par des volontaires. Ces personnes ont été formées afin que les observations soient harmonisées. Quatre niveaux de classement ont été définis :

- **Niveau zéro.** Absence d'algues à la surface de l'eau ou sur la plage. La transparence de l'eau mesurée au disque de Secchi est normale.
- **Niveau 1.** Présence d'algues : des flocons verdâtres sont visibles à la surface de l'eau, dans un échantillon placé dans un flacon transparent, ou sur le rivage. La transparence de l'eau est réduite par les algues.
- **Niveau 2.** Abondance d'algues : l'eau a pris une nette coloration. Des tâches d'écume sont visibles sur l'eau ou la plage.
- **Niveau 3.** Forte abondance d'algues : on observe des nappes d'écume ou d'épais agrégats sur le rivage.

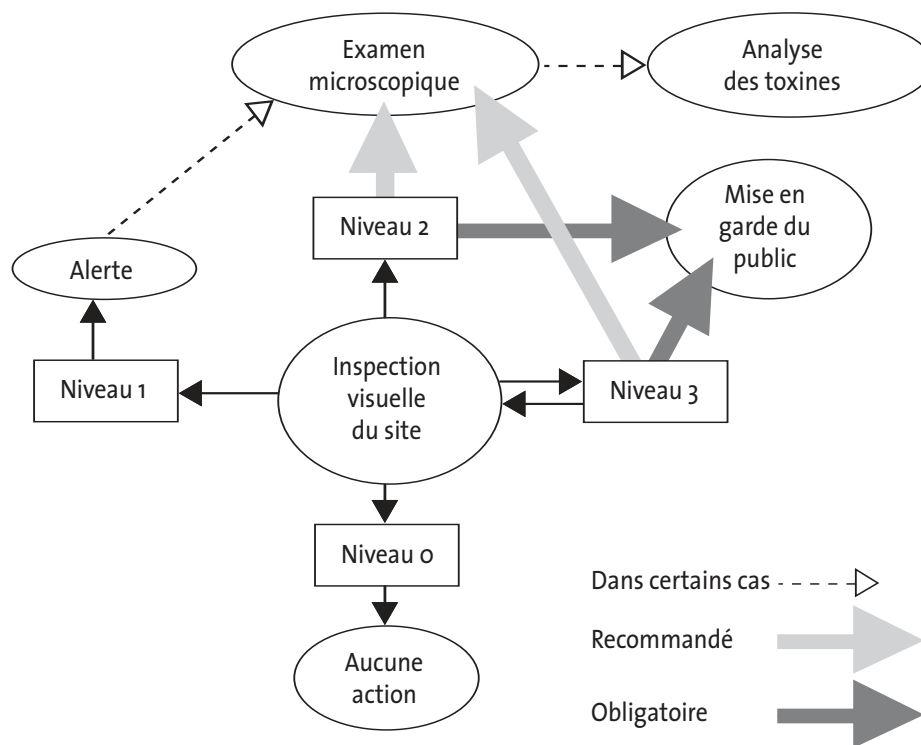
1.2.7.3. Mesures à prendre

Niveau 1. Une alerte est déclenchée. Elle peut conduire dans certains cas (problème sanitaire, empoisonnement d'animaux, persistance des cyanobactéries, fréquentation de la plage, etc.) à un examen microscopique et à l'analyse des toxines.

Niveaux 2 et 3. L'examen microscopique est conseillé et la mise en garde du public est obligatoire.

La figure VI-2 résume les différentes situations envisagées et les recommandations :

Figure VI-2 : Arbre de décision en Finlande (d'après Rapala *et al.* 2005).



Il est à noter que depuis 1998, le public a été impliqué dans la démarche de surveillance par le biais de numéros d'appel permettant de recueillir des témoignages.

1.2.8. Recommandations aux Pays-Bas

1.2.8.1. Les bases

Les recommandations de ce pays sont basées sur la DJT de la microcystine-LR proposée par l'OMS et la valeur admissible pour l'eau de boisson ($1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) qui en découle. La quantité d'eau susceptible d'être ingérée au cours d'une baignade est estimée à 100 mL et on a considéré que la baignade avait lieu tous les jours (exposition chronique). L'historique des sites (antécédents de proliférations de cyanobactéries, décolorations de l'eau et problèmes sanitaires) est également pris en considération de façon à alléger l'ensemble du travail de surveillance (Ibelings 2005).

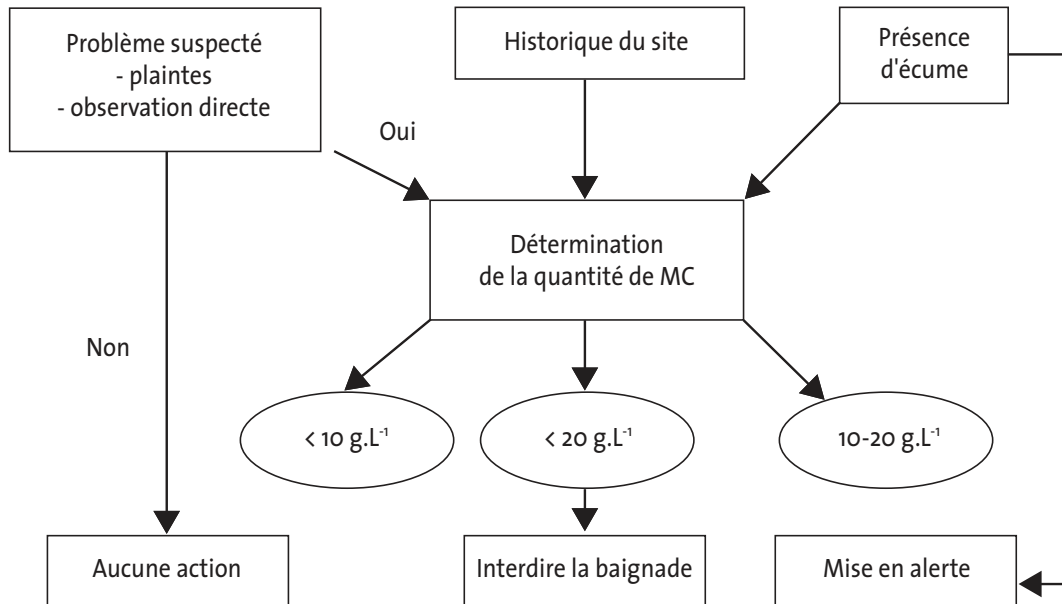
1.2.8.2. Programme de surveillance et de mise en alerte

Trois niveaux d'action ont été définis :

- ***mise en alerte*** : niveau déclenché lorsque la concentration en MC-LR est supérieure à $10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,
- ***mise en alerte, suivi prolongé et interdiction de la baignade*** : $\text{MC-LR} > 20\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,
- ***mise en alerte, suivi prolongé et quantification des toxines*** : présence d'écume.

La figure VI-3 présente les différentes situations envisagées :

Figure VI-3 : Arbre décisionnel aux Pays-Bas (Ibelings 2005).

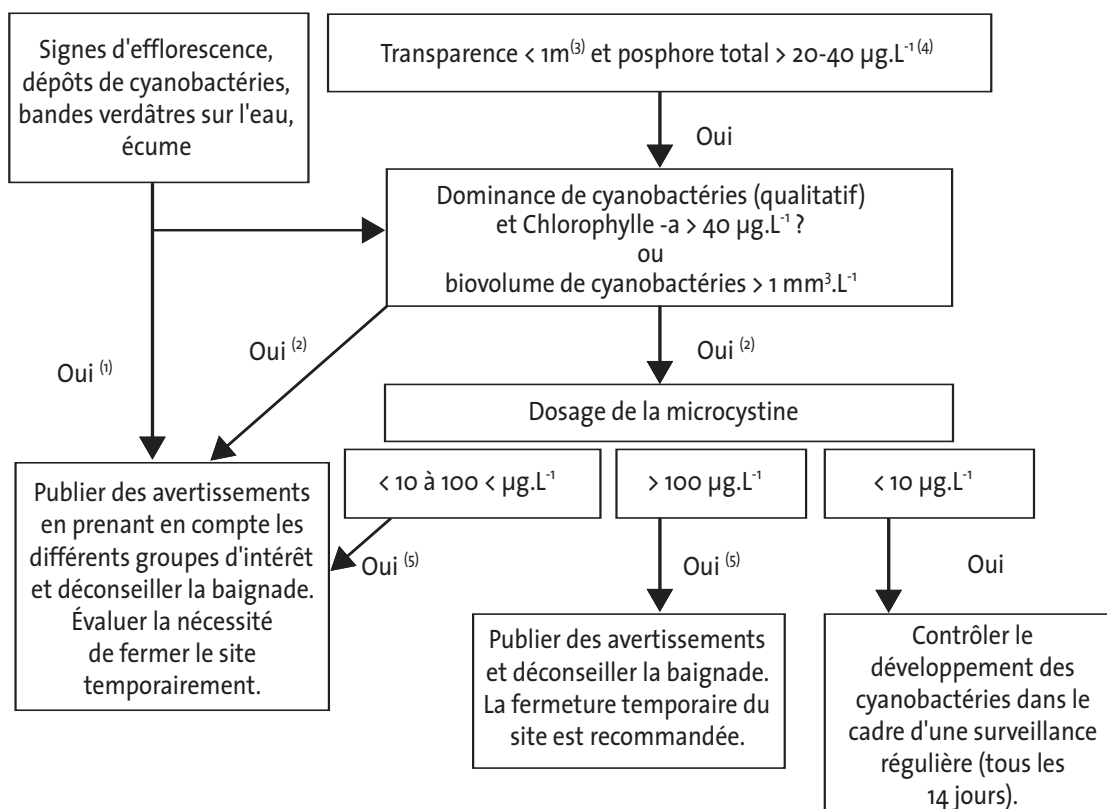


Dans le texte est précisé que le suivi des sites a permis de montrer que des valeurs supérieures à $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcystine pouvaient être atteintes pour des valeurs modestes de chlorophylle *a* (à partir de $22 \mu\text{g.L}^{-1}$) (Ibelings 2005).

1.2.9. Recommandations en Allemagne

Ces recommandations émanent du ministère de l'environnement. La surveillance débute par un contrôle d'indices d'efflorescence, de la transparence de l'eau et du statut du phosphore total (Chorus 2005). Il n'y a pas de seuil formel d'interdiction de la baignade. En effet, au seuil $> 100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR la baignade est déconseillée et la fermeture du site est recommandée. La figure VI-4 présente les différentes situations envisagées.

Figure VI-4 : Arbre décisionnel en Allemagne (d'après Chorus 2005).



- 1 : lorsque l'on a une bonne connaissance du plan d'eau et de sa susceptibilité aux efflorescences de cyanobactéries ;
 2 : selon estimation de la situation concrète, donner des avertissements provisoires et faire une surveillance renforcée du site ;
 3 : à appliquer seulement quand la profondeur de l'eau est > à 1 m. Les cyanobactéries coloniales peuvent former des efflorescences à des transparences d'environ 2 m ;
 4 : dans des eaux qui possèdent des strates thermiques et particulièrement dans de vastes plans d'eau, des cyanobactéries peuvent dominer à partir de 20 µg.L⁻¹ de phosphore total (et parfois moins). Dans de petits plans d'eau bien mélangés, la dominance commence plutôt à partir de 30-40 µg.L⁻¹ ;
 5 : intensifier la surveillance du développement des cyanobactéries).

1.2.10. Recommandations au Canada (INSPQ, 2005)

Le Groupe Scientifique sur l'Eau de l'Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ) a élaboré des recommandations (2005b) qui nuancent l'avis de Santé Canada qui considère que le dénombrement cellulaire n'est pas un indicateur fiable ou représentatif des concentrations en toxines (Santé Canada, 2003).

L'absence de données démontrant que des effets irritants soient engendrés par les cyanobactéries lors de la baignade a conduit l'INSPQ à rejeter le seuil à faible risque sanitaire (risques passagers d'irritations) défini par l'OMS à 20 000 cellules.mL⁻¹. En revanche, le seuil de 100 000 cellules.mL⁻¹ est considéré comme un élément décisionnel complémentaire lors de l'évaluation d'une situation donnée.

Les recommandations mettent l'accent sur le fait que les valeurs seuil ne sont pas des critères réglementaires ou des normes et qu'elles ne doivent pas se substituer au jugement professionnel et à la prise en compte de l'ensemble de la situation. Elles constituent seulement un élément provisoire de décision accompagnant la gestion.

• Seuil d'alerte.

Des seuils d'alerte de 16 µg.L⁻¹ d'équivalent microcystine-LR et de 40 µg.L⁻¹ d'anatoxine-a ont été définis d'après une évaluation de la concentration limite d'exposition qui permet de garantir l'absence d'effets nocifs chez les enfants. Le scénario retenu est celui d'un enfant de 10 kg, ingérant un volume de 250 mL au cours d'une session aquatique. Les valeurs toxicologiques retenues pour la microcystine et l'anatoxine-a sont respectivement, les DSENO de 40 µg.kg⁻¹.j⁻¹ (Fawell *et al.* 1994, Fawell *et al.* 1999a) et de 100 µg.kg⁻¹.j⁻¹ (Fawell *et al.* 1999b). Un facteur d'incertitude de 100 a été appliqué à chacune de ces valeurs dans les calculs.

• **Mesures à prendre**

En cas de prolifération, l'INSPQ recommande d'informer la population d'éviter les activités aquatiques impliquant un contact avec l'eau.

Si les seuils d'alerte sont dépassés même après disparition de l'efflorescence, la recommandation précitée doit être maintenue.

1.2.11. Recommandations en France

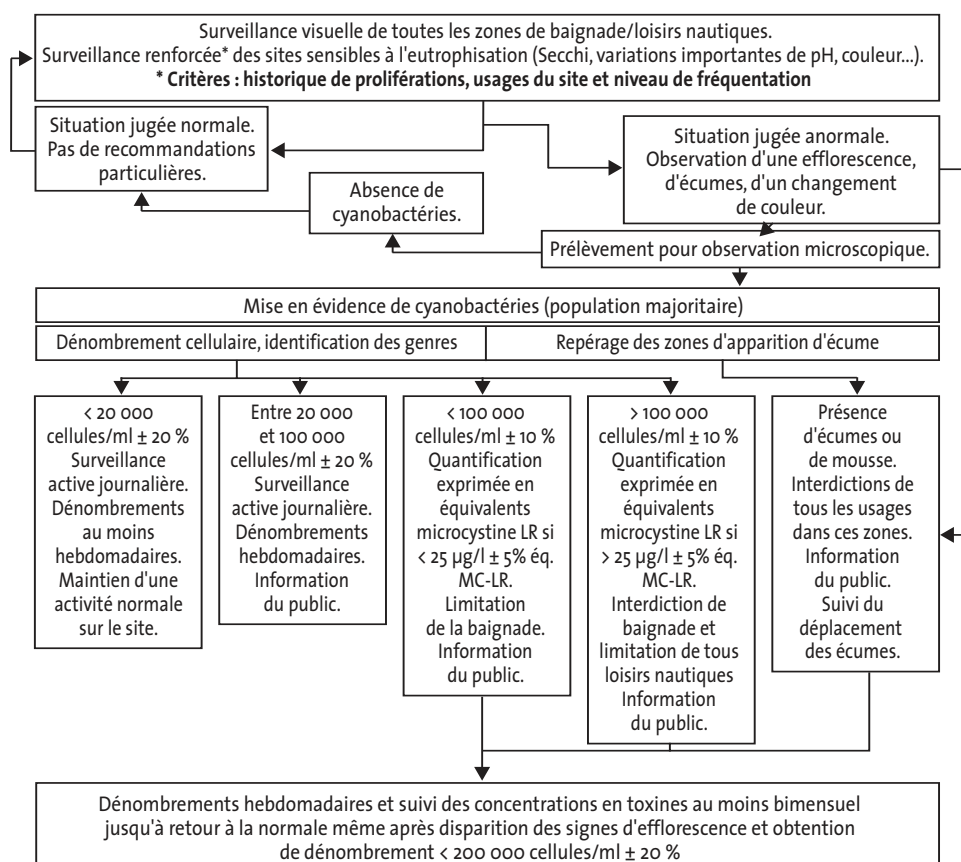
1.2.11.1. Les bases

Des recommandations de surveillance et gestion de phénomènes de prolifération de cyanobactéries dans des eaux de baignade ont été publiées par la Direction générale de la santé (circulaire DGS/SD7A 2003/270, 2004/364, 2005/304) sur la base d'un avis du Conseil supérieur d'hygiène publique de France (avis du CSHPF du 6 mai 2003). La surveillance et le contrôle sanitaire ne concernent que les sites de baignade ou activités aquatiques aménagés et est effectuée sous la responsabilité de la personne publique ou privée responsable de la gestion de la zone de baignade ou de loisirs nautiques. La surveillance sanitaire est organisée sur la base de trois aspects : vulnérabilité des eaux (site à faible risque ou à risque), comptage cellulaire et dosage des microcystines en équivalent microcystine-LR.

1.2.11.2. Programme de surveillance et mesures à prendre

Les gestionnaires de sites ou le maire concerné doivent mettre en place un système de surveillance renforcé pour les sites à risque (sensibles à l'eutrophisation, ayant déjà présenté des proliférations de cyanobactéries ou présentant une forte fréquentation) et un système de surveillance visuelle pour les autres sites (circulaire DGS/SD7A 2003/270, 2004/364, 2005/304).

Figure VI-5: Arbre décisionnel en France (d'après l'avis du CSHPF, 6 mai 2003).



* Surveillance renforcée : observation visuelle et mesure de la turbidité ou observation au disque de Secchi ou mesure du pH. Suivi éventuel de la chlorophylle-a (entre 10 et 50 µg.L⁻¹ : niveau d'alerte, > 50 µg.L⁻¹ : niveau préoccupant si la dominance des cyanobactéries est établie). La chlorophylle a ne doit pas être considérée comme un indicateur spécifique des cyanobactéries.

Dans l'avis du 6 mai 2003 du CSHPF, la gestion des phénomènes de prolifération des cyanobactéries est basée sur les résultats des observations microscopiques et du dénombrement cellulaire. En cas de présence majoritaire des cyanobactéries, des actions spécifiques sont à mettre en place en fonction des deux niveaux seuils de cellules tels que recommandé par l'OMS et des recommandations spécifiques en cas d'apparition d'écume ou mousse.

• Niveau I

- Comptage inférieur à 20 000 cellules.mL⁻¹ ± 20% (cyanobactéries en population majoritaire).

Gestion : maintien d'une activité normale sur le site mais information du public et des usagers du site par la pose de panneaux exclusivement au niveau des zones de dépôts d'efflorescence ou d'écume (à adapter en fonction des variabilités géographiques liées aux vents).

Surveillance : poursuite de la surveillance visuelle renforcée de manière journalière. Réalisation d'un comptage cellulaire et d'une identification des espèces de cyanobactéries au moins bi-mensuelle.

- Comptage compris entre 20 000 et 100 000 cellules.mL⁻¹ ± 20% (cyanobactéries en population majoritaire).

Gestion : pas de restrictions d'utilisation du site mais information du public et des usagers du site par la pose de panneaux, notamment au niveau des zones de plus forte présence d'algues (variable en fonction du vent) et des zones d'usages.

Surveillance : poursuite de la surveillance visuelle renforcée quotidienne du site, observation microscopique, dénombrement et identification d'espèces à une fréquence d'échantillonnage hebdomadaire.

- Comptage supérieur à 100 000 cellules.mL⁻¹ ± 10% (cyanobactéries en population majoritaire).

Gestion : passage au dispositif de gestion et suivi de niveau II.

• Niveau II

Réalisation d'une recherche et d'une quantification de toxines. Pour ce faire, et en attendant de méthodes normalisées, il est recommandé de procéder à une analyse selon la méthode d'inhibition de l'activité enzymatique de la PP2A exprimée en équivalent microcystine-LR. Si le laboratoire ne dispose pas de cette méthode, et bien que ne donnant pas une réponse de même nature, il est également possible de réaliser des dosages de microcystines par essai immunologique (résultat exprimé en équivalent microcystine-LR) ou par couplage chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse.

- Concentration en équivalent MCs inférieure à 25 µg.L⁻¹ ± 5 %.

Gestion : limitation de la baignade selon la localisation journalière des zones de plus forte présence de cyanobactéries et des résultats analytiques des zones d'eau échantillonnées; Information du public et des usagers du site par la pose de panneaux, notamment au niveau des zones de plus forte présence d'algues (variable en fonction du vent) et des zones d'usages.

Surveillance : poursuite du suivi avec une fréquence hebdomadaire (dénombrement cellulaire, si ce dernier est supérieur à 100 000 cellules.mL⁻¹, nouvelle mesure de concentration de toxines).

- Concentration en équivalent MCs supérieure à 25 µg.L⁻¹ ± 5 %.

Gestion : interdiction de la baignade et limitation d'usages pour les loisirs nautiques individuels ou collectifs. Information du public et des usagers du site par la pose de panneaux, notamment au niveau des zones de plus forte présence d'algues (variable en fonction du vent) et des zones d'usages.

Surveillance : poursuite du suivi avec une fréquence hebdomadaire (dénombrement cellulaire, si ce dernier est supérieur à 100 000 cellules.mL⁻¹, nouvelle mesure de concentration de toxines).

• Niveau III

La présence de mousse ou d'écume sur une aire de la zone, conduit au déclenchement du dispositif de suivi de niveau III.

Gestion : interdiction de la baignade et de toutes les autres activités de loisirs nautiques dans les zones concernées. Prévenir tout contact de personnes ou d'animaux avec les écumes.

Information du public et des usagers du site par la pose de panneaux, notamment au niveau des zones de plus forte présence d'algues (variable en fonction du vent) et des zones d'usages.

Surveillance : suivi de l'évolution des mousses ou écumes et de leur localisation, poursuite du suivi du site avec une fréquence hebdomadaire (dénombrement cellulaire et identification). Suivi des concentrations en toxines au moins bi-mensuel.

En cas de doute sur les résultats du suivi analytique et en fonction des conditions environnementales, des mesures plus contraignantes concernant la restriction de pratique des activités nautiques peuvent être prises par les autorités locales ou les responsables et éducateurs sportifs qui travaillent sur les zones d'activités nautiques.

L'information du public (extrait de l'avis du 6 mai 2003).

Le CSHPF propose que dans le message d'information au public et aux usagers des sites de baignade présentant des phénomènes de proliférations algales soient indiqués :

- les effets possibles lors d'un contact avec de l'eau contaminée par des cyanotoxines (irritations et rougeurs de la peau, du nez, de la gorge, des yeux, des muqueuses) et lors de son ingestion: maux de ventre, diarrhées, nausées, vomissements ;
- les résultats de la surveillance ;
- des conseils aux usagers en rappelant d'éviter absolument de se trouver en contact avec des zones de dépôts abondants et d'irisations de couleur verte et de mousses.

1.3. Synthèse

Un nombre restreint de pays disposent aujourd'hui de recommandations pour la surveillance sanitaire de la contamination des eaux de zones de baignade et d'activités aquatiques et sa gestion en cas de prolifération de cyanobactéries ou de contamination par des cyanotoxines. Les recommandations existantes sont généralement basées sur celles de l'OMS, des spécificités sont toutefois observées dans les plans de gestion de l'Australie, de l'Allemagne et des Pays-Bas.

Toutes les recommandations s'accordent sur le fait que la présence d'écume est un indicateur d'un risque sanitaire élevé. Ainsi, l'observation visuelle régulière des cours et plans d'eau constitue la base de la surveillance. En revanche, l'absence d'écume ne permet pas d'exclure un risque compte tenu du fait que certaines cyanobactéries comme *Planktothrix agardhii* produisent de grandes quantités de toxines sans former d'écume.

Globalement, la plupart des institutions considèrent que :

- la prévention des risques liés aux cyanobactéries pour les baignades, commence par une connaissance de la vulnérabilité d'un site en utilisant les critères tels que l'historique des proliférations, les saisons à risque, les types d'activité pratiqués, le niveau d'eutrophisation de l'eau ou encore la concentration en phosphore ;
- le risque le plus important est associé à l'ingestion d'eau lors de la baignade et la pratique d'activités aquatiques, particulièrement en présence d'écume.

Au-delà de la surveillance visuelle, des valeurs guides pour des paramètres de surveillance et de contrôle sanitaire ont été dérivées à partir de concentrations limites d'exposition permettant de garantir l'absence d'effets nocifs. Ces concentrations limites d'exposition ont été calculées d'après des scénarios théoriques prenant en compte des valeurs pour le volume ingéré, la masse corporelle et les VTR qui varient selon les institutions. Ces divergences conduisent à des valeurs guides différentes.

Les valeurs guides élaborées pour le paramètre « toxine » concernent dans la plupart des cas la MC LR, compte tenu de leur toxicité, de leur abondance dans les écosystèmes et des connaissances toxicologiques dont on dispose.

En ce qui concerne les neurotoxines, seul l'INSPQ a développé une valeur d'exposition maximale pour l'anatoxine-a.

Les paramètres de surveillance et de contrôle sanitaire sont généralement: le nombre de cellules par mL, la concentration en microcystines ($\mu\text{g.L}^{-1}$), la concentration en chlorophylle *a* ($\mu\text{g.L}^{-1}$). Les valeurs guides et les principales recommandations, retenues pour différents pays, sont résumées dans le tableau VI-III.

La gestion des cas de dépassement des valeurs seuils ou guides se fait en fonction de l'amplitude du dépassement du seuil considéré à faible risque. L'interdiction d'accès au plan d'eau à tous les usages ou à la baignade varie selon les institutions.

En France, il apparaît nécessaire de remédier à l'absence de surveillance et de contrôle sanitaire des zones de baignades et des loisirs aquatiques à faible fréquentation par un public pratiquant la « baignade spontanée » et à l'absence de recommandation précise sur la levée de l'interdiction de la baignade et des activités aquatiques.

Points à retenir

- Moins de 10 pays dans le monde ont élaboré des recommandations de surveillance sanitaire et de gestion de la prolifération de cyanobactéries dans les cours et plans d'eau aménagés pour la baignade ou la pratique des activités aquatiques.
- La plupart de ces recommandations sont proches de celles de l'OMS.
- L'historique et les caractéristiques des sites (vulnérabilité à la prolifération, antécédents de proliférations et de problèmes sanitaires, espèces de cyanobactéries présentes...) sont les éléments clés de la gestion du risque préconisés dans la plupart des recommandations.
- Les paramètres de surveillance sanitaire en cas de prolifération algale sont généralement la surveillance visuelle, le dénombrement de cyanobactéries (avec ou sans identification d'espèce), et la concentration en microcystines.
- La surveillance visuelle des sites est recommandée afin de détecter la présence éventuelle d'écume ou de zones d'accumulation qui constituent le niveau à plus haut risque sanitaire.
- Lorsque la gestion de phénomènes de prolifération de cyanobactéries se base sur les concentrations cellulaires, les valeurs paramétriques pour un risque faible varient selon les pays entre 500 et $< 20\ 000\ \text{cellules.mL}^{-1}$. Pour un risque élevé avec interdiction de la baignade celles-ci varient de $> 15\ 000$ à $> 100\ 000\ \text{cellules.mL}^{-1}$.
- Lorsque la gestion de phénomènes de prolifération de cyanobactéries est basée sur la concentration en « équivalent microcystine-LR », des valeurs comprises entre > 16 et $100\ \mu\text{g.L}^{-1}$ sont préconisées pour éviter ou interdire la baignade.
- Une seule institution a dérivé une VTR pour l'anatoxine-a et propose un seuil d'exposition maximale de $40\ \mu\text{g.L}^{-1}$ pour les eaux de baignade.
- En France, la surveillance et le contrôle sanitaire ne concernent que les sites de baignade et autres activités aquatiques récréatives dits « aménagés », correspondant à des sites à fréquentation répétée et simultanée par au moins 10 personnes. La surveillance est effectuée sous la responsabilité de la personne publique ou privée responsable de la gestion de la zone de baignade ou d'activité récréative. La surveillance sanitaire est organisée sur la base de quatre aspects : vulnérabilité des eaux (site à faible risque ou à risque), comptage cellulaire et dosage des microcystines en équivalent microcystine-LR et présence ou non d'écume.

Tableau VI-III : Valeurs guides et principales recommandations retenues pour différents pays (MC-LR : Microcystine LR ; MCs somme des microcystines).

Niveau	Actions	Paramètres	OMS	Allemagne	Australie		Canada	Finlande	France	Pays Bas
					NHMRC*	Hunter et Tasmanie	INSPQ			
I	Surveillance régulière situation normale	Nombre de cyanobactéries (cellules.mL ⁻¹)	20000		500 à 5000 <i>Microcystis aeruginosa</i>	500 à 2000			< 20 000	
		MC-LR ou MCs (µg.L ⁻¹)	2 à 4 (MC-LR) si cyanobactéries toxigènes	< 10						< 10 µg.L ⁻¹
		Indicateur	10 µg de chlorophylle a.L ⁻¹					Transparence réduite		
II	Renforcement de la surveillance et interdiction de la baignade avec maintien des activités nautiques	Nombre de cyanobactéries (cellules.mL ⁻¹)	100 000		5000 à 40000 <i>Microcystis aeruginosa</i>	2000 à 15000	100000		20 000 à 10 000	
		MC-LR ou MCs (µg.L ⁻¹)	20 à 100 MC-LR selon souche de <i>Microcystis aeruginosa</i> 40 MC-LR si <i>Plantohrix agardhii</i>	10 à < 100	8		> 16 (MC- LR ou 40 µg.L ⁻¹ anatoxine a		< 25 (MC-LR)	
		Indicateur	50 µg de chlorophylle a.L ⁻¹					Eau colorée et tâches d'écume		10 -20
III	Interdiction de la baignade	Nombre de cyanobactéries (cellules.mL ⁻¹)	Écume (plusieurs centaines à plusieurs millions de cyanobactéries)		> 40000 <i>Microcystis aeruginosa</i>	> 15000 cellules toxigènes			> 100 000 (avec maintien limité des activités nautiques)	
		MC-LR ou MCs (µg.L ⁻¹)		> 100					> 25 (MC-LR) (avec interdiction des activités nautiques)	> 20
		Indicateur						Nappes d'écume	Présence d'écume	Présence d'écume

2. Eau d'alimentation et autres aliments

2.1. Recommandations de l'OMS

2.1.1. Valeur guide pour la qualité de l'eau d'alimentation

Les toxines de cyanobactéries ont été considérées dès 1998 dans la liste des constituants organiques évalués des *Directives de qualité pour l'eau de boisson* de l'OMS (OMS 1998). Les données toxicologiques disponibles ont été jugées insuffisantes pour fixer des valeurs guides pour les toxines de cyanobactéries, à l'exception de la microcystine-LR (MC-LR).

Pour fixer la valeur guide pour ce variant de microcystine, l'OMS a retenu une étude de 13 semaines chez la souris par voie orale. La DSENO a été évaluée sur la base des troubles hépatiques observés à $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$.

L'application d'un facteur d'incertitude de 1 000 (10 pour les variations intraspécifiques, 10 pour les variations interspécifiques, 10 pour les limites de la base de données, en particulier le manque de données sur la toxicité chronique et la cancérogénicité) conduit à une DJT de $0,04 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$.

L'eau de boisson est considérée comme la principale source d'intoxication par les toxines de cyanobactéries, sa contribution relative à l'exposition a été estimée à 80 %. Pour un individu de 60 kg, la **valeur guide pour l'eau de boisson**, pour une consommation pendant la vie entière, est donc fixée pour la **microcystine-LR totale** (libre et intracellulaire) à $1 \mu\text{g MC LR}\cdot\text{L}^{-1}$.

Cette valeur guide, qui a été confirmée par une étude de 44 jours par voie orale chez le porc, demeure provisoire, dans l'attente de données complémentaires sur la toxicité des toxines de cyanobactéries et notamment sur la toxicité chronique de la microcystine-LR.

Dans son ouvrage de 1999 consacré aux cyanobactéries toxiques, l'OMS rappelle la méthode de fixation de cette valeur guide (Chorus & Bartram 1999). Pour la microcystine-LR, il est indiqué que le dépassement de la valeur guide de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, définie pour une exposition vie entière, peut être toléré pour de brèves périodes si des mesures sont mises en œuvre pour interrompre l'exposition par des traitements préventifs ou curatifs. Il peut s'avérer approprié, dans ces cas, d'informer la population en particulier les sous-populations sensibles : patients avec des affections hépatiques, parents des nourrissons et des enfants en bas-âge, centres de dialyse ou patients dialysés à domicile.

Les auteurs rappellent l'existence de plus de 60 variants de la microcystine-LR et la possibilité pour que cette dernière toxine ne soit pas présente parmi les microcystines détectées, ce qui entraîne des difficultés d'interprétation des résultats au regard de la valeur guide. Les résultats concernant des variants pour lesquels il n'existe pas d'étalons peuvent être exprimés en concentration équivalente de microcystine-LR. La toxicité de la plupart des variants étant inférieure à celle de la microcystine-LR voire nulle, cette concentration équivalente ne correspond pas à un équivalent toxicité. Cette approche conduit à une estimation « dans le pire des cas » de la concentration en microcystines toxiques. Les concentrations résultant d'essais sur souris peuvent être exprimées en équivalents toxicité par rapport à la microcystine-LR si l'essai a été calibré avec cet étalon. Il n'est pas certain que les résultats d'essai sur protéines phosphatases puissent bénéficier du même traitement. En effet la capacité des différents variants à entrer dans les cellules et à réagir sur ces enzymes est variable et influe sur la toxicité.

Dans la troisième édition des *Guidelines for drinking-water quality*, l'OMS note l'activité de promotion tumorale de cette toxine démontrée par différentes publications (OMS 2004). La valeur guide provisoire est maintenue à la suite d'une évaluation de risque conduite en 2003. Plutôt que de réaliser un suivi purement analytique de la toxine, l'OMS préconise de suivre dans les ressources l'augmentation de la densité cellulaire des cyanobactéries ou la capacité à générer une prolifération. Dans ces situations, une vigilance accrue est recommandée.

2.1 2. Autres recommandations de l'OMS (Chorus & Bartram 1999)

2.1.2.1. Mesures préventives

Selon l'OMS, on peut considérer comme fiable un système de production et de distribution d'eau dont la ressource ne contient pas de cyanotoxines ou qui comprend une chaîne de traitement capable aussi bien d'extraire les cellules sans les rompre que d'éliminer les cyanotoxines. L'OMS estime que bien souvent il est possible de maîtriser efficacement ce danger sans faire appel à des techniques de traitement poussées, par la gestion de la ressource et le retrait des cellules intactes. Cette organisation souligne que la plupart des épisodes d'intoxication humaine par l'eau d'alimentation ont eu lieu suite à l'utilisation de sulfate de cuivre sur une prolifération établie de cyanobactéries.

Parmi les pratiques sécuritaires, l'OMS considère comme très efficace le recours à une ressource de substitution. Elle incite à l'enregistrement de la tendance de la ressource à subir des proliférations et à la mise en place de schémas combinant la surveillance de la dynamique de ces organismes et des actions de gestion appropriées en fonction de la vulnérabilité du système de production d'eau d'alimentation vis-à-vis de ces événements.

2.1.2.2. Évaluation de la vulnérabilité des systèmes de production-distribution

L'OMS propose un arbre de décision pour évaluer le niveau de protection d'un système de production-distribution par rapport au risque représenté par les cyanotoxines. Cet arbre de décision fait appel à différents critères pour définir 7 niveaux de protection :

- présence d'une étape d'ozonation ou de filtration sur charbon actif, garantie des performances de la filière en cas de charge organique importante ;
- existence d'un système de surveillance de la présence des cyanobactéries ;
- capacité de la filière à éliminer les cellules de l'eau ;
- présence de conditions conduisant à la rupture des cellules avant que l'eau ne soit captée ;
- présence de genres potentiellement producteurs de saxitoxines ou d'anatoxines ;
- présence d'une étape de chloration de l'eau.

Le rapprochement du niveau de protection du système de production et de distribution d'eau ainsi déterminé et du niveau de biomasse présente ou pouvant être attendue (tableau VI.IV) permet d'apprécier la vulnérabilité du système. Les seuils de biomasse décrits ci-dessous sont ceux utilisés par l'OMS pour définir les niveaux d'alerte 1 et 2 pour l'eau d'alimentation.,2 mm³ biovolume.L⁻¹,

Tableau VI-IV: Description des niveaux de biomasse (Chorus & Bartram 1999).

Niveau de biomasse	Description
Faible (long terme)	Biomasse de cyanobactéries : < 2 000 cellules.mL ⁻¹ ou < 0,2 mm ³ biovolume.L ⁻¹ , ou <1 µg chlorophylle a.L ⁻¹ avec des données compilées sur une durée d'au moins 2 mois.
Faible (court terme)	Même expression des seuils mais données obtenues sur une période inférieure à 2 mois. Ceci couvre le recours aux résultats d'une seule analyse et prend en compte le risque lié à la persistance de toxines après la disparition d'une prolifération.
Modéré-élevé Niveau d'alerte 1	Biomasse de cyanobactéries comprise entre : 2 000 et 100 000 cellules.mL ⁻¹ , ou 0,2 et 10 mm ³ biovolume.L ⁻¹ , ou 1 et 50 µg chlorophylle a.L ⁻¹
Très élevé Niveau d'alerte 2	Biomasse de cyanobactéries : > 100 000 cellules.mL ⁻¹ , ou > 10 mm ³ biovolume.L ⁻¹ , ou > 50 µg chlorophylle a.L ⁻¹

2.1.2.3. Mesures de gestion et seuils d'alerte

L'OMS incite les gestionnaires à se doter d'un cadre structuré de gestion des alertes. Elle présente un cadre ouvert, avec trois niveaux d'alerte. Des actions graduées à associer à chaque seuil d'alerte sont proposées, mais elles doivent être adaptées à chaque ressource et aux possibilités analytiques et de traitement de l'eau.

• Seuil de vigilance

Ce niveau correspond, par exemple, à la détection dans 1 mL d'eau brute d'une colonie ou de quelques filaments de cyanobactéries. Quand le seuil de vigilance est atteint, il est conseillé d'augmenter la fréquence d'échantillonnage, qui doit atteindre une fréquence au moins hebdomadaire, afin qu'un changement rapide de la biomasse de cyanobactéries puisse être observé.

• Seuil 1 d'alerte (2 000 cellules par mL)

Le seuil 1 d'alerte découle de la valeur guide proposée pour la microcystine-LR dans l'eau d'alimentation et de la plus forte concentration de microcystine par cellule enregistrée. Ce seuil indique la possibilité de dépasser la valeur

guide de l'OMS et nécessite d'évaluer la possibilité de capter une eau moins chargée ou l'efficacité de la filière de traitement à éliminer les toxines.

Un tel niveau de biomasse devrait entraîner un échange avec les autorités sanitaires, la poursuite de la surveillance des eaux brutes avec une fréquence au moins hebdomadaire et une évaluation de la qualité de l'eau distribuée par des analyses de toxines.

Si les cyanobactéries présentes sont susceptibles de produire d'autres toxines que la microcystine cette éventualité doit être investiguée.

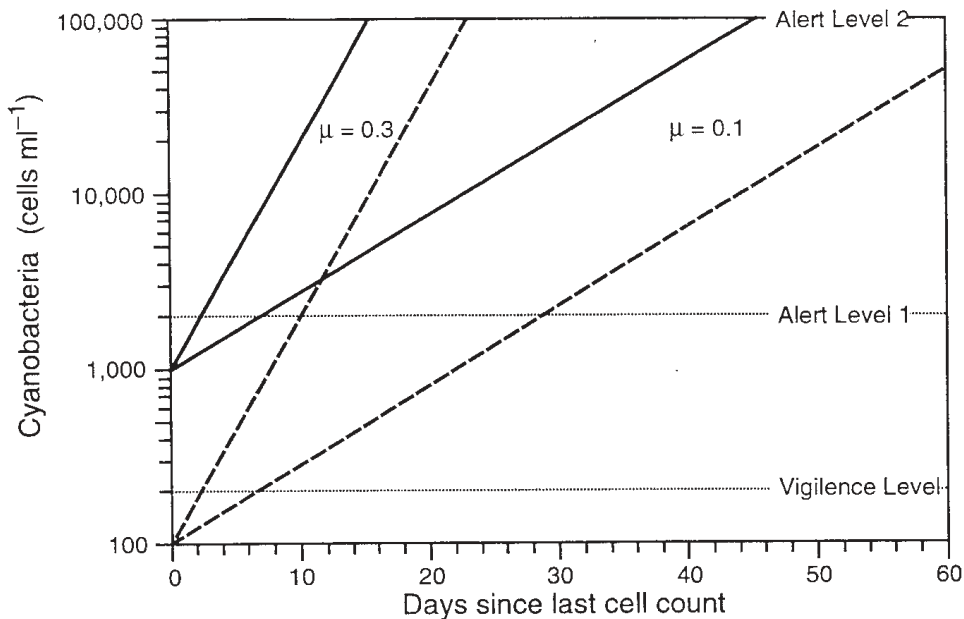
Si les analyses de toxines, quelles qu'elles soient, restent négatives, mais que la biomasse reste supérieure au niveau d'alerte 1, la surveillance des cyanobactéries dans l'eau brute doit être maintenue.

• **Seuil 2 d'alerte (100 000 cellules par mL)**

Ce seuil décrit, pour l'OMS, une importante prolifération de cyanobactéries, établie et toxique. Ces conditions témoignent d'un risque accru d'effets néfastes sur la santé à court terme si aucun traitement n'est en place ou si la filière de traitement n'est pas assez efficace. L'efficacité de la filière de traitement et l'évaluation continue de ses performances est d'importance primordiale dans ces conditions. L'application d'algicides dans un tel cas peut augmenter les difficultés de traitement en générant des toxines dissoutes, plus susceptibles de percer à travers la filière que les cellules. En l'absence d'étape de traitement comprenant du charbon activé ou une autre technologie avancée, il convient d'envisager la mise en place d'un plan d'urgence pour garantir la distribution de l'eau d'alimentation. L'eau reste cependant utilisable pour les autres usages que sont la toilette, le lavage, l'évacuation sanitaire, etc. Une surveillance de la prolifération s'impose pour déterminer le retour à une situation de fonctionnement normal.

L'OMS présente graphiquement les niveaux de concentrations cellulaires prédits, à partir d'études de terrain, pour des populations de cyanobactéries ayant des taux de croissance respectifs de 0,35 par jour ou 0,1 par jour (figure VI-6). Avec un taux de croissance de 0,35 par jour, il faut environ 12 jours à une population pour passer du seuil 1 d'alerte au seuil 2. L'OMS signale que, sous des climats chauds, des populations naturelles peuvent doubler en moins de 2 jours.

Figure VI-6: Croissance potentielle d'une population de cyanobactéries à partir d'une concentration initiale de 100 ou 1 000 cellules à des taux de croissance (μ) de 0,1 ou 0,3.j⁻¹ (OMS 1999).



2.1.2.4. Évaluation de la vulnérabilité de la ressource aux phénomènes de proliférations de cyanobactéries

L'OMS conseille d'identifier les ressources superficielles les plus sensibles aux proliférations de cyanobactéries afin de cibler la surveillance. Les informations permettant de caractériser la vulnérabilité sont de 5 ordres : historiques, physiques, hydrauliques, chimiques et biologiques. Considérant ces 5 facteurs de risques, une ressource peut être considérée comme à risque si :

- des informations historiques ou des connaissances locales font état de précédents épisodes de proliférations ;
- la température de surface dépasse 18°C et /ou la ressource est stratifiée ;
- le temps de séjour dépasse 5 à 10 jours ;
- les concentrations annuelles moyennes en phosphore, voire en azote, permettent le développement des cyanobactéries présentes sur le site, selon leur type d'écostratégie (Chorus & Mur 1999) ;
- des informations issues de suivis biologiques font état du niveau de présence, des périodes d'apparition et de la persistance des cyanobactéries dans la ressource.

L'OMS prône également une gestion de ces problèmes par identification et actions sur les points critiques pour la maîtrise de la qualité finale de l'eau d'alimentation. Ceci intègre aussi bien les actions sur le bassin versant que l'adaptation de la filière de traitement.

2.2. Déclinaisons nationales des recommandations de l'OMS pour l'eau d'alimentation

2.2.1. Réglementations nationales relatives aux cyanotoxines dans les eaux d'alimentation

2.2.1.1. Brésil

Suite au grave accident sanitaire lié aux cyanotoxines de Caruaru en 1996 (chapitre IV, 2.1.2), le ministère de la santé brésilien a entamé en 2000 une révision de la réglementation relative aux eaux d'alimentation. Au terme d'une consultation de plusieurs mois, le ministère de la santé brésilien a publié une nouvelle réglementation relative aux cyanobactéries et aux cyanotoxines le 29 décembre 2001, intitulée Portaria MS n° 1.469/2000. Cette législation devait entrer en vigueur 12 mois après sa publication. Elle a été modifiée en 2004 par la Portaria MS n° 518/2004.

Cette réglementation fixe une limite de qualité dans l'eau d'alimentation pour la microcystine, ainsi que des règles établissant un programme de surveillance des cyanobactéries et des cyanotoxines. Il est également recommandé de rechercher les autres cyanotoxines et de ne pas dépasser certaines valeurs dans l'eau d'alimentation pour la cylindrospermopsine et les saxitoxines (tableau VI-V).

Tableau VI-V : Limites de qualité pour les eaux d'alimentation au Brésil.

Microcystines*	1 µg équivalent MC-LR.L ⁻¹	Limite de qualité réglementaire
Saxitoxines	3 µg.L ⁻¹	Limite de qualité recommandée
Cylindrospermopsine	15 µg.L ⁻¹	

* Sur une période de 1 an, une concentration de 10 µg.L⁻¹ peut être acceptée dans trois échantillons, consécutifs ou non.

• Programme de surveillance des cyanobactéries et des cyanotoxines

Ce programme prévoit des actions et une adaptation de la surveillance en fonction de l'abondance des cyanobactéries au point de captage dans la ressource.

- Biomasse de cyanobactéries < 10 000 cellules.mL⁻¹ (ou 1 mm³ de biovolume.L⁻¹)
Surveillance régulière par examen microscopique de l'eau brute avec une fréquence d'échantillonnage mensuelle.
- Biomasse de cyanobactéries comprise entre 10 000 et 20 000 cellules.mL⁻¹ (ou entre 1 et 2 mm³ de biovolume.L⁻¹).
Surveillance régulière par examen microscopique de l'eau brute avec une fréquence d'échantillonnage hebdomadaire.
- Biomasse de cyanobactéries ≥ 20 000 cellules.mL⁻¹ (ou 2 mm³ de biovolume.L⁻¹).
Surveillance de la densité cellulaire avec une fréquence hebdomadaire,
Interdiction d'utiliser des traitements algicides sur la ressource ou tout autre produit chimique susceptible d'entraîner la lyse des cellules de cyanobactéries pendant le processus de production des eaux d'alimentation.

Réalisation de test de toxicité (tests sur souris) sur l'eau brute. Si le bioessai montre des effets toxiques, l'analyse des cyanotoxines dans l'eau d'alimentation produite sera nécessaire. Si la concentration en toxines est assez élevée pour menacer la santé publique, les autorités sanitaires doivent être informées et l'eau ne doit pas être considérée comme conforme pour la distribution pour la consommation.

Des actions prioritaires pour permettre la mise en place de cette réglementation ont déjà été identifiées. Elles comprennent :

- le développement de matériels didactiques sur les cyanobactéries, leurs toxines et les problématiques associées, sous forme de livres, de guides destinés aux autorités sanitaires des états et des municipalités et aux personnels des unités de production d'eaux d'alimentation ;
- la promotion des formations sur l'analyse des cyanotoxines ;
- la constitution d'un réseau national de laboratoires capables de réaliser l'analyse des cyanotoxines selon des méthodes normalisées.

2.2.1.2. France

Le paramètre microcystine-LR a été introduit dans le Code de santé publique (CSP) au titre de l'article R.1321-2 lors de la codification du décret 2001/1220 pris pour la transposition de la Directive 98/83/CE du Conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. Ainsi la limite de qualité aux points de conformité, basée sur les recommandations de l'OMS, inscrite à l'annexe 13.1 du CSP a été fixée à 1 µg.L⁻¹. Il est précisé en observation pour ce paramètre « À rechercher en cas de prolifération algale dans les eaux brutes ». Ceci entraîne des difficultés d'application liées à la définition d'une « prolifération algale ».

Dans son avis du 3 avril 2006, l'Afssa a estimé que, dans le cadre de la révision des limites de qualité des eaux brutes pour la production d'eau destinée à la consommation humaine, l'ensemble des microcystines devaient être analysées.

2.2.1.3. Espagne

La transcription de la directive 98/83/CE a donné lieu au décret 140/2003 du 7 février 2003 qui introduit une limite de qualité pour le paramètre « microcystine ». La valeur retenue est celle de l'OMS, 1 µg.L⁻¹. Au printemps 2003, aucune méthode d'analyse n'était précisée pour le contrôle de cette exigence réglementaire. Cette analyse est requise seulement quand il existe une suspicion d'eutrophisation de l'eau faisant l'objet du captage. Elle a lieu à la sortie de l'installation de production d'eau d'alimentation ou du réservoir de tête.

2.2.1.4. République Tchèque

La république tchèque a intégré la valeur guide de l'OMS dans sa réglementation par l'ordonnance gouvernementale n° 252/2004. Ce texte implique la surveillance des microcystines dans les eaux au niveau du robinet, la limite de qualité étant fixée à 1 µg.L⁻¹ de microcystine-LR. Il pourrait évoluer dès 2005, potentiellement vers une quantification de la biomasse de cyanobactéries dans les eaux brutes, afin de cibler les analyses de microcystine (Marsálek *et al.* 2005).

2.2.2. Autres modalités de gestion des risques liés aux cyanobactéries

De nombreux pays sont sensibilisés à la problématique des cyanobactéries. La plupart des États affirment suivre les recommandations de l'OMS, mais en pratique, différentes adaptations sont développées.

2.2.2.1. Afrique du Sud

La valeur guide proposée par l'OMS pour la microcystine-LR a été incorporée dans les lignes directrices nationales pour la qualité de l'eau d'alimentation. La plage de valeurs jugées souhaitable s'étend de 0 à 0,8 µg.L⁻¹, les concentrations supérieures à 1 µg.L⁻¹ étant considérées comme posant un risque aigu d'hépatotoxique (Harding & Kempster 2005).

2.2.2.2. Allemagne

L'ordonnance nationale pour l'eau d'alimentation couvre la problématique des cyanotoxines seulement de façon implicite en stipulant que l'eau d'alimentation ne doit contenir aucune substance à une concentration qui puisse se révéler dommageable pour la santé humaine. La valeur guide de l'OMS pour la microcystine-LR sert de support à l'appréciation d'une telle concentration. La plupart des producteurs d'eau d'alimentation utilisant des eaux de surface ont mis en place depuis longtemps des programmes de surveillance du phytoplancton afin d'adapter les traitements à la qualité de l'eau brute. Depuis que la sensibilisation aux cyanotoxines s'est largement répandue,

nombre d'installations ont pris l'habitude de compléter ces programmes par des analyses de cyanotoxines lorsque les cyanobactéries sont présentes dans l'eau brute. Les zones de protection pour les ressources destinées à la production d'eau d'alimentation sont mises en place de façon efficace. En conséquence, peu de ces ressources sont fortement eutrophisées et connaissent des proliférations majeures de cyanobactéries. Les installations correspondantes à ces derniers sites sont généralement équipées avec des traitements poussés tels que le charbon activé en grain et l'ozonation, compte tenu des autres défis qu'elles ont à relever, comme l'élimination de hauts niveaux de demande chimique en oxygène et/ou de pesticides. Des réglementations techniques détaillées précisent comment concevoir et opérer de tels filières de traitement efficacement (Chorus 2005).

2.2.2.3. Australie

L'Australie ne dispose pas d'une réglementation nationale en matière de cyanobactéries mais elle a publié des lignes directrices qui incluent dès 2000 les toxines de cyanobactéries. Les informations sanitaires pertinentes pour l'élaboration de valeurs guides sont rassemblées dans des fiches techniques, régulièrement actualisées (NHMRC & NRMCC 2004). Ces recommandations sont mises en œuvre par les autorités sanitaires de chaque état.

Les fiches techniques reprennent les 4 familles de cyanotoxines identifiées dans des efflorescences sur le territoire australien, soit :

- la cylindrospermopsine ;
- les microcystines ;
- la nodularine ;
- les saxitoxines.

En raison d'un manque de données appropriées, seule une valeur guide est définie pour les microcystines totales, elle est exprimée en équivalents toxicité microcystine-LR à partir de méthodes basées sur la CLHP :

$$1,3 \mu\text{g} \text{ éq.-MC-LR.L}^{-1}.$$

Il est entendu que l'expression du résultat par CLHP en équivalents MC-LR tend à surestimer légèrement la toxicité réelle de l'échantillon si les autres variants analysés présentent un seuil de toxicité plus faible que celui de la MC-LR.

La valeur de $1,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ est dérivée de la même DSEIO que celle utilisée par l'OMS avec le même facteur de sécurité de 1 000, mais en considérant un individu de 70 kg avec une consommation de 2 L d'eau par jour et en attribuant à l'eau une contribution de 90 % de la DJT.

À titre indicatif, les lignes directrices signalent qu'une telle concentration correspond pour une population de *Microcystis aeruginosa* très toxique à une densité cellulaire de l'ordre de 6 500 cellules par mL.

Pour la cylindrospermopsine, aucune valeur guide ne peut être élaborée en raison de l'insuffisance des données sur la toxicité. Il est donc recommandé d'informer les autorités en cas de prolifération des espèces *C. raciborskii* et *A. ovalisporum*.

Pour la nodularine, bien qu'aucune valeur guide ne puisse être élaborée en raison de l'insuffisance des données sur la toxicité, la concentration de $1,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ de nodularine, équivalente à celle des microcystines, est retenue pour définir une concentration d'alerte de 40 000 cellules de *Nodularia spumigena* par millilitre. L'identification d'une efflorescence de cette espèce doit entraîner la notification aux autorités sanitaires.

La même approche est appliquée aux saxitoxines. Les informations disponibles permettent de proposer un niveau d'alerte vis-à-vis de la toxicité aiguë des saxitoxines de $3 \mu\text{g} \text{ éq.-STX.L}^{-1}$, correspondant à une densité cellulaire de 20 000 cellules par mL. L'identification de proliférations à *Anabaena circinalis* doit entraîner la notification immédiate aux autorités sanitaires.

Les autorités sanitaires de chaque état ont accès aux données des distributeurs d'eau d'alimentation.

2.2.2.4. Canada

Santé Canada (2006) a fixé dès 2002 une concentration maximale admissible pour le paramètre « Toxines de cyanobactéries sous la forme de microcystine-LR » à $1,5 \mu\text{g}$ de microcystine-LR.L⁻¹.

Cette concentration maximale admissible repose sur la dose sans effets néfastes observés (DSENO) de $0,04 \mu\text{g kg}^{-1}$ par voie orale (source identique à celle de l'OMS) à laquelle est appliquée un facteur de sécurité de 1 000. La part relative attribuée à l'exposition par l'eau est de 0,8. Le poids corporel moyen retenu pour le calcul est de 70 kg et la consommation quotidienne moyenne de $1,5 \text{ L.j}^{-1}$. Santé Canada estime que cette recommandation, qui ne concerne que la microcystine-LR, protège la santé humaine contre l'exposition à d'autres microcystines qui peuvent être présentes dans l'eau (Groupe scientifique sur l'eau 2005a).

Ce Groupe scientifique sur l'eau de l'Institut national de santé publique du Québec (INSPQ) considère approprié d'utiliser la concentration maximale admissible élaborée par Santé Canada pour la microcystine-LR, en l'absence de norme sur les cyanotoxines dans le *Règlement sur la qualité de l'eau potable* du Québec. L'INSPQ note cependant que d'autres microcystines peuvent être produites et recommande provisoirement de calculer une concentration en équivalent toxicité de microcystine-LR à partir des éléments apportés par Wolf & Frank (2002). Un facteur de 1,0 (égal à celui de la MC LR) est accordé aux variants -LA, -YR, et -YM et un facteur de 0,1 est accordé au variant MC RR.

Par ailleurs le groupe scientifique sur l'eau propose une concentration balise pour l'anatoxine-a de 3,7 µg.L⁻¹ dans l'eau d'alimentation. Cette concentration dérive de la DSENO de 98 µg.kg⁻¹ établie chez la souris par Fawell *et al.* (1999b), avec un facteur d'incertitude de 1 000, un poids moyen de 70 kg, une consommation de 1,5 L et une proportion de l'exposition attribuable à l'eau de 0,8.

2.2.2.5. États-Unis d'Amérique

Il n'existe pas actuellement de réglementation fédérale, ni même de recommandation nationale concernant cette problématique. Cependant les toxines de cyanobactéries sont inscrites depuis 1998 sur la *Drinking Water Contaminant Candidate List* (CCL) révisée tous les 5 ans par le *Safe Water Act* (USEPA 1998). Cette liste regroupe les contaminants encore non réglementés mais susceptibles de le devenir. Ils sont répartis entre trois listes :

- la liste 1 correspond aux contaminants dont la présence dans l'eau d'alimentation est connue. L'inscription sur cette liste a pour effet d'obtenir des données à l'échelle de la nation sur ces contaminants afin d'évaluer le besoin de les réglementer et les limites de qualité à envisager en cas de réglementation ;
- la liste 2 identifie les contaminants pour lesquels des méthodes analytiques viennent d'être développées et dont le criblage est requis afin d'évaluer leur présence dans l'eau d'alimentation. C'est l'étape préalable à l'inscription en liste 1 ;
- la liste 3 comprend des contaminants récemment identifiés comme pouvant poser un problème pour l'eau d'alimentation mais pour lesquels le développement des méthodes analytiques n'est pas achevé. L'objectif est d'évaluer les performances de ces méthodes et d'entreprendre un pré-criblage sur un nombre restreint de système de production-distribution, en vue d'une éventuelle inclusion en liste 2. Le paramètre « cyanobactéries (algues bleues), autres algues d'eau douce, et leurs toxines » (USEPA 2004) est inscrit dans cette liste. La priorité est donnée au développement de méthodes d'analyse adaptées avant tout recueil de données d'occurrence.

2.2.2.6. Finlande

La Finlande préconise, pour la surveillance des eaux brutes destinées à la consommation humaine et des eaux traitées, l'examen microscopique des cyanobactéries. Si des cellules de cyanobactéries sont détectées dans l'eau traitée, il est recommandé de rechercher les microcystines par des méthodes de détection produisant un résultat le plus rapidement possible. En fonction des espèces observées, d'autres toxines peuvent être recherchées. En particulier, en présence d'*Anabaena* spp. ou de *Planktothrix* spp., l'intérêt de rechercher des neurotoxines devrait être envisagé. La surveillance par microscopie est préférée à l'observation visuelle du fait que certaines cyanobactéries se situent en profondeur dans les eaux brutes et ne sont pas toujours visibles en surface. Elle est réalisable en routine au niveau des installations de traitement, même si une identification spécifique nécessite une expertise plus importante (Rapala *et al.* 2005a).

2.2.2.7. Nouvelle-Zélande

La révision des normes pour l'eau d'alimentation de Nouvelle-Zélande est entrée en vigueur le 1^{er} janvier 2001 (Ministère de la santé de Nouvelle-Zélande 2000). Ce document spécifie des valeurs maximales admissibles pour différents paramètres, dont plusieurs cyanotoxines. Seuls les paramètres représentant le plus grand risque pour la santé et inscrits sur les listes de priorité 1 et 2 nécessitent un suivi analytique. Le suivi des paramètres inscrits sur les listes de priorité 3 et 4 est à la discrétion du responsable de la distribution, sauf exigence particulière de l'autorité sanitaire. Les toxines de cyanobactéries pour lesquelles des valeurs maximales admissibles sont définies sont regroupées dans une table correspondant à la liste de priorité 3. Cette liste rassemble les paramètres considérés comme n'étant pas connus pour dépasser 50% de la valeur maximale admissible. Cependant ces mêmes paramètres peuvent être inscrits en liste 2 pour certains systèmes de production et de distribution.

Dans la révision de ces normes en cours de validation, une nouvelle section spécifique aux cyanobactéries est développée et les valeurs maximales admissibles pour plusieurs cyanotoxines ont été révisées. Quand les cyanotoxines, inscrites sur la liste de priorité 3, sont présentes à des concentrations dépassant 50 % de la valeur maximale admissible dans un système de distribution d'eau qui dessert plus de 500 personnes, elles deviennent des paramètres de priorité 2 et bénéficient d'un suivi analytique systématique. Ce suivi, réalisé selon les méthodes

préconisées par les Lignes directrices éditées par le Ministère de la santé, comprend le dénombrement cellulaire des échantillons prélevés à l'endroit où les populations sont vraisemblablement les plus importantes et deux analyses de toxines par semaine en sortie d'installation de traitement et au robinet dans la zone de distribution. La méthode de référence proposée pour toutes les cyanotoxines est la CG-SM après extraction liquide/liquide. Des méthodes alternatives et des points de prélèvement sont associés à chacune des toxines. Ces paramètres redeviennent de priorité 3 si trois échantillons successifs présentent des concentrations inférieures à 50 % des valeurs maximales admissibles. En cas de dépassement de ces valeurs maximales admissibles, il est requis de fournir aux consommateurs de l'eau d'une ressource alternative jusqu'à 4 semaines après le retour des concentrations à des niveaux inférieurs à 50 % des valeurs maximales admissibles (Ministère de la santé de Nouvelle-Zélande 2005).

La maîtrise des risques liés aux cyanobactéries est abordée dans les Plans de gestion des risques pour la santé publique publiés par le Ministère de la santé de Nouvelle-Zélande.

2.2.2.8. Portugal

La Direction Générale de la Santé a lancé depuis quelques années, avec l'Institut National de la Santé et l'Université de Porto, un programme de surveillance, de gestion des risques et de recherche ciblé sur les ressources superficielles et sur les eaux d'alimentation et de baignade. Les mesures de surveillance et de gestion sont basées sur les travaux de l'OMS. Cependant la limite de qualité pour les eaux d'alimentation prend en compte les différentes variantes de microcystines, elle est fixée à :

1 µg d'équivalent MC-LR.L⁻¹.

En relation avec les autorités sanitaires locales ainsi que les gestionnaires de la production d'eau d'alimentation, le programme de surveillance de la qualité générale des eaux brutes et des eaux d'alimentation qui font appel à des ressources superficielles prévoit un contrôle mensuel, qui peut devenir bi-mensuel voire hebdomadaire selon les résultats, sur la base du dénombrement des cyanobactéries dans un échantillon représentatif de la colonne d'eau proche du captage.

En cas de dépassement des seuils préconisés dans les recommandations de l'OMS, le dosage des toxines est réalisé selon les méthodes présentées dans le tableau VI-VI (F. Araujo, communication personnelle au groupe de travail le 1^{er} décembre 2003).

Tableau VI-VI : Méthodes de détection des cyanotoxines préconisées au Portugal.

Toxines recherchées	Méthodes
Microcystines	Bioessai et méthodes immunologiques
Saxitoxines	Bioessai et CLHP
Cylindrospermopsine	CLHP
Anatoxine-a	

2.2.2.9. Royaume-Uni

Le Royaume-Uni a produit une réglementation pour les eaux brutes et des recommandations pour les eaux d'alimentation après traitement. Elles s'appuient sur les recommandations OMS et des lignes directrices développées nationalement depuis une dizaine d'années. La mise en œuvre est assurée par l'Environmental Agency (EA) pour l'Angleterre et le Pays de Galles, par Scottish Environmental Protection Agency (SEPA) pour l'Écosse.

Les limites de qualité des eaux brutes utilisées pour structurer la gestion sont celles de l'OMS. Elles reposent sur le dosage de la chlorophylle *a* et l'examen microscopique (évaluation de l'abondance cellulaire et identification des espèces). Si la teneur en chlorophylle *a* dépasse 10 µg.L⁻¹ et que les cyanobactéries sont dominantes, le dosage des toxines est réalisé.

Pour les eaux d'alimentation les agences environnementales recommandent la limite de qualité de 1 µg d'équivalent MC-LR.L⁻¹.

Sur le terrain, la surveillance repose sur un double système d'alerte :

- la surveillance proactive est réalisée par les autorités sanitaires sur les sites historiquement connus pour leurs proliférations de cyanobactéries. La fréquence de réalisation des analyses est variable pendant l'année, avec une surveillance au moins bimensuelle en été ;

- la surveillance réactive est déclenchée par un signalement émanant du public. Un tel signalement par un particulier oblige les agences environnementales à réaliser des analyses sur le site, quels que soient les usages de l'eau.

L'approche développée par le Royaume-Uni pour gérer cette problématique de santé publique est de type amont, la réglementation contraignante concernant uniquement les eaux brutes, et ce quel que soit l'usage qui en est fait, pour les loisirs, l'agriculture ou les eaux destinées à l'alimentation humaine.

2.3. Autres recommandations

2.3.1. Compléments alimentaires à base d'algues bleues

2.3.1.1. Canada

Santé Canada (Département fédéral de la santé du Canada) met en garde la population contre ces produits dans un communiqué Internet. En effet un programme d'échantillonnage mené par cet organisme a montré la contamination par des microcystines de nombreux produits de ce type autres que ceux ne contenant que de la spiruline. Ce ministère estime que, en attendant la publication de normes de qualité par l'Agence canadienne d'inspection des aliments, les consommateurs de ces produits à base d'algues bleues autres que spiruline devraient limiter leur consommation à de courtes périodes et interdire l'utilisation par les enfants de tels produits (Santé Canada 1999).

2.3.1.2. États-Unis d'Amérique

Gilroy *et al.* (2000), ayant constaté la réalité de la contamination de ces produits par les microcystines, ont proposé une limite de qualité fondée sur la dose journalière tolérable retenue par l'OMS pour la microcystine-LR, qui est de $0,04 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$. Considérant une consommation de 2 g par jour par un adulte de 60 kg et une dose journalière tolérable de $2,4 \mu\text{g}\cdot\text{j}^{-1}$ pour un adulte de 60 kg, les auteurs ont recommandé une limite de sécurité de 1 μg de microcystines par gramme de complément. Cette limite de sécurité a été adoptée comme norme réglementaire pour les produits à base d'algues bleues par l'Oregon Department of Agriculture le 23 octobre 1997.

L'OMS estime que cette limite de sécurité ne tient pas compte du fait que 80 % de la dose journalière tolérable sont affectés à l'apport par l'eau d'alimentation et qu'elle pourrait entraîner une surexposition des enfants, qui sont une des cibles marketing de ces produits recommandés pour lutter contre les déficits de l'attention (Chorus & Bartram 1999). Dietrich & Hoeger (2005) estiment, à la lumière de données nouvelles, que cette limite de sécurité n'est protectrice ni pour les enfants, ni pour les adultes.

2.3.1.3. France

En France, l'Afssa a rendu un avis le 16 mai 2003 relatif à l'évaluation de l'emploi d'une micro-algue, *Aphanizomenon flos-aquae* var. *flos-aquae*, du Lac Klamath Supérieur (Oregon, États-Unis) sous forme de complément alimentaire et de poudre à saupoudrer sur les aliments. Dans cet avis, l'Afssa estime que le produit ne présente pas toutes les garanties d'innocuité et que sa consommation selon les recommandations du fabricant comporte un risque de dépassement de la DJT définie par l'OMS pour la microcystine-LR.

2.3.2. Produits de la pêche

2.3.2.1. Australie

L'état de Victoria a défini un niveau d'alerte sanitaire pour les microcystines et la nodularine dans les poissons, les crevettes et les fruits de mer, à partir d'une DJT pour les adultes modifiée pour tenir compte des expositions à court terme. Ces niveaux sont de $250 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pour le poisson, de $1\ 100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pour les crevettes et de $1\ 500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pour les moules. Ces niveaux d'alerte sanitaire sont utilisés pour mettre en place des restrictions à la pêche professionnelle ou de loisir, lors de proliférations de cyanobactéries, notamment en présence de *Nodularia spumigena* (Burch & Humpage 2005).

2.3.2.2. Canada

La Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs met en ligne sur le site de Santé Canada une fiche d'information relative aux cyanobactéries et à leurs toxines. À la question « Puis-je consommer du poisson provenant d'eau contaminée ? » il est répondu qu'il faut faire preuve de prudence lorsqu'on envisage de consommer du poisson pêché dans des plans d'eau où les fleurs d'eau sont abondantes ; il faut surtout éviter de consommer les viscères du poisson (Santé Canada 2003).

2.4. Synthèse

Les valeurs guides ou les limites de qualité proposées concernent essentiellement l'eau d'alimentation délivrée au consommateur. Ce parti pris permet de s'affranchir du niveau de contamination de la ressource comme de l'efficacité de la filière de traitement, qui peuvent varier d'un site à un autre. Certains pays recommandent cependant le suivi dans les eaux brutes de la présence des cyanobactéries afin de cibler les analyses portant sur les toxines avec plus de pertinence au cours de l'année et d'optimiser la surveillance du risque à moindre coût. La plupart des pays ayant adopté une réglementation ou des recommandations relatives aux risques liés aux toxines de cyanobactéries s'appuient sur les recommandations de l'OMS et notamment sur la dose journalière tolérable de 0,04 µg de microcystine-LR.kg⁻¹.j⁻¹. Les variations observées entre pays concernant ce danger résultent des caractéristiques de l'individu « type » et du choix du scénario d'exposition (tableau VI-VII).

Nombreux sont les pays qui signalent l'importance des autres toxines, bien que des limites de qualité soient rarement proposées, les données toxicologiques étant souvent jugées insuffisantes (tableau VI-VIII). Des mesures de précaution en cas d'identification des genres potentiellement producteurs de ces toxines sont proposées dans certains pays. Elles relèvent essentiellement d'une vigilance analytique, voire épidémiologique, accrue et ciblée à la lumière des commémoratifs.

Les recommandations relatives aux autres sources alimentaires sont rares, elles concernent les microcystines et la nodularine. Pour les compléments alimentaires, la limite de sécurité proposée par l'État de l'Oregon fait complètement abstraction des autres sources alimentaires de microcystines, et en particulier de l'apport par l'eau d'alimentation.

Tableau VI-VII : Hypothèses utilisées pour la construction des seuils relatifs aux microcystines.

	Dose toxique de référence MC-LR	Facteurs de sécurité	Part attribuable à l'eau	Poids moyen (kg)	Consommation d'eau (L.j ⁻¹)	Valeur guide (µg.L ⁻¹)
OMS	40 µg/kg/j	1 000	0,8	60	2	0,96 ⇒ 1
Australie			0,9	70	2	1,26 ⇒ 1,3
Canada			0,8	70	1,5	1,49 ⇒ 1,5

Tableau VI-VIII : Seuils réglementaires ou valeurs maximales admissibles provisoires recommandés pour l'eau d'alimentation proposées pour certaines cyanotoxines.

Toxine	Concentration	État
Anatoxine-a	3,7 µg.L ⁻¹ 6 µg équivalent STX.L ⁻¹	Province de Québec (2005) Nouvelle-Zélande (2005)
Anatoxine-a(s)	1 µg.L ⁻¹	Nouvelle-Zélande (2005)
Homoanatoxine-a	2 µg.L ⁻¹	Nouvelle-Zélande (2005)
Saxitoxines	3 µg équivalent STX.L ⁻¹ 3 µg.L ⁻¹ 3 µg.L ⁻¹	Australie (2004) Brésil (2000, 2004) Nouvelle-Zélande (2005)
Cylindrospermopsine	15 µg.L ⁻¹ 1 µg.L ⁻¹	Brésil (2000, 2004) Nouvelle-Zélande (2005)
Microcystines	1 µg MC-LR.L ⁻¹ 1 µg équivalent MC-LR.L ⁻¹ 1 µg MC(s).L ⁻¹ 1,5 µg MC-LR.L ⁻¹ 1,3 µg équivalent-MC-LR.L ⁻¹	OMS (1999, 2004), Afrique du sud (1999), France (2001), République Tchèque (2004) Brésil (2000, 2004) 2, Portugal, Royaume-Uni Espagne (2003), Nouvelle-Zélande (2005) Canada (2004) Australie (2004)
Nodularine	1 µg.L ⁻¹	Nouvelle-Zélande (2005)
LPS endotoxines	3 µg.L ⁻¹	Nouvelle-Zélande (2005)

Points à retenir

- La microcystine-LR est la seule cyanotoxine pour laquelle une valeur toxicologique de référence a été fixée par l'OMS. Cette VTR a permis d'élaborer une valeur guide provisoire pour l'eau d'alimentation.
- Cette valeur guide est appliquée par de nombreux pays, de façon réglementaire ou sous forme de recommandation. Certains pays appliquent cette valeur guide exprimée en équivalent microcystine-LR à l'ensemble des microcystines présentes.
- L'Australie, le Brésil et la Nouvelle-Zélande ont proposé des concentrations seuils pour d'autres cyanotoxines dans l'eau d'alimentation. Ces seuils recommandés n'ont pas de valeur réglementaire.
- Seuls deux États ont proposé des concentrations seuils dans d'autres sources alimentaires (compléments alimentaires et produits de la pêche).

VII. Exposition des populations et appréciation des risques

1. Les cyanotoxines dans les eaux continentales françaises

Dans certaines circonstances, les cyanobactéries peuvent être abondantes dans les eaux de surface susceptibles d'être utilisées directement en agriculture, pour des activités nautiques ou après traitement comme eaux d'alimentation. Cependant les effets sanitaires ne sont pas directement engendrés par ces microorganismes mais sont générés par les toxines qu'ils peuvent produire et qui, sous l'action de divers facteurs, sont libérées dans le milieu. L'évaluation des risques sanitaires s'appuie donc sur la nature et la concentration des toxines dans ces milieux et non sur la quantité de microorganismes présents. On peut d'ailleurs rappeler qu'une même toxine peut être produite par des espèces différentes et qu'une même espèce peut produire différentes toxines et cela de manière variable en fonction de facteurs évoqués au chapitre I (paragraphe 1.4 et 3.2).

Les familles de toxines ainsi que les genres potentiellement producteurs de toxines qui ont été détectés à ce jour en France, sont rappelés dans le tableau VII.I.

Tableau VII-I : Genres potentiellement toxiques de cyanobactéries ayant déjà été observés en France et toxines associées. En gras, les toxines déjà identifiées en France (d'après les chapitres I et IV).

Genres potentiellement toxiques	Toxines
<i>Anabaena</i> <i>Anabaenopsis</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Cylindrospermopsis</i> <i>Coelosphaerium</i> <i>Lyngbya</i> <i>Microcystis</i> <i>Nostoc</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Phormidium</i> <i>Planktothrix</i> <i>Pseudanabaena</i> <i>Rhaphidiopsis</i> <i>Synechococcus</i> <i>Woronichinia</i>	Anatoxines Cylindrospermopsines Débromoaplysiatoxine Lyngbyatoxine Microcystines Microviridines Saxitoxines

D'autres cyanotoxines (cylindrospermopsine, nodularines, BMAA) ont été identifiées dans d'autres pays européens ; en l'absence de recherche ciblée, leur présence en France ne peut être exclue.

En France, 97 % des 1 492 résultats⁽³⁷⁾ de dosage de microcystines disponibles pour les années 2002 à 2004 (eau brute et eau traitée) se situent entre juin et octobre. La présence de microcystines à une concentration supérieure à 0,16 µg.L⁻¹ (limite de détection et de quantification de la base Afssa-Afsset) est observée pour 37 % de ces résultats.

Pour les eaux brutes, tous usages confondus :

- 1 266 prélèvements d'eau brute ont fait l'objet d'une recherche de microcystines, correspondant à 212 sites dans 43 départements ;
- 88 % des résultats sont inférieurs à 3 µg.L⁻¹, 8 % des valeurs sont comprises entre 3 et 15 µg.L⁻¹, les 4 % restants se distribuant entre 15 et 1 624 µg.L⁻¹. Si l'on considère seulement les prélèvements pour lesquels la concentration est supérieure à la limite de détection, leur médiane se situe à 1,17 µg.L⁻¹ et 75 % de ces résultats sont inférieurs à 3,75 µg.L⁻¹.

Les concentrations des eaux brutes en microcystines varient selon les années et en cours d'année. Les valeurs les plus élevées sont généralement observées de juillet à septembre. Peu de données sont cependant disponibles pour les périodes de novembre à juin (3,6 % du total des analyses).

(37) Les résultats décrits dans le présent chapitre sont issus de la base Afssa/Afsset.

Il apparaît que le sous-échantillon des prélèvements pour lesquels on dispose d'un résultat de dosage des microcystines est biaisé par rapport à l'échantillon total des prélèvements vis-à-vis de l'abondance des cellules de cyanobactéries : les dosages de microcystines sont effectués lorsque l'abondance est importante (chapitre IV, § 4.2). En effet l'abondance moyenne géométrique pour les prélèvements avec dénombrement algal et dosage de microcystines est de 70 000 cellules.mL⁻¹ pour seulement 5 000 cellules.mL⁻¹ quand le dosage des toxines n'est pas réalisé.

La concentration en anatoxine-a mesurée dans des échantillons prélevés à la surface de sédiments, de pierres et de macrophytes de la rivière la Loue a été estimée à 8 mg.g⁻¹ de biofilm lyophilisé (Gugger *et al.* 2005).

2. Eau et alimentation

2.1. Sources d'exposition aux cyanotoxines par voie alimentaire

Les sources potentielles d'exposition aux cyanotoxines par l'alimentation sont les suivantes :

- l'eau de distribution publique ;
- la chair des animaux exposés à des cyanotoxines, poissons et crustacés d'eaux douces ou saumâtres ;
- les légumes, notamment les légumes feuilles en cas d'irrigation par aspersion avec une eau chargée en cyanobactéries ;
- les compléments alimentaires à base d'algues bleues, c'est-à-dire à base de cyanobactéries.

Les valeurs citées pour les denrées d'origine animale ne représentent qu'une fraction de la quantité de toxines présentes, en l'absence de méthode validée fournissant la teneur totale de toxines. Les grandeurs numériques issues de travaux de recherche sont données à titre indicatif. Il n'existe pas de données concernant l'exposition de la population française par les denrées d'origine animale.

2.1.1. Eau d'alimentation

Les résultats de dosages de microcystines dans les eaux brutes destinées à la production d'eau d'alimentation sont au nombre de 639 pour les années 2002 à 2004, répartis dans 24 départements sur les 88 départements français où au moins une usine de traitement utilise de l'eau de surface. Pour les eaux brutes destinées à la production d'eau de consommation, les microcystines sont détectées à une concentration supérieure à 0,16 µg.L⁻¹ dans un peu plus de 34 % des cas. La moitié de ces résultats « positifs » ont une concentration inférieure à 0,58 µg.L⁻¹, le 75^e percentile se situant à 1,63 µg.L⁻¹. La concentration maximale pour les eaux brutes destinées à l'alimentation en eau potable est de 665 µg.L⁻¹.

Les 226 résultats de dosage des microcystines disponibles pour les eaux traitées entre 2002 et 2004 ne concernent que 13 départements (soit 45 sites). Sur ces 226 mesures, 82 % (201) présentent un résultat inférieur à la limite de détection retenue (0,16 µg.L⁻¹), 26 mesures sont comprises entre la LD et 0,3 µg.L⁻¹ et une seule valeur est supérieure à la limite de qualité de 1 µg.L⁻¹ (1,9 µg.L⁻¹). Cette dernière valeur a été observée en sortie d'une usine équipée avec une étape de charbon actif en poudre, sans filtration sur charbon actif en grain. L'ozonation s'est révélée déficiente à cette période.

L'analyse de la base de données indique un abattement de l'ordre de 200, en moyenne, du nombre de cellules de cyanobactéries entre l'eau brute et l'eau traitée. Pour les microcystines, l'abattement entre les eaux brutes et les eaux traitées apparaît bien plus faible, il est de l'ordre de 2 en moyenne (chapitre IV, § 5.2).

Les dosages de microcystines relatifs à l'usage AEP, que ce soit en eau brute ou en eau traitée, ne procèdent pas d'une campagne de prélèvement systématique ou aléatoire. Il n'est donc pas possible d'évaluer la représentativité des données de dosage des microcystines en eau traitée. Elles doivent être considérées avec la plus grande prudence.

2.1.2. Organismes aquatiques

2.1.2.1. Mollusques

Les mollusques sont susceptibles d'être contaminés par des cyanotoxines, soit directement au contact de celles-ci lorsqu'elles sont libérées dans le milieu par les cyanobactéries soit indirectement par la consommation de cyanobactéries qui en contiennent (Frémy & Lassus 2001). Ce dernier mode de transfert est principalement à l'origine de la contamination de la chaîne alimentaire. En effet, la concentration en microcystines dans les tissus de différentes espèces de gastéropodes est corrélée à la concentration en toxines présentes dans les cyanobactéries mais pas à celle en toxines libres dans l'eau (Frémy & Lassus 2001). D'autres travaux ont mis en

évidence l'accumulation de microcystines chez les moules d'eau douce de type anodonte *Anodonta cygnea* (Eriksson *et al.* 1989), mais également chez des espèces de moules marines *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*. Les moules d'eau douce accumulent également la cylindrospermopsine jusqu'à des concentrations de $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de tissus (poids sec). Les mollusques étant peu sensibles à l'effet des toxines, ils peuvent ainsi les assimiler de manière active et les accumuler dans des proportions considérables (Frémy & Lassus 2001). Différentes études mettent en avant le rôle prépondérant des mollusques dans la transmission des toxines à travers le réseau trophique. Ces derniers en effet, et principalement les gastéropodes d'eau douce, constituent une source importante de nourriture pour les poissons, les crustacés, les amphibiens et les oiseaux.

La bioaccumulation tout au long de la chaîne trophique des principales toxines décrites dans la littérature (nodularines, microcystines, cylindrospermopsine, saxitoxines, BMAA) est désormais démontrée (Falconer 1992, Lindholm 1989, Negri 1995, Saker 1999). La répartition des toxines dans le mollusque n'est pas uniforme, l'hépatopancréas est l'organe le plus contaminé. Les tissus locomoteurs (muscles, pieds) contribuent faiblement à la contamination globale et les gonades montrent une contamination intermédiaire. Ainsi Saker *et al.* (2004) mentionnent une répartition en cylindrospermopsine chez la moule d'eau douce ne faisant pas l'objet d'un élevage aquacole (lac Mira au Portugal) mais consommée de façon non contrôlée, de 68 % dans l'hémolymphe, 23 % dans les viscères, 8 % dans le pied et les gonades et 1 % dans le manteau. Une période de 15 jours de détoxification permet de diminuer de 50 % la contamination des tissus. Ce phénomène de répartition non homogène est important et doit être pris en compte selon le type de mollusque considéré et les parties habituellement consommées. Selon les auteurs, un transfert passif de toxines d'un organe à l'autre n'est pas à exclure et doit être envisagé lorsque le mollusque est conservé à l'état congelé de manière prolongée. Saker *et al.* (2004) ont évalué l'accumulation de cylindrospermopsines par des moules (*A. cygnea*) exposées pendant 16 jours à des cultures de *C. raciborskii* et leur décontamination après 16 jours de maintien dans un milieu propre. Les concentrations maximales obtenues après 16 jours d'exposition sont de $2,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour l'animal entier, avec des concentrations de $61,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (poids sec) dans l'hémolymphe et de $5,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (poids sec) dans les viscères. Après 16 jours de décontamination, 50 % des cylindrospermopsines ont été éliminés. Les concentrations en CYN varient pendant la période d'exposition.

Les différentes données relatives à la contamination des mollusques par des cyanotoxines montrent qu'elle peut survenir tant chez les espèces d'eau douce que chez les espèces marines. Le risque lié à leur consommation par l'homme est très dépendant des pratiques locales de pêche, d'aquaculture et de consommation.

2.1.2.2. Crustacés

Les crustacés présentent un profil de contamination par les cyanotoxines similaire à celui des mollusques, à savoir : contamination par la consommation de cyanobactéries ou de mollusques contaminés, dans le cas des gros crustacés de type crabe, accumulation dans l'hépatopancréas, faible sensibilité aux toxines. La mortalité des crustacés n'est observée que pour des concentrations élevées en cyanotoxines. Aucune intoxication animale ou humaine par des toxines de cyanobactéries et liée à la consommation de crustacées n'est rapportée dans la littérature. Les crustacés représentent néanmoins une source potentielle de contamination pour les échelons trophiques supérieurs (Briand *et al.* 2003).

Une étude de Magalhaes *et al.* (2003) dans la baie de Rio de Janeiro, a mis en évidence des teneurs pouvant atteindre 100 ng de microcystines par gramme de muscle de crabe ainsi que des teneurs de 10 ng de microcystines par gramme de crevettes (poids frais). Les auteurs indiquent que, pour 19 % des échantillons analysés, les teneurs en microcystines étaient telles qu'elles exposeraient le consommateur à un dépassement de la DJT, dans le cas d'une consommation quotidienne de 300 g de chair de crabe par un adulte de 60 kg, ($0,52 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ d'apport par le crabe, soit 13 fois au-dessus de la DJT de $0,04 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$).

Une étude récente (Kankaanpää *et al.* 2005b) sur des crevettes Black Tiger, objet d'un élevage intensif en Australie, fait état de la présence de cyanobactéries dans le milieu d'élevage. Plusieurs genres ont été identifiés comme *Oscillatoria sp.* ($4\cdot 10^6 \text{ cell}\cdot\text{L}^{-1}$), *Pseudanabaena sp.* ($1,8\cdot 10^6 \text{ cell}\cdot\text{L}^{-1}$), *Microcystis sp.* ($3,5\cdot 10^4 \text{ cell}\cdot\text{L}^{-1}$), *Aphanocapsa sp.* ($2\cdot 10^4 \text{ cell}\cdot\text{L}^{-1}$) ainsi qu'une espèce rare *Romeria sp.* ($2,2\cdot 10^6 \text{ cell}\cdot\text{L}^{-1}$). Un protocole ELISA a permis d'obtenir des dosages en hépatotoxines totales (MC-LR, MC-LA, MC-RR, MC-YR et NOD). Les concentrations en hépatotoxines totales dans l'hépatopancréas de ces crevettes se sont avérées croissantes au cours de l'étude (de 6-20 μg d'hépatotoxines par kg d'hépatopancréas durant l'hiver à 20-80 μg d'hépatotoxines par kg d'hépatopancréas au cours du printemps) tout en restant à des valeurs considérées comme ne présentant pas de risque toxique ni pour les crevettes ni pour le consommateur. L'hépatopancréas et le cœur ont été identifiés comme les principaux organes d'accumulation des toxines. Les concentrations retrouvées dans le muscle sont en revanche relativement faibles. Enfin, la décontamination des organes s'est avérée rapide, de quelques heures (microcystines) à quelques jours (nodularines).

Des écrevisses australiennes à pattes rouges (*Cherax quadricarinatus*) provenant d'un bassin aquacole ont été capables d'accumuler de la cylindrospermopsine produite par *Cylindrospermopsis raciborskii* (590 µg.L⁻¹ de CYN dans l'eau du bassin, dont 93 % intracellulaire et 7 % dissoute dans l'eau) à des concentrations de l'ordre de 4 µg.g⁻¹ d'hépatopancréas et 0,9 µg.g⁻¹ (poids sec) de muscle lyophilisés (Saker & Eaglesham 1999). Ces résultats ont été complétés par une étude d'exposition au laboratoire des écrevisses à des cylindrospermopsines pendant 14 jours, à une concentration proche de celle observée dans le bassin (568 µg CYN.L⁻¹). La contamination des tissus de ces dernières s'est avérée inférieure à celle des écrevisses provenant du bassin. Il semble donc que le mécanisme d'accumulation le plus vraisemblable est celui lié à l'ingestion des cellules de cyanobactéries, plutôt que celui lié à l'absorption de toxines dissoutes. Ces écrevisses font l'objet d'un élevage aquacole intensif aux États-Unis et en Israël. Des contrôles à l'importation pourraient être opportuns.

2.1.2.3. Poissons

Contrairement aux invertébrés, les poissons sont sensibles aux cyanotoxines et les principaux organes touchés sont le foie et les reins. L'étude menée dans la baie de Rio de Janeiro par Magalhaes *et al.* (2003) indique des teneurs en microcystines pouvant atteindre 40 µg par kg de muscle de poisson (poids frais), exposant potentiellement un consommateur à une dose supérieure à la DJT fixée par l'OMS.

Dans une étude menée par Xie *et al.* (2004) en parallèle sur deux lots de carpes, les premières nourries tout au long de l'expérimentation par des cellules de *Microcystis viridis*, les secondes nourries pendant 40 jours avec les cyanobactéries puis par de la nourriture artificielle, le dosage des microcystines MC-LR et MC-RR par CLHP dans différents tissus et organes des poissons (intestin, foie, muscle, sang) a été réalisé. Les teneurs en microcystines des cellules de cyanobactéries utilisées pour l'alimentation étaient comprises entre 268 et 580 µg.g⁻¹ (poids sec) pour la microcystine-LR et 110 et 292 µg.g⁻¹ (poids sec) pour la MC-RR. Chez les poissons nourris exclusivement avec des cyanobactéries, des teneurs maximales en MC-RR de 49,7 ; 17,8 et 1,77 µg.g⁻¹ (poids sec) ont été respectivement mesurées dans le sang, le foie et le muscle. Aucune trace de MC-LR n'a pu être détectée dans le muscle et le sang malgré une très forte concentration dans les intestins. Ces données contrastent avec les résultats d'études menées sur des truites (Burry *et al.* 1997, Tencala & Dietrich 1997, Burry *et al.* 1998) et incitent à penser que la carpe posséderait un mécanisme de conversion/dégradation de ces toxines ou limitant le passage à travers la paroi intestinale. La détoxification observée chez les carpes soumises à un régime alimentaire « classique » après contamination par les microcystines est lente et s'observe d'abord au niveau hépatique puis musculaire.

Des filets ont été exposés à des toxines de type nodularine par l'intermédiaire de moules contaminées (Kankaanpää *et al.* 2005a). Les teneurs en toxines ont été déterminées dans le foie par ELISA et CLHP-SM. Les valeurs obtenues par spectrométrie de masse (0 et 390 µg.kg⁻¹ de poids frais) se sont avérées jusqu'à 10 fois plus faibles que celles obtenues en ELISA (20 et 2 230 µg.kg⁻¹ de poids frais). Différentes hypothèses ont été avancées, les plus vraisemblables considèrent des phénomènes de suppression d'ions en CLHP-SM et la prise en compte simultanée des métabolites en ELISA (reconnaissance par l'anticorps). Les valeurs obtenues en CLHP-SM et en ELISA étant vraisemblablement respectivement sous-estimées et sur-estimées, il semble réaliste d'estimer que ces valeurs sont comprises entre 500 et 1 000 µg.kg⁻¹ de poids frais.

2.1.3. Bétail et produits laitiers

Le bétail est susceptible de se trouver en contact avec des cyanotoxines lorsqu'il s'abreuve. De nombreux cas d'empoisonnement sont rapportés dans la littérature chez les ovins et surtout les bovins. Les premiers cas rapportés l'ont été en Australie à la fin du XIX^e siècle ; depuis les États-Unis, le Canada, la Suisse, l'Afrique du Sud ont connu de tels événements. En Suisse plus de 100 vaches sont ainsi mortes ces 20 dernières années. L'intoxication la plus dramatique s'est déroulée en Australie (1992) et a causé la mort de plus de 10 000 animaux après un épisode d'efflorescence massive d'*Anabaena circinalis* sur plus de 1 000 km de rivière (Falconer 1998, Briand *et al.* 2003). Les toxines les plus souvent identifiées lors de ces épisodes sont des cylindrospermopsines et des microcystines.

Dans une étude menée par Orr *et al.* (2003), des bovins ont été abreuvés pendant 28 jours avec de l'eau contaminée par des cyanobactéries du type *Microcystis aeruginosa*, à des concentrations classiquement rencontrées lors d'efflorescences. Les teneurs en microcystines retrouvés dans le foie et le sang ont été mesurées par ELISA, CLHP et CG-SM. Aucune trace de toxine n'a pu être mise en évidence dans les matrices testées au moyen des techniques chromatographiques. Seul le test ELISA a permis de doser des microcystines à des concentrations de l'ordre de 0,92 µg.équ.MC-LR.g⁻¹ de foie frais, ce qui représenterait une quantité accumulée dans le foie par individu comprise entre 0,74 et 2,62 mg selon les animaux testés. Cette valeur étant 1 000 fois supérieure à la limite de quantification des MC-LR par CLHP ou CG-SM, il paraît évident que les résultats obtenus par ELISA doivent être attribués à des réactions croisées. Les calculs réalisés dans cet article indiquent que les quantités retrouvées dans le foie des animaux correspondent à 10 à 40 % des MC-LR ingérées par l'animal.

Devant les intoxications rapportées chez les bovins, il est légitime de s'interroger sur la possible contamination du lait par les cyanotoxines. Une seule étude sur le sujet a été menée par Orr *et al.* (2001), au cours de laquelle des vaches allaitantes ont été abreuvées pendant 21 jours par de l'eau contaminée par de la microcystine-LR. Les conclusions sont ambiguës. En effet, des traces de microcystines ($< 2 \text{ ng.L}^{-1}$) ont été détectées dans le lait par ELISA alors que l'analyse CLHP ne permettait pas de mettre en évidence le pic caractéristique de cette toxine en raison des interférences dues aux protéines du lait. En se fondant sur la DJT de cette toxine définie par l'OMS et sur les consommations moyennes de lait en Australie, les auteurs concluent que la consommation de lait de vaches exposées à ces toxines ne présente pas de risque sanitaire mais considèrent qu'une concentration en microcystines supérieure à $0,86 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de lait serait problématique en terme de santé humaine.

2.1.4. Légumes

Seule une étude de Codd *et al.* (1999) a mis en évidence la présence de microcystines sur des feuilles de laitues irriguées avec de l'eau contaminée par des cyanobactéries. Des colonies de *Microcystis aeruginosa*, visibles à l'œil nu sur les feuilles de laitues, étaient apparues lors de cette étude environ 10 jours après la dernière aspersion. Les concentrations en microorganismes et en toxines dans l'eau d'aspersion ne sont pas connues. Ces observations indiquent une possible contamination des fruits et légumes irrigués par des eaux contenant des efflorescences de cyanobactéries et soulèvent certaines interrogations comme celle de l'efficacité d'un lavage de produits contaminés en surface.

2.1.5. Compléments alimentaires

Des compléments alimentaires commercialisés en Amérique du Nord et en Europe, sous forme de poudre à saupoudrer sur les aliments ou sous forme de gélules, sont produites à partir d'une cyanobactérie, *Aphanizomenon flos-aquae var. flos-aquae*, récoltée à partir d'efflorescences naturelles sur le lac Klamath Supérieur (Oregon, États-Unis). Les allégations accompagnant ces produits concernent le bien-être des individus en particulier lorsqu'il est perturbé par des causes physiologiques. Les enfants sont une des populations cibles de ces produits, présentés comme capables de lutter contre les déficits de l'attention.

Selon une étude menée aux États-Unis, les concentrations moyennes en microcystines rapportées pour ces compléments alimentaires varient de $0,01$ à $0,45 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ de produit. Cependant de fortes variations au sein d'un même lot ont été relevées et des échantillons contenant jusqu'à $2,1 \text{ } \mu\text{g}$ de microcystines par gramme de produit ont été rapportées. La consommation journalière recommandée sur l'étiquetage est de 3 à 5 g.j^{-1} ce qui correspond à une exposition aux microcystines comprise entre $0,03$ et $2,25 \text{ } \mu\text{g.j}^{-1}$ (Gilroy *et al.* 2000). Ces auteurs ont recommandé une limite de sécurité de $1 \text{ } \mu\text{g}$ de microcystines par gramme de complément. Cette limite de sécurité a été adoptée comme norme réglementaire pour les produits à base d'« algues bleues » par l'Oregon *Department of Agriculture* le 23 octobre 1997.

L'OMS estime que cette limite de sécurité ne tient pas compte du fait que 80 % de la dose journalière tolérable sont affectés à l'apport par l'eau d'alimentation et qu'elle pourrait entraîner une surexposition des enfants (Chorus & Bartram 1999).

Il apparaît clairement qu'en fonction du lot considéré, de la quantité consommée (certains consommateurs admettent consommer jusqu'à 20 g de compléments par jour), les taux de contamination peuvent conduire à un dépassement très important de la DJT et ceci sans prendre en compte d'autres sources alimentaires de microcystines. Il n'existe pas de données françaises sur le niveau de contamination de ce type de produits.

2.2. Estimation de l'exposition alimentaire aux microcystines et éléments d'évaluation du risque

L'exposition est le résultat d'un calcul obtenu en croisant les données de consommation (résultats de l'enquête de consommation auprès d'une population donnée) avec les moyennes ou médianes de contamination par les microcystines (**méthode déterministe**). Au regard des données disponibles, différents scénarios peuvent être envisagés (enfants, adultes, population particulière). Ces scénarios permettent d'estimer différentes situations d'exposition possibles. Dans le cas de contaminants pouvant présenter une toxicité à court terme, il est possible de déterminer la quantité maximale d'aliments consommés à ne pas dépasser pour ne pas atteindre une dose de référence aiguë déterminée.

Une autre approche consiste à croiser des distributions statistiques de la consommation d'eau et des denrées alimentaires avec les distributions des niveaux de contamination de l'eau ou des denrées alimentaires par les microcystines (**méthode probabiliste**). Dans cette approche, on considère que les consommateurs sont exposés sur de longues périodes à des produits alimentaires, dont l'eau, contaminés à des niveaux variables dans le temps selon une loi de probabilité estimée par les distributions empiriques observées.

Parmi les sources potentielles d'exposition aux microcystines par l'alimentation, **seule l'exposition due à une contamination de l'eau de distribution publique sera considérée ici**. Les autres sources d'exposition précédemment citées sont en effet soit anecdotiques, soit soumises à une très forte incertitude concernant les teneurs susceptibles d'être retrouvées dans les parties consommables des crustacés ou des poissons contaminés, notamment en l'absence d'une méthode de dosage validée.

2.2.1. Données de contamination

Le tableau IV-XII (chapitre IV), relatif aux données de contamination de l'eau traitée, a permis de définir une distribution des concentrations en microcystines pouvant être rencontrées dans l'eau d'alimentation.

Ces données proviennent de 45 sites répartis dans 13 départements et sont comprises entre « inférieur à la limite de quantification ($0,16 \mu\text{g.L}^{-1}$) » et $1,9 \mu\text{g.L}^{-1}$. Du fait que les dosages de microcystines tendent à être réalisés quand l'abondance des cellules de cyanobactéries dans les eaux brutes est élevée, ces données de contamination ne sont pas représentatives des niveaux de contamination auxquels la population générale est exposée. Elles traduisent seulement l'existence d'une situation de contamination à une période donnée qui concerne une population desservie à partir de ressources présentant des proliférations de cyanobactéries identifiées.

Par ailleurs, il convient de rappeler que les performances des différentes méthodes utilisées pour générer ces données n'étant pas connues et compte tenu des difficultés soulignées dans le chapitre IV, la qualité relative des données utilisées pour ces évaluations doit être gardée présente à l'esprit lors de l'interprétation des résultats des estimations d'exposition.

2.2.2. Niveaux de consommation retenus en eau de boisson

Les données de consommation de l'eau de boisson sont apportées par le résultat de l'enquête alimentaire INCA 99⁽³⁸⁾ réalisée auprès de 3003 individus, enfants et adultes, représentatifs de la population française (Agence française de sécurité sanitaire des aliments - Observatoire des consommations alimentaires 2003). Dans cette enquête, l'eau non chauffée est représentée par l'eau du robinet telle que consommée, l'eau chauffée correspondant à l'eau du robinet consommée sous forme de thé ou de café. Les données d'enquête ont permis d'exprimer, selon une loi Gamma, la distribution de la consommation d'eau du robinet par jour, ramenée au poids corporel des individus pour les 5 catégories d'âge (tableau VII-II).

Tableau VII-II : Consommation d'eau totale (froide et chauffée) par classes d'âges en $\text{mL.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

	n	Percentile 50	Percentile 95	Percentile 99
3-4 ans	178	14,9	41,1	59,0
5-8 ans	334	11,8	33,7	49,8
9-11 ans	238	8,2	22,9	34,5
12-14 ans	268	6,8	19,1	30,7
15 ans et +	1 474	6,9	21,5	30,5

Le niveau de consommation maximale est fixé à $60 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$, ce qui correspond à environ deux fois la valeur du Percentile 99 de la consommation chez l'adulte.

2.2.3. VTR retenue

La valeur toxicologique de référence à laquelle sont comparés les résultats des simulations d'exposition aux microcystines est la DJT de la microcystine-LR, fixée par l'OMS à $0,04 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (poids corporel). Cette approche tient compte de la position exprimée sur les mélanges de microcystines en conclusion du chapitre III.

Compte tenu des propriétés toxicologiques des microcystines, une valeur toxicologique de référence aiguë de $2,5 \mu\text{g.kg pc}^{\circ}$ a été proposée au chapitre III.

(38) Cette enquête a été réalisée par le CREDOC-DGAL-Afssa en 1998-99. Elle recueille toutes les prises alimentaires des individus pendant une semaine entière. Les données de consommation alimentaire ont été obtenues à partir de carnets de consommation, renseignés sur une période de 7 jours consécutifs. L'enquête a été réalisée auprès de 3 003 individus, enfants et adultes, représentatifs de la population française métropolitaine. La représentativité nationale a été assurée par stratification (âge, sexe, PCS individuelle et taille du ménage). L'échantillon des adultes comprend 1 985 individus de 15 ans et plus. Les calculs ne portent que sur les adultes normo-évaluants soit 1 474 individus. L'échantillon des enfants regroupe 1018 individus âgés de 3 à 14 ans. Ne disposant d'aucune formule permettant de sélectionner les individus sous-évaluants, cet échantillon n'a pas été redressé.

2.2.4 Estimation du risque de dépassement de la DJT de la MC-LR lié à une exposition par l'eau d'alimentation, selon une approche probabiliste

En s'appuyant sur les paramètres d'entrée précédemment décrits, la simulation de calcul a été réalisée à partir des 10 000 tirages de type Monte Carlo dans la distribution des concentrations et des consommations à l'aide d'un logiciel (Cristal Ball 2000Pro v.5, Decisioneering Inc.). Le résultat de cette simulation est une distribution du quotient de danger, qui se définit comme le rapport entre la dose d'exposition journalière et la DJT (QD = estimation de l'exposition journalière/DJT).

Un quotient de danger inférieur à la valeur 1 pour un niveau d'exposition donné permet de conclure que la population reste exposée à un niveau inférieur à la dose journalière tolérable.

Les résultats de la distribution des quotients de danger sont présentés dans le tableau VII-III.

Tableau VII-III : Distribution des quotients de danger simulés pour différentes classes d'âge, concernant l'exposition aux microcystines par l'eau d'alimentation de distribution publique.

Percentiles	3-4 ans	5-8 ans	9-11 ans	12-14 ans	adultes
2,5%	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
5,0%	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01
50,0%	0,07	0,06	0,04	0,03	0,04
95,0%	0,30	0,26	0,19	0,16	0,17
97,5%	0,48	0,40	0,29	0,26	0,27
99,0 %	0,78	0,68	0,49	0,41	0,45

La grille de lecture du tableau est la suivante : par exemple, pour 97,5 % de la population adulte, le quotient de danger est inférieur à 0,27.

L'ensemble des quotients de danger obtenus à partir des 226 données disponibles en eau traitée est inférieur à 1. Les plus fortes valeurs de quotient de danger s'observent chez les jeunes enfants en raison d'une consommation rapportée au poids corporel plus importante que celles des autres classes d'âge. Cependant à ce jour la bibliographie ne fait état d'aucune sensibilité particulières aux microcystines pour ces classes d'âge.

2.3. Appréciation des situations de dépassement de la limite de qualité réglementaire

La démarche proposée a pour but de décrire l'exposition théorique d'une personne exposée à une certaine concentration de microcystines *via* l'eau d'alimentation et de comparer cette exposition soit à la DJT selon une approche déterministe ou selon une approche probabiliste.

Interrogé par le groupe de travail, le Comité d'Experts Spécialisé « Résidus et contaminants chimiques et physico-chimiques » (CES « RCCP ») de l'Afssa s'est estimé conscient qu'une des difficultés du gestionnaire des situations accidentelles où la contamination est limitée dans le temps est de pouvoir se situer par rapport, non pas à une valeur d'exposition vie entière, mais à une valeur acceptable pour une courte période de temps. Cependant, du point de vue toxicologique et au regard des données disponibles, il n'a pas estimé possible de définir une "courte période de temps". Le CES RCCP de l'Afssa a estimé qu'il n'est pas pertinent de fixer une concentration maximale tolérable dans l'eau pour une courte période de temps, simplement en jouant sur un facteur de sécurité, tel que celui du passage du chronique au subchronique, et sans pouvoir définir la période de temps d'exposition acceptable.

Le CES RCCP de l'Afssa estime qu'il serait plus approprié de s'orienter vers la définition d'une dose de référence aiguë (ARfD) à l'instar du *Codex Alimentarius* qui, afin de protéger le consommateur d'une exposition aiguë (ingestion en une journée), fixe des ARfD par exemple pour certains pesticides dont les effets peuvent se manifester rapidement (effets neurotoxiques). Une valeur toxicologique de référence aiguë de 2,5 µg.kg pc⁻¹ est proposé en conclusion du chapitre III par ce CES.

2.3.1. Évaluation de l'exposition théorique chronique (approche déterministe)

2.3.1.1. Évaluation du quotient de danger pour un individu de 60 kg, 100 % de la DJT étant attribuée à l'eau potable

Conformément à la position exprimée en conclusion du chapitre III sur les mélanges de microcystines, les scénarios d'exposition proposés dans le tableau VII-IV prennent en compte toutes les microcystines, sommées de façon arithmétique, l'eau d'alimentation étant considérée comme la seule source de microcystines.

L'exposition théorique aux microcystines par l'eau d'alimentation est estimée par le calcul d'un apport journalier maximum théorique (AJMT) pour différentes concentrations en microcystines dans l'eau d'alimentation, pour un individu de 60 kg consommant 2 L par jour. La DJT de l'OMS de 0,04 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ pour la microcystine-LR conduit, pour un individu de 60 kg consommant 2 L par jour, à un apport journalier tolérable (AJT) de 2,4 $\mu\text{g}\cdot\text{j}^{-1}$.

Le quotient de danger est calculé pour les différentes valeurs de contamination par les microcystines. Les résultats sont présentés dans le tableau VII-IV.

Tableau VII -IV: Scénarios d'exposition aux microcystines par l'eau d'alimentation et quotients de danger associés.

Concentration de l'eau ($\mu\text{g MCs}\cdot\text{L}^{-1}$)	AJMT pour un individu de 60 kg consommant 2 L d'eau ($\mu\text{g}\cdot\text{j}^{-1}$)	AJT pour un individu de 60 kg ($\mu\text{g}\cdot\text{j}^{-1}$)	QD
1	2	2,4	0,83
1,2	2,4		1
1,5	3		1,25
1,8	3,6		1,5
2	4		2,67

L'ingestion quotidienne d'une eau dont la concentration en microcystines est proche de 1,2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ exposerait, selon ce scénario, un individu de 60 kg à une dose équivalente à la dose journalière tolérable de l'OMS, sans prendre en compte les éventuels autres apports en microcystines.

La DJT n'ayant été fixée que pour la microcystine-LR, le fait de sommer l'ensemble des microcystines dosées et de comparer cette exposition à la DJT de la MC-LR est une hypothèse plutôt conservatrice, car les données toxicologiques indiquent que la MC-LR fait partie des variants de microcystines les plus toxiques, sur le critère DL_{50} .

2.3.1.2. Prise en compte de la consommation journalière connue de la population française

Selon l'hypothèse d'une sensibilité aux microcystines indépendante de l'âge (chapitre III), C_a , la concentration maximale tolérable dans l'eau d'alimentation pour une consommation vie entière peut s'écrire en fonction de α , la proportion de la DJT attribuée à l'eau d'alimentation, et q_a , la quantité journalière d'eau d'alimentation ingérée par kg de poids corporel :

$$C_a = \alpha \times \frac{DJT}{q_a}$$

La DJT définie par l'OMS pour la microcystine-LR, utilisée par défaut pour la somme des microcystines, est de 0,04 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$.

Au sein de la population française âgée de 3 ans et plus, la classe d'âge la plus exposée, de par sa consommation d'eau, est celle des enfants de 3 à 4 ans (tableau VII-II et VII-III). Cette classe d'âge présente une distribution de consommation et de masse corporelle connue par le biais de l'étude INCA. Selon le tableau VII-II, la valeur q_a (quantité journalière d'eau d'alimentation ingérée par kg de poids corporel) au 95^e percentile de cette classe d'âge est de 0,04 $\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$.

Si l'apport en microcystines est totalement attribué à l'eau d'alimentation $\alpha = 1$, la concentration maximale tolérable dans l'eau d'alimentation, protectrice pour le 95^e percentile de la classe d'âge des 3-4 ans de la population française serait de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Si la proportion de l'apport en microcystines attribuée à l'eau α est réduite à 0,8 pour tenir compte des **apports par d'autres aliments ou d'autres expositions**, la **concentration maximale tolérable** pour que la DJT ne soit pas dépassée, au percentile 95 des données de consommation de la population française, pour des individus de 3 ans et plus, serait de **0,8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$** .

2.3.2. Évaluation de l'exposition théorique chronique et calcul du quotient de danger (approche probabiliste)

La démarche proposée a pour but d'estimer le quotient de danger pour une population exposée à différents niveaux de concentration en microcystine-LR, dans l'eau de boisson, supérieurs à la limite de qualité fixée à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Les données de consommation d'eau sont les mêmes que celles décrites au point 2.3.2 auxquelles on ajoute une valeur minimale de 170 $\text{mL}\cdot\text{j}^{-1}$ et une valeur maximale de 280 $\text{mL}\cdot\text{j}^{-1}$ pour tenir compte de l'apport en eau lors de la cuisson des aliments (Meyer *et al.* 1999).

Le résultat de la simulation, obtenue à partir de 10 000 itérations de type Monte-Carlo (Crystal Ball 2000Pro v.5, Decisioneering Inc.), est une distribution du quotient de danger pour la population française en considérant différents niveaux de concentration en microcystine-LR dans l'eau de boisson ingérée par cette population. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VII-V.

Tableau VII-V : Distribution du quotient de danger (QD) pour une population ingérant une eau présentant différentes teneurs en microcystine-LR.

Concentration en Microcystine-LR ($\mu\text{g}/\text{L}$)	% population QD < 1	P95 QD	P97,5 QD	QD max
1	99,9	0,55	0,65	1,07
1,5	97,4	0,85	1,01	1,61
1,8	94,5	1,02	1,22	1,93
2	92,5	1,13	1,33	2,12
2,5	86,6	1,40	1,69	2,67

La grille de lecture du tableau est la suivante : par exemple, le quotient de danger est inférieur à 1 (deuxième colonne) pour 94,5 % de la population utilisant une eau dont la concentration en MC-LR est proche de 1,8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Pour 97,5 % de la population, le quotient de danger est inférieur à 1,22 (quatrième colonne) ; le QD de danger maximum estimé pour cette situation est de 1,93.

Ceci peut être transposé à la somme des microcystines, si on considère que la toxicité des différents variants est équivalente à celle de la microcystine-LR (cf. chapitre III).

2.4. Relation entre concentrations en microcystines et présence des cyanobactéries dans les eaux brutes destinées à la production d'eau d'alimentation

Le ratio entre les concentrations en microcystines en eau brute et en eau traitée calculé pour 20 prélèvements conjoints dont la concentration en eau traitée est supérieur au seuil de quantification de la base Afssa-Afsset est compris entre 0,56 et 14,6, avec une moyenne de l'ordre de 2 (Chapitre IV, § 5.2).

Compte tenu de la limite de qualité réglementaire de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, une analyse de la base a été conduite afin de calculer, pour les **eaux brutes** destinées à la production d'eau potable, les risques de dépassement des concentrations de 1 et 2 μg de microcystines par litre, en fonction du nombre de cellules de cyanobactéries dénombrées dans un prélèvement.

2.4.1. Méthode

Ont été utilisés pour cette analyse 386 résultats de prélèvements réalisés en eau brute utilisée pour la production d'eau d'alimentation entre 2002 et 2004. Cinquante huit lieux de prélèvements sont concernés, soit 53 communes et 21 départements. Les données proviennent pour 235 d'entre elles de l'année 2002, pour 38 d'entre elles de l'année 2003 et pour 113 d'entre elles de l'année 2004. Quatre vingts pourcents des données proviennent des mois de juillet à septembre inclus.

À chaque prélèvement est associé :

1. un résultat numérique de dénombrement cellulaire de cyanobactéries non nul ;
2. un résultat de dosage des microcystines au-dessus ou en-dessous du seuil de détection-quantification qui est égal à 0,16 µg.L⁻¹. Les méthodes analytiques employées pour le dosage des microcystines sont la méthode HPLC (essentiellement HPLC-UV) pour 293 résultats et la méthode ELISA pour 93 résultats.

La probabilité de dépassement de différentes concentrations en microcystines est exprimée en fonction log base 10 du nombre de cellules de cyanobactéries grâce à une régression logistique. Le modèle employé s'exprime donc sous la forme explicitée dans l'encadré ci-dessous.

$$\text{logit}(P_{MC>S}) = \alpha + \beta \times \log(NbCC)$$

où :

- $\text{logit}(P) = \log(P/(1 - P))$ est la fonction logit ;
- $P_{MC>S}$ est la probabilité que la concentration en microcystines dépasse la valeur seuil S ;
- $NbCC$ est le nombre de cellules de cyanobactéries ;
- α et β sont les coefficients de la régression estimés grâce aux résultats de prélèvements.

Un modèle quadratique ($\alpha + \beta \times \log(NbCC) + \gamma \times [\log(NbCC)]^2$) a également été testé à titre de comparaison. Il n'est pas apparu comme significativement différent du modèle linéaire.

Ce modèle est ajusté sur les résultats extraits de la base Afssa/Afsset au travers d'une variable MC_S qui vaut 1 lorsque la concentration en microcystines dépasse la valeur seuil S et 0 dans le cas contraire. Une fois le modèle ajusté et les coefficients de la régression estimés, ce modèle permet la prédiction de valeurs de risques de dépassement de différents seuils sur la concentration en microcystines pour toute valeur d'abondance et ce quel que soit le nombre de données présentes dans l'échantillon initial. L'intervalle de confiance de cette prédiction dépend néanmoins du nombre de données de l'échantillon.

2.4.2. Résultats

Les résultats présentés dans le tableau VII-VI s'interprètent de la manière suivante.

Pour 2 000 CC.mL⁻¹, la probabilité de dépasser la valeur de 1 µg.L⁻¹ de microcystines dans l'eau brute est de 0,05 (i.e. 5 %). Cette valeur a 95 % de chance d'être inférieure à 0,1 (i.e. inférieure à 10 %) compte tenu des hypothèses de modélisation. Autrement dit, on a moins de 5 % de chance que le risque de dépasser 1 µg.L⁻¹ soit supérieur à 0,1 quand le nombre de cellules de cyanobactéries est égal à 2 000 CC.mL⁻¹.

De la même façon, on a moins de 5 % de chance que le risque de dépasser 2 µg.L⁻¹ soit supérieur à 0,05 quand le nombre de cellules de cyanobactéries est égal à 5 000 CC.mL⁻¹.

Tableau VII-VI : Probabilités de dépassement des concentrations de 1 et 2 µg.L⁻¹ en eau brute en fonction du nombre de cellules de cyanobactéries dénombrées.

NbCC	p(MC>1µg.L ⁻¹)		p(MC>2µg.L ⁻¹)	
	ME*	IC** (5 % - 95 %)	ME*	IC** (5 % - 95 %)
500	0,03	0,01 - 0,07	0,01	0 - 0,03
1 000	0,04	0,02 - 0,08	0,01	0 - 0,03
2 000	0,05	0,02 - 0,1	0,01	0 - 0,04
5 000	0,07	0,04 - 0,12	0,02	0,01 - 0,05
10 000	0,09	0,06 - 0,14	0,03	0,02 - 0,07
20 000	0,12	0,09 - 0,17	0,05	0,03 - 0,08
50 000	0,17	0,13 - 0,22	0,08	0,05 - 0,12
100 000	0,22	0,17 - 0,28	0,11	0,08 - 0,16
200 000	0,28	0,21 - 0,36	0,15	0,1 - 0,22
500 000	0,37	0,26 - 0,49	0,23	0,14 - 0,35

* ME = Valeur de meilleure estimation dans la prédiction.

** IC = Intervalle de confiance de la prédiction (à 90 % entre les deux bornes).

Ces résultats ont été obtenus à partir de prélèvements effectués sur 58 sites avec une moyenne de 7 prélèvements par site. L'analyse menée sur la base de données cyanobactéries (chapitre IV) a fait apparaître des différences inter-sites importantes. **Ces résultats ne peuvent en l'état être appliqués à un site en particulier. Ils correspondent à une estimation moyenne pour un ensemble de sites dont, malheureusement, il est difficile d'évaluer la représentativité.**

Ces résultats concernent les mois de juillet à septembre essentiellement et surestiment probablement le risque pour les autres mois de l'année. En revanche ils sont fondés sur le nombre total de cellules de cyanobactéries, tous genres confondus. Il a été montré que seuls certains genres (dont *Microcystis* évidemment) étaient statistiquement reliés à la présence de microcystines. De ce fait, les valeurs de risque affichées sont excessives lorsque les genres producteurs de microcystines sont absents et sous-estimés lorsqu'ils sont en proportion importante.

Ces points sont à garder en mémoire avant d'utiliser les résultats de cette modélisation pour proposer un schéma de surveillance des eaux destinées à la production d'eau d'alimentation.

2.5. Synthèse

Différentes cyanotoxines peuvent s'accumuler dans les tissus d'animaux susceptibles d'être consommés par l'homme. Le transfert des cyanotoxines dans les chaînes trophiques est encore insuffisamment connu pour que le risque toxique lié à la consommation de poissons ou de crustacés par l'homme puisse faire l'objet d'une évaluation, mais les produits de la pêche doivent être considérés comme une source possible d'exposition. L'accumulation préférentielle des toxines dans certains organes peut être prise en compte pour apprécier le risque lié à la consommation de ces animaux et aux habitudes alimentaires associées.

Pour pouvoir mener une évaluation des risques liés à la contamination de ces produits par les cyanotoxines, il conviendrait de pouvoir appréhender leur niveau de contamination, voire la biodisponibilité des toxines accumulées dans ces matrices complexes. Actuellement, les protocoles d'extraction et de purification des microcystines à partir des matrices alimentaires complexes ne sont pas validés. Les résultats de dosages sur ces matrices sont à considérer avec précaution, l'incertitude associée pouvant être importante.

La contamination de compléments alimentaires à base de cyanobactéries par des microcystines a été rapportée. En l'absence de données sur la consommation de ces produits en France et sur leur niveau de contamination, l'évaluation des risques liés à ces produits n'est pas possible. Il convient cependant de souligner que la limite de sécurité de 1 µg de microcystines par gramme adoptée par le département de l'agriculture de l'Oregon ne tient pas compte du fait que l'OMS affecte 80 % de la dose journalière tolérable de la microcystine-LR à l'apport par l'eau d'alimentation.

Des microcystines, ainsi que des cellules de cyanobactéries, ont été détectées, voire dénombrées, dans l'eau d'alimentation après traitement. L'analyse de la base Afssa-Afsset montre une variabilité de l'élimination des microcystines et des cyanobactéries par les filières. Pour les filières les moins efficaces dans la rétention de ces toxines, un risque ponctuel d'exposition ne peut être écarté. La population potentiellement exposée n'est pas connue précisément. Si le traitement de l'eau n'est pas pris en compte, sont *a priori* concernées les populations desservies à partir de ressources superficielles ou influencées par les eaux de surface qui sont susceptibles d'être contaminées par des cyanotoxines.

La représentativité de la fréquence et de l'amplitude de ces contaminations décrites à partir de la base Afssa-Afsset (226 mesures réparties sur 3 ans et 13 départements) ne peut être évaluée.

Dans la limite des données disponibles dans la base Afssa-Afsset, la simulation conduite à partir des consommations de la base de données INCA ne montre pas de dépassement de la dose journalière tolérable de la microcystine-LR. Compte tenu de l'incertitude et de la variabilité associées au niveau de contamination des eaux traitées et du facteur de sécurité utilisé dans la construction de la VTR ce résultat de l'évaluation de risque liée à l'exposition aux microcystines esquissée dans ce chapitre au vu des données actuellement disponibles est à considérer avec précaution. Une évaluation quantitative du risque pourrait être réalisée à l'avenir, à condition de disposer de données de contamination représentatives de l'exposition de la population.

Points à retenir

- Seule la microcystine-LR a été prise en compte dans cette évaluation. Parmi les différentes sources d'exposition alimentaire, seule l'eau d'alimentation a été considérée.
- Les simulations réalisées dans ces conditions montrent que le risque sanitaire chronique est nul pour la majorité de la population et faible pour les individus les plus exposés. La base de donnée utilisée pour cette évaluation de risque ne peut cependant être considérée comme représentative de la situation en France.
- Parmi la population exposée, plus les enfants sont jeunes, plus le quotient de danger est élevé.
- L'absence de données concernant les autres sources d'exposition n'exclut pas la possibilité d'une sous-évaluation de l'exposition par voie alimentaire.
- Les filières de traitement des eaux de distribution éliminent inégalement les microcystines. De ce fait, l'exposition des consommateurs ne peut être exclue.

3. Eaux de baignade et autres activités aquatiques de type récréatives

Pour rappel, la saisine de l'Afsset en date du 30 mars 2004 vise principalement à :

1. évaluer les risques sanitaires encourus par les baigneurs et autres usagers des plans et cours d'eau ;
2. proposer des valeurs limites de qualité relatives à la concentration de cellules et de toxines dans les eaux récréatives sur la base de l'évaluation des risques sanitaires.

Dans ce contexte, les concentrations maximales en cyanotoxines dans les eaux de baignade et autres loisirs auxquelles peuvent être exposées les personnes sans provoquer des effets indésirables ont été estimées et mises en regard de la concentration limite en microcystines dans les eaux de baignade actuellement recommandée en France.

Dans l'attente de données en nombre suffisant et représentatives de la pollution des cours et plans d'eau destinés à la baignade et autres activités aquatiques sur l'ensemble du territoire français permettant de procéder au calcul de l'exposition de la population générale et des travailleurs de ce secteur, une approche théorique a été utilisée par les experts de l'Afsset pour proposer des valeurs limites de qualité provisoires portant sur les paramètres d'abondance de cyanobactéries et de concentration de toxines dans les eaux récréatives.

Cette approche s'appuie sur des considérations et hypothèses maximalistes, fondées sur les deux arguments suivants :

- les experts de l'Afsset ont estimé, au regard de leurs connaissances et expérience du terrain, qu'en France métropolitaine, les personnes se baignent dans un cours ou plan d'eau pendant l'été (2 mois) et éventuellement quelques jours le reste de l'année lorsqu'un individu pratique une activité récréative ou habite près d'un cours ou plan d'eau ; pour les experts, de ce fait, la baignade n'est donc pas pratiquée de manière quotidienne. Le nombre exact de jours de baignade est inconnu, n'ayant jamais fait l'objet d'études spécifiques. Toutefois, pour les cas estimés comme « les plus extrêmes », le nombre de jours de baignade ne dépasserait pas les 7 ans sur une vie entière à raison de 4 semaines par saison avec un bain tous les jours entre 1 an et 77 ans, ou bien, le cas d'une personne habitant près d'un plan ou cours d'eau et pratiquant une activité sportive aquatique toute l'année à raison d'une fois par semaine, entre 8 ans et 77 ans ;
- les experts se sont appuyés, notamment, sur les considérations et hypothèses utilisées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ) et le National Health and Medical research council d'Australie (NHRMC) pour estimer les ordres de grandeur de valeurs guides de qualité pour les eaux de baignade.

La démarche employée est donc un peu différente de celle retenue pour les expositions dites alimentaires présentées précédemment. En effet, il s'agit de prendre en compte ici des expositions, annuellement irrégulières et répétées tous les ans tout au long de la vie, impliquant l'ingestion de faibles volumes à des eaux douces non-traitées.

Ce chapitre décrit les hypothèses et les valeurs paramétriques retenues afin d'estimer la concentration maximale de toxines dans les eaux récréatives et l'abondance maximale de cyanobactéries permettant de garantir l'absence d'effets indésirables, en l'état des connaissances scientifiques disponibles.

3.1. Modalités de surveillance des eaux de baignade et de loisirs

En France, les « zones » de cours et plans d'eau fréquentées de manière répétitive (fréquentation instantanée supérieure à 10 baigneurs) pour des loisirs aquatiques (baignade et/ou activités nautiques) sont classées comme des « zones de baignade aménagées » et à ce titre soumises à une surveillance sanitaire établie d'après les articles D1332, livre III du code de la santé publique et de la Directive 76/160/CEE du 8 décembre 1975.

En revanche, les sites fréquentés par du public pratiquant la « baignade spontanée », en l'absence de tout aménagement destiné à favoriser cette activité, doivent, si leur fréquentation le justifie et dès lors que la baignade n'y a pas été interdite, faire l'objet d'une surveillance sanitaire en application de l'article D 1332-16 du code de la santé. Leur importance relative par rapport aux baignades aménagées est variable d'un département à l'autre mais peut être prépondérante dans certains secteurs (cours d'eau de montagne ou de régions méditerranéennes). La mise en œuvre d'un contrôle sanitaire de ces zones non aménagées mais fréquentées est à la diligence de la D.D.A.S.S. (article 1332-17 du code de la santé publique), mais la prise en charge financière est une décision qui incombe, désormais, seulement à la collectivité locale concernée. Ceci entraîne des disparités d'organisation et conduit, dans certains cas, à une quasi absence de données sur la présence des cyanobactéries dans ce type de milieux qui, généralement ne sont pas réputés à risque au regard de ces proliférations, bien que cette appréciation ne repose pas sur une réelle évaluation.

Pourraient également être associées aux sites « non-aménagés », d'autres activités de loisirs que la baignade, mais entraînant cependant des contacts réguliers, plus ou moins intenses, avec les eaux, telles que la pêche et éventuellement la chasse au gibier d'eau.

L'absence de données relatives aux conditions de l'exposition et aux types de populations concernées par ces cas sortant du champ des activités réglementées ne permet pas d'aller plus loin dans la caractérisation des risques spécifiques encourus.

La collecte de données sur la contamination des cours et plans d'eau entrant ou non dans le champ des « zones de baignade réglementées » reste donc une étape essentielle à l'estimation des risques de l'ensemble de la population de France métropolitaine et d'Outre-Mer pratiquant des activités récréatives dulçaquicoles.

3.2. Sources et qualité des données utilisées pour l'estimation des valeurs limites de concentration de cyanotoxines et cyanobactéries dans les eaux de baignade et autres loisirs.

Les données concernant les niveaux de contamination des eaux douces en cyanobactéries et en cyanotoxines proviennent pour la quasi-totalité du système de surveillance sanitaire.

L'analyse statistique de ces données (base Afssa-Afsset) a permis de montrer pour les eaux de baignade que :

- leur répartition est hétérogène sur le territoire de l'hexagone avec une absence de données sur l'est de l'hexagone et des DOM-TOM et un grand nombre sur l'ouest du territoire de l'hexagone ;
- leur répartition temporelle est également hétérogène et les résultats concernent principalement les mois de juillet à septembre ;
- parmi l'ensemble de ces données (2 680 prélèvements), seuls 623 prélèvements ont fait l'objet d'un comptage de cellules et d'un dosage de microcystines. Cinq cents analyses présentent simultanément un résultat numérique de dénombrement de cyanobactéries non nul et un résultat en concentration de MCs au dessus ou en dessous du seuil de détection-quantification de la méthode CLHP-UV ou SM ($0,16 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (228 en eau de baignade et 272 en eaux destinées aux activités aquatiques) ;
- ces 500 résultats proviennent de 93 lieux de prélèvements correspondant à 92 communes et 20 départements ;
- le sous échantillon des prélèvements pour lesquels on dispose d'un résultat de dosage des microcystines est biaisé par rapport à l'échantillon total vis-à-vis de l'abondance de cellules de cyanobactéries car la recherche des toxines n'est effectuée que lorsque le nombre de cellules est supérieur ou égal à $100\,000 \text{ cellules}\cdot\text{mL}^{-1}$;
- les données saisies à ce jour dans la base Afssa-Afsset sont insuffisantes pour estimer l'exposition de la population française aux microcystines *via* l'eau de baignade, et la part qu'elle représente par rapport à l'apport total provenant de différentes sources (eau de boisson, alimentation...).

3.3. Éléments de base considérés pour l'estimation des valeurs limites de concentration de cyanotoxines et cyanobactéries dans les eaux de baignade et autres activités récréatives

3.3.1. Éléments de base des scénarios d'exposition

3.3.1.1. Hypothèses et données de référence

Au cours des activités aquatiques, l'exposition des individus aux cyanotoxines présentes sous forme intracellulaire ou dissoute, peut avoir lieu par absorption orale ou par inhalation, notamment lors de l'immersion volontaire du visage ou lors des chutes accidentelles dans l'eau. Ces phénomènes sont particulièrement fréquents au cours de la baignade et lors de la pratique de sports aquatiques tels que la planche à voile, ou le canoë-kayak. L'exposition par voie orale peut aussi avoir lieu par la mise en bouche d'eau et par le contact main/bouche, notamment chez les jeunes enfants. L'ingestion accidentelle d'écume de cyanobactéries, notamment par contact main/bouche constitue aussi une voie d'exposition.

L'exposition par contacts cutanés et cutanéomuqueux n'étant pas particulièrement documentée (voir chapitre 3 : caractérisation du danger), elle ne sera pas abordée dans la suite de ce travail. Elle gagnerait cependant à être prise en compte, dans les cas, par exemple, où le port de combinaisons humides ou de bottes et chaussons, permet un contact prolongé entre l'eau et la peau par macération pouvant favoriser la lyse de cyanobactéries. (Chorus & Fastner 2001).

L'exposition par inhalation ne sera pas considérée dans ce rapport, faute de données toxicologiques et de données relatives à l'importance du phénomène lors des activités récréatives aquatiques, bien qu'elle soit possible, en particulier lors d'immersions brutales ou de fausses routes.

Pour la suite de cette évaluation des risques, seule la voie « ingestion d'eau » est considérée.

Toutes les tranches d'âge de la population générale peuvent être exposées aux cyanotoxines lors de la baignade ou de la pratique de sports nautiques, de même que les professionnels responsables de l'encadrement d'individus ou de leur surveillance. Toutefois, ces professionnels seraient moins exposés que la population générale en raison de leur meilleure maîtrise du milieu aquatique et d'un faible nombre de chutes accidentelles dans l'eau. En outre, une étude récente sur l'estimation de l'exposition de plongeurs professionnels en eau douce et de mer, a permis d'estimer que le volume ingéré était d'environ 4,8 à 12 mL par plongée et que ces volumes seraient plus faibles lorsque les individus plongent avec un tuba ou avec un casque de plongeur (Schijven and de Roda Husman, 2005).

Parmi la population générale, les sujets les plus exposés *a priori* seraient les enfants de moins de 10 ans compte tenu du temps passé dans l'eau estimé en moyenne à 2 à 3 heures par après-midi, du nombre de baignades par jour et de leur manque de maîtrise des pratiques aquatiques (Vial 2004) ainsi que les sujets de 12 à 17 ans, en raison d'une pratique régulière d'une activité nautique au cours de l'année (Stat – INFO, 2005).

En revanche, il n'a pas été trouvée des données expérimentales publiées permettant de définir avec précision pour la population française les valeurs moyennes de durée de la baignade et la fréquence par jour et par année.

Au sein de la population générale, les enfants ont, soit une durée d'exposition plus longue lors de chaque contact avec les eaux (moins de 10 ans) ; soit une fréquence d'exposition plus importante au cours d'une année (12-17 ans).

En l'absence de données expérimentales publiées sur la durée et la fréquence de la baignade, le volume d'eau ingéré pendant les activités aquatiques ne peut être défini qu'en utilisant des valeurs par défaut. C'est la démarche adoptée par les institutions ayant effectué une estimation de risque en vue de fixer des valeurs guides ou seuils, à savoir : l'OMS, le NHMRC et INSPQ.

Selon les institutions, les volumes d'eau théoriquement ingérés par les enfants sont de 100 ou 250 mL et sont définis en fonction de la masse corporelle à laquelle on peut faire correspondre un intervalle d'âge. Ainsi, le volume d'eau assigné par l'OMS pour la masse corporelle de 15 kg est de 250 mL (Guidelines for safe recreational water environments. OMS, 2004). Cette masse corporelle est proche de celle des enfants de 2 à 7 ans en France, à savoir de 12 à 22 kg (Base CIBLEX ; Beaugelin-Seiller, *et al.* 2004 ; ADEME-INRS, 2003). L'INSPQ assigne aussi 250 mL mais aux enfants d'une masse corporelle inférieure (10 kg). Le NHMRC assigne à une masse corporelle de 10 kg correspondant au poids des enfants de 1 à 2 ans, un volume ingéré de 100 mL. Ainsi, les valeurs paramétriques les plus pénalisantes sont celles prises en compte par l'INSPQ.

3.3.1.2. Valeurs paramétriques retenues par le groupe d'experts

• Population

Les scénarios d'exposition sont élaborés pour toutes les tranches d'âge de la population : les enfants de 1 à 2 ans, > 2 à 7 ans, > 7 à 12 ans, > 12 à 17 ans et les adultes de plus de 17 ans.

• Masse corporelle

La conversion en termes de masse corporelle correspondant à ces tranches d'âge a été réalisée selon la base CIBLEX (Beaugelin-Seiller *et al.*, 2004 ; ADEME-INRS, 2003).

Pour chaque tranche d'âge, les valeurs de masse corporelle minimum pour les femmes et maximum pour les hommes proposées par la base CIBLEX ont été retenues. Ces valeurs pour les différentes tranches d'âge sont rassemblées dans le tableau VII. 1.

Dans les calculs de risque répété sur une vie entière, une masse corporelle moyenne de 60 kg a été retenue. Cette masse corporelle est couramment utilisée par l'OMS lors de la déclinaison des valeurs guides pour les micropolluants chimiques présents dans l'eau de boisson. (Recommandations de la qualité de l'eau potable. Annexe 3, Default assumptions. OMS, 2004)

• Volumes d'eau ingérés

Les volumes d'eau ingérés assignés par défaut pour les risques aigus et sub-chroniques ou intermédiaires (répétées irrégulièrement pendant une vie entière) par jour de baignade ont été fixés à :

- 100 mL pour les enfants de 1 à 2 ans (un dixième du volume assigné pour l'eau de boisson) tel que proposé par le NHMRC car les experts ont considéré que ce volume était plus pertinent, en particulier si l'on considère que cette tranche d'âge est plus surveillée par les parents que celle de 2 à 7 ans ;
- 250 mL pour les tranches d'âge de > 2 à 17 ans (un quart du volume assigné pour l'eau de boisson) et pour les adultes (un huitième du volume assigné pour l'eau de boisson).

Les valeurs tiennent compte des indications de l'OMS (Directives pour la sécurité des eaux de baignade. OMS 2004) et de l'expérience du terrain des experts. Ceci est, de plus, une hypothèse fortement conservatrice au regard d'autres études indiquant des volumes très inférieurs (S. Ratnapalan, *et al.*, 2003).

La notion de bain unique sur une journée n'est probablement pas tout à fait exacte aux périodes les plus longues et chaudes de l'année, pour lesquelles plusieurs bains par jour peuvent avoir lieu. Compte tenu de l'incertitude associée au volume d'eau ingéré pendant une journée de baignade, une analyse de sensibilité a été effectuée en attribuant un facteur de plus ou moins 50 % à la valeur choisie.

Dans le cas d'un risque chronique, le volume d'eau ingéré pris en compte est celui utilisé par l'OMS, à savoir, un adulte de 60 kg ingérant 200 mL d'eau en une seule fois ou en deux fois 100 mL (Guidelines for Safe Recreational Water Environments. OMS 2004).

Tableau VII-VII : Valeurs paramétriques de volume d'eau et masse corporelle retenus.

Âge (ans)	Masse corporelle (kg)	Volume ingéré par jour de baignade (L)	Ratio eau de boisson
1 à 2	8 à 13	0,100	0,1
> 2 à 7	12 à 22	0,250	0,25
> 7 à 12	19 à 40	0,250	0,25
> 12 à 17	34 à 70	0,250	0,25
> 17	42 à 83	0,250	0,125
Adultes (exposition chronique)	60 (valeur moyenne)	0,200	0,1

3.3.2. Doses-repères et Valeurs toxicologiques de référence

3.3.2.1. Données de la littérature

Les seules valeurs toxicologiques de référence (VTR) retrouvées dans la littérature sont celles proposées par l'OMS et le NHRMC pour la MC-LR, l'INSPQ pour les MC-LR et l'anatoxine, la FAO/IOC/OMS pour les saxitoxines :

- l'OMS a dérivé une DJT pour une exposition chronique à la MC-LR à partir d'une étude sub-chronique chez la souris ;
- le NHRMC dérive une VTR pour une exposition sub-chronique à la MC-LR à partir d'une étude subchronique chez le porc ;
- l'INSPQ dérive une VTR pour une exposition sub-chronique aux MC-LR et une pour l'anatoxine a à partir de deux études réalisées chez la souris ;
- la FAO dérive une VTR pour une exposition aiguë aux saxitoxines, dérivée à partir des études épidémiologiques chez l'homme.

Pour la MC-LR, au delà de la différence entre modèles animaux et le type de risque considéré, les VTRs déclinées par ces institutions diffèrent aussi parce qu'elles assignent des facteurs d'incertitude différents. Ce facteur est de 100 pour l'INSPQ ; il tient compte de la variabilité intra-espèce (facteur de 10) et de la transposition de la DSENO de la souris à l'homme (facteur de 10). L'OMS utilise un facteur de 1 000 pour tenir compte de la variabilité intra-espèce (facteur de 10), de la variabilité inter-espèce (facteur de 10) et du faible nombre de données disponibles sur la toxicité chronique et la cancérogenèse (facteur de 10). Pour dériver une VTR sub-chronique, le NHRMC utilise un facteur de 5000 incluant la variabilité inter-espèce (facteur de 10), intra-espèce (facteur de 10), l'incertitude lié à la cancérogenèse (facteur de 10) et la transposition d'une DMENO à une DSENO (facteur de 5). Les résultats de ces calculs sont les suivants pour la MC-LR :

- DJT dérivée par l'OMS 0,04 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$;
- VTR dérivée par l'INSPQ 0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$;
- VTR dérivée par le NHRMC 0,02 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$.

Pour les neurotoxines, l'INSPQ a dérivé une valeur de référence de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ pour l'anatoxine-a pour une exposition répétée liée à l'ingestion d'eau de baignade à partir d'une DSENO de 98 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ et d'un facteur d'incertitude de 100 (Fawell *et al.* 1999b) et la FAO/IOC/WHO (2004) ont dérivé une dose de 0,7 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pour une exposition aiguë aux saxitoxines (cf. chapitre III de ce même rapport).

À ce jour, aucune institution internationale n'a publiée de VTR pour des effets aigus. Ainsi, les experts du CES « Résidus et contaminants chimiques et physico-chimiques » (RCCP) ont décliné une VTR pour l'exposition aiguë (ingestion unique) associée à la présence de MC-LR. Cette valeur est indiquée dans le chapitre III – toxicologie de ce même rapport et rappelée ci-après.

3.3.2.2. Valeurs toxicologiques de référence et valeurs repères retenues par le groupe d'experts

• Exposition associée à une ingestion unique

Les experts du groupe de l'Afsset ont considéré qu'une exposition aiguë existe éventuellement lors de l'ingestion accidentelle d'eau contaminée par des cyanotoxines, lors d'une chute dans l'eau par exemple une fois dans la vie et qui peut concerner l'ensemble d'une journée et non une seule ingestion. Par conséquent, la concentration maximale de MC-LR et de saxitoxines dans les eaux de baignade permettant de garantir l'absence d'effets indésirables lors d'une exposition aiguë a été calculée en utilisant la VTR aiguë déclinée par les experts du CES RCCP : 2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pour la MC-LR (dérivée d'après Dietrich et Hoeger, 2005), et la VTR aiguë proposé par la FAO/IOC/WHO (2004) pour les saxitoxines de 0,7 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. En revanche, pour le cas de l'ingestion accidentelle d'écume, il n'existe pas de VTR spécifique. Toutefois, une DSENO de 333 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ a été établie lors d'une étude de gavage de souris avec un extrait de cyanobactéries toxiques appartenant au genre toxique *Anabaena flos-aquae* (Schaeffer *et al.* 1999). Cette valeur est 10 fois plus élevée que celle obtenue lors des études de gavage avec les toxines purifiées. Sur la base de ce constat et à toxicité égale par rapport à des eaux contaminées par ces mêmes toxines, ce serait des volumes de 1 à 2 litres d'écumes qui devraient être ingérés pour atteindre la dose de toxicité aiguë. Cette hypothèse est peu réaliste, même pour de jeunes enfants qui joueraient dans de telles écumes. Il faut noter cependant, que cette étude n'a pas été jugée d'une qualité scientifique suffisante par plusieurs groupes d'expertise internationaux.

Pour ces raisons, en l'absence de données scientifiques plus solides compte tenu de la forte variabilité de la concentration en cyanobactéries dans les écumes et du fait que ces écumes ne sont pas obligatoirement toxigènes, le groupe d'expertise de l'Afsset décide de ne pas retenir un scénario spécifique d'exposition aux écumes.

Il n'est resté pas moins que des procédures de gestion de précaution doivent être définies pour éviter le contact avec des écumes de cyanobactéries même sans savoir si elles contiennent des toxines.

- **Exposition répétée irrégulièrement sur une vie entière.** Les experts Afsset estiment, d'après leurs connaissances et leurs expériences, que l'exposition par la baignade ou la pratique régulière d'une activité de loisir aquatique est une exposition répétée annuellement mais de manière discontinue sur une vie entière. Dans ce contexte et bien que le nombre exact de jours de baignade soit inconnu, ils ont retenu par défaut et provisoirement, une hypothèse maximaliste qui tient compte « des cas les plus extrêmes » tel que l'exemple d'un individu se baignant quotidiennement pendant 4 semaines par saison d'été, où bien, le cas d'un individu habitant près d'un plan ou cours d'eau et pratiquant une activité sportive pendant plusieurs mois de l'année. Cette hypothèse maximaliste conduit à estimer que l'exposition répétée par la baignade et/ou la pratique de loisirs aquatiques, cumulée sur une vie entière, serait d'environ 10 % d'une vie entière.

Ce type d'exposition ne correspondant pas à une des définitions d'exposition classiques et acceptées au niveau international, deux positions scientifiques divergentes sur la valeur toxicologique à utiliser pour estimer l'exposition aux cyanotoxines, par les eaux de baignade sont apparues parmi les experts et cette divergence nécessite que soient présentées les deux positions :

- l'une considère que l'exposition par la baignade et autres loisirs aquatiques correspond plus à la définition d'une exposition sub-chronique ou intermédiaire telles que définies, respectivement, par l'Environmental Protection Agency des États Unis (US EPA, 1993) et par l'Agency for Toxic Substances and Disease Register (ATSDR 2006) ; par conséquent, les experts partisans de cette approche préconisent d'utiliser la valeur toxicologique repère sub-chronique de la MC-LR de **0,4 µg.kg⁻¹ par jour de baignade**, telle que proposée par l'INSPQ ; cette valeur est déclinée à partir de la DSENO de 40 µg.kg⁻¹.j⁻¹ de l'étude d'exposition sub-chronique (Fawell *et al.*, 1994) étude considérée par l'ensemble des experts toxicologues comme pertinente (cf. chapitre III toxicologie de ce même rapport ; étude retenue pour la construction de la VTR appliquée à l'alimentation) divisée par un facteur d'incertitude de 100 (variabilité inter- et intra-espèce). Dans le contexte particulier de la baignade, les experts qui proposent d'appliquer l'approche sub-chronique ne jugent pas nécessaire de retenir le facteur supplémentaire de 10 qui est appliqué par l'OMS pour l'eau d'alimentation et destiné à tenir compte à la fois de la durée de l'étude (passage de sub-chronique au chronique), de la promotion tumorale et des connaissances réduites dans le domaine de la toxicité et de la reproduction (cf. point 1.1.1.11- conclusions du chapitre III toxicologie) ; ils ne retiennent pas non plus la VTR proposée par le NHMRC car fondée sur une DMENO et non une DSENO ;
- l'autre estime que l'étude de toxicité subchronique de Fawell *et al.* n'est pas assez solide pour s'affranchir d'un facteur de sécurité supplémentaire de 10, d'autant plus que les observations de Heinze (1999) mettent en évidence des altérations hépatiques chez le rat lors de l'administration orale de 50 µg.kg⁻¹ de MC-LR pendant 28 jours, ce qui laisse une marge de sécurité faible par rapport à la DSENO de 40 µg.kg⁻¹.j⁻¹. Par ailleurs, en l'état actuel des données disponibles, il apparaît difficile de définir la période de temps qui correspondrait à une exposition subchronique pour laquelle il serait possible de garantir la sécurité des personnes au regard de ce risque. Ils préconisent donc de travailler avec la VTR chronique définie par l'OMS, c'est-à-dire avec la **DJT de 0,04 µg.kg⁻¹.j⁻¹** (bien qu'elle ne soit pas la plus conservatrice, celle du NHMRC conduisant à une DJE de 0,02 µg.kg⁻¹.j⁻¹), dans l'attente de l'obtention de données toxicologiques permettant de mieux caractériser le pouvoir génotoxique et l'activité de promotion tumorale des MCs. Enfin, en raison du petit nombre de données de contamination dans l'eau de boisson, l'eau de baignade et les aliments, les experts considèrent qu'il est difficile d'estimer la contribution relative à la DJT de ces trois sources d'exposition. Cependant, selon les hypothèses de l'OMS, néanmoins, certains experts estiment que 80 % de la DJT pourraient être attribués à l'eau de boisson et les 20 % restants aux autres sources d'apport de cyanotoxines.

Les représentants des deux opinions acceptent, en revanche et conjointement, que la toxicité des cyanotoxines soit une toxicité dite à seuil. Le tableau VII.2 récapitule l'ensemble des valeurs paramétriques retenues pour estimer les risques liés à la baignade.

Tableau VII-VIII : Valeurs paramétriques prises en compte par diverses institutions pour l'estimation des risques liés à une exposition à la MC-LR par l'ingestion des eaux de baignade et valeurs retenues pour la présente évaluation de risques.

	OMS*		NHMRC**		INSPQ***	Présente étude
	Enfants	Adultes	Enfants	Adultes	Enfants	Enfants et Adultes
Masse corporelle (kg)	15	60	10	70	10	Enfants : 8 à 13 12 à 22 19 à 40 34 à 70 Adultes : 42 à 83
Volume d'eau ingéré accidentellement (mL)	250	100-200	100	100	250	8 à 13 kg : 100 > 12 : 250
Valeur toxicologique de repère de MC-LR	40 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ (DSENO, souris, 90 jours)		100 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ (DMENO, porc, 44 jours)		40 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ (DSENO, souris, 90 jours)	40 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ (DSENO, souris, 90 jours)
Facteur de sécurité	1 000 10 : variabilité inter-espèces 10 : variabilité intra-espèce 10 : extrapolation étude sub-chronique à chronique, manque de données sur la toxicité chronique et promotion tumorale		5 000 5 : utilisation d'une DMENO à la place d'une DSENO 10 : variabilité inter-espèces 10 : variabilité intra-espèce 10 : incertitude sur cancérogenèse		100 10 : variabilité interspécifique 10 : variabilité interindividuelle	100 (sub-chronique) ou 1 000 (chronique) 10 : variabilité inter-espèces 10 : variabilité intra-espèce 10 : associée à l'extrapolation d'une exposition sub-chronique à une exposition chronique et incertitude sur cancérogenèse
Nombre de jours d'exposition par an	Tous les jours sur une vie entière Risque faible : 2 à 4 µg.L ⁻¹ de MC-LR		11		NP	exposition sub-chronique : environ 10 % d'une vie entière exposition chronique : DJT soit exposition quotidienne vie entière
Valeurs guides pour les eaux de baignade	Risque modéré : 20 µg.L ⁻¹ MC-LR avec <i>M. aeruginosa</i> et 40 µg.L ⁻¹ MC-LR avec <i>Plantothrix agardii</i> Risque élevé : écume		8 µg.L ⁻¹	56 µg.L ⁻¹	16 µg.L ⁻¹	Indiqués dans la suite de ce chapitre

NP : non précisé ; MC-LR : microcystine-LR, * OMS 2004 ** NHMRC 2004, ***INSPQ 2005

Les discussions entre les experts sur l'approche à utiliser lors d'une exposition répétée de manière discontinue sur une vie entière montrent qu'il n'existe pas d'approche ou de définition de VTR validée par un panel d'experts internationaux ou nationaux pour ce type d'expositions. Ceci conduit les experts à recommander la mise en place d'un groupe d'experts internationaux pour examiner cette question, notamment parce que ce type d'exposition est couramment rencontré dans le cadre de l'exposition de population générale et professionnelle *via* l'environnement.

En ce qui concerne la cylindrospermopsine, bien que les experts du CES RCCP de l'Afssa aient proposée une VTR chronique, les experts Afsset ont considéré qu'en l'absence de méthode analytique et de données de fréquence et amplitude de cylindrospermopsine dans les eaux de baignade, il n'était pas pertinent d'estimer une limite de qualité.

3.4. Estimation d'une concentration maximale tolérable de cyanotoxines dans les eaux à usage de baignade et autres activités récréatives.

3.4.1. Objectif et méthode

L'objectif est d'estimer la concentration maximale tolérable (CMT) de cyanotoxines dans les eaux récréatives permettant de garantir l'absence d'effets indésirables lors d'une ingestion unique (exposition aiguë) ou lors des ingestions répétées annuellement (exposition sub-chronique) ou répétées quotidiennement (exposition chronique). Dans tous les cas la concentration maximale tolérable découle directement des valeurs de référence toxicologiques et des doses repères retenues, exposées dans le paragraphe précédant et selon la formule suivante :

$$CMT = VTr \times mc / V$$

CMT = concentration maximale tolérable de cyanotoxine dans les eaux récréatives

VTr = valeur toxicologique repère (DJT ou VTR sub chronique ou aiguë) en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$

mc = masse corporelle en kg

V = volume d'eau ingéré par jour de baignade en $\text{L}\cdot\text{j}^{-1}$.

3.4.2. Résultats

Les tableaux VII-IX à VII-XI présentent les valeurs de CMT de cyanotoxines dans les eaux à usage récréatif permettant de garantir l'absence d'effet nocif observable lors d'une exposition aiguë ou sub-chronique en fonction de l'âge des individus et obtenues en utilisant les valeurs paramétriques indiquées dans les paragraphes précédents.

Tableau VII-IX : Scénario d'exposition aiguë : Concentrations maximales tolérables (CMTs) de MC-LR pour l'eau à usage récréatif lors d'une ingestion unique.

Âge	Masse corporelle (kg)	Volume d'eau ingérée (L)	Concentration maximale tolérable de MC-LR pour l'eau à usage récréatif lors d'une ingestion unique ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		
			CMT	+ 50 % du volume d'eau	- 50 % du volume d'eau
1 à 2 ans	8	0,100	200	133	400
	12	0,100	300	200	600
> 2 à 7 ans	12	0,250	120	80	240
	22	0,250	220	147	440
> 7 à 12 ans	19	0,250	190	127	380
	40	0,250	400	267	800
> 12 à 17 ans	34	0,250	340	227	680
	77	0,250	770	513	1 540
Adulte > 17 ans	42	0,250	420	280	840
	82	0,250	820	547	1 640

Tableau VII-X : Scénario d'exposition aiguë : Concentrations maximales tolérables (CMTs) de saxitoxines pour l'eau à usage récréatif lors d'une ingestion unique.

Âge	Masse corporelle (kg)	Volume d'eau ingérée (L)	Concentration maximale tolérable de saxitoxines pour l'eau à usage récréatif lors d'une ingestion unique ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		
			CMT	+ 50 % du volume d'eau	- 50 % du volume d'eau
1 à 2 ans	8	0,100	56	37	112
	12	0,100	84	56	168
> 2 à 7 ans	12	0,250	33	22	67
	22	0,250	61	41	123
> 7 à 12 ans	19	0,250	53	36	106
	40	0,250	112	75	224
> 12 à 17 ans	34	0,250	95	63	190
	77	0,250	215	144	431
Adulte > 17 ans	42	0,250	117	78	235
	82	0,250	229	153	459

> Sommaire

Compte tenu des avis divergents des experts sur les valeurs toxicologiques de référence (chronique ou sub-chronique) à utiliser pour calculer les concentrations maximales tolérables en MC-LR dans l'eau à usage récréatif, les tableaux VII-XI et VII-XII présentent les concentrations maximales tolérables pour la MC-LR en utilisant les valeurs paramétriques retenues pour l'exposition sub-chronique (tableau VII-XI) et chronique (tableau VII-XII) décrites dans les paragraphes précédents.

Tableau VII-XI : Scénario d'exposition sub-chronique : Concentrations maximales tolérables (CMTs) de MC-LR pour l'eau à usage récréatif lors d'une ingestion d'eau répétée annuellement.

Âge	Poids corporel (kg)	Volume d'eau ingérée (L)	Concentration maximale tolérable de MC-LR pour l'eau à usage récréatif lors d'une ingestion répétée annuellement ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
			CMT	+ 50 % du volume d'eau	- 50 % du volume d'eau
1 à 2 ans	8	0,100	32	21	64
	13	0,100	52	35	100
> 2 à 7 ans	12	0,250	19	13	40
	22	0,250	35	23	70
> 7 à 12 ans	19	0,250	30	20	60
	40	0,250	64	43	130
> 12 à 17 ans	34	0,250	54	36	100
	77	0,250	123	82	250
Adulte > 17 ans	42	0,250	67	45	130
	82	0,250	133	90	27

Tableau VII-XII : Scénario d'exposition chronique : Concentrations maximales tolérables de MC-LR pour l'eau à usage récréatif lors d'une ingestion quotidienne d'un adulte de 60 kg.

Cyanotoxine	Masse corporelle (kg)	Volume d'eau ingérée (L)	Concentration maximale tolérable pour les eaux à usage récréatif lors d'une ingestion quotidienne ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
			CMT	+ 50 % du volume d'eau	- 50 % du volume d'eau
Microcystine -LR	60	0,200	12	8	24

3.4.3. Prise en compte de la part relative liée aux autres apports journaliers

Les CMTs calculées en utilisant la clé de répartition arbitraire proposée par l'OMS, pour la DJT de la MC-LR entre l'eau de boisson et l'eau de baignade sont présentées, à titre informatif, sur le tableau VII.7.

Tableau VII-XIII : Scénario d'exposition chronique : répartition arbitraire de la DJT entre l'eau alimentaire et l'eau de baignade et déduction des concentrations maximales tolérables dans l'eau de baignade pour un adulte de 60 kg.

Pourcentage de la DJT chronique attribuée à l'eau de baignade (%)	Masse corporelle (kg)	Volume d'eau mL	CMT de MC-LR		
			CMT ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	CMT - 50 % du volume d'eau ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	CMT + 50 % du volume d'eau ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
20	60	200	2,4	4,8	1,6

CMT pour l'eau potable correspondant à 80 % de la DJT = $1 \mu\text{g.L}^{-1}$

3.5. Principaux enseignements de l'évaluation de risques

3.5.1. Populations à risque

Les calculs montrent que, pour les expositions aiguës et répétées annuellement, ce sont les enfants de 2 à 7 ans qui sont les individus les plus exposés aux cyanotoxines. Ces données s'expliquent par le ratio masse corporelle sur le volume d'eau ingéré ; en effet, le volume d'eau attribué est le même pour tous les individus présentant une masse corporelle égale au supérieur à 12 kg.

La tranche d'âge 1 à 2 ans (masse corporelle moyenne de 10 kg) est moins exposée que la tranche d'âge 2 à 7 ans car le volume d'eau ingéré accidentellement assigné par défaut est inférieur (100 mL). Rappelons que le volume d'eau, retenu par défaut par le NHMRC pour les enfants de 10 kg (100 mL), est considéré par les experts de l'Afsset comme plus pertinent que les 250 mL assignés par l'OMS aux enfants d'une masse corporelle supérieure à 15 kg, en particulier si l'on considère que cette tranche d'âge est plus surveillée par les parents que les enfants de 2 à 7 ans.

3.5.2. Concentrations à risque

Les CMT obtenues pour chaque toxine en fonction du type d'exposition et permettant de garantir l'absence d'effets indésirables pour la population la plus exposée sont synthétisées dans le tableau VII-XIV.

Tableau VII-XIV : Concentrations maximales tolérables calculées pour les différentes toxines en fonction du type d'exposition.

Cyanotoxines	Type d'exposition	CMT valeur minimale ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	CMT maximale ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
MC-LR	aiguë	80	440
MC-LR	sub-chronique	13	70
MC-LR	chronique (100% de la DJT)	8	24
MC-LR	chronique (20 % de la DJT)	1,6	4,8
Saxitoxines	aiguë	22,4	123,2

Les concentrations maximales tolérables en MC-LR pour l'eau à usage récréatif permettant de garantir l'absence d'effets nocifs pour les tranches d'âge les plus exposées sont celles obtenues avec le scénario sub-chronique (13 à 70 $\mu\text{g.L}^{-1}$). La valeur correspondant à la limite basse est proche des valeurs guides préconisées par l'OMS (entre 2 et 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) pour un risque faible, par le NHRMC (8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour les enfants) et par l'INSPQ (16 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour les enfants).

Bien qu'il soit difficile d'estimer la répartition relative de la DJT entre les eaux de baignade et les eaux potable, les valeurs obtenues en appliquant la répartition arbitraire de la DJT préconisés par l'OMS, (80 % pour l'eau potable et 20 % pour les autres sources), des concentrations maximales tolérables ont été calculées. Ces valeurs de 1,6 à 4,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ restent dans l'intervalle des concentrations basses préconisées pour les eaux de baignade par l'OMS.

Au vu de ces calculs et constatant que les concentrations maximales tolérables obtenues avec les hypothèses les plus protectrices restent en dessous de 13 $\mu\text{g.L}^{-1}$, les experts du groupe de travail Afsset considèrent que la valeur limite de qualité en MCs (somme de la concentration de tous les dérivés de MC) pour interdire la baignade et la pratique des activités nautiques par des enfants et des adultes débutants, devrait, au moins compte tenu des divergences exprimées, ne pas dépasser la concentration maximale tolérable de 13 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Cette valeur devrait s'accompagner d'un facteur de +/- 5% ce qui permet de prendre en compte l'incertitude associée aux techniques analytiques du dosage des microcystines (cf. chapitre III de ce même rapport).

Il est à souligner qu'en France, la valeur limite de qualité recommandée actuellement par les autorités sanitaires pour l'interdiction de la baignade avec maintien limité des activités nautiques, $\geq 25 \mu\text{g.L}^{-1} \pm 5\%$ en MC-LR, se situe dans la gamme de valeurs basses obtenues avec les scénarii d'expositions sub-chroniques et de valeurs hautes obtenues avec les scénarii d'expositions chroniques.

En ce qui concerne la cylindrospermopsine et la saxitoxine rappelons ici qu'en l'absence de méthode analytique validée (cf. Chapitre II de ce même rapport) et de données sur la fréquence et l'amplitude de la concentration de cylindrospermopsine dans les eaux de baignade, les experts ont considéré qu'il n'était pas pertinent de proposer une valeur limite de qualité pour les eaux de baignade.

Pour ces mêmes raisons et du fait que pour l'anatoxine a, il n'existe pas de VTR validée, ni de protocole de prélèvement permettant de bien estimer la contamination d'un cours ou plan d'eau aucune valeur limite de qualité n'est proposée. Néanmoins, il convient de signaler que la valeur de 40 µg.L⁻¹ proposée comme concentration maximale tolérable dans l'eau de baignade par l'INSPQ peut servir provisoirement, en l'attente de l'acquisition de connaissances et de nouvelles données, comme référence en cas de situation d'alerte avérée. Ces situations d'alerte sont, en effet, probables dans la mesure où des études ont pu démontrer que la mort de chiens était attribuable à l'ingestion d'eau douce d'un cours d'eau de l'hexagone contaminée avec de l'anatoxine a (Gugger, *et al.* 2005). En outre, les sites fortement suspectés pourraient faire l'objet des campagnes de collecte des données.

3.6. Limites de qualité relatives à la concentration en cellules de cyanobactéries définies par une approche probabiliste

La probabilité de dépassement des concentrations maximales tolérables de MCs dans les eaux récréatives les plus protectrices en fonction du nombre de cellules de cyanobactérie a été réalisée d'après une régression logistique à partir des données disponibles sur la base Afssa-Afsset. Pour ce faire 228 résultats de prélèvements réalisés en eau de baignade et 272 en eaux destinées aux activités aquatiques ont été considérés. Ils présentaient parallèlement un dénombrement des cyanobactéries non nul et un dosage de la concentration en MCs supérieur ou inférieur à une limite de détection de 0,16 µg.L⁻¹. Les limites de qualité relatives à la concentration de MCs dans les eaux récréatives proposées par les experts ont été retenues. Ces calculs ont été réalisés en appliquant la formule suivante :

$$\text{logit}(P_{MC>S}) = \alpha + \beta \times \log(NbCC)$$

où :

- $\text{logit}(P) = \log(P/(1 - P))$ est la fonction logit ;
- $P_{MC>S}$ est la probabilité que la concentration en microcystines dépasse la valeur seuil S ;
- $NbCC$ est le nombre de cellules de cyanobactéries ;
- α et β sont les coefficients de la régression estimés grâce aux résultats de prélèvements.

Ce modèle est ajusté sur les données disponibles au travers d'une variable MCS qui vaut 1 lorsque la concentration en microcystines dépasse la valeur d'exposition limite S, (8 ou 13 µg.L⁻¹) et 0 dans le cas contraire. Les résultats sont présentés sur le tableau VII-XV.

Tableau VII-XV : Probabilité de dépassement des limites de qualité relatives aux MCs dans les eaux récréatives préconisées dans cette étude en fonction de l'abondance des cyanobactéries.

Nombre de cyanobactéries.mL ⁻¹	Seuil MCs = 8 µg.L ⁻¹		Seuil MCs = 13 µg.L ⁻¹	
	BE	IC 95 %	BE	IC 95 + %
1 000	0,00	0,00-0,02	0,00	0,00-0,01
10 000	0,02	0,01-0,05	0,01	0,00-0,03
20 000	0,02	0,01-0,06	0,01	0,00-0,04
50 000	0,04	0,02-0,08	0,02	0,01-0,05
100 000	0,06	0,04-0,11	0,03	0,01-0,07
200 000	0,10	0,06-0,14	0,05	0,03-0,09
500 000	0,16	0,12-0,21	0,09	0,06-0,14

* BE = best estimate. Valeur de meilleure estimation dans la prédiction.
 ** IC = Intervalle de confiance (à 95 %) de la prédiction.

Les données relevées sur des eaux de baignade et de loisirs aquatiques collectées entre 2002 et 2004 permettent de montrer que lorsque le nombre de cyanobactéries est de :

- 100 000 cellules.mL⁻¹, 1 à 7 % de prélèvements ont une probabilité significative (≥ 95 %) de dépasser une valeur limite de qualité de 13 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et 4 à 11% de prélèvements une probabilité significative (≥ 95 %) de dépasser une valeur limite de qualité de 8 $\mu\text{g.L}^{-1}$;
- 20 000 cellules.mL⁻¹, de 0 à 4 % et de 1 à 6 % de prélèvements ont une probabilité significative (95 %) de dépasser, respectivement, une valeur limite de qualité de 13 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ou de 8 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Ces données montrent qu'il existe probablement des situations pour lesquelles la présence de 100 000 cellules.mL⁻¹ de cyanobactéries potentiellement toxigènes pourrait conduire au dépassement des valeurs limites de qualité les plus conservatrices calculées pour les jeunes enfants. Ces situations seraient cependant assez rares.

3.7. Conclusions et recommandations

Les cours et plans d'eau de zones aménagées ou non pour la baignade et/ou pour la pratique d'autres activités récréatives sont des sources éventuelles d'exposition aux cyanotoxines lors de ces activités. Pourtant, seule une partie de ces zones fait l'objet de recommandations réglementaires de surveillance de la prolifération de cyanobactéries et de la contamination des eaux par les microcystines. Les experts soulignent la nécessité de disposer de données autant sur les sites aménagés que non aménagés afin d'estimer de manière réaliste l'exposition aux cyanotoxines de l'ensemble de la population française lors des activités récréatives. L'amont des lieux de baignades est également à prendre en compte en raison de la présence de biofilms contenant des cyanobactéries benthiques potentiellement neurotoxiques et de leur déplacement dans un cours d'eau. En effet, sous certaines conditions environnementales, ces biofilms peuvent se détacher de leur support (sédiment, cailloux,...) et être transportés en aval par le courant.

Les experts estiment, d'après leurs connaissances et leur expérience de terrain, que l'exposition par la baignade ou la pratique régulière d'une activité de loisir aquatique est une exposition répétée annuellement et de manière discontinue sur une vie entière. Ce type d'exposition ne correspondant pas exactement à une définition d'exposition classique et acceptée au niveau international, deux positions sur la valeur toxicologique repère à utiliser pour estimer les concentrations maximales tolérables de cyanotoxines pour les eaux récréatives hors exposition accidentelle aiguë, sont apparues parmi les experts : une approche sub-chronique et une autre chronique :

- pour les enfants et selon des hypothèses d'exposition répétées annuellement et des hypothèses d'ingestion de volumes d'eau particulièrement maximalistes (375 mL⁻¹), les concentrations maximales tolérables calculées selon un scénario d'exposition sub-chronique se situent dans l'intervalle de 13 $\mu\text{g.L}^{-1}$ à 70 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en MC-LR ;
- pour un adulte de 60 kg en utilisant la DJT définie par l'OMS correspondant à une exposition chronique à la MC-LR, les concentrations maximales tolérables varient entre 8 et 24 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et de 1,6 à 4,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ si seulement 20 % de la DJA est assigné à l'eau de loisirs.

Compte tenu des habitudes de comportement, des caractéristiques des individus considérés dans les hypothèses et scénarii retenus et du fait que la population la plus exposée en France est la tranche d'âge des enfants de 2 à 7 ans, notamment en raison d'un volume d'eau maximaliste (375 mL) rapporté à une faible masse corporelle (12 à 22 kg), le groupe d'experts de l'Afssset considère :

- que la valeur limite de qualité relative à la somme de la concentration de tous les dérivés de MCs dans les eaux récréatives devrait, au moins compte tenu des divergences d'expertise, ne pas dépasser une valeur de 13 $\mu\text{g.L}^{-1}$ +/- 5%.
- qu'en l'absence de protocole de prélèvements permettant de bien estimer la contamination d'un cours ou plan d'eau par des cyanobactéries benthiques potentiellement toxiques et dans l'attente de la progression des connaissances, toute mortalité d'animaux potentiellement attribuable à l'ingestion de ces cyanobactéries (présence sur les roches ou les sédiments d'un biofilm important ou de plaques flottantes, cyanobactéries en quantités importantes dans les estomacs des animaux morts, symptômes au moment de la mort correspondant à ceux causés par les effets des neurotoxines ...) devrait se traduire par une interdiction temporaire de la baignade en l'attente des résultats des analyses permettant de déterminer précisément la présence de cyanotoxines et/ou l'origine de la mort de l'animal. Une information doit être affichée sur les lieux fréquentés. Cette interdiction pourra se prolonger s'il s'avère que les cyanobactéries sont la cause du décès de l'animal jusqu'à ce que les toxines ne soient plus détectables ou que les espèces en cause aient disparues depuis au moins une semaine.

Les données de la base Afssa-Afssset montrent qu'un dénombrement concomitant de cyanobactéries et un dosage de microcystines n'ont été effectués que sur 500 prélèvements. 7,6 % et 12 % d'entre eux ont, respectivement, dépassé les concentrations limites d'exposition de 13 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et de 8 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

L'analyse statistique des données de la base, avec toutes les limites relatives à ces données, a permis de montrer que les probabilités statistiquement significatives (95 %) de dépasser les concentrations maximales d'exposition les plus protectrices de 8 et 13 $\mu\text{g.L}^{-1}$ sont inférieures à, respectivement 1 à 6 % et 0 à 4 % des échantillons lorsque les prélèvements contiennent 20 000 cyanobactéries par mL.

Par conséquent, considérant que la concentration maximale tolérable pour la somme de MCs à ne pas dépasser dans les eaux de baignade, 13 $\mu\text{g.L}^{-1}$, et que l'analyse statistique des données de la base Afssa-Afsset montre que 0 à 4 % des prélèvements présentant un nombre de cyanobactéries de 20 000 cellules.mL⁻¹ pourraient dépasser cette valeur, les experts proposent de retenir :

- la valeur de 20 000 +/- 20% cellules.mL⁻¹ comme seuil d'alerte pour passer à une surveillance hebdomadaire ;
- la valeur de 20 000 cellules.mL⁻¹ +/- 20% si cette communauté est dominée par un ou plusieurs genres potentiellement toxiques pour déclencher la recherche et le dosage des toxines ou d'effets toxiques globaux et en tout état de cause de MCs selon le genre dominant ;
- provisoirement la valeur de 100 000 +/- 20% cellules.mL⁻¹ pour l'interdiction de la baignade comme mesure conservatoire sans limiter les autres activités récréatives. Cette mesure conservatoire permet de prendre en compte le fait que de nombreuses toxines ne sont pas dosées à ce jour (anatoxines, BMAA,...) et que peu de données sont disponibles quant à la présence ou l'absence de ces toxines dans les genres de cyanobactéries fréquemment présents dans les cours et plans d'eau. La valeur proposée permettrait donc de prévenir une éventuelle exposition des individus à des quantités élevées de ces toxines lors d'une prolifération massive de cyanobactéries. Cette recommandation devrait faire l'objet d'une réévaluation lorsque les connaissances auront progressées. Le public doit être informé par l'affichage sur les lieux concernés des raisons ayant conduit à l'interdiction.

Points à retenir

- Les cours et plans d'eau destinés à la baignade et/ou à la pratique de sports nautiques de sites ou zones aménagées ou non constituent des sources éventuelles d'exposition aux cyanotoxines. Seuls les sites de zones dont la fréquentation est répétitive pour la baignade et/ou pour des activités nautiques font l'objet de recommandations de surveillance sanitaire relatives à la présence de cyanobactéries et de cyanotoxines.
- Compte tenu des coutumes de vie et des caractéristiques des individus considérés dans les hypothèses et scénarii retenus, la population la plus exposée en France est la tranche d'âge des enfants de 2 à 7 ans, notamment en raison d'un volume d'eau maximaliste (375 mL) rapporté à une faible masse corporelle.
- Pour cette population la concentration maximale tolérable en MC-LR dans l'eau de baignade calculée pour une pratique discontinuée dans l'année mais répétée chaque année la plus protectrice est de $13 \mu\text{g.L}^{-1}$. Pour un adulte de 60 kg, la concentration maximale tolérable en MC-LR calculée à partir de la DJT, supposant une pratique quotidienne pendant 70 ans est de $8 \mu\text{g.L}^{-1}$ et de $1,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ si seulement 20 % de la DJT est assignée à l'eau de baignade.
- Ces valeurs sont inférieures à la concentration actuellement recommandée, donc plus protectrices car obtenues avec des hypothèses maximalistes qui devraient permettre de garantir l'absence d'effets nocifs observables liés à l'ingestion involontaire d'eau contaminée par des microcystines lors de la baignade ou de la pratique de sports nautiques.
- D'après les données de la base Afssa-Afsset, parmi les prélèvements ayant fait l'objet concomitant d'un dénombrement de cyanobactéries et un dosage de MCs, la fréquence de prélèvements ayant dépassée la CMT de $13 \mu\text{g.L}^{-1}$ est de 7,6 %. Ce pourcentage est probablement surestimé dans la mesure où à partir d'un total de prélèvements de 2 680 seul 500 ont fait l'objet d'un dosage de MCs. L'analyse statistique de ces données montre que 0 à 4 % des prélèvements présentant un nombre de cyanobactéries de 20 000 cellules.mL⁻¹ pourraient dépasser la concentration maximale tolérable de $13 \mu\text{g.L}^{-1}$.
- Les experts recommandent de fixer :
 - un seuil d'alerte à 20 000 +/- 20 % cellules.mL⁻¹ en remplacement du seuil actuel de 100 000 +/- 20 % cellules.mL⁻¹. Ce seuil déclencherait :
 - le passage à une surveillance hebdomadaire,
 - la recherche et le dosage des toxines ou d'effets toxiques globaux si cette communauté est dominée par un ou plusieurs genres potentiellement toxiques et en tout état de cause la recherche de MCs selon le genre dominant ;
 - l'interdiction temporaire de la baignade pour les enfants lors de toute mortalité d'animaux potentiellement attribuable à l'ingestion des cyanobactéries benthiques en l'attente des analyses permettant de déterminer précisément l'origine de la mort de l'animal. S'il s'avère que les cyanobactéries sont la cause du décès de l'animal, l'interdiction devrait se prolonger jusqu'à ce que les toxines ne soient plus détectables ou que les espèces en cause aient disparues depuis au moins une semaine ;
 - l'interdiction de la baignade pour l'ensemble de la population sans restriction de la pratique de sports nautiques lorsqu'une abondance de 100 000 +/- 20% cellules.mL⁻¹ est atteinte ainsi que lorsqu'il y a présence d'écumes ;
 - l'interdiction de la baignade et de la pratique de sports nautiques à une valeur seuil ne dépassant pas la concentration maximale tolérable de $13 \mu\text{g.L}^{-1}$ +/- 5 %, valeur permettant de garantir un niveau d'exposition acceptable pour la population générale et pour les individus les plus exposés (2 à 7 ans).
 - pour toutes les situations d'interdiction, le public doit être informé et les causes ayant conduit à l'interdiction indiquées dans l'affiche d'information au public du site concerné.
- Les experts conseillent l'élargissement du dispositif actuel d'information du public aux individus fréquentant un site non aménagé lorsque celui-ci fait partie de la même masse d'eau qu'un site aménagé afin de réduire les risques d'exposition.

VIII. Synthèse et recommandations

1. Synthèse

Les cyanobactéries sont des microorganismes procaryotes adaptés à des écosystèmes très variés et de nombreux genres se développent en eau douce comme en eau marine. Ces microorganismes sont capables de se multiplier très rapidement et peuvent conduire à l'apparition d'une coloration très intense de l'eau voire d'écumes en surface. Ces écumes peuvent s'accumuler, dans les zones où le vent les pousse, sous la forme de dépôts. Certaines souches de différentes espèces ont été remarquées pour leur capacité à produire des toxines, essentiellement intracellulaires et libérées dans le milieu en cas d'atteinte de l'intégrité de la cellule.

Les toxines produites par les cyanobactéries sont extrêmement nombreuses. Elles sont classées selon leur type d'action toxique et en fonction de leur structure moléculaire :

- Hépatotoxines : microcystines, nodularines, cylindrospermopsines ;
- Neurotoxines : anatoxines, saxitoxines, et récemment la BMAA.

Des effets irritants ou allergisants ont été décrits, mais les molécules responsables ne sont pas clairement identifiées.

En milieu marin, d'autres organismes, notamment des dinoflagellés, sont connus pour produire des phycotoxines qui peuvent contaminer les fruits de mer. Parmi ces phycotoxines, les saxitoxines sont identiques à celles produites par certaines cyanobactéries d'eau douce.

La production de cyanotoxines lors de certaines proliférations de cyanobactéries a été observée sur tous les continents. Ces toxines ont pu conduire à un nombre restreint d'intoxications humaines ou animales avérées, parfois mortelles. L'OMS a traduit cette préoccupation mondiale par la publication d'un ouvrage de référence, *Toxic cyanobacteria in water*, en 1999. Bien qu'aucun cas d'intoxication humaine confirmée n'ait été signalé jusqu'à présent en France, la Direction générale de la santé a saisi l'Afssa et l'Afsset d'une demande d'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries dans les eaux destinées à la consommation humaine et dans les eaux de baignade.

1.1. Que sait-on de la présence des cyanobactéries toxigènes et des cyanotoxines en France ?

La présence, en France métropolitaine, de proliférations de cyanobactéries potentiellement toxigènes est régulièrement confirmée dans les eaux continentales et parfois accompagnée de celle de cyanotoxines. Les cyanotoxines identifiées de façon formelle en France appartiennent aux familles des microcystines et des anatoxines, qui sont souvent présentes sous la forme d'un mélange de plusieurs variants de la même famille.

La représentativité des données recueillies dans le cadre du présent rapport est difficile à évaluer compte tenu du fait que les données obtenues proviennent essentiellement de l'ouest et du centre de la métropole. Les distributions géographique et temporelle des proliférations de genres potentiellement toxigènes et de la production de microcystines sont imparfaitement connues à l'échelle du territoire.

Néanmoins, le développement de cyanobactéries potentiellement toxigènes semble pouvoir survenir sur l'ensemble du territoire métropolitain et probablement aussi dans les DOM-TOM, bien qu'aucune donnée n'ait été reçue concernant ces zones. Les informations sur la présence de cyanobactéries dans les milieux saumâtres et marins sont également parcellaires.

Pour les toxines autres que les microcystines, des épisodes de contamination par des anatoxines ont été signalés en France. Des nodularines, des cylindrospermopsines et des saxitoxines ont été identifiées dans d'autres pays européens. En l'absence de recherche ciblée, il est impossible d'exclure leur présence en France. Les distributions géographique et temporelle de ces cyanotoxines restent inconnues.

La rareté et la faible représentativité des données recueillies sur les cyanobactéries et les cyanotoxines résultent notamment :

- de l'absence d'obligation de surveillance de ces paramètres dans les eaux brutes destinées à la production d'eau d'alimentation ou aux activités de loisirs ;

- de l'inscription récente de la seule microcystine-LR, parmi toutes les toxines potentielles, dans les paramètres réglementaires pour l'eau d'alimentation ;
- du fait qu'il est difficile de définir les proliférations algales, critère retenu dans le Code de santé publique pour déclencher l'analyse de la microcystine-LR ;
- de l'absence de méthodes analytiques validées permettant d'identifier les autres cyanotoxines que la MC-LR, ce qui limite toute conclusion sur leur incidence en France ;
- du manque de disponibilité des étalons nécessaires pour effectuer les dosages.

Il n'existe pas de réseau de surveillance des cyanotoxines et/ou des cyanobactéries à l'échelle nationale permettant l'acquisition de données, comme cela peut-être le cas concernant les phycotoxines marines et les fruits de mer. Des analyses sont néanmoins réalisées, mais les résultats ne sont pas toujours intégrés dans les bases de données nationales existantes sur la qualité des eaux : SISE-Eaux et SISE-Baignades, Système de données sur l'eau (SDDE).

Outre les apports en phosphore et en azote dans les eaux continentales, les facteurs et les mécanismes conditionnant l'émergence des proliférations de cyanobactéries sont complexes. Le potentiel toxigène des différents genres de cyanobactéries dépend en grande part de caractéristiques génétiques, dont l'investigation doit être poursuivie, en lien avec l'évolution de la classification taxonomique de ces organismes. De plus, les mécanismes moléculaires de régulation de la toxinogénèse ne sont que partiellement élucidés.

Compte tenu de ces limites, il n'existe pas aujourd'hui de modèle de prédiction des proliférations, et encore moins de la production des toxines, en fonction des caractéristiques physico-chimiques des ressources. Cependant, les évolutions climatiques attendues (hydrologie, température, ensoleillement) pourraient avoir une influence sur la dynamique des cyanobactéries et conduire à des changements aussi bien dans la localisation des proliférations que dans leur fréquence, leur intensité ou la nature des organismes colonisateurs.

1.2. Que sait-on des effets toxiques de ces composés ?

Les principaux effets aigus des différentes familles de cyanotoxines sont identifiés, au moins chez l'animal. La plupart des études toxicologiques concernent la recherche d'effets à très court terme et la détermination d'une dose létale 50 % chez les rongeurs. Les informations concernant des aspects toxicologiques plus spécifiques (neurotoxicité, tératogénèse, immunotoxicité, effets sensibilisants et allergiques...) sont extrêmement fragmentaires.

Des études d'exposition sub-chronique ne sont disponibles que pour quelques toxines (microcystine-LR, anatoxine-a, cylindrospermopsine).

Concernant le pouvoir cancérogène, des études *in vitro* ont permis d'identifier, pour certaines toxines, des caractères liés au processus de cancérisation, comme la capacité à former des adduits ou à provoquer des cassures de l'ADN. Des études *in vivo* révèlent un pouvoir de promotion tumorale avéré chez l'animal pour la MC-LR et la nodularine. Cependant, l'ensemble des études permettant de qualifier avec certitude un composé de cancérogène pour l'homme n'a été réalisé pour aucune de ces toxines.

La caractérisation des effets toxiques de ces molécules reste donc très lacunaire :

- une seule valeur toxicologique de référence (VTR) a été proposée par l'OMS, pour la microcystine-LR. Elle repose sur une expérimentation de 13 semaines chez la souris et conduit, après application d'un facteur de sécurité de 1 000, à une dose journalière tolérable de 0,04 µg.kg⁻¹.j⁻¹ par voie orale pour une exposition vie entière ;
- aucune relation dose-effet ou dose-réponse concernant les effets aigus des différentes cyanotoxines n'est disponible ;
- l'évaluation de la toxicité chronique des « chefs de file » de certaines familles de toxines a juste débuté.

1.3. De quelle façon peut-on être exposé à ces toxines ? Des intoxications par les cyanotoxines ont-elles été recensées en France ?

Expérimentalement chez l'animal, des effets liés aux cyanotoxines ont été observés suite à une exposition par ingestion ou par inhalation, voire par contact pour certains effets irritants ou allergisants.

Les modalités d'exposition rapportées dans la littérature lors d'intoxications animales impliquent essentiellement l'ingestion d'eau brute lors de la baignade ou de l'abreuvement dans le milieu naturel. Chez l'homme, en dehors des intoxications résultant d'une dialyse avec une eau insuffisamment traitée, les épisodes d'intoxication décrits dans la littérature concernent la baignade en milieu naturel ou la consommation d'eau de boisson dont le

traitement était insuffisant pour éliminer les toxines. Pour ce dernier mode d'exposition, il apparaît que, parmi les personnes touchées, les enfants ont développé des symptômes plus sévères. Cette observation est actuellement attribuée au volume d'eau consommé par unité de masse corporelle, particulièrement élevé chez les enfants, et non à une sensibilité particulière aux toxines.

D'autres sources d'exposition par voie alimentaire aux cyanotoxines sont suspectées, il s'agit notamment :

- de la chair d'organismes aquatiques (poissons, crustacés, mollusques) se développant dans une eau contaminée ;
- de légumes feuilles irrigués par aspersion avec une eau contaminée ;
- de compléments alimentaires à base de cyanobactéries.

Les rares données publiées de contamination relatives à ces différentes sources d'exposition portent sur des produits échantillonnés à l'étranger et l'acquisition de données complémentaires est actuellement limitée par les possibilités analytiques. La biodisponibilité des toxines accumulées dans ces différentes matrices est insuffisamment évaluée. Elle apparaît forte pour les saxitoxines et la BMAA, mais reste à évaluer pour les autres toxines.

Aucun cas d'intoxication humaine en relation avec ces sources d'exposition n'a été documenté. En revanche des intoxications animales par consommation d'organismes aquatiques sont suspectées dans différents pays étrangers, dont certains pays européens.

L'ingestion d'eau contenant des toxines ou des cyanobactéries toxigènes est donc considérée comme la principale voie d'exposition aux cyanotoxines, bien que la contribution d'autres sources et d'autres voies d'exposition ne soit pas quantifiée.

À l'heure actuelle en France, aucune intoxication humaine n'a été imputée aux cyanotoxines. En revanche, depuis 2002, l'intoxication d'un peu plus de trente chiens par des cyanotoxines de type neurotoxines a été suspectée en métropole. Pour deux chiens, l'intoxication par des anatoxines a été confirmée. Outre les traitements symptomatiques et généraux pour lutter contre l'effet des intoxications, il n'existe pas d'antidote spécifique des cyanotoxines. Il reste souvent difficile de confirmer l'étiologie de ces intoxications. Le manque de connaissances précises sur les effets de ces toxines et sur leur dosage contribue à ce qu'aucune étude épidémiologique n'ait été réalisée en France sur ce sujet.

1.4. Que peut-on dire concernant les risques liés aux cyanotoxines en France ?

Outre les lacunes dans les données toxicologiques et le manque de VTR précédemment signalé pour ces toxines, le niveau de connaissance sur les expositions humaines aux cyanotoxines est très insuffisant, notamment car la nature, les concentrations et la fréquence de contamination des sources sont insuffisamment décrites. Il n'est donc pas possible d'identifier les populations éventuellement concernées de façon exhaustive et de définir des scénarios représentatifs de la réalité de l'exposition. De plus, il est encore impossible d'élaborer des scénarios intégrant les différentes voies d'exposition (inhalation, ingestion...).

Compte tenu de ce contexte, seules des tendances peuvent être esquissées concernant les risques liés à la microcystine-LR.

- **Concernant les effets aigus :**

la probabilité d'exposition par l'eau de distribution publique à une concentration de microcystine-LR susceptible d'entraîner l'apparition à court terme d'effets sur la santé semble nulle à négligeable au regard des données disponibles en France. Ces données s'avèrent cependant rares et leur représentativité ne peut être estimée. Il n'est donc pas possible de fournir une évaluation chiffrée de ce risque.

- **Concernant les effets à long terme :**

la microcystine-LR possède des caractères qui contribuent au processus de cancérisation. Ces effets sont encore insuffisamment évalués à l'heure actuelle et ce risque ne peut être estimé, quelles que soient les modalités d'exposition envisagées (alimentation ou activités récréatives).

Pour toutes les autres cyanotoxines, les connaissances toxicologiques comme les données de contamination sont très insuffisantes et ne permettent pas de conduire une évaluation du risque sanitaire lié à l'exposition par l'eau de boisson ou au cours des activités de loisirs en eau douce.

1.5. Quelles sont les possibilités de maîtrise de l'exposition aux cyanotoxines ?

La prévention à long terme des proliférations de cyanobactéries, et donc des risques de production de cyanotoxines, repose sur la réduction des apports nutritifs, et en particulier des apports de phosphore aux ressources.

Concernant l'exposition par le biais de l'eau d'alimentation, la littérature et l'analyse de la base de données constituée dans le cadre du présent rapport tendent à montrer que le risque d'exposition aux microcystines ou aux cellules de cyanobactéries peut théoriquement être maîtrisé de façon satisfaisante, à condition de veiller à l'optimisation des conditions de pilotage des filières de traitement et d'adapter celles qui ne sont pas encore mises à niveau pour traiter ces dangers.

En l'absence de données représentatives de la contamination des ressources et de l'eau traitée ou d'une typologie précise des ressources susceptibles d'être affectées par des proliférations de cyanobactéries toxiques, il n'est pas possible d'apprécier l'adéquation du parc de filières de traitement actuellement installé en France avec la qualité des eaux à traiter. Toutes les filières de traitement des usines de production d'eau d'alimentation concernées par ces toxines ne sont pas systématiquement au niveau requis pour maîtriser cette exposition en toutes circonstances : la formation des personnels, la surveillance de la ressource et de l'eau produite et les filières de traitement restent parfois à optimiser.

Trop peu de données sont disponibles sur l'efficacité des filières à éliminer les autres cyanotoxines.

L'analyse de la base de données, malgré les limites de sa représentativité, montre que les rendements moyens d'élimination des cellules de cyanobactéries par les filières sont très supérieurs aux rendements moyens d'élimination des toxines libres. Ceci plaide en faveur de la non-utilisation d'algicides en amont des filières de traitement, afin de favoriser la rétention des toxines sous forme intracellulaire conjointement aux cellules, au lieu d'imposer le traitement des toxines sous forme dissoute. En effet, le sulfate de cuivre le plus souvent utilisé sans étude des impacts sur le système global « eau-sédiment-biocénose » et parfois même sans suivi du relargage des toxines, alors que son accumulation dans les sédiments et son transfert en aval sont avérés et que ces inconvénients sont insuffisamment évalués.

1.6. Quels sont les moyens disponibles pour la surveillance des risques liés aux cyanotoxines ?

Les systèmes de production d'eau destinée à la consommation humaine ou à l'irrigation des cultures, les sites de baignade et des activités aquatiques récréatives, les activités de pêche, professionnelle, ne font pas toujours l'objet d'une surveillance suffisante et adaptée à ces dangers. Aux dires des acteurs de terrain, le cadre et les obligations de surveillance pour certaines de ces situations ne sont pas assez précis.

Concernant les effets sanitaires à long terme, de type cancers hépatiques, l'Institut de veille sanitaire (InVS) estime que l'épidémiologie ne plaide pas pour la mise en place d'un suivi spécifique et ne fournit pas d'éléments probants de la faisabilité d'une telle surveillance, compte tenu des autres étiologies possibles.

En revanche, il est utile d'organiser une veille épidémiologique des effets aigus sur la santé animale et humaine de toutes les proliférations de cyanobactéries. Un programme de surveillance nationale des épidémies d'origine hydrique et des pollutions accidentelles de l'eau distribuée est en cours de réalisation à l'InVS. Parmi les outils mis à disposition dans le cadre de ce programme, un système de recueil d'information sur les pollutions accidentelles des eaux d'alimentation (PADEA2) permettra de pointer les tendances épidémiologiques et étiologiques de ces événements. Ce dernier point prend en compte les cyanotoxines, même si le système n'est pas spécifique des risques liés aux cyanobactéries.

En parallèle de cette surveillance des effets des cyanotoxines, et compte tenu de ses limites, il apparaît nécessaire de suivre directement par des analyses la présence des cyanotoxines dans les différentes sources d'exposition.

Concernant les microcystines, un seul projet de norme ISO TC 147/SC2, dont la dernière version date du 10/01/2005, permet la détermination, dans l'eau brute ou l'eau d'alimentation, des microcystines -LR, -RR, -YR par CLHP-UV ou par couplage CLHP-spectrométrie de masse. Il n'a pas encore été mis en place d'essai d'aptitude interlaboratoire pour ces paramètres. Les autres méthodes de dosage des microcystines (méthodes immunologiques) n'ont pas fait l'objet de travaux d'intercomparaison à grande échelle.

Concernant les autres sources d'exposition (biomasses pélagiques et benthiques, sédiments, aliments), et notamment la chair des organismes aquatiques, l'acquisition de données relatives à la contamination de ces produits par les microcystines est fortement limitée par l'absence de méthodes validées de leur dosage dans ces matrices complexes.

Le développement de la surveillance des autres cyanotoxines reste très limité, en raison de l'absence de méthodes analytiques validées et de difficultés d'approvisionnement en étalons, lorsqu'ils existent.

Il est possible en outre de recourir à des indicateurs indirects qui alertent de leur présence potentielle par la révélation d'une activité biochimique (test phosphatase, test acétylcholinestérase) ou d'une activité biologique

(bioessais sur animaux ou sur lignées cellulaires), bien que ces méthodes ne soient pas normalisées et que certaines impliquent des manipulations sur animaux.

Enfin, à l'instar de ce qui est pratiqué pour la surveillance des phycotoxines marines, il est fréquemment proposé, pour rationaliser le recours aux analyses de toxines, de surveiller la présence de cyanobactéries ou des paramètres indicateurs de leur présence.

Concernant les cyanobactéries elles-mêmes, l'analyse du phytoplancton (identification et dénombrement) par observation microscopique apparaît comme la méthode la plus spécifique. Elle permet notamment l'identification, par des spécialistes, des genres toxigènes et fait l'objet d'un projet de norme CEN prEN15204 soumis à enquête en décembre 2005 avant le vote d'approbation.

D'autres méthodes, basées sur la composition pigmentaire spécifique des cyanobactéries, semblent également prometteuses mais aucune n'est encore validée. Les paramètres indirects et non spécifiques tels que la mesure de la chlorophylle-*a*, ou le suivi des variations de la turbidité, du pH ou des concentrations en oxygène ou en CO₂ sont utilisés par différents acteurs pour déceler l'apparition de proliférations et en suivre la cinétique. La mesure de ces paramètres est normalisée, mais l'interprétation des résultats par rapport à la surveillance des cyanobactéries nécessite néanmoins une observation microscopique conjointe du phytoplancton.

Pour exercer cette surveillance, la France dispose de compétences au sein de laboratoires inégalement répartis sur le territoire et dont les prestations (identification et dénombrement microscopiques, analyse et quantification des toxines, tests de toxicité ou d'allergie ...), en l'absence de tout référentiel normalisé, peuvent présenter des difficultés d'interprétation. Il n'existe pas en France de laboratoire proposant de doser en routine les toxines autres que les microcystines. Pour ces dernières, il peut s'avérer difficile d'identifier les laboratoires pour faire procéder aux analyses, notamment en situation d'urgence. La liste de ces compétences, publiée dans la circulaire du 5 juillet 2005 relative aux modalités d'évaluation et de gestion des risques sanitaires face à des situations de proliférations de micro-algues dans les zones de baignade et de loisirs nautiques, n'est pas aisément accessible à tous les acteurs de terrain. Il n'existe pas de structure nationale de référence, telles que celles consacrées à d'autres microorganismes à effets pathogènes ou à d'autres contaminants.

Le nombre de limnologues et de taxonomistes susceptibles d'assurer des déterminations fiables est insuffisant et les techniciens de laboratoire capables d'identifier et de dénombrer les cyanobactéries restent à former.

Enfin les stratégies d'échantillonnage et de prélèvement ne sont pas harmonisées et ne prennent pas toujours en compte l'hétérogénéité spatiale mais également temporelle de la distribution des cyanobactéries et de leurs toxines dans les différents compartiments pouvant conduire à une exposition. Par ailleurs, des questions demeurent quant à la stabilité des toxines prélevées, aux conditions de température et aux temps de transport avant analyse, mais aussi concernant le flaconnage et les éventuelles opérations de stabilisation ou de prétraitements nécessaires.

2. Recommandations

À la vue de ce constat, les experts du groupe de travail « cyanobactéries et cyanotoxines » de l'Afssa et les experts du groupe « eau de baignade » de l'Afset expriment la nécessité de prêter une plus grande attention à cette problématique et souhaitent que soient retenus trois thèmes majeurs composés de 8 principaux axes de recommandations, indispensables pour améliorer l'évaluation des risques et renforcer leur prévention et leur maîtrise.

- **Permettre l'évaluation des risques liés aux cyanotoxines :**
 - acquérir des connaissances sur les toxines et les ressources ;
 - identifier les ressources à risques et évaluer l'efficacité des traitements de l'eau destinée à la consommation humaine ;
 - développer les moyens analytiques et harmoniser les méthodes, de l'échantillonnage à la mesure ;
 - développer une stratégie de surveillance des toxines et de leurs effets adaptée aux différents usages.
- **Renforcer la prévention et la maîtrise des risques :**
 - renforcer la prévention ;
 - favoriser la gestion.
- **Recommandations spécifiques à la problématique des baignades et autres activités aquatiques récréatives.**
 - concernant les suivis des masses d'eaux et les seuils de qualité ;
 - concernant l'identification et le classement des lieux d'exposition.

La mise en œuvre de ces recommandations suppose différentes actions reposant sur l'acquisition de données à l'aide d'outils analytiques existants mais également sur la recherche et le développement d'outils nouveaux pour l'acquisition de connaissances fondamentales et appliquées et le développement de modèles. Avant de les détailler, les experts rappellent qu'il importe qu'un programme national de financement de recherches spécifiques aux problématiques liées aux cyanobactéries soit proposé, à l'instar du programme national efflorescences algales toxiques (PNEAT) mis en place en milieu marin.

2.1. Permettre l'évaluation des risques liés aux cyanotoxines

2.1.1. Acquérir des connaissances sur les toxines et les ressources

- Renforcer les programmes de recherche portant sur la toxicité des cyanotoxines.

Cette action doit porter sur les effets aigus et à long terme des cyanotoxines (exposition chronique, cancérogenèse et maladies neurodégénératives) en vue de l'obtention des relations doses-réponse et de l'établissement des VTR. Ceci suppose :

- d'identifier et de caractériser la structure des toxines nouvelles ;
- de réaliser des essais de toxicité subchronique et chronique pour un plus grand nombre de toxines ;
- de réaliser des essais d'évaluation de la cancérogénicité sur des toxines purifiées et des mélanges ;
- de compléter la connaissance de volets toxicologiques plus spécifiques tels que : neurotoxicité, tératogénèse, immunotoxicité, effets sensibilisants et allergiques, ... ;
- d'identifier la nature des composés et les mécanismes à l'origine de la dermatotoxicité et des irritations cutanées ;
- d'évaluer les différents effets biologiques (synergies, antagonismes) des mélanges complexes de cyanotoxines et de micropolluants organiques rencontrés dans les eaux continentales, en tenant compte des interactions possibles avec les produits de traitements de l'eau d'alimentation.

- Acquérir suffisamment de données représentatives sur les cyanotoxines produites par les cyanobactéries planctoniques et benthiques dans les milieux (eaux douces, saumâtres et marines) liés à des usages récréatifs, à la production d'eau d'alimentation ou de denrées alimentaires, et ce pour l'ensemble de la métropole et des DOM-TOM.

Cette action constitue un préalable indispensable pour :

- mesurer les variabilités géographiques et saisonnières afin de préciser selon les usages (baignade, production d'eau potable, pêche...), les sites et les périodes d'exposition potentielle nécessitant une surveillance renforcée et d'affiner la maîtrise des risques ;
- pouvoir étudier les déterminants et les mécanismes de régulation du développement des cyanobactéries et de la production de toxines en conditions naturelles.

Ceci suppose de coordonner des campagnes de prélèvement et d'analyse réparties sur toute l'année et sur au moins plusieurs régions pilotes, selon une stratégie d'échantillonnage statistiquement adaptée.

Cette action est immédiatement envisageable pour les toxines pour lesquelles les méthodes d'analyse sont disponibles. Pour les autres toxines connues, il convient de développer les outils analytiques.

- Développer, entretenir et renseigner régulièrement, à partir de celle réalisée dans le cadre du présent groupe de travail, une base de donnée nationale comprenant l'ensemble des éléments en relation avec la problématique (climat, géographie, qualités des eaux, hydraulique, genres identifiés, toxines analysées, épidémiologie ...) et la rendre accessible à tous les acteurs du domaine.

Cette action a pour objet :

- d'étudier les facteurs agissant sur la dynamique des cyanobactéries et leur production de toxine (hydrologie, température, ensoleillement...) ;
- d'étudier l'impact des évolutions climatiques attendues sur ces facteurs, qui pourraient conduire à une exposition plus étendue spatialement ou dans le temps ou plus importante quantitativement ;
- de développer des outils de prédiction.

- Poursuivre le soutien financier des projets de recherche consacrés à la révision de la classification des cyanobactéries sous l'angle bactériologique afin de :

- caractériser précisément les espèces toxigènes, connues ou nouvelles ;
- permettre l'étude du potentiel toxique des genres d'un point de vue phylogénétique et développer de nouveaux critères d'alerte concernant ce caractère.

La France dispose, à l'Institut Pasteur de Paris et au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, d'importantes collections de cyanobactéries indispensables à la conduite de ces projets : la maintenance, le développement et l'usage de ce patrimoine pour la recherche, voire pour la production d'étalons, doivent être soutenus et encouragés.

- Améliorer l'identification des voies et sources d'exposition de l'Homme aux cyanotoxines et quantifier la contribution de chacune à l'exposition globale.

Cette action suppose :

- d'améliorer les connaissances sur la répartition des cyanotoxines dans les différents compartiments environnementaux (eau, sédiments, aérosols) et biologiques (foie, muscle, SNC, feuilles, fruits...) en étudiant la bioaccumulation dans les différentes sources alimentaires ;
- d'évaluer les concentrations de cyanotoxines dans les différentes sources alimentaires (eau, compléments alimentaires, produits de la pêche, produits du maraîchage ...) et dans les eaux à usage récréatif ;
- d'étudier la biodisponibilité des cyanotoxines, selon les compartiments d'origine et les voies d'exposition envisagées ;
- de mieux caractériser l'exposition par voie orale, notamment les consommations de certaines sources alimentaires (compléments alimentaires, produits de la pêche, notamment d'eau douce) et les volumes d'eau ingérés lors de la baignade ou d'autres activités nautiques, et l'exposition par voie aérienne, afin de pouvoir :
 - mesurer la variabilité et l'incertitude de l'exposition pour permettre une aide à la décision dans les cas de non-conformité des eaux destinées à la consommation humaine,
 - développer un modèle agrégatif permettant l'estimation d'un risque global en intégrant les expositions de type aiguë, sub-aiguë, chronique et sub-chronique,
 - de définir précisément les zones d'usage pour les activités récréatives.

2.1.2. Identifier les ressources à risques et évaluer l'efficacité des traitements de l'eau destinée à la consommation humaine

- Identifier les ressources potentiellement concernées par des proliférations de cyanobactéries et utilisées pour la production d'eau de consommation humaine ou pour des loisirs nautiques (en particulier les zones de baignade aménagées et non aménagées) et caractériser les populations desservies ou concernées.

Cette action suppose de développer une typologie hydromorphologique des ressources en eau utilisées en AEP et loisirs nautiques en cohérence avec la mise en œuvre de la Directive Cadre sur l'Eau afin de pouvoir relier ces informations avec celles des suivis de cellules et de toxines et les données météorologiques pour :

- identifier de façon préventive les sites à risques ;
- alimenter les modèles mécanistiques expliquant les dynamiques des populations de cyanobactéries ;
- tester les hypothèses du rapport de l'étude « Grand-Ouest » (DGS *et al.* 2004) à l'échelle nationale, en relation avec différentes « classes trophiques ».

- Réaliser systématiquement des dosages de cyanotoxines en entrée et en sortie des filières de traitement des eaux destinées à la consommation humaine en cas de prolifération de cyanobactéries.

Cette action permettra d'apprécier l'efficacité, sur un nombre suffisant de données, des différents types de filières en conditions normales d'opération et permettra d'intégrer cette composante dans une évaluation de risque intégrée amont-aval.

2.1.3. Développer les moyens analytiques et harmoniser les méthodes, de l'échantillonnage à la mesure

- Développer les outils analytiques qui font défaut pour étudier les cyanotoxines autres que la microcystine-LR et pour identifier de nouvelles cyanotoxines.

Cette action suppose de :

- développer, valider et harmoniser des méthodes d'analyse pour l'ensemble des cyanotoxines connues dans les matrices aqueuses ;
- mettre au point et valider des méthodes de dosage des différentes cyanotoxines dans les matrices complexes (biomasses, sédiments, biofilms, aliments) et en particulier dans les sources alimentaires autres que l'eau pour affiner l'évaluation de l'exposition et du risque ;
- rendre accessible aux laboratoires d'analyses l'approvisionnement en étalons, actuellement difficile ou impossible en raison de contraintes géopolitiques, voire de produire les étalons manquants. Cette action pourrait s'appuyer sur les collections françaises de cyanobactéries de l'Institut Pasteur de Paris ou du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris ;

- développer des mesures de toxicité globale *in vivo*, même si cette voie, actuellement employée dans le contrôle sanitaire des coquillages, reste d'un avenir incertain en raison des difficultés et des contraintes réglementaires sur l'expérimentation animale. Les laboratoires ne pouvant analyser toutes les toxines sur tous les échantillons suspects, certaines toxines étant peu ou pas analysables et le coût potentiel étant trop élevé, la surveillance peut être améliorée par ce biais ;
- favoriser l'évaluation des sondes de détection des cyanobactéries mais également le développement d'analyseurs, de capteurs ou de méthodes analytiques en ligne ou automatisables, permettant les dénombrements de cyanobactéries et la détection des toxines, de façon à faciliter la surveillance de ces dangers.

- Standardiser les méthodes d'analyse des cyanotoxines déjà disponibles.

Ceci suppose :

- de finaliser le plus rapidement possible la norme analytique ISO pour le dosage dans l'eau des microcystines -LR, -RR, -YR par CLHP-UV ou par couplage CLHP-spectrométrie de masse ;
- d'harmoniser les protocoles et les stratégies d'échantillonnage et de prélèvements dans les eaux de surface, pour les cyanobactéries benthiques et planctoniques ;
- d'étudier la stabilité des toxines dans les prélèvements en fonction des conditions de température, des temps de transport avant analyse, du flaconnage afin de définir les éventuelles opérations de stabilisation ou de prétraitements nécessaires ;
- de favoriser des travaux d'inter-comparaison des différentes méthodes d'analyse des microcystines ;
- d'encourager la normalisation de la méthode d'identification et de numération des cyanobactéries par observation microscopique, compte tenu du fait que ces informations font partie des premiers éléments de décision ;
- d'organiser leur recueil et leur échange en standardisant les paramètres : un identifiant unique pour une molécule x protocole x matrice x compartiment en distinguant au sein du total les fractions intracellulaire et libre, pour améliorer la qualité des données nationales relatives aux cyanotoxines ;
- de créer une structure nationale de référence en charge de l'harmonisation et la coordination des actions dans ce domaine et dont la structure, les moyens et le champ d'action seront définis en concertation avec les compétences nationales existantes.

- Former les acteurs pour assurer une disponibilité plus large des compétences :

- former un plus grand nombre de techniciens de laboratoire à l'identification et au dénombrement des cyanobactéries, en particulier dans les laboratoires d'astreinte ou accessibles en situation d'urgence ;
- assurer la formation de limnologues et de taxonomistes susceptibles d'assurer des déterminations relevant du niveau de l'expertise.

2.2. Renforcer la prévention et la maîtrise des risques

2.2.1. Développer une stratégie de surveillance des toxines et de leurs effets adaptée aux différents usages

- Élaborer un référentiel d'investigation permettant la validation des cas d'intoxications animales ou humaines par les cyanotoxines et organiser la collecte des cas potentiels ou confirmés (épidémiologie).

La mise en place d'une surveillance épidémiologique apparaissant prématurée en l'état actuel des connaissances, il est essentiel de poursuivre en parallèle la surveillance environnementale des cyanotoxines et notamment des microcystines au niveau des sites de baignade et d'autres activités aquatiques récréatives, et des systèmes d'adduction en eau potable.

- Structurer, comme cela a été fait pour les phycotoxines marines et les coquillages, un réseau national de surveillance spécifique ou *a minima* une stratégie de surveillance des cyanotoxines et des cyanobactéries de référence, fondée sur des paramètres pertinents associés à des méthodes d'échantillonnage et d'analyses normalisées et adossées à la base de données nationale ou à des systèmes de recueil nationaux préexistants : SISE-Eaux, SISE-Baignade, SIE (ex-RNDE)....

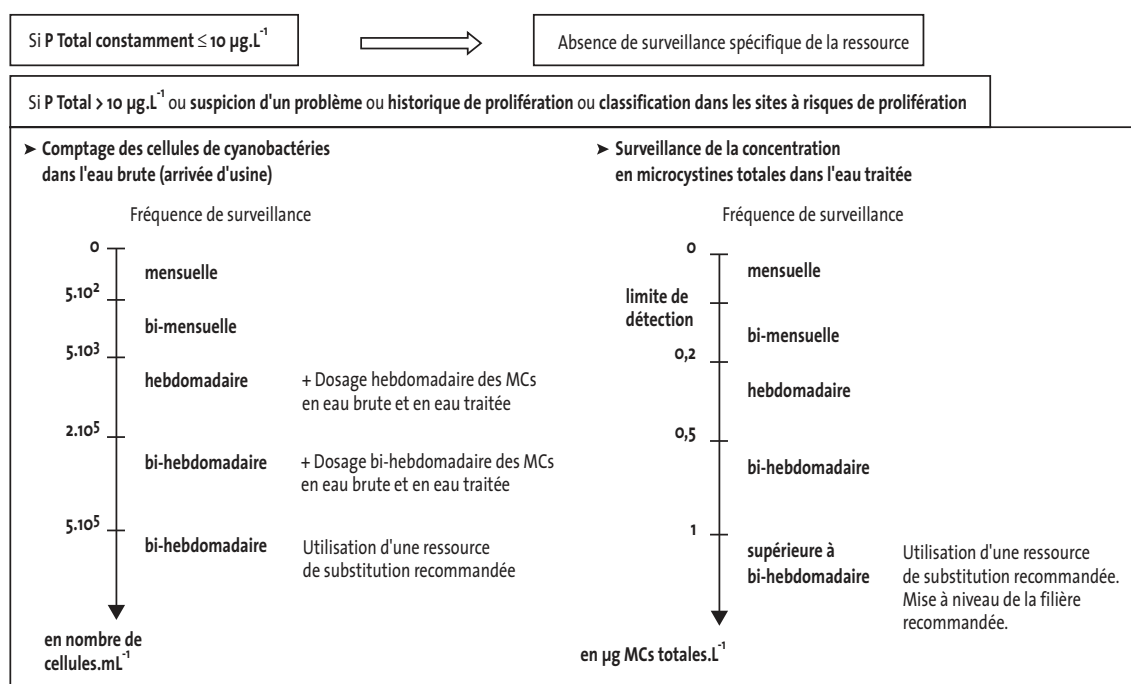
Ces deux actions doivent s'accompagner :

- du développement, à proximité des sites propices à la production de cyanotoxines, de l'épidémiologie animale et/ou humaine par les professionnels concernés (médecins, vétérinaires, pharmaciens, ingénieurs du génie sanitaire...), qui doivent être sensibilisés à envisager cette étiologie face à des intoxications et incités à signaler les cas suspects ou avérés aux autorités sanitaires ;

- du recensement annuel, en raison des variations interannuelles de fréquentation, des sites concernés par l'application de la stratégie de surveillance, que leur usage soit la production d'eau d'alimentation, la baignade au sens réglementaire, ou les autres usages récréatifs, en précisant la nature de ces derniers ;
- de la formation des gestionnaires des ressources à usage récréatif ou de production d'eau d'alimentation le plus rapidement possible à :
 - la détection précoce des changements des caractéristiques du milieu associés éventuellement à la prolifération des cyanobactéries,
 - la diffusion des informations aux autorités compétentes et aux usagers.
- Rendre la liste des compétences et des laboratoires susceptibles de réaliser les dénombrements cellulaires et les dosages de la stratégie de surveillance facilement accessible aux commanditaires potentiels.
- Mieux définir l'apport, les limites d'interprétation, l'usage possible et la fiabilité des indicateurs globaux indirects (chlorophylle-*a*, variations des concentrations en oxygène ou CO₂, variation de pH, turbidité...).
- Surveiller la présence de cyanotoxines dans les compléments alimentaires et les aliments à bases de cyanobactéries par le biais de plans de contrôle ciblés.

Une stratégie de surveillance applicable aux ressources destinées à la consommation humaine fondée sur le dénombrement des cyanobactéries et des toxines est donc proposée (figure VIII.1).

Figure VIII-1 : Proposition de stratégie de surveillance des eaux destinées à la consommation humaine vis-à-vis des risques liés aux cyanotoxines. Les fréquences proposées sont maintenues tant que deux résultats consécutifs situés au niveau inférieur n'ont pas été obtenus.



2.2.2. Renforcer la prévention

- Mettre en œuvre l'ensemble des moyens disponibles, à commencer par l'application des réglementations existantes, pour réduire, dans les meilleurs délais, les apports environnementaux en azote et phosphore dans les milieux aquatiques. En particulier un programme d'action sur la réduction du phosphore (interdiction généralisée dans les lessives domestiques et mise en place de la déphosphatation sur les stations de traitement des eaux usées) et des plans de gestion appropriés dans les zones agricoles à excédents de phosphore liés aux élevages intensifs ou à l'usage domestique devrait être mis en œuvre rapidement.

- Encadrer la mise sur le marché des procédés ou produits commercialisés comme destinés à prévenir les proliférations de cyanobactéries dans les ressources, notamment par l'évaluation de leur efficacité dans des conditions représentatives de leur utilisation sur site.
- En l'absence de réglementation de l'usage des algicides dans les ressources, et dans l'attente des résultats de l'évaluation de ces produits dans le cadre de la réglementation « biocides », interdire l'usage de produits algicides et en particulier du CuSO₄ en mode préventif ou curatif en cas de prolifération de cyanobactéries :
 - dans les ressources, en raison de l'absence d'évaluation de l'impact environnemental et du risque de sélection de clones résistants,
 - dans les bassins de stockage d'eau brute et les filières de traitement, en raison des difficultés d'élimination des cyanotoxines libres et de l'absence de méthode analytique permettant la détection de l'ensemble des toxines.
- Prendre en compte dans la réglementation le risque de présence de cyanotoxines dans les compléments alimentaires à bases de cyanobactéries et dans les aliments.

2.2.3. Favoriser la gestion

- Élaborer des procédures de gestion des non-conformités de l'eau d'alimentation, sur la base des évaluations fournies dans le présent rapport.
- Définir une stratégie nationale d'information du public pour les usages récréatifs en élargissant son application aux sites non aménagés qui ne font pas l'objet de la réglementation « baignade ».
- Initier un programme de recherche en évaluation économique permettant de choisir, selon les sites, le scénario à privilégier entre la reconquête de la qualité des ressources et l'investissement dans la mise à niveau des installations de traitement, notamment en fonction des autres usages impliqués.
- Sensibiliser à la problématique les personnes publiques ou privées responsables de la prise en charge des frais occasionnés.
- La situation de retour à la normale après un épisode d'alerte est à définir compte tenu de la grande incertitude associée aux comptages de cyanobactéries et aux dosages de microcystines et à leur persistance dans le milieu.
- Aligner la stratégie des contrôles sur celle qui est mise en œuvre pour les pesticides en prescrivant la recherche dans les analyses de types RS et P₂ du paramètre « total des microcystines analysées ». La fréquence pourrait être réduite sur les ressources présentant une faible probabilité de prolifération de cyanobactéries.

2.3. Recommandations spécifiques aux eaux de baignade et autres activités aquatiques récréatives

2.3.1. concernant les suivis des masses d'eaux et les seuils de qualité

Surveillance sanitaire

Les experts recommandent pour les sites à risque aménagés et non aménagés :

- un suivi régulier, sous la responsabilité des gestionnaires de sites et en collaboration avec les autorités sanitaires, afin d'assurer en toute circonstance la protection sanitaire de la population et de détecter les changements des caractéristiques du milieu, signes précoces d'un éventuel phénomène de prolifération de cyanobactéries ;
- une surveillance basée sur le dénombrement, au moins bimensuel, des cyanobactéries avec identification de genres ;
- de procéder à une surveillance hebdomadaire si le nombre de cyanobactéries est de 20 000 +/- 20 % cellules de cyanobactéries.mL⁻¹ car les phénomènes dynamiques peuvent conduire à une augmentation rapide du nombre de cellules.
- de réaliser des campagnes de sensibilisation des responsables et des surveillants de baignade à la problématique sanitaire des cyanotoxines, notamment parce qu'ils pourraient contribuer au signalement des signaux précoces tels qu'un changement de la couleur de l'eau qui peut traduire une phase de prolifération de cyanobactéries.

Mode de prélèvement

Dans l'attente de la normalisation de protocoles de prélèvements, les experts recommandent que dans le cadre de la surveillance sanitaire, les prélèvements d'eaux soient effectués avec un tube permettant d'intégrer les 50 premiers centimètres de la colonne d'eau.

Compte tenu du caractère hétérogène de la distribution spatiale des cyanobactéries à l'échelle des plans d'eau, plusieurs points de prélèvements sont recommandés. L'un de ces points sera obligatoirement réalisé sur le lieu de baignade proprement dit, et il fera l'objet d'un comptage cellulaire et éventuellement d'un dosage de microcystines d'après les recommandations présentées ci-dessous. Les autres points de prélèvements ont pour objet d'obtenir une estimation globale des concentrations cellulaires en cyanobactéries à l'échelle du plan d'eau. Ils pourront être rassemblés en un seul échantillon sur lequel seront effectués un comptage cellulaire et un dosage éventuelle de toxines. Enfin, si une accumulation en surface de cyanobactéries est observée sur une quelconque partie du plan d'eau, un prélèvement sera réalisé et traité de la même façon que décrit précédemment.

Concernant les cyanobactéries benthiques, il n'est pas possible, en l'état des connaissances, de proposer aujourd'hui un protocole de prélèvement.

Seuil d'alerte

Il est recommandé d'effectuer une recherche systématique de toxines ou d'effets toxiques globaux lorsque le nombre de cyanobactéries est égal ou supérieur à 20 000 +/- 20 % cellules.mL⁻¹ si cette communauté est dominée par un ou plusieurs genres potentiellement toxiques et en tout état de cause, la recherche de MCs selon le (les) genre(s) dominant(s).

Restriction de la baignade

Il est proposé l'interdiction temporaire de la baignade pour les enfants lors de toute mortalité d'animaux potentiellement attribuable à l'ingestion des cyanobactéries benthiques en l'attente des analyses permettant de déterminer précisément l'origine de la mort de l'animal. En l'attente des résultats, le public doit être informé des risques éventuels. S'il s'avère que les cyanobactéries sont la cause du décès de l'animal, l'interdiction devrait se prolonger jusqu'à ce que les toxines ne soient plus détectables ou que les espèces en cause aient disparues depuis au moins une semaine.

Seuil d'interdiction de la baignade sans restriction des activités nautiques

Il est proposé provisoirement et comme mesure conservatoire d'interdire la baignade sans limiter les autres activités récréatives lorsque 100 000 +/- 20% cellules.mL⁻¹ de cyanobactéries sont dénombrées et lors de la présence d'écumes. Cette mesure conservatoire permet de prendre en compte le fait que de nombreuses toxines ne sont pas dosées à ce jour (anatoxines, BMAA,...) et que peu de données sont disponibles quant à la présence ou l'absence de ces toxines dans les genres de cyanobactéries fréquemment présents dans les cours et plans d'eau. La valeur proposée permettrait donc de prévenir une éventuelle exposition des individus à des quantités élevées de ces toxines lors d'une prolifération massive de cyanobactéries. Cette recommandation devrait faire l'objet d'une réévaluation lorsque les connaissances auront progressées. Le public doit être informé des risques éventuels et de causes ayant conduit à l'interdiction.

Seuil d'interdiction de la baignade et de la pratique de sports nautiques

Il est proposé que ce seuil soit fixé à une valeur ne dépassant pas la concentration maximale tolérable de 13 µg.L⁻¹ +/- 5 % en MCs (somme de tous les dérivés de microcystines), valeur permettant de garantir un niveau d'exposition acceptable pour la population générale et pour les individus les plus exposés (2 à 7 ans) car calculée sur la base des hypothèses particulièrement maximalistes et lorsque une accumulation visible de cyanobactéries est observée. Les experts proposent que l'interdiction soit effective lorsque le dépassement de la valeur limite est confirmé par le résultat de deux prélèvements menés avec trois jours d'intervalle. En l'attente des résultats, le public doit être informé des risques éventuels. Comme précédemment, les risques éventuels et les causes ayant conduit à l'interdiction doivent être signalés dans l'affiche d'information au public.

Définition du retour à la normale

Compte tenu de l'incertitude associée aux dosages de microcystines, il conviendrait de lever l'interdiction lorsqu'au moins deux dosages de toxine consécutifs, réalisés à trois jours d'intervalle seront inférieurs à la valeur limite de qualité en MCs à fixer par les autorités sanitaires selon les recommandations développées ici avec un maximum de 13 µg/L en MCs.

2.3.2. concernant l'information du public.

En cas d'interdiction, il importe de prévoir l'élargissement du dispositif d'affichage destiné au public fréquentant un site non aménagé lorsque celui-ci fait partie de la même masse d'eau qu'un site aménagé concerné par la présence de cyanobactéries.

2.3.3. concernant l'identification et le classement des lieux d'exposition

Identification des sites à risque

Dans la mesure où tous les contacts récréatifs avec les eaux douces n'ont pas lieu au sein de zones aménagées et surveillées, il est recommandé qu'un recensement annuel de toute « zone de baignade ou de pratique de sports nautiques » non aménagées soit réalisé au niveau de communes ou des départements, en précisant leur(s) usage(s). Cette démarche permettra de prendre en compte les usages ne rentrant pas dans le champ direct de la réglementation et les éventuelles évolutions inter-annuelles de fréquentation des sites.

Classification des sites et élaboration d'un dispositif de surveillance et alerte.

L'élaboration d'une grille de vulnérabilité permettant la classification a priori des sites est proposée selon des notions de risques « faible », « modéré » et « élevé ». Les critères seraient basés, par exemple, sur la morphologie des ressources, la dynamique de la masse d'eau, les apports connus en phosphore mais également sur l'historique de la présence des cyanobactéries. Il s'agirait de rendre le dispositif de surveillance et d'alerte plus approprié, efficace et économiquement plus acceptable, en adaptant les moyens nécessaires au risque présumé. L'élaboration d'un tel outil permettrait de mieux répondre à une demande croissante de la part des élus et gestionnaires des sites.



2001 - SA - 0035

REPUBLIQUE FRANÇAISE

PARIS, le 22 JAN. 2001

DIRECTION GÉNÉRALE DE LA SANTÉ

Sous-direction de la gestion des
risques des milieux

Bureau des eaux et aliments

DGS/SD7A n° 181

Personne chargée du dossier : Mme HERAULT

Téléphone : 01.40.56.41.65

LA MINISTRE DE L'EMPLOI
ET DE LA SOLIDARITÉ

à

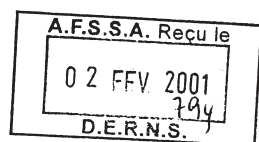
MONSIEUR LE DIRECTEUR GÉNÉRAL DE
L'AGENCE FRANÇAISE DE SÉCURITÉ
SANITAIRE DES ALIMENTS

23 Avenue du Général de Gaulle

BP 19

94701 - MAISONS-ALFORT CEDEX -

DERNS



OBJET : Qualité des eaux destinées à la consommation humaine.

Lors de la séance plénière du 9 janvier 2001, les membres de la Section des Eaux du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPPF) et du Comité d'Experts Spécialisé "Eaux" (CES Eaux) ont assisté à une présentation relative aux risques toxiques induits par la présence de cyanobactéries en eau douce et au programme EFFLOCYA initié par le ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement et auquel a participé les services déconcentrés du ministère de la Santé depuis 1998.

A l'issue de cet exposé, les experts des deux comités ont demandé à être saisi sur le thème des risques liés à la présence de ces bactéries dans les eaux de consommation humaine et de baignade.

Je vous prie donc de trouver ci-joint, pour avis, le fond de dossier relatif à l':

**EVALUATION DES RISQUES LIÉS À LA PRÉSENCE DE CYANOBACTÉRIES DANS
LES EAUX DESTINÉES À LA CONSOMMATION HUMAINE,**

enregistré sous le n° DGS : 010008.

Pour la ministre et par délégation,
par empêchement du directeur général de la santé

Thierry MICHELON

Sous-Directeur de la Gestion des Risques des Milieux

CONSEIL SUPERIEUR D'HYGIENE PUBLIQUE DE FRANCE

Section des Eaux

SEANCE DU 6 JUILLET 2004

**RECOMMANDATIONS POUR LA GESTION DES SITUATIONS DE CONTAMINATION
D'EAU DE BAINADES ET DE ZONES DE LOISIRS NAUTIQUES PAR PROLIFERATION DE
CYANOBACTERIES - BILAN NATIONAL DE LA SURVEILLANCE DES PROLIFERATIONS
DE CYANOBACTERIES LORS DE LA SAISON BALNEAIRE 2003**

AVIS

Le Conseil supérieur d'hygiène publique de France, à la suite des travaux réalisés par son groupe de travail et après discussion, considérant :

- l'avis émis le 6 mai 2003 relatif à la gestion des situations de contamination d'eau de baignades et de zones de loisirs nautiques par proliférations de cyanobactéries ;
- les signalements de proliférations de cyanobactéries dans des eaux de baignade et de zones de loisirs nautiques, recensées par les Directions Départementales des Affaires Sanitaires et Sociales dans le cadre du contrôle sanitaire des baignades aménagées et du suivi de zones de loisirs nautiques, lors de la saison balnéaire 2003 ;
- les observations des DDASS ayant mis en œuvre les mesures de gestion lors de la saison balnéaire 2003 ;
- les échanges intervenant au sein du groupe de travail de l'AFSSA sur le thème des cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux ;
- l'absence de certitudes scientifiques sur l'écologie générale, les paramètres conditionnant l'apparition des efflorescences et la production de métabolites et en particulier de toxines par les cyanobactéries, la faiblesse des données épidémiologiques sur l'impact sanitaire des proliférations en France et l'absence de cas pathologiques recensés à ce jour liés à de telles contaminations ;
- le manque de méthodes analytiques normalisées pour les dénombrements des cyanobactéries et la détection ou le dosage de certaines de leurs toxines ;
- les risques sanitaires potentiels pour les baigneurs ou les pratiquants d'activités nautiques, induits par les différentes toxines qui peuvent être associées aux proliférations de cyanobactéries et être à l'origine de pathologies telles que des démangeaisons, des gastro-entérites, voire des atteintes hépatiques ou neurologiques ;
- le projet de directive de la Commission européenne relative à la qualité des eaux de baignade qui introduit le paramètre "prolifération de micro-algues" en tant que paramètre entrant dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux de baignade ;

1- note que :

- la majorité des régions ayant fait l'objet d'une surveillance et d'un retour d'information est concernée par des épisodes de proliférations d'algues dont certaines avec présence de cyanobactéries en proportion majoritaire ;
- les valeurs de microcystine LR détectées en 2003 sont généralement inférieures à 25µg/L ;
- les services déconcentrés :
 - expriment, à juste titre, leurs préoccupations sur le manque de moyens supplémentaires accordés pour cette surveillance, le manque d'harmonisation des méthodes analytiques, l'absence de protocole normalisé de prélèvement,
 - regrettent que seule la recherche de microcystine LR (MLR) soit préconisée dans les eaux de baignades,
 - et s'inquiètent de l'éventuelle présence d'autres toxines n'entrant pas dans le protocole de

surveillance préconisé dans la circulaire DGS N° 2003/270 du 4 juin 2003 en cas de présence de cyanobactéries ;

2- renouvelle sa demande :

- que soit validé un protocole permettant de définir et d'évaluer sur le terrain une "prolifération algale" pouvant déclencher la recherche de cyanobactéries et de leurs toxines ;
- que soient validées et normalisées les stratégies et les méthodes de prélèvements et d'analyses relatives à la détermination d'une contamination des eaux de baignades et de zones de loisirs nautiques par des cyanobactéries et leurs toxines pour lesquelles des méthodes existent (dénombrement cellulaire, identification, quantification de toxines) ;
- que soit réalisée une étude sur les contaminations des eaux de loisirs nautiques par les cyanobactéries et leurs toxines dans le but d'estimer les expositions à prendre en compte pour évaluer l'impact sanitaire sur les pratiquants de la baignade et des activités de loisirs nautiques ;
- qu'une veille épidémiologique soit organisée pour identifier d'éventuels cas de pathologies associées à des proliférations de cyanobactéries ;

3- recommande :

- que soit poursuivi le programme de surveillance des zones de baignade et de loisirs nautiques, selon les recommandations de son avis du 6 mai 2003 en modifiant l'annexe et l'arbre décisionnel selon les points suivants :
 - selon les situations locales, la détection de l'apparition de proliférations de micro-algues soit effectuée sous la responsabilité de la personne publique ou privée responsable de la gestion de la zone de baignade ou de loisirs nautiques;
 - que devant l'impossibilité de réaliser l'analyse de toutes les toxines potentiellement présentes, une étude soit menée pour permettre d'évaluer l'intérêt et la faisabilité de la détection globale par test sur souris;
 - que toute détection de toxine soit suivie avec attention compte tenu du fait qu'une apparition de toxines est généralement suivie d'une augmentation rapide de la concentration. Les procédures doivent être, en tout état de cause, maintenues au-delà de 25µg/L pour la microcystine LR;”
- qu'à la suite de ce programme, un bilan et un recueil de données soit établi à la fin de l'année 2004 pour permettre l'élaboration d'un nouvel avis pour la saison 2005,

4) rappelle sa recommandation que soit interdit l'usage de produits algicides en mode curatif lorsqu'une efflorescence est détectée en amont ou sur les zones de baignade.

COPIE CONFORME

SIGNE

Thierry MICHELON
Sous-directeur de la gestion des risques des milieux



MINISTÈRE DE LA SANTÉ, DE LA FAMILLE
ET DES PERSONNES HANDICAPÉES

DIRECTION GÉNÉRALE DE LA SANTÉ
Sous-direction de la gestion des risques des milieux (542)

MINISTÈRE DE L'ÉCOLOGIE ET DU
DÉVELOPPEMENT DURABLE

DIRECTION DES ÉTUDES ÉCONOMIQUES
ET DE L'ÉVALUATION ENVIRONNEMENTALE

PARIS, le 30 MAR. 2004

Le Directeur général de la santé
Le Directeur des études économiques et
de l'évaluation environnementale

à

Madame la Directrice Générale de
l'Agence Française de Sécurité Sanitaire
de l'Environnement
27-31 avenue du Général Leclerc
94703 Maisons Alfort cedex

Objet : évaluation des risques sanitaires liés à la présence de cyanobactéries dans les plans et cours d'eau destinés à la baignade et ou à d'autres usages.

P.J :

- circulaire DGS/SD7A n°270 du 4 juin 2003 relative aux modalités d'évaluation et de gestion des risques sanitaires face à des situations de prolifération de micro-algues (cyanobactéries) dans des eaux de zones de baignades et de loisirs nautiques.
- annexe I : synthèse des informations techniques et scientifiques recueillies auprès des DDASS dans le cadre de la surveillance des proliférations de cyanobactéries

La présence de cyanobactéries dans les eaux de baignade ou dans des eaux utilisées pour la production d'eau potable constitue une problématique émergente de sécurité sanitaire.

En effet des risques sanitaires, encore mal évalués, sont rapportés dans la littérature scientifique. Ils sont liés au développement de ces efflorescences algales (démangeaisons, gastro-entérite, voire des atteintes neurologiques) soit par contact cutané avec les cyanobactéries, soit suite à l'ingestion de toxines susceptibles d'être libérées par les cyanobactéries (dermatotoxines, hépatotoxines, neurotoxines). Le développement de ces efflorescences algales est favorisé notamment par l'eutrophisation des plans d'eaux, les températures élevées et une faible agitation du milieu.

Selon leurs attributions respectives, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (pour l'eau potable et la consommation de poissons pêchés) et le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (pour les baignades) ont été saisis respectivement pour préciser l'évaluation et la gestion des risques sanitaires induits par ces proliférations de cyanobactéries. Lors de la saison balnéaire 2003, la Direction générale de la santé (DGS) a demandé par circulaire aux DDASS de mettre en place un dispositif de surveillance et de gestion des situations de prolifération de cyanobactéries sur la base d'un avis rendu par le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF) le 6 mai 2003.

Une vingtaine de départements ont signalé au bureau des eaux de la DGS, la survenue d'épisodes de prolifération de cyanobactéries au cours de la saison balnéaire 2003. Lors de ces épisodes qui ont concerné des retenues destinées à la production d'eau potable, des sites de baignade et des zones de loisirs nautiques, les résultats des prélèvements effectués mettent en évidence des dépassements du seuil de 100 000 cellules/ml (niveau II), ainsi que la présence de toxines. Le nombre de cellules mesurées et les taux de toxines varient selon les sites et selon la période de la saison balnéaire. Vous trouverez, ci-jointe (cf. annexe I), la synthèse des informations techniques et scientifiques recueillies auprès des DDASS dans le cadre de la surveillance des proliférations de cyanobactéries.

Des recommandations, en matière de fermeture des sites concernés sont appliquées au cas par cas par les DDASS, en fonction des conditions topographiques et hydrologiques des sites et compte tenu des incertitudes scientifiques sur les risques sanitaires. L'ensemble de ces épisodes donne lieu à des interrogations parmi les usagers des plans et cours d'eau sur les risques sanitaires potentiels liés aux expositions humaines.

Nous vous demandons en conséquence d'évaluer les risques sanitaires encourus par les baigneurs et les autres usagers des plans et cours d'eau, notamment en actualisant les données de la littérature scientifique, et de proposer des valeurs limites de qualité relatives à la concentration de cellules et ou de toxines dans les eaux de baignade.

A cette occasion, vous pourrez vous rapprocher le cas échéant du Groupement d'Intérêt Scientifique sur les cyanobactéries (GRISCYA), des agences de l'eau ainsi que des services concernés du ministère de la santé, de la famille et des personnes handicapées et du ministère de l'écologie et du développement durable.

Nous vous ^{serions} rions gré de nous communiquer pour le mois de juin une première note d'étape sur la manière dont vous envisagez d'organiser vos travaux.

Nous vous prions d'agréer, madame la directrice générale, l'assurance de notre considération distinguée.

Le directeur général de la santé



Professeur William DAB

**Le directeur des études économiques
et de l'évaluation environnementale**



Dominique BUREAU

ORIGINAL AGENCE FRANÇAISE DE SECURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS

Décision n°2003-05-258 relative au groupe de travail « Cyanobactéries et Cyanotoxines »

Le directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments,

Vu le code de la santé publique, et notamment ses articles L.1323-4 et R.794-23 ;

Vu le décret n°99-242 du 26 mars 1999 relatif à l'organisation et au fonctionnement de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu l'arrêté du 23 août 2000 relatif aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu l'arrêté du 30 août 2000 portant nomination aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu le règlement intérieur de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments.

DECIDE :

Article premier. Il est créé sur proposition du comité d'experts spécialisé « Eaux » lors de la réunion du 6 mai 2003 un groupe de travail dénommé « Cyanobactéries et Cyanotoxines », chargé d'assister l'Afssa dans l'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries dans les eaux douces servant à la production d'eau destinée à la consommation humaine.

Article 2. Le groupe de travail mentionné à l'article premier est composé des membres suivants :

- Membres du comité d'experts spécialisé « Eaux » :

M. BALEUX Bernard
M. CABILLIC Pierre-Jean
M. DELATTRE Jean-Marie
Mme DUBROU Sylvie
M. HARTEMANN Philippe
M. JOYEUX Michel
Mme LEDRANS Martine
M. LEROY Pierre
M. MONTIEL Antoine
M. SEUX René

- Des membres du comité d'experts spécialisé « Résidus et Contaminants physiques et chimiques » peuvent être sollicités en tant que de besoin.

- Autres experts :

Mme BERNARD Cécile - Muséum national d'histoire naturelle
M. BOUAÏCHA Nouredine - Université Paris Sud
M. BRIENT Luc - Université Rennes I
M. CODD Geoffrey - Université de Dundee (Royaume Uni)
Mme COLLE Delphine - CRECEP
M. CROUZET Philippe - IFEN
M. DUCHEMIN Jean - Agence de l'eau Seine-Normandie
M. ETTER Eric - Afssa
Mme FESSARD Valérie - Afssa
Mme ITEMAN Isabelle - Institut Pasteur Paris
Mme HARVEY Mathilde - Afssa
Mme HENNION Marie-Claire - ESPCI
M. HUMBERT Jean-François - INRA
Mme KRYS Sophie - Afssa
Mme LEITAO Maria - Bi-Eau (organisme privé)

M. MANSOTTE François – DDASS 44
M. PEIGNER Patrick – DDASS 49
M. PEIRERA Paulo – Institut national de la santé (Portugal)
M. POUILLOT Régis – Afssa
Mme QUIBLIER Catherine – université Paris VII
Mme TANDEAU de MARSAC Nicole – Institut Pasteur Paris
M. TRICARD Dominique - Afssa

Article 3. M. LEVI Yves est nommé président du groupe de travail mentionné à l'article premier.

Article 4. Les conclusions du groupe de travail seront présentées au comité d'experts spécialisé « Eaux » dans un délai de 12 mois.

Article 5. Le secrétariat du groupe de travail mentionné à l'article premier est assuré par la direction de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires.

Fait à Maisons-Alfort, le

20 MAI 2003

Le Directeur général de l'Agence française de
sécurité sanitaire des aliments



Martin HIRSCH

ORIGINAL

AGENCE FRANÇAISE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS

**Décision n° 2003-10-441
relative au groupe de travail « Cyanobactéries et Cyanotoxines »**

Le directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments,

Vu le code de la santé publique, et notamment ses articles L.1323-4 et R.1323-22 ;

Vu l'arrêté du 23 août 2000 relatif aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu l'arrêté du 3 septembre 2003 portant nomination aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu la décision du 17 juillet 2003 établissant une liste d'experts auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu le règlement intérieur de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments.

DECIDE :

Article premier : Le mandat du groupe de travail « Cyanobactéries et Cyanotoxines » créé par la décision N° 2003-05-258 du 20 mai 2003 est élargi à l'évaluation de l'ensemble des risques sanitaires à travers l'alimentation liés à la présence de cyanobactéries dans les eaux.

Article second : La composition du groupe de travail « Cyanobactéries et Cyanotoxines » institué par la décision N° 2003-05-258 du 20 mai 2003 est modifiée :

- en ôtant de la liste de ses membres :

- Mme COLLE Delphine (démissionnaire)
- M. ETTER Eric (démissionnaire)
- Mme LEDRANS Martine (démissionnaire)
- M. TRICARD Dominique (démissionnaire)

- en ajoutant parmi ses membres :

- M. BAUDEAU Pascal (membre du CES « Eaux »)
- Mme CUN Christine
- Mme WELTE Bénédicte

Fait à Maisons-Alfort, le

04 NOV. 2003

Le Directeur général de l'Agence française de
sécurité sanitaire des aliments


Martin HIRSCH

ORIGINAL

AGENCE FRANÇAISE DE SECURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS

**Décision n°2004- 06- 274
relative au groupe de travail «cyanobactéries et cyanotoxines»**

Le directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments,

Vu le code de la santé publique, et notamment ses articles L.1323-4 et R.1323-22 ;

Vu l'arrêté du 23 août 2000 relatif aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu l'arrêté du 4 juillet 2001 portant nomination au comité d'experts spécialisé « encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles » placé auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu la décision du 17 juillet 2003 établissant une liste d'experts auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu l'arrêté du 3 septembre 2003 portant nomination aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu l'arrêté du 15 octobre 2003 modifiant l'arrêté du 3 septembre 2003 portant nomination aux comités d'experts spécialisés placés auprès de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ;

Vu le règlement intérieur de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments,

Vu la décision n° 2003-05-258 du 20 mai 2003 relative à la création du groupe de travail « cyanobactéries et cyanotoxines »,

Vu la décision n° 2003-10-441 du 04 novembre 2003, modifiant la composition du groupe de travail,

Vu le courriel de Mme Marie-Claire HENNION, démissionnaire,

DECIDE :

Article premier : Le mandat du groupe de travail dénommé « Cyanobactéries et Cyanotoxines » créé par la décision n° 2003-05-258 du 20 mai 2003 est prolongé jusqu'au 31 mai 2005.

Article second : La composition du groupe de travail est modifiée :

- en ôtant de la liste de ses membres :

- Mme HENNION Marie-Claire – ESPCI

- en ajoutant parmi ses membres :

-M. LE BIZEC Bruno, membre du CES « Résidus et Contaminants physiques et chimiques »

-M. MOULY Damien – INVS

Fait à Maisons-Alfort, le

20 JUIL. 2004

Le Directeur général de l'Agence française de
sécurité sanitaire des aliments


Martin HIRSCH

Par décision administrative de la Directrice Générale de l'Afsset, le groupe de travail de l'agence, intitulé « Cyanobactéries et cyanotoxines dans les eaux de loisirs » a été établi comme suit :

Experts	Domaine d'expertise	Organisme d'attachement
ALLIX Sylvie	Surveillance et gestion sanitaire.	DDASS Manche
BAAN Robert	Senior scientist, unit of carcinogen identification and evaluation WHO/IARC.	Centre international de Recherche sur le cancer. Lyon. Membre du comité d'experts spécialisés « évaluation des risques liés aux substances chimiques » de l'Afsset.
BOUAÏCHA Noureddine	Toxicologue, mécanismes d'action des hépatotoxines.	EA 3542 Santé publique-Environnement. Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry Université Paris Sud 11.
DUCHEMIN Jean	Eau et Santé.	Agence de l'eau Seine-Normandie
HARVEY Mathilde	Cyanobactéries-cyanotoxines - eau potable.	DERNS. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Secrétaire scientifique du groupe de travail Afssa.
HUMBERT Jean-François	Dynamique des populations de cyanobactéries.	Centre alpin de recherche sur les réseaux trophiques des écosystèmes Limniques. UMR 42 - Institut National de Recherche Agronomique de Thonon les Bains.
LEGEAS Michèle	Analyse et de gestion des situations à risque.	École Nationale de la Santé Publique.
LEVI Yves	Santé publique environnement.	EA 3542. Santé publique environnement. Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry. Université Paris Sud. Membre du comité d'experts spécialisés « eaux » de l'Afssa et président du groupe de travail cyanobactéries-cyanotoxines - eau potable.
MONFORT Patrick	Écologie microbienne.	UMR-CNRS 5119 « Ecosystèmes lagunaires ». Université de Montpellier 2 .
PRAT Maryannick	Médecin inspecteur de Santé Publique.	DDASS Pays de la Loire.
RIOU Jeanine	Gestion et surveillance sanitaire.	DDASS Gard.

X. Références bibliographiques

- Abdullah M., Low G.K. & Matthews R.W., 1990.** Effects of common inorganic anions on rates of photocatalytic oxidation of organic carbon over illuminated titanium dioxide. *J. Phys. Chem.* 94 (17), 6820-6825.
- Agence française de sécurité sanitaire des aliments - Observatoire des consommations alimentaires, 2003.** Note technique OCA/NB/2003-693 Données de consommation d'eau du robinet dans la population française. 4 p.
- 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 (12), 1495-1507.
- Andersen R.J., Luu H.A., Chen D.Z.X., Holmes C.F.B., Kent M., Le Blanc M., Taylor F.J.R. & Williams D.E., 1993.** Chemical and biological evidence links microcystins to salmon « Netpen Liver Disease ». *Toxicon* 31 (10), 1315-1323.
- Andrew S. & Huck P., 1994.** Using fractionated natural organic matter to quantitate organic by-products of ozonation. *Ozone Sci. Eng.* 16 (1), 1-12.
- Andrinolo D., Michea L.F. & Lagos N., 1999.** Toxic effects, pharmacokinetics and clearance of saxitoxin, a component of paralytic shellfish poison (PSP), in cats. *Toxicon* 37 (3), 447-464.
- Andrinolo D., Gomes P., Fraga S., Soares-da-Silva P. & Lagos N., 2002.** Transport of the organic cations gonyautoxin 2/3 epimers, a paralytic shellfish poison toxin, through the human and rat intestinal epitheliums. *Toxicon* 40 (10), 1389-1397.
- Antenucci J.P., Alexander R., Romero J.R. & Imberger J., 2002.** Management strategies for a eutrophic water supply reservoir - San Roque, Argentina. International conference IWA. Melbourne. April, 7-12.
- Aranda-Rodriguez R., Kubwabo C. & Benoit F.M., 2003.** Extraction of 15 microcystins and nodularin using immunoaffinity columns. *Toxicon* 42 (6), 587-599.
- Araoz R., Nghiêm H.O., Rippka R., Palibroda N., Tandeau de Marsac N. & Herdman M., 2005.** Neurotoxins in axenic oscillatorian cyanobacteria: coexistence of anatoxin-a and homoanatoxin-a determined by ligand-binding assay and GC/MS. *Microbiology* 151 (4), 1263-1273.
- Astrachan N.B., Archer B.G. & Hilbelink D.R., 1980.** Evaluation of the subacute toxicity and teratogenicity of anatoxin-a. *Toxicon* 18 (5-6), 684-688.
- Babin J., Prepas E.E., Murphy T.P., Serediak M., Curtis P.J., Zhang Y. & Chambers P.A., 1994.** Impact of lime on sediment phosphorus release in hardwater lakes : the case of hypereutrophic Halfmoon Lake, Alberta. *Lake Reservoir Manage.* 8 (2), 131-142.
- Bagu J.R., Sykes B.D., Craig M.M. & 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 (8), 5087-5097.
- Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A.E., Barber I., Bradley M.C. & Calow P., 1989.** The long-term maintenance of *Daphnia magna* for use in ecotoxicity tests: Problems and prospects. First Conference on Ecotoxicology. Lyngby, Denmark.
- Banker R., Carmeli S., Hadas O., Teltsch B., Porat R. & Sukenik A., 1997.** Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from lake Kinneret, Israël. *J. Phycol.* 33 (4), 613-616.
- Banker R., Teltsch B., Sukenik A. & Carmeli S., 2000.** 7-Epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the *Cyanobacterium Aphanizomenon ovalisporum* from Lake Kinneret, Israel. *J. Nat. Prod.* 63 (3), 387-389.
- Banker R., Carmeli S., Werman M., Teltsch B., Porat R. & Sukenik A., 2001.** Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. *J. Toxicol. Environ. Heal. A* 62 (4), 281-288.
- Barbiero R.P., James W.F. & Barko J.W., 1999.** The effects of disturbance events on phytoplankton community structure in a small temperate reservoir. *Freshwater Biol.* 42, 503-512.
- Batoréu M.C.C., Dias E., Pereira P. & Franca S., 2005.** Risk of human exposure to paralytic shellfish toxins of algal origin. *Environ. Toxicol. Phar.* 19 (3), 401-406.
- Baylis J.R., 1955.** Effect of microorganisms on lengths of filter runs. *Water Works Engr.* 108, 127.

- Beattie K.A., Ressler J., Wiegand C., Krause E., Codd G.A., Steinberg C.E.W. & Pflugmacher S., 2003.** Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. *Aquat. Toxicol.* 62 (3), 219-226.
- Beaugelin-Seiller K., Cessac B., Marot F., Chartier C., Deportes I., Metivier J.-M., Morin A., Mourlon C. & Vincent G., 2004.** La banque de données CIBLEX, une compilation de paramètres d'exposition de la population française au voisinage d'un site pollué. *Déchets - REVUE FRANCOPHONE D'ÉCOLOGIE INDUSTRIELLE* 34.
- Benoufella F., Laplanche A., Boisdon V. & Bourbigot M.M., 1995.** Élimination de trois espèces d'algues de type cyanobactéries par un procédé d'ozoflottation : approche de la toxicité avant et après traitement. *TSM* (10), 737-742.
- Berg K., Skulberg O.M., Skulberg R., Underdal B. & Willen T., 1986.** Observations of toxic blue-green algae (cyanobacteria) in some Scandinavian lakes. *Acta Vet. Scand.* 27, 440-452.
- Bernard C., Harvey M., Briand J.F., Biré R., Krys S. & Fontaine J.J., 2003.** Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* toxic strains : Evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environ. Toxicol.* 18, 176-186.
- Bernazeau F., 1994.** Can microcystins enter drinking water distribution systems ? In *Toxic Cyanobacteria Current Status of Research Management*. Steffensen D. & Nicholson E. (eds). Adelaide (Australia), Denver (Colorado), American Water Works Association Research Foundation. p. 115-118.
- Bernazeau F., Baudin I., Pieronne P., Bruchet A. & Anselme C., 1995.** Traitement des problèmes de toxines générées par les algues. *TSM* (10), 747-748.
- Bernhardt H., 1984.** Treatment disturbances with water out of eutrophic reservoirs as consequences of extensive algal development. *Water Supply* 2 (SS), 4-7.
- Bernhardt H., Hoyer O., Schell H. & Lusse B., 1985.** Reaction mechanisms involved in the influence of algogenic organic matter on flocculation. *Zeitschrift für Wasser und Abwasserforschung* 18 (1), 18-30.
- Bernhardt H. & Clasen J., 1991.** Flocculation of micro-organisms. *J. Water SRT - Aqua* 40 (22), 76-87.
- Bernhardt H. & Schell H., 1993.** Control of flocculants by use of a streaming current detector. *J. Water SRT - Aqua* 42 (4), 239.
- Bernhardt H.e.a., 1987.** Investigations on the Influence of Algal-derived Organic Substances on Flocculation and Filtration. Treatment of Drinking Water for Organic Contaminants, Proc. Second Natl. Conf. Drinking Water.
- Bertrand F., Dunand A., Fosse J., Fradin N. & Liger D., 2004.** Les cyanobactéries neurotoxiques. Étude de cas d'intoxications chez le chien dans la rivière Tarn. Rapport d'inspecteurs stagiaires de la santé publique vétérinaire. Ecole Nationale des Services Vétérinaires. 28 p.
- Beutler M., Wiltshire K.H., Meyer B., Moldaenke C., Lüring C., Meyerhöfer M., Hanse U.-P. & Dau H., 2002.** A fluorometric method for the differentiation of algal populations *in vivo* and *in situ*. *Photosynth. Res.* 72 (1), 39-53.
- Bideau M., Claudel B., Dubien C., Faure L. & Kazouan H., 1995.** On the immobilization of titanium dioxide in the photocatalytic oxidation of spent waters. *J. Photochem. Photobiol. A : Chem.* 91 (2), 137-144.
- Billings W.H., 1981.** Water associated human illness in northeast Pennsylvania audits suspected associated with the blue green algae. In *The water environment, algal toxins and health*. Carmichael W.W. (ed). New York, London, Plenum Press. p. 243-255.
- Bonnélye V., Baudin I., Bernazeau F., Gislette P. & Mouchet P., 1995.** Élimination des algues planctoniques : efficacité des filières de traitement. *TSM* (10), 721-727.
- Bose P., Bezbarua B.K. & Reckhow D.A., 1994.** Effect of ozonation on some physical and chemical properties of aquatic natural organic matter. *Ozone Sci. Eng.* 16 (2), 89-112.
- Botana L.M., 2000.** *Seafood and freshwater toxins : pharmacology, physiology and detection*, Marcel Dekker. 798 p.
- Botha N., Gehring M.M., Downing T.G., Venter M.V.D. & Shephard E.G., 2004.** The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. *Toxicon* 43 (1), 85-92.
- Bouaïcha N. & Maatouk I., 2004.** Microcystin-LR and Nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 148 (1-2), 53-63.
- Bourke A.T.C., Hawes R.B., Neilson A. & Stallman N.D., 1983.** An outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicon* 21 (Suppl. 3), 45-48.

- Bourne D.G., Jones G.J., Blakeley R.L., Jones A., Negri A.P. & Riddles P., 1996.** Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (11), 4086-4094.
- Briand J.-F., Jacquet S., Bernard C. & Humbert J.F., 2003.** Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vet. Res.* 34, 361-377.
- Briand J.-F., Jacquet S., Flinois C., Avois-Jacquet C., Maissonnette C., Leberre B. & Humbert J.-F., 2005.** Variations in the microcystin production of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria) assessed from a four-year survey of Lac du Bourget (France) and from laboratory experiments. *Microb. Ecol.* 50 (3), 418-428.
- Brient L., Raoult C., Le Rouzic B., Vézic C. & Bertru C., 2001.** Conditions d'utilisation du CuSO₄ pour limiter les proliférations de cyanobactéries et réduire ses effets sur l'environnement. *TSM* (9), 66-74.
- Briley D.S. & Knappe D.R.U., 2002.** Optimizing ferric sulfate coagulation of algae with streaming current measurements. *JAWWA* 94 (2), 80-90.
- Brooks W.P. & Codd G.A., 1987.** Distribution of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin and interactions with hepatic microsomes in mice. *Pharmacol. Toxicol.* 60 (3), 187-191.
- Brunberg A.K. & Blomqvist P., 2002.** Benthic overwintering of *Microcystis* colonies under different environmental conditions. *J. Plankton Res.* 24 (11), 1247-1252.
- Brunberg A.K. & Blomqvist P., 2003.** Recruitment of *Microcystis* (cyanophyceae) from lake sediments: the importance of littoral inocula. *J. Phycol.* 39 (1), 58-63.
- Bruno M., Barbini D.A., Pierdominici E., Serse A.P. & Ioppolo A., 1994.** Anatoxin-a and a previously unknown toxin in *Anabaena planctonica* from blooms found in Lake Mulargia (Italy). *Toxicon* 32 (3), 369-373.
- Burch M. & Humpage A., 2005.** Australia: regulation and management of Cyanobacteria. In *Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*. Chorus I. (ed). Berlin, Umweltbundesamt. p. 9-20.
- Burch M.D., Velzeboer R.M.A., Chow C.W.K., Stevens H.C., Bee C.M. & House J., 1998.** Évaluation of copper algicides for the control of algae and cyanobacteria. Research report n° 130, Urban Water Research Association of Australia p.
- Burns J., Chapman A., Williams C., Flewelling L., Carmichael W.W. & Pawlowicz M., 2000.** Cyanotoxic blooms in Florida's lakes, rivers and tidal river estuaries: the recent invasion of toxigenic *Cylindrospermopsis raciborskii* and consequences for Florida's drinking water supplies. 9th International Conference on Harmful Algae, 7-11 February. Hobart, Australia.
- Burry N.R., McGeer J.C. & 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. *J. Fish Dis.* 20, 209-215.
- Burry N.R., Newlands A.D., Eddy F.B. & Codd G.A., 1998.** *In vivo* and *in vitro* intestinal transport of 3H-microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.* 42, 139-148.
- Carbis C.R., Waldron D.L., Mitchell G.F., Anderson J.W. & McCauley I., 1995.** Recovery of hepatic function and latent mortalities in sheep exposed to the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Vet. Rec.* 137 (1), 12-15.
- Cardellina I.J.H., Marner F.J. & Moore R.E., 1979.** Seaweed dermatitis: structure of lyngbyatoxin A. *Science* 204, 193-195.
- Carlile P.R., 1994.** Further studies to investigate microcystin-LR and anatoxin-a removal from water. Report FR0458, Foundation for Water Research, Marlow, Buckinghamshire. 44 p.
- Carlson M., 1993.** The effect of organic carbon on ozone demand and decay. Proceedings of the Water Quality Technology Conference, American Water Works Association. Miami, FL, November 7-11.
- Carmichael W.W., 1988.** Toxins of freshwater algae. In *Handbook of natural toxins. Marine toxins and venoms*. Vol. 3. Tu AT. Marcel Dekker N.Y. (ed). p. 121-147.
- Carmichael W.W., Eschedor J.T., Patterson G.M. & Moore R.E., 1988.** Toxicity and partial structure of a hepatotoxic peptide produced by the cyanobacterium *Nodularia spumigena* Mertens emend. L575 from New Zealand. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (9), 2257-2263.
- Carmichael W.W., 1994.** The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am.* 270 (1), 78-86.
- Carmichael W.W., 1995.** Toxic *Microcystis* and the environment. In *Toxic Microcystis*. Watanabe M. Harada K. Carmichael W. & Fujiki H. (eds). Boca Raton, Florida, CRC Press. p. 1-12.

- Carmichael W.W., Evans W.R., Yin Q.Q., Bell P. & Moczydlowski E., 1997.** Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (8), 3104-3110.
- Carmichael W.W., Azevedo S.M.F.O., An J.S., Molica R.J.R., 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 (7), 663-668.
- Carpenter S.R., 1989.** Replication and treatment strength in whole-lake experiments. *Ecology* 70 (12), 453-463.
- Castenholz R.W., 2001.** Phylum BX. Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototropic Bacteria. Second Edition.* Garrity G.Boone D.R. & Castenholz R.W. (eds). New York, Springer-Verlag.
- Castiglioni B., Rizzi E., Frosini A., Sivonen K., Rajaniemi P., Rantala A., Mugnai M.A., Ventura S., Wilmotte A., Boutte C., Grubisic S., Balthasart P., Consolandi C., Bordoni R., Mezzelani A., Battaglia C. & De Bellis G., 2004.** Development of a universal microarray based on the ligation detection reaction and 16S rRNA gene polymorphism to target diversity of cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (12), 7161-7172.
- Chambers P.A., Prepas E.E., Ferguson M.E., Serediak M., Guy M. & Holst M., 2001.** The effects of lime addition on aquatic macrophytes in hard water : in site and microcosm experiments. *Freshwater Biol.* 46, 1121-1138.
- Charlton T.S., Marini A.M., Markey S.P., Norstog K. & Duncan M.W., 1992.** Quantification of the neurotoxin 2-amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) in Cycadales. *Phytochemistry* 31 (10), 3429-3432.
- Chernoff N., Hunter E.S., Hall L.L., Rosen M.B., Brownie C.F., Malarkey D., Marr M. & Herkovits J., 2002.** Lack of teratogenicity of microcystin-LR in the mouse and toad. *J. Appl. Toxicol.* 22 (1), 13-17.
- Chevalier M.R., Brodard E. & Mevelec P., 1995.** Influence d'un « bloom algal » sur les performances de l'ultrafiltration. *TSM* (10), 728-731.
- Chiswell R.K., Shaw G.R., Eaglesham G., Smith M.J., Norris R.L., Seawright A.A. & Moore M.R., 1999.** Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: Effect of pH, temperature and sunlight on decomposition. *Environ. Toxicol.* 14 (1), 155-161.
- Chong M.W.K., Wong B.S.F., Lam P.K.S., Shaw G.R. & Seawright A.A., 2002.** Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophytotoxin in primary rat hepatocytes. *Toxicon* 40 (2), 205-211.
- Chorus I., Klein G., Fastner J. & Rotard W., 1993.** Off-flavors in surface waters, how efficient is bank filtration for their abatement in drinking water ? *Wat. Sci. Tech.* 25 (2), 251-258.
- Chorus I. & Bartram J., 1999.** *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.* London & New York, Spon, E. & F.N. 416 p.
- Chorus I. & Mur L., 1999.** Preventative measures. In *Toxic Cyanobacteria in Water : a guide to their public health consequences, monitoring and management.* Chorus I. & Bartram J. (eds). London, Spon, E. & F.N. p. 235-273.
- Chorus I. (ed) 2001.** *Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences.* Berlin, Springer. 357 p.
- Chorus I. & Fastner J., 2001.** Recreational exposure to cyanotoxins. In *Cyanotoxins, occurrence, causes, consequences.* Chorus I. (ed). Berlin, Springer. p. 190-199.
- Chorus I., 2005.** Germany: Approaches to assessing and managing the cyanotoxin risk. In *Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries.* Chorus I. (ed). Berlin, Umweltbundesamt (Federal Environmental Agency). p. 59-67.
- Chow C.W.K., House J., Velzeboer R.M.A., Drikas M., Burch M.D. & Steffensen D.A., 1998.** The effect of ferric chloride flocculation on cyanobacterial cells. *Wat. Res.* 32 (3), 808-814.
- Chow C.W.K., Drikas M., House J., Burch M.D. & Velzeboer R.M.A., 1999.** The impact of conventional water treatment processes on cells of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Wat. Res.* 33 (15), 3253-3262.
- Christopher P., Davis P., Falconer I., Bowling L. & Dyson J., 1991.** Lake Cargelligo hit by blue-green algae. *NSW Pub. Health Bull.* 2, 110-113.
- Clasen J., Mischke U., Drikas M. & Chow C., 2000.** Improved method for detecting electrophoretic mobility of algae during the destabilization process of flocculation: Flocculant demand of different species and the impact of DOC. *J. Water SRT - Aqua* 49 (2), 89-101.
- Codd G.A., 1983.** Cyanobacterial poisoning hazard in British freshwaters. *Vet. Rec.* 113 (10), 223-224.
- Codd G.A., Edwards C., Beattie K.A., Barr W.M. & Gunn G.J., 1992.** Fatal attraction to cyanobacteria? *Nature* 359 (6391), 110-111.

- Codd G.A., Metcalf J.S. & Beattie K.A., 1999.** Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon* 37 (8), 1181-1185.
- Codd G.A., Metcalf J.S., Ward C.J., Beattie K.A., Bell S.G., Kaya K. & Poon G.K., 2001.** Journal AOAC International. *J. AOAC Int.* 84 (5), 1626-1635.
- Codd G.A., Lindsay J., Young F.M., Morrison L.F. & Metcalf J.S., 2005.** Harmful cyanobacteria: from mass mortalities to management measures. In *Harmful cyanobacteria*. Huisman J. Matthijs H.C.P. & Visser P.M. (eds). Dordrecht, The Netherlands, Springer. p. 1-24.
- Cook G.D., 1993.** Phosphorus inactivation and sediment oxidation. In *Restoration and management of lakes and reservoirs. 2nd edition*. Cooke G.D. Welch E.B. Peterson S.A. & Newroth P.R. (eds). Boca Raton, Lewis Publishers. p. 161-209.
- Cornish B.J.P.A., Lawton L.A. & Robertson P.K.J., 2000.** Hydrogen peroxide enhanced photocatalytic oxidation of microcystin-LR using titanium dioxide. *App. Catal. B* 25 (1), 59-67.
- Cousins I.T., Bealing D.J., James H.A. & Sutton A., 1996.** Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations. *Wat. Res.* 30 (2), 481-485.
- Couté A. & Bernard C., 2001.** Les cyanobactéries toxiques. In *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Frémy J.-M. & Lassus P. (eds). Plouzané, Editions Ifremer. p. 21-37.
- Cox P.A., Banack S.A. & Murch S.J., 2003.** Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among Chamorro people of Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (23), 13380-13383.
- Cox P.A., Banack S.A., Murch S.J., Rasmussen U., Tien G., Bidigare R.R., Metcalf J.S., Morrison L.F., Codd G.A. & Bergman B., 2005.** Diverse taxa of cyanobacteria produce b-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (14), 5074-5078.
- Craig M., McCready T.L., Luu H.A., Smillie M.A., Dubord P. & Holmes C.F.B., 1993.** Identification and characterisation of hydrophobic microcystins in Canadian freshwater cyanobacteria. *Toxicon* 31 (12), 1541-1549.
- Dass Manche 2003.** Suivi barrage à l'amont de la Selune. SAGEP (ed.).
- Dawson R.M., 1998.** The toxicology of microcystins. *Toxicon* 36 (7), 953-962.
- De Silva E.D., Williams D.E., Andersen R.J., Klix H., Holmes C.F.B. & Allen T.M., 1992.** Motuporin, a potent protein phosphatase inhibitor isolated from the Papua New Guinea sponge *Theonella swinhoei* Gray. *Tetrahedron Lett.* 33 (12), 1561-1564.
- Dell'Aversano C., Eaglesham G.K. & Quilliam M.A., 2004.** Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1028 (1), 155-164.
- Demelo R., France R. & Mc Queen D.J., 1992.** Biomanipulation - hit or myth ? *Limnol. Oceanogr.* 37, 192-207.
- Deppe T., Ockenfeld K., Meybohm A., Opitz M. & Benndorf J., 1999.** Reduction of *Microcystis* blooms in a hypertrophic reservoir by a combined ecotechnological strategy. *Hydrobiologia* 408/409, 31-38.
- DGS, ENSP, Université Rennes 1 & Bi-Eau, 2004.** Étude inter-régionale Grand Ouest sur les cyanobactéries d'eau douce. 80 p.
- DHFS, 2004.** *Guidance for Local Health Departments. Cyanobacteria and Human Health*. Madison. 4 p.
- DHS.** DHS news release: Algae advisory lifted for Crane Prairie Reservoir, Deschutes County. Consulté le 21/01/2005. Dernière mise à jour: 24/09/2004.
- Dietrich D. & Hoeger S., 2005.** Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203 (3), 273-289.
- Dillinger H.O. & Dehnel M.K., 1960.** Toxic waterbloom in Saskatchewan, 1959. *Can. Med. Asso. J.* 83, 1151-1154.
- Dillon P.P., Miller M., Fallowfield H. & Hutson J., 2002.** The potential of riverbank filtration for drinking water supplies in relation to microcystin removal in brackish aquifers. *J. Hydrol.* 266 (3-4), 209-221.
- Ding W.X., Shen H.M., Zhu H.G., Lee B.L. & Ong C.N., 1999.** Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. *Mutat. Res. - Gen. Tox. En.* 442 (2), 69-77.
- DIPNR, 2004.** Guidelines for management response to marine and freshwater algal blooms: for application in the Lower North Coast, Hunter Valley and Central Coast. Department of Infrastructure, Planning and Natural Resources, Hunter Region. 1-112 p.
- Donati C., Drikas M., Hayes R. & Newcombe G., 1994.** Microcystin-LR adsorption by powdered activated carbon. *Wat. Res.* 28 (8), 1735-1742.

- Donati C.D., Drikas M., Hayes R. & Newcombe G., 1993.** Adsorption of microcystin-LR by powdered activated carbon. *JAWWA* 20 (3), 25-28.
- Done S.H. & Bain M., 1993.** Hepatic necrosis in sheep associated with ingestion of blue-green algae. *Vet. Rec.* 133 (24), 600.
- Dorigo U., Jacquet S. & Humbert J.F., 2004.** Cyanophage diversity, inferred from g20 gene analysis, in the largest natural French lake, Lake Bourget (France). *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2), 1017-1022.
- DPIWE, 2001.** Guidelines for management of blooms of blue-green algae in freshwaters in Tasmania. Department of Primary Industries, Water & Environment. 1-35 p.
- Drikas M., Chow C.W.K., House J. & Burch M., 2001a.** Using coagulation, flocculation and settling to remove toxic cyanobacteria. *JAWWA* 93 (2), 100-111.
- Drikas M., Newcombe G. & Nicholson B., 2001b.** Water treatment options for Cyanobacteria and their toxins. WQTC Proceedings. Nashville, TN. November, 11-15.
- Duncan M.W., Kopin I.J., Crowley J.S., Jones S.M. & Markey S.P., 1989.** Quantification of the putative neurotoxin 2-amino-3-(methylamino)propanoic acid (BMAA) in cycadales: analysis of the seeds of some members of the family Cycadaceae. *J. Anal. Toxicol.* 13 (3), 169-175. Corrected Vol.113 (164) suppl. A-G.
- Duncan M.W., Steele J.C., Kopin I.J. & Markey S.P., 1990.** 2-Amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) in cycad flour: an unlikely cause of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam. *Neurology* 40 (5), 767-772.
- Duncan M.W., Markey S.P., Weick B.G., Pearson P.G., Ziffer H., Hu Y. & Kopin I.J., 1992.** 2-Amino-3-(methylamino) propanoic acid (BMAA) bioavailability in the primate. *Neurobiol. Aging* 13 (2), 333-337.
- Duy T.N., Lam P.K.S., Shaw G.R. & Connel D.W., 2000.** Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algae) toxins in water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 163, 113-186.
- Eaglesham G.K., Norris R.L., Shaw G.R., Smith M.J., Chiswell R.K., Davis B.C., Neville G.R., Seawright A.A. & Moore M.R., 1999.** Use of HPLC-MS/MS to monitor cylindrospermopsin, a blue-green algal toxin, for public health purposes. *Environ. Toxicol.* 14, 151-154.
- Echihabi L., Foutlane A., Bouchich L. & Bouloud A., 2001.** Amélioration de la qualité des eaux des retenues de barrages à vocation eau potable au Maroc. *L'Eau, l'Industrie, les Nuisances* 244, 77-82.
- Edwards C., Beattie K.A., Scrimgeour C.M. & Codd G.A., 1992.** Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicon* 30 (10), 1165-1175.
- Eriksson J.E., Meriluoto J.A.O., Kujari H.P., Österlund K., Fagerlund K. & Hällbom L., 1988.** Preliminary characterization of a toxin isolated from the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Toxicon* 26 (2), 161-166.
- Eriksson J.E., Meriluoto J.A.O. & Lindholm T., 1989.** Accumulation of a peptide toxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* in the fresh water mussel *Anodonta cygnea*. *Hydrobiologia* 183, 211-216.
- Eriksson J.E., Toivola D., Meriluoto J.A., Karaki H., Han Y.G. & Hartshorne D., 1990.** Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173 (3), 1347-1353.
- Eriksson J.E., Brautigam D.L., Vallee R., Olmsted J., Fujiki H. & Goldman R.D., 1992.** Cytoskeletal integrity in interphase cells requires protein phosphatase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (22), 11093 - 11097.
- Faivre M. & Langlais B., 1991.** L'ozoflottation : procédé d'élimination des algues. In *L'ozonation des eaux*. Masschelein W.J. (ed). Paris, Edition Tech & Doc. p. 311-314.
- Falconer I., Runnegar M., Buckley T., Huynh V. & Bradshaw P., 1989.** Using activated carbon to remove toxicity from drinking water containing cyanobacterial blooms. *JAWWA* 81, 102-105.
- Falconer I.R., Beresford A.M. & Runnegar M.T.C., 1983a.** Evidence of liver damage by toxin from a bloom of blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Med. J. Australia* 1 (11), 511-514.
- Falconer I.R., Runnegar M.T.C. & Huynh V., 1983b.** Effectiveness of activated carbon in the removal of algal toxin from potable water supplies : a pilot plant investigation. Technical Papers, Tenth Federal Convention of the Australian Water and Wastewater Association. Sydney, Australia.
- Falconer I.R., Buckley T. & Runnegar M.T.C., 1986.** Biological half-life, organ distribution and excretion of Iodine¹²⁵-labelled toxic peptide from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Aust. J. Biol. Sci.* 39 (1), 17-22.

- Falconer I.R., Smith J.V., Jackson A.R.B., Jones A. & Runnegar M.T.C., 1988.** Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* administered to mice over periods up to one year. *J. Toxicol. Environ. Heal. A* 24 (3), 291-305.
- Falconer I.R., 1991.** Tumour promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6 (3), 177-218.
- Falconer I.R., Dornbush M., Moran G. & Yeung S.K., 1992.** Effect of cyanobacterial (blue-green algal) toxins from *Microcystis aeruginosa* on isolated enterocytes from chicken small intestine. *Toxicon* 30 (7), 790-793.
- Falconer I.R., 1993.** Measurement of toxins from blue-green algae in water and foodstuff. In *Algal toxins in seafood and drinking water*. Falconer I.R. (ed). London, Academic Press. p. 165-175.
- Falconer I.R., 1994.** Health problems from exposure to cyanobacteria and proposed safety guidelines for drinking and recreational water. In *Detection methods for cyanobacterial toxins*. Codd G.A. Jeffries T.M. Keevil C.W. & Potter P. (eds). Cambridge, Royal Society of Chemistry. p. 3-10.
- Falconer I.R., 1998.** Algal toxins and human health. In *The handbook of environmental chemistry*. Vol. 5 part C Quality and treatment of drinking water II. Hrubec J. (ed). Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. p. 52-82.
- Falconer I.R., 2004.** Abstract from Harmful Algal Blooms. Harmful Algal Blooms. Le Cap, Afrique du Sud.
- FAO/IOC/WHO, 2004.** Report of the FAO/IOC/WHO *ad hoc* expert consultation on biotoxins in bivalve molluscs.
- Fastner J., Flieger I. & Neumann U., 1998.** Optimised extraction of microcystins from field samples - A comparison of different solvents and procedures. *Wat. Res.* 32 (10), 3177-3181.
- Fastner J., Neumann U., Wirsing B., Weckesser J., Wiedner C., Nixdorf B. & Chorus I., 1999.** Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German fresh water bodies. *Environ. Toxicol.* 14 (1), 13-22.
- Fastner J., Heinze R., Humpage A.R., Mischke U., Eaglesham G.K. & Chorus I., 2003.** Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* 42 (3), 313-321.
- Fawell J.K., Hart J., James H.A. & Parr W., 1993.** Blue-green algae and their toxins-analysis, toxicity, treatment and environmental control. *Water Supply* 11 (3-4), 109-121.
- Fawell J.K., James C.P. & James H.A., 1994.** Toxins from blue-green algae: Toxicological assessment of Microcystin-LR and a method for its determination in water. Water Research Centre, Medmenham, UK. 1-46 p.
- Fawell J.K., Mitchell R.E., Everett D.J. & Hill R.E., 1999a.** The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I microcystin-LR. *Hum. Exp. Toxicol.* 18 (3), 162-167.
- Fawell J.K., Mitchell R.E., Hill R.E. & Everett D.J., 1999b.** The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II anatoxin-a. *Hum. Exp. Toxicol.* 18 (3), 168-173.
- Feitz A., Waite T., Jones G. & Boyden B., 1999a.** Photocatalytic degradation of microcystin-LR: Conceptual model and pilot scale studies. *Z. Phys. Chem.* 213 (5), 75-86.
- Feitz A.J., Waite T.D., Jones G.J., Boyden B.H. & Orr P.T., 1999b.** Photocatalytic degradation of the blue green algal toxin microcystin-LR in a natural organic aqueous matrix. *Environ. Sci. Technol.* 33, 243-249.
- 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 (1), 73-81.
- Fischer W.J., Hitzfeld B.C., Tencalla F., Eriksson J.E., Mikhailov A. & Dietrich D.R., 2000.** Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in livers of blue-green algae exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. Sci.* 54 (2), 365-373.
- Fischer W.J., Altheimer S., Cattori V., Meier P.J., Dietrich D.R. & Hagenbuch B., 2005.** Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203 (3), 257-263.
- Fitzgeorge R.B., Clark S.A. & Keevil C.W., 1994.** Routes of intoxication. In *1st International symposium on detection methods for cyanobacterial (blue-green algal) toxins*. Codd G.A. Jeffries T.M. Keevil C.W. & Potter E. (eds). Cambridge, UK, Royal Society of Chemistry. p. 69-74.
- Fleming L.E., Rivero C., Burns J., Williams C., Bean J.A., Shea K.A. & Stinn J., 2002.** Blue-green algal (cyanobacterial) toxins, surface drinking water, and liver cancer in Florida. *Harmful Algae* 1 (2), 157-168.
- Flöder S. & Sommer U., 1999.** Diversity in planktonic communities: An experimental test of the intermediate disturbance hypothesis. *Limnol. Oceanogr.* 44, 1114-1119.

- Francis G., 1878.** Poisonous Australian Lake. *Nature* 18, 11-12.
- Frémy J.-M., Amzil Z. & Puech L., 2001.** Techniques d'analyses basées sur la structure moléculaire. In *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Ifremer (ed). Plouzané. p. 481-523.
- Frémy J.-M. & Lassus P., 2001.** *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Plouzané, Editions Ifremer. 553 p.
- Froscio S.M., Humpage A.R., Burcham P.C. & Falconer I.R., 2001.** Cell-free protein synthesis inhibition assay for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Environ. Toxicol.* 16 (5), 408-412.
- Fujiki 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. (eds). Washington D.C., American Chemical Society. p. 232-240.
- Fujiki H., 1992.** Is the inhibition of protein phosphatase 1 and 2A activities a general mechanism of tumor promotion in human cancer development ? *Mol. carcinogen.* 5 (2), 91-94.
- Gächter R. & Wehrli B., 1998.** Ten years of artificial mixing and oxygenation : no effect on the internal phosphorus loading of two eutrophic lakes. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3659-3665.
- Geering F., 1999.** Ozone applications : the state-of-the-art in Switzerland. *Ozone Sci. Eng.* 21 (2), 187-200.
- Gehring M.M., Govender S., Shah M. & Downing T.G., 2003.** An investigation of the role of vitamin E in the protection of mice against microcystin toxicity. *Environ. Toxicol.* 18 (2), 142-148.
- Gessner B.D., Bell P., Doucette G.J., Moczydlowski E., Poli M.A., Van Dolah F. & Hall S., 1997.** Hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks. *Toxicon* 35 (5), 711-722.
- Gilroy D.J., Kauffman K.W., Hall R.A., Huang X. & Chu F.S., 2000.** Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements. *Environ. Health Perspect.* 108 (5), 435-439.
- Giovannardi S., Pollegioni L., Pomati F., Rossetti C., Sacchi S., Sessa L. & Calamari D., 1999.** Toxic cyanobacterial blooms in lake Varese (Italy): A multidisciplinary approach. *Environ. Toxicol.* 14 (1), 127-134.
- Glare L.G. & Hopson N.E., 1975.** Algae problems in eastern lake Erie. *JAWWA* 3 (75), 131-134.
- Goldberg J., Huang H.B., Kwon Y.G., Greengard P., Nairn A.C. & Kuriyan J., 1995.** Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* 376 (6543), 745-753.
- Grabow W.O., Du Randt W.C., Prozesky O.W. & Scott W.E., 1982.** *Microcystis aeruginosa* toxin: cell culture toxicity, hemolysis, and mutagenicity assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 43 (6), 1425-1433.
- Graham N., Wardlaw V., Perry R. & Jiang J.Q., 1998.** The significance of algae as trihalomethane precursors. *Wat. Sci. Tech.* 37 (2), 83-89.
- Gregor J. & Marsalek B., 2004.** Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: A comparative study of *in vitro*, *in vivo* and *in situ* methods. *Wat. Res.* 38, 517-522.
- Greuter W., Barrie F.R., Burdet H.M., Chaloner W.G., Demoulin V., Hawksworth D.L., Jorgensen P.M., Nicolson D.H., Silva P.C., Trehane P. & McNeill J. (eds), 1994.** *International Code of Botanical Nomenclature (Tokyo Code)*. Königstein, Koeltz Scientific Books. 388 p.
- Groupe scientifique sur l'eau 2005a.** Cyanobactéries et cyanotoxines (eau potable et eaux récréatives). In *Fiches de synthèses sur l'eau potable et la santé humaine*. Institut National de Santé Publique du Québec (ed.), pp. 1-19.
- Groupe scientifique sur l'eau, 2005b.** Propositions de critères d'intervention et de seuils d'alerte pour les cyanobactéries. 4 p.
- Gugger M. 2001.** Études taxinomiques et phylogénétiques des cyanobactéries toxiques d'eau douce par des approches biochimique et moléculaire. Paris, Université Paris VII, pp. 193.
- Gugger M., Lenoir S., Berger C., Ledreux A., Druart J.C., Humbert J.-F., Guetté C., Bernard C., & GUGGER M. L.S., BERGER C., LEDREUX A., DRUART J.C., HUMBERT J.F., GUETTE C. & BERNARD C. 2005.** *Toxicon* 45, 919-928, 2005. First record in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* 45, 919-928.
- Gunn G.J., Rafferty A.G., Rafferty G.C., Cockburn N., Edwards C., Beattie K.A. & Codd G.A., 1992.** Fatal canine neurotoxicosis attributed to blue-green algae (cyanobacteria). *Vet. Rec.* 130 (14), 301-302.
- Gupta N., Pant S.C., Vijayaraghavan R. & Rao P.V., 2003.** Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology* 188 (2-3), 285-296.

- Gupta S., Giddings M.S. & Sheffer M., 2001.** Cyanobacterial toxins in drinking water : a Canadian perspective. In *Cyanotoxins : occurrence, causes, consequences*. Chorus I. (ed). Berlin, Springer. p. 208-212.
- Hall T., Hart J., Croll B. & Gregory R., 2000.** Laboratory-scale investigations of algal toxin removal by water treatment. *J. Inst. Water Environ. Manage* 14 (2), 143-149.
- Hanson J.M. & Stefan G.H., 1984.** Side effects of 58 years of copper sulfate treatment of the Fairmont lakes, Minnesota. *Water Resour. Bull.* 20 (6), 889-900.
- Harada K.I., Murata H., Qiang Z., Suzuki M. & Kondo F., 1996.** Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. *Toxicon* 34 (6), 701-710.
- Harada K.-I., Ohtani I., Iwamoto K., Suzuki M., Watanabe M.F., Watanabe M. & Terao K., 1994.** Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon* 32 (1), 73-84.
- Harding W.R. & Kempster P., 2005.** South Africa: Regulatory approaches to cyanobacteria. In *Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*. Chorus I. (ed). Berlin, Umweltbundesamt. p. 103-105.
- Hart B., Roberts S., James R., Taylor J., Donnert D. & Furrer R., 2002.** Use of active barriers to reduce eutrophication problems in Urban Lakes. International conference IWA. Melbourne. April, 11.
- Hart J. & Stott P., 1993.** *Microcystin-LR removal from water*. Marlow, Buckinghamshire, Foundation for Water Research. 88 p.
- Hart J., Fawell J.K. & Croll B., 1997.** The fate of both intra and extra cellular toxins during drinking water treatment. IWSA World Congress.
- Hawkins P.R., Runnegar M.T.C., Jackson A.R.B. & Falconer I.R., 1985.** Severe hepatotoxicity caused by tropical cyanobacterium (blue-green algae) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (5), 1292-1295.
- Hawkins P.R., Chandrasena N.R., Jones G.J., Humpage A.R. & Falconer I.R., 1997.** Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 35 (3), 341-346.
- Heinze R., 1999.** Toxicity of the cyanobacterial toxin microcystin-LR to rats after 28 days intake with the drinking water. *Environ. Toxicol.* 14, 57-60.
- Heise H.A., 1951.** Symptoms of hayfever caused by algae. *Ann. Allerg.* 9 (1), 100-101.
- Henriksen P., 1996.** Microcystin profiles and contents in Danish populations of cyanobacteria/blue-green algae as determined by HPLC. *Phycologia* 35 (6), 102-110.
- Hernandez M., Macia M., Padilla C. & Del Campo F.F., 2000.** Modulation of human polymorphonuclear leukocyte adherence by cyanopeptide toxins. *Environ. Res.* 84 (1), 64-68.
- Hessen D.O. & Van Donk E., 1994.** Effects of UV-radiation of humic water on primary and secondary production. *Water Air Soil Poll.* 75 (3-4), 325-338.
- Himberg K., Keijola A.M., Hiisvirta L., Pyysalo H. & Sivonen K., 1989.** The effect of water treatment processes on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria : A laboratory study. *Wat. Res.* 23, 979-984.
- Hines H.B., Naseem S.M. & Wannemacher Jr R.W., 1993.** [3H]-Saxitoxinol metabolism and elimination in the rat. *Toxicon* 31 (7), 905-908.
- Hitzfeld B.C., Höger S.J. & Dietrich D.R., 2000.** Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 108 (Suppl. 1), 113-122.
- Hoeger S.J., Dietrich D.R. & Hitzfeld B.C., 2002.** Effect of ozonation on the removal of cyanobacterial toxins during drinking water treatment. *Environ. Health Perspect.* 110 (11), 1127-1132.
- Hoehn R.C. & al. e., 1980.** Algae as sources of trihalomethane precursors. *JAWWA* 72 (6), 344-350.
- Hoffmann J., 1976.** Removal of *Microcystis* toxins in water purification processes. *Water SA* 2, 58-60.
- Hoffmann M.R., Martin S.T., Choi W. & Bahnemann D.W., 1995.** Environmental applications of semiconductor photocatalysis. *Chem. Rev.* 95, 69-96.
- Holden W.S., 1970.** The control of organisms associated with water supplies. In *Water Treatment and Examination*. London, J & A. Churchill. p. 453-460.

- Hooser S.B., 2000.** Fulminant hepatocyte apoptosis *in vivo* following microcystin-LR administration to rats. *Toxicol. Pathol.* 28 (5), 726-733.
- Hrbacek J., Desortova B. & Popovsky J., 1998.** Influence of fish stock on the phosphorus Chlorophyll-ratios. *Verh. Int. Ver.Theoret. Angew. Limnol.* 20, 1624-1628.
- 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*. Chorus I. & Bartram J. (eds). London, Spon, E. & F.N. p. 275-312.
- Huisman J., Johansson A.M., Folmer E.O. & Weissing F.J., 2001.** Towards a solution of the plankton paradox: the importance of physiology and life history. *Ecol. Lett.* 4, 408-411.
- Humbert J.F., Bérard a. & Leboulanger C., 2001a.** Impact écologique des cyanobactéries des eaux douces et saumâtres. In *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Ifremer (ed). Plouzané. p. 87-108.
- Humbert J.F., Paolini G. & Le Berre B., 2001b.** Monitoring a cyanobacterial bloom and its consequences for water quality. In *Harmful Algal Bloom 2000*. Hallegraeff G. & et al. (eds), Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 2001. p. 496-499.
- Humpage A.R. & Falconer I.R., 1999.** Microcystin-LR and liver tumor promotion: Effects on cytokinesis, ploidy, and apoptosis in cultured hepatocytes. *Environ. Toxicol.* 14, 61-75.
- Humpage A.R., Hardy S.J., Moore E.J., Frosco S.M. & Falconer I.R., 2000.** Microcystins (cyanobacterial toxins) in drinking water enhance the growth of aberrant crypt foci in the mouse colon. *J. Toxicol. Environ. Heal. A* 61 (3), 155-165.
- Humpage A.R. & Falconer I.R., 2003.** Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male swiss albino mice : determination of no adversed effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environ. Toxicol.* 18 (2), 94-103.
- Hyenstrand P., Metcalf J.S., Beattie K.A. & Codd G.A., 2001a.** Losses of the cyanobacterial toxin microcystin-LR from aqueous solution by adsorption during laboratory manipulations. *Toxicon* 39 (4), 589-594.
- Hyenstrand P., Metcalf J.S., Beattie K.A. & Codd G.A., 2001b.** Effects of adsorption to plastics and solvent conditions in the analysis of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by high performance liquid chromatography. *Wat. Res.* 35 (14), 3508-3511.
- Ibelings B.W., 2005.** Risks of toxic cyanobacterial blooms in recreational waters: guidelines in the Netherlands (sous presse). In *Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*. Chorus I. (ed). Berlin, Umweltbundesamt (Federal Environmental Agency). p. 85-91.
- Interlandi S.J. & Kilham S.S., 2001.** Limiting resources and the regulation of diversity in phytoplankton communities. *Ecology* 82, 1270-1282.
- Isobe M., Sugiyama Y., Ito T., Ohtani I.I., Toya Y., Nishigohri Y. & Takai A., 1995.** New analysis method for protein phosphatase type 2A inhibitors using the firefly bioluminescence system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 2235-2238.
- Ito E., Kondo F. & Harada K.-I., 1997.** Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of microcystin-LR. *Toxicon* 35 (2), 231-239.
- Ito E., Kondo F. & Harada K.I., 2001.** Intratracheal administration of microcystin-LR, and its distribution. *Toxicon* 39 (2-3), 265-271.
- Ito E., Takai A., Kondo F., Masui H., Imanishi S. & Harada K.-i., 2002.** Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds. *Toxicon* 40 (7), 1017-1025.
- Izaguirre G., 1992.** A copper tolerant *Phormidium* species from Lake Matthews, California, that produces 2-methylisoborneol and geosmin. *Wat. Sci. Tech.* 25, 217-223.
- Jacoby J.M., Collier D.C., Welch E.B., Hardy F.J. & Crayton M., 2000.** Environmental factors associated with a toxic bloom of *Microcystis aeruginosa*. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 57 (1), 231-240.
- Jacquet S., Briand J.F., Leboulanger C., Avois-Jacquet C., Oberhaus L., Tassin B., Vinçon-Leite B., Paolini G., Druart J.C., Anneville O. & Humbert J.F., 2005.** The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae* Sous presse (4), 651-672.
- James H. & Fawell J.K., 1991.** Detection and removal of cyanobacterial toxins from freshwaters. Foundation for Water Research p.

- Janssens J.G., Mus I. & Delire C., 1989. Practice of rapid filtration. *Water Supply* 7 (S511), 1-23.
- Jochimsen E.M., Carmichael W.W., An J.S., Cardo M.D., Cookson S.T., Holmes C.E.M., Antunes M.B.d.C., Melo Filho D.A., Lyra T.M., Barreto V.T.S., Azevedo S.M.F.O. & Jarvis W.R., 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New Engl. J. Med.* 338 (13), 873-878.
- Jones G.J., Bourne D.G., Blakely R.L. & Doelle H., 1994. Degradation of cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. *Nat. Toxins* 2, 228-235.
- Jones G.J. & Orr P.T., 1994. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Wat. Res.* 28 (4), 871-876.
- Jones G.J. & Negri A.P., 1997. Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) in freshwater. *Wat. Res.* 31, 525-533.
- Juin D. (ed) 2002. *L'environnement en France - Édition 2002*. Paris et Orléans, IFEN. 602 p.
- Kalbe L., 1984. Animal experiments on the oral toxicity of blue-green algae water blooms. *Limnologica* 15 (2), 559-562.
- Kankaanpää H., Turunen A.-K., Karlsson K., Bylund G., Meriluoto J. & Sipiä V., 2005a. Heterogeneity of nodularin bioaccumulation in northern Baltic Sea flounders in 2002. *Chemosphere* 59 (8), 1091-1097.
- Kankaanpää H.T., Holliday J., Schröder H., Goddard T.J., Von Fister R. & Carmichael W.W., 2005b. Cyanobacteria and prawn farming in northern New South Wales, Australia - A case study on cyanobacteria diversity and hepatotoxin bioaccumulation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203 (3 SPEC. ISS.), 243-256.
- Kano K. & Sano T., 1998. A photodetoxification mechanism of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by ultraviolet irradiation. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 159-163.
- Keijola A.M., Himberg K., Esala A.L., Sivonen K. & Hiisvirta L., 1988. Removal of cyanobacterial toxins in water treatment processes : laboratory and pilot-scale experiments. *Toxicity Assessment* 3 (5), 643-656.
- Keleti G. & Sykora J.L., 1982. Proportion and properties of cyanobacterial endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 43 (6), 104-109.
- Kenefik S.L., Hrudey S.E., Peterson H.G. & E.E. P., 1993. Toxin release from *Microcystis aeruginosa* after chemical treatment. *Wat. Sci. Tech.* 27 (3-4), 433-440.
- Kennedy H.R. & Cook G.D., 1982. Control of lake phosphorus with aluminium sulfate : dose determination and application techniques. *Water Resour. Bull.* 18 (3), 389-395.
- Khan S.A., Wickstrom M.L., Haschek W.M., Schaeffer D.J., Ghosh S. & Beasley V.R., 1996. Microcystin-LR and kinetics of cytoskeletal reorganization in hepatocytes, kidney cells, and fibroblasts. *Nat. Toxins* 4 (5), 206-214.
- Kiefer E., Sigg L. & Schosseler P., 1997. Chemical and spectroscopic characterization of algae surface. *Environ. Sci. Technol.* 31, 759-764.
- Kiviranta J., Saario E., Sivonen K. & Niemelä S.I., 1990. Mouse oral toxicity of the cyanobacterium *Nodularia spumigena*, and inhibition of hepatotoxicity by hydrocortisone. *Acta Pharm. Fenn.* 99, 69-76.
- Kiviranta J., A. A.-H., Sivonen K., Niemela S.I. & Carlberg G., 1993. Toxicity of cyanobacteria to mosquito larvae : screening of active compounds. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 8 (1), 63-71.
- Knappe D.R.U., Briley O.S. & Rastogi N., 1998. Strategies for algae removal in conventional treatment. Proceedings of the 1998 AWWA Annual Conference. Dallas. June, 21-25.
- Knauer K., Ahner B., Xue H.B. & Sigg L., 1998. Metal and photochelation content in phytoplankton from freshwater lakes with different metal concentration. *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (12), 2444-2452.
- Köhler J., 1992. Influence of turbulent mixing on growth and primary production of *Microcystis aeruginosa* in the hypertrophic Bautzen Reservoir. *Arch. Hydrobiol.* 123 (4), 413-429.
- Kondo F., Ikai Y., Oka H., Okumura M., Ishikawa N., Harada K., Matsuura K., Murata H. & Suzuki M., 1992. Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chem. Res. Toxicol.* 5 (5), 591-596.
- Kondo F., Matsumoto H., Yamada S., Ishikawa N., Ito E., Nagata S., Ueno Y., Suzuki M. & Harada K.I., 1996. Detection and identification of metabolites of Microcystins formed *in vivo* in mouse and rat livers. *Chem. Res. Toxicol.* 9 (8), 1355-1359.

- Kondo F., Ito Y., Oka H., Yamada S., Tsuji K., Imokawa M., Niimi Y., Harada K.I., Ueno Y. & Miyazaki Y., 2002.** Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column. *Toxicon* 40 (7), 893-899.
- Kuhn W., 1999.** Overview of riverbank filtration issues. The International Riverbank Filtration Conference. Louisville, USA, November. November, 4-6.
- Kuiper-Goodman T., Falconer I. & J. F., 1999.** Human health aspects. In *Toxic Cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Chorus I. & Bartram J. (eds). London, Spon, E. & F.N. p. 113-153.
- Kurmayer R. & Kutzenberger T., 2003.** Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis sp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (11), 6723-6730.
- Lafforgue M., 1998.** Techniques de réhabilitation des plans d'eau eutrophisés. *TSM* (12), 27-40.
- Lagos N. & Andrinolo D., 2000. Paralytic shellfish poisoning (PSP): toxicology and kinetics. In *Seafood and freshwater toxins : pharmacology, physiology and detection*. Botana L.M. (ed). New-York, Dekker. p. 203-215.
- Lahti K. & Hiisvirta L., 1989.** Removal of cyanobacterial toxins in water treatment processes : review of studies conducted in Finland. *Water Supply* 7 (4), 149-154.
- Lahti K., Ahtiainen J., Rapala J., Sivonen K. & Niemela S.I., 1995.** Assessment of rapid bioassays for detecting cyanobacterial toxicity. *Lett. Appl. Microbiol.* 21 (2), 109-114.
- Lahti K., Kilponen J., Kivimäki A.L., Erkomaa K. & Sivonen K., 1996.** Removal of cyanobacteria and their hepatoxins from raw water in soil and sediment columns. In *Artificial Recharge of Groundwater. NHP/Report N°38, Helsinki*. Kivimäki A.L. & Suokko T. (eds). p. 187-195.
- Lahti K., Vaitomaa J., Kivimäki A.L. & Sivonen K., 1998.** Fate of cyanobacterial hepatotoxins in artificial recharge of groundwater and in bank filtration. In *Artificial recharge of groundwater*. Peters J. (ed). Balkema, Rotterdam. p. 211-216.
- Lai W.L., Yeh H.H., Tseng T.F., Chen J.J. & Wang G.T., 2002.** Conventional versus advanced treatment for eutrophic source water. *JAWWA* 94 (12), 96-108.
- Lakshmana Rao P.V. & Bhattacharya R., 1996.** The cyanobacterial toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver *in vivo*. *Toxicology* 114, 29-36.
- Lam A.K.Y., Fedorak P.M. & Prepas E.E., 1995a.** Biotransformation of cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR, as determined by HPLC and protein phosphatase bioassay. *Environ. Sci. Technol.* 29 (1), 242-246.
- Lam A.K.Y., Prepas E.E., Spink D. & Hrudey S.E., 1995b.** Chemical control of hepatotoxic phytoplankton blooms : implications for human health. *Wat. Res.* 29 (8), 1845-1854.
- Lambert T.W., Boland M.P., Holmes C.F.B. & Hrudey S.E., 1994.** Quantitation of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with the protein phosphatase bioassay. *Environ. Sci. Technol.* 28 (4), 753-755.
- Lambert T.W., Holmes C.F.B. & Hrudey S.E., 1996.** Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full-scale water treatment 30, 1411-1422.
- Lankoff A., Banasik A., Obe G., Deperas M., Kuzminski K., Tarczynska M., Jurczak T. & Wojcik A., 2003.** Effect of microcystin-LR and cyanobacterial extract from Polish reservoir of drinking water on cell cycle progression, mitotic spindle, and apoptosis in CHO-K1 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189 (3), 204-213.
- Latour-Duris D., Giraudet H. & Berthon J.L., 2002.** Effet d'une expérimentation de brassage artificiel épilimnique par aération sur les poussées cyanobactériennes dans la retenue hypereutrophe de Grangent (France). *Rev. Sci. Eau* 15 (1), 289-299.
- Lavoux T. & Rechatin C., 1998.** *L'environnement en France*. Paris et Orléans, La Découverte. 472 p.
- Lawrence J., Tosine H., Onuska F. & Comba M., 1980.** The ozonation of natural waters : product identification. *Ozone Sci. Eng.* 2 (1), 55-64.
- Lawrence J.F. & Menard C., 2001.** Determination of microcystins in blue-green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection after sample clean-up employing immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr. A* 922, 111-117.
- Lawrence J.F. & Niedzwiadek B., 2001.** Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish by using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC Int.* 84 (4), 1099-1108.

- Lawton L.A., Beattie K.A., Hawser S.P., Campbell D.L. & Codd G.A., 1994a. Evaluation of assay methods for the determination of cyanobacterial hepatotoxicity. In *Detection Methods for Cyanobacterial Toxins*. Codd G.A. Jefferies T.M. Keevil C.W. & Potter E. (eds). Cambridge, The Royal Society of Chemistry. p. 111-116.
- Lawton L.A., Edwards C. & Codd G.A., 1994b. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* 119 (7), 1525-1530.
- Leboulanger C., Dorigo U., Jacquet S., Le Berre B., Paolini G. & Humbert J.F., 2002. Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study. *Aquat. Microb. Ecol.* 30, 83-89.
- Leeuwangh P., Kappers F.I., Dekker M. & Koerselman W., 1983. Toxicity of cyanobacteria in Dutch lakes and reservoirs. *Aquat. Toxicol.* 142, 163-169.
- Leitão M. & Couté A. (eds), 2005. *Guide pratique des cyanobactéries du Grand Ouest de la France*. Nanterre, Agence de l'Eau Seine Normandie. 63 p.
- Lepistö L., Lahti K., Niemi J. & Fardig M., 1994. Removal of cyanobacterial and other phytoplankton in four Finnish waterworks. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 75, 167-181.
- Leuschner C., 1984. Auswirkungen der Phosphateliminierungsanlage Beelitzhof auf die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Phytoplanktonpopulation im Wannseewasser bei der Überleitung in den Schlachtensee. Federal Environmental Agency. 62 p.
- Li R., Carmichael W.W., Brittain S., Eaglesham G., Shaw G.R., Mahakhant A., Noparatnaraporn N., Yongmanitchai W., Kaya K. & Watanabe M.M., 2001. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria). *Toxicon* 39 (7), 973-980.
- Lin J.R. & Chu F.S., 1994. Kinetics of distribution of microcystin-LR in serum and liver cytosol of mice: an immunochemical analysis. *J. Agric. Food Chem.* 42 (4), 1035-1040.
- Lippy E.C. & Erb J., 1976. Gastrointestinal illness at Sewickley, Pa. *JAWWA* 68, 606-610.
- Liu Y., Song L., Li X. & Liu T., 2002. The toxic effects of microcystin-LR on embryo-larval and juvenile development of loach, *Misgururus mizolepis* Gunthe. *Toxicon* 40 (4), 395-399.
- Llewellyn L.E., 1997. Haemolymph protein in xanthid crabs: its selective binding of saxitoxin and possible role in toxin bioaccumulation. *Mar. Biol.* 128 (4), 599-606.
- Llewellyn L.E. & Doyle J., 2001. Microtitre plate assay for paralytic shellfish toxins using saxiphilin: gauging the effects of shellfish extract matrices, salts and pH upon assay performance. *Toxicon* 39 (2-3), 217-224.
- Long R.R., Sargent J.C. & Hammer K., 1990. Paralytic shellfish poisoning: a case report and serial electrophysiologic observations. *Neurology* 40 (8), 1310-1312.
- Lovell R.A., Schaeffer D.J., Hooser S.B., Haschek W.M., Dahlem A.M., Carmichael W.W. & Beasley V.R., 1989. Toxicity of intraperitoneal doses of microcystin-LR in two strains of male mice. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 9 (3), 221-237.
- Lund J.W.G. & Talling J.F., 1957. Botanical limnological methods with special reference to the algae. *Bot. Rev.* 23 (8-9), 489-583.
- Lund J.W.G., Kipling C. & Le Creen E.D., 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers by counting and the statistical basis of enumeration by counting. *Hydrobiologia* 11, 143-170.
- Lund V. & Hongve D., 1994. Ultraviolet irradiated water containing humic substances inhibit bacterial metabolism 28 (5), 1111-1116.
- Maatouk I., Bouaïcha N., Fontan D. & Lévi Y., 2002. Seasonal variation of microcystin concentration in the St Caprais reservoir (France) and their removal in a small full scale treatment plant. *Wat. Res.* 36 (11), 2891-2897.
- Maatouk I., Bouaïcha N., Plessis M.J. & Périn F., 2004. Detection by ³²P-postlabelling of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in DNA as biomarker of microcystin-LR- and nodularin-induced DNA damage *in vitro* in primary cultured rat hepatocytes and *in vivo* in rat liver. *Mutat. Res. - Gen. Tox. En.* 564 (1), 9-20.
- Magalhaes V.F., Marinho M.M., Domingos P., Oliveira A.C., Costa S.M., Azevedo L.O. & Azevedo S.M.F.O., 2003. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon* 42 (3), 289-295.
- Mahmood N.A. & Carmichael W.W., 1986. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxicon* 24 (2), 175-186.

- Mahmood N.A. & Carmichael W.W., 1987.** Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* 25 (11), 1221-1227.
- Manti G., Mattei D., Messineo V., Melchiorre S., Bogianni S., Sechi N., Casiddu P., Lugliè A., Di Brizio M. & Bruno M., 2005.** First report of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Italy. *HAN* 28, 8-9.
- Marnálek B., Bláha L., Bláhová L. & Babica P., 2005.** Czech Republic: Management and regulation of cyanobacteria and cyanotoxins. In *Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*. Agency F.E. (ed). Dessau, Germany., Federal Environmental Agency. p. 39-41.
- Matsunaga S., Moore R.E., Niemczura W.P. & Carmichael W.W., 1989.** Anatoxin-a(s) a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *J. Am. Chem. Soc.* 111 (20), 8021-8023.
- Mc Knight D.M., Chisholm S.W. & Harleman D.R.F., 1983.** CuSO₄ treatment of nuisance algal blooms in drinking water reservoirs. *Environ. Manage.* 7, 311-320.
- McDermott C.M., Nho C.W., Howard W. & Holton B., 1998.** The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types. *Toxicon* 36 (12), 1981-1996.
- McElhenney T.R., Bold H.C., Malcolm Brown R. & McGovern J.P., 1962.** Algae: a cause of inhalant allergy in children. *Ann. Allerg.* 20, 739-743.
- McElhiney J., Lawton L.A., Edwards C. & Gallacher S., 1998.** Development of a bioassay employing the desert locust (*Schistocerca gregaria*) for the detection of saxitoxin and related compounds in cyanobacteria and shellfish. *Toxicon* 36 (2), 417-420.
- McFarren E., Schafer M., Campbell J., Lewis K., Jensen E. & Schantz E., 1960.** Public health significance of paralytic shellfish poisons. *Adv. Food Res.* 10, 135-179.
- McKintosh C., Beattie K.A., Klumpp S., Cohen P. & Codd G.A., 1990.** Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* 264 (2), 187-192.
- Meriluoto J.A.O., Sandström A., Eriksson J.E., Remaud G., Craig A.G. & Chattopadhyaya J., 1989.** Structure and toxicity of a peptide hepatotoxin from *Oscillatoria agardhii*. *Toxicon* 27 (9), 1021-1034.
- Meriluoto J.A.O., Nygard S.E., Dahlem A.M. & Eriksson J.E., 1990.** Synthesis, organotropism and hepatocellular uptake of two tritium-labeled epimers of dihydromicrocystin-LR, a cyanobacterial peptide toxin analog. *Toxicon* 28 (12), 1439-1446.
- Metcalf J.S., Beattie K.A., Pflugmacher S. & Codd G.A., 2000a.** Immuno-crossreactivity and toxicity assessment of conjugation products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *FEMS Microbiol. Lett.* 189 (2), 155-158.
- Metcalf J.S., Hyenstrand P., Beattie K.A. & Codd G.A., 2000b.** Effects of physicochemical variables and cyanobacterial extracts on the immunoassay of microcystin-LR by two ELISA kits. *J. Appl. Microbiol.* 89 (3), 532-538.
- Meyer N., Helynck B., Ledrans M., Le Goaster C., Kintz P. & Michel A., 1999.** Évaluation de l'imprégnation biologique d'une population exposée à une concentration élevée en arsenic dans les eaux de distribution, Ferrette, 1997. *Rev. Epidemiol. Sante Pub.* 47 (4), 315-321.
- Mez K., Hanselmann K., Hauser B., Braun U., Schmidt J. & Naegeli H., 1994.** Aufruf zur mitteilung von beobachtungen sind cyanobakterien (blaualgen) verantwortlich für todesfälle von alprindern? *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 136 (9), 313-314.
- 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.
- Mez K., Hanselmann K. & Preisig H.R., 1998.** Environmental conditions in high mountain lakes containing toxic benthic cyanobacteria. *Hydrobiologia* 368, 1-16.
- Miettinen I.T., Martikeinen P.J. & Vartiainen T., 1994.** Humus transformation at the bank filtration water plant. *Wat. Sci. Tech.* 30 (10), 179-187.
- Miller M.J., Critchley M.M., Hutson J. & Fallowfield H.J., 2001.** The adsorption of cyanobacterial hepatotoxins from water onto soil during batch experiments. *Wat. Res.* 35 (6), 1461-1468.
- Miller M.J. & Fallowfield H.J., 2001.** Degradation of cyanobacterial hepatotoxins in both experiments. *Wat. Sci. Tech.* 43 (12), 229-232.
- Milutinovic A., Zivin M., Zorc-Pleskovic R., Sedmak B. & Suput D., 2003.** Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins -LR and -YR. *Toxicon* 42 (3), 281-288.

- Ministère de la santé de Nouvelle-Zélande, 2000.** *Drinking-water standards of New-Zealand*. Wellington, Ministry of Health. 145 p.
- Ministère de la santé de Nouvelle-Zélande, 2005.** *Pre-press draft of the proposed Drinking-water Standards for New Zealand 2005*. Wellington. 162 p.
- Mittal A., Agarwal M.K. & Schivpuri D.N., 1979.** Respiratory allergy to algae: clinical aspects. *Ann. Allerg.* 42 (4), 253-256.
- Miura G.A., Robinson N.A., Lawrence W.B. & Pace J.G., 1991.** Hepatotoxicity of microcystin-LR in fed and fasted rats. *Toxicon* 29 (3), 337-346.
- Mons M.N., van Egmond H.P. & Speijers G.J.A., 1998.** Paralytic shellfish poisoning ; a review. National Institute of Public Health and the Environment. 47 pages p.
- Montebruno D., 1993.** Intoxicacion por consumo de mariscos contaminados con veneno paralizante en la XII region, Chile. Estudio anatomopatologico. *Rev. Med. Chile* 121 (1), 94-97.
- Montgomery J.M., 1985.** *Water treatment principles and design*. New York. 712 p.
- Moore G.T. & Kellerman K.F., 1905.** Cooper as an algicide and disinfectant in water supplies. *Bull. Bureau Plant. Indus. USDA* 75, 19-55.
- Morin J.P. & Nicolas R. 2004.** Communication au groupe de travail « Cyanobactéries et cyanotoxines » de l'Afssa.
- Mouchet P. & Bonnelye V., 1998.** Solving algae problems : French expertise and world-wide applications. *J. Water SRT - Aqua* 47 (3), 125-141.
- Mur L.R., Skulberg O.M. & Utkilen H., 1999.** Cyanobacteria in the environment. In *Toxic Cyanobacteria in Water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. Chorus I. & Bartram J. (eds). London and New York, Spon, E. & F.N. p. 15-40.
- Murch S.J., Cox P.A. & Banack S.A., 2004.** A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (33), 12228-12231.
- Mynderse J.S., Moore R.E., Kashiwagi M. & Norton T.R., 1977.** Antileukemia activity in the Oscillatoriaceae: isolation of debromoaplysiatoxin from *Lyngbya*. *Science* 196 (4289), 538-540.
- Naegeli H., Sahin A., Braun U., Hauser B., Mez K., Hanselmann K., Preisig H.R., Bivetti A. & Eitel J., 1997.** Plötzliche todesfälle von alprindern im kanton Graubünden. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 139 (5), 201-209.
- Nakano M., Nakano Y., Saito-Taki T., Mori N., Kojima M., Ohtake A. & Shirai M., 1989.** Toxicity of *Microcystis aeruginosa* K-139 strain. *Microbiol. Immunol.* 33 (9), 787-792.
- Nakano Y., Shirai M., Mori N. & Nakano M., 1991.** Neutralization of microcystin shock in mice by tumor necrosis factor alpha antiserum. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1), 327-330.
- Narayan L. & Nunez W., 1974.** Biological control : isolation and bacterial oxydation of the taste and odor compound geosmin. *JAWWA*, 532-536.
- Negri A.P. & 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.
- Negri A.P., Jones G.J., Blackburn S.I., Oshima Y. & Onodera H., 1997.** Effect of culture and bloom development and of sample storage on paralytic shellfish poisons in the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *J. Phycol.* 33 (1), 26-35.
- Neumann U. & Weckesser J., 1998.** Elimination of microcystin peptide toxins from water by reverse osmosis. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13 (2), 143-148.
- NHMRC, 2004.** Guidelines for managing risks in recreational water. National Health and Medical Council. 139 p.
- NHMRC & NRMCC, 2004.** *Australian drinking-water guidelines, 6^e édition*. 511 p.
- Nicholson B., Rositano J., Humpage A. & Burch M., 1993.** Removal of algal toxins in water treatment processes. 15th AWWA Federal Convention. Gold Coast, Queensland, Australia.
- Nicholson B.C., Rositano J. & Burch M.D., 1994.** Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine. *Wat. Res.* 28 (6), 1297-1303.
- Nicholson E. & Rositano J., 1997.** Chemical methods for the destruction of cyanobacterial toxins. Workshop on Cyanobacteria (Blue-Green Algae) and their Toxins. Brisbane, Australia.
- Nishiwaki R., Ohta T., Sueoka E., Suganuma M., Harada K., Watanabe M.F. & Fujiki H., 1994.** Two significant aspects of microcystin-LR: specific binding and liver specificity. *Cancer Lett.* 83 (1-2), 283-289.

- Nishiwaki-Matsushima R., Ohta T., Nishiwaki S., Suganuma M., Kohyama K., Ishikawa T., Carmichael W.W. & Fujiki H., 1992.** Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 118 (6), 420-424.
- Nobre A.C.L., Jorge M.C.M., Menezes D.B., Fonteles M.C. & Monteiro H.S.A., 1999.** Effects of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32 (8), 985-988.
- Nobre A.C.L., Coelho G.R., Coutinho M.C.M., Silva M.M.M., Angelim E.V., Menezes D.B., Fonteles M.C. & Monteiro H.S.A., 2001.** The role of phospholipase A2 and cyclooxygenase in renal toxicity induced by microcystin-LR. *Toxicon* 39 (5), 721-724.
- Nobre A.C.L., Martins A.M.C., Havt A., Benevides C., Lima A.A.M., Fonteles M.C. & Monteiro H.S.A., 2003.** Renal effects of supernatant from rat peritoneal macrophages activated by microcystin-LR: role protein mediators. *Toxicon* 41 (3), 377-381.
- Norris R.L., Eaglesham G.K., Pierens G., Shaw G.R., Smith M.J., Chiswell R.K., Seawright A.A. & Moore M.R., 1999.** Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ. Toxicol.* 14 (1), 163-165.
- Norris R.L., Seawright A.A., Shaw G.R., Senogles P., Eaglesham G.K., Smith M.J., Chiswell R.K. & Moore M.R., 2002.** Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin *in vivo* in the mouse. *Toxicon* 40 (4), 471-476.
- Ohta T., Sueoka E., Iida N., Komori A., Suganuma M., Nishiwaki R., Tatematsu M., Kim S.J., Carmichael W.W. & 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 (24), 6402-6406.
- Ohtani I., Moore R.E. & Runnegar M.T.C., 1992.** Cylindrospermopsin : a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* 114 (20), 7941-7942.
- Oliver R.L. & Gant G.G., 2000.** Freshwater blooms. In *The ecology of cyanobacteria*. Whitton B.A. & Potts M. (eds). Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p. 149-194.
- OMS, 1998.** *Directives de qualité pour l'eau de boisson. Deuxième édition. Additif au Volume 1 Recommandations.* Genève. 40 p.
- OMS, 2003.** Algae and cyanobacteria in fresh water. In *Guidelines for safe recreational water environments*. Geneva, World Health Organization. p. 136-158.
- OMS, 2004.** *Guidelines for drinking-water quality. Third edition. Volume 1 Recommendations.* Geneva. 515 p.
- Orikas M. & Hrudehy S., 1994.** Control and removal of toxins. Summary of discussions. Toxic Cyanobacteria Current Status of Research and Management. Adelaide, Australia.
- Orr P.T., Jones G.J., Hunter R.A., Berger K., De Paoli D.A. & Orr C.L.A., 2001.** Ingestion of toxic *Microcystis aeruginosa* by dairy cattle and the implications for microcystin contamination of milk. *Toxicon* 39 (12), 1847-1854.
- Orr P.T., Jones G.J., Hunter R.A. & Berger K., 2003.** Exposure of beef cattle to sub-clinical doses of *Microcystis aeruginosa*: toxin bioaccumulation, physiological effects and human health risk assessment. *Toxicon* 41 (5), 613-620.
- Ortea P.M., Allis O., Healy B.M., Lehane M., Ni Shuilleabhain A., Furey A. & James K.J., 2004.** Determination of toxic cyclic heptapeptides by liquid chromatography with detection using ultra-violet, protein phosphatase assay and tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 55 (10), 1395-1402.
- Oshima Y., 1995.** Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Int.* 78 (2), 528-532.
- Osmera S., 1966.** Zur methode der Festsetzung der Biomasse einiger Plankton krebstiere. *Zoll. Listy* 15, 79-83.
- Pahan K., Sheikh F.G., Namboodiri A.M.S. & Singh I., 1998.** Inhibitors of protein phosphatase 1 et 2A differentially regulate the expression of inducible nitric-oxide synthase in rat astrocytes and macrophages. *J. Biol. Chem.* 273 (20), 12219-12226.
- Paresys G., Rigart C., Rousseau B., Wong A.W.M., Fan F., Barbier J.P. & Lavaud J., 2005.** Quantitative and qualitative evaluation of phytoplankton communities by trichromatic chlorophyll fluorescence excitation with special focus on cyanobacteria. *Wat. Res.* 39, 911-921.
- Park T.J., Song K.Y., Sohn S.H. & Lim I.K., 2002.** Marked inhibition of testosterone biosynthesis by the hepatotoxin nodularin due to apoptosis of Leydig cells. *Mol. carcinogen.* 34 (3), 151-163.
- Pereira P., Onodera H., Andrinolo D., Franca S., Araujo F., Lagos N. & Oshima Y., 2000.** Paralytic shellfish toxins in

the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon* 38 (12), 1689-1702.

Peterson H.G., Hruddy S.E., Cantin I.A., Perley T.R. & Kenefick S.L., 1995. Physiological toxicity, cell membrane damage and the release of dissolved organic carbon and geosmin by *Aphanizomenon flos-aquae* after exposure to water treatment chemicals. *Wat. Res.* 29 (6), 1515-1523.

Pflugmacher S., Wiegand C., Oberemm A., Beattie K.A., Krause E., Codd G.A. & Steinberg C.E.W., 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochim. Biophys. Acta* 1425 (3), 527-533.

Pflugmacher S., Wiegand C., Beattie K.A., Krause E., Steinberg C.E. & 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 (4), 846-852.

Pilotto L., Hobson P., Burch M.D., Ranmuthugala G., Attewell R. & Weightman W., 2004. Acute skin irritant effects of cyanobacteria (blue-green algae) in healthy volunteers. *Aust. NZ J. Pub. Health* 28 (3), 220-224.

Pilotto L.S., Douglas R.M., Burch M.D., Cameron S., Beers M., Rouch G.J., Robinson P., Kirk M., Cowie C.T., Hardiman S., Moore C. & Attewell R.G., 1997. Health effects of recreational exposure to cyanobacteria (blue-green) during recreational water related activities. *Aust. NZ J. Pub. Health* 21 (6), 562-566.

Pomati F., Sacchi S., Rossetti C., Giovannardi S., Onodera H., Oshima Y. & Neilan B.A., 2000. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* SP. FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Phycol.* 36 (3), 553-562.

Poston H.W. & Garnet M.B., 1964. Effect of algae on filter runs with great lakes water. *JAWWA* 56 (9), 1203.

Pouria S., de Andrade A., Barbosa J., Cavalcanti R.L., Barreto V.T.S., Ward C.J., Preiser W., Poon G.K., Neild G.H. & Codd G.A., 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 352, 21-26.

Prados M. & Belotte D., 2002. Impact de la présence d'algues sur les filières de production d'eau potable : étude Générale des eaux. Agence de l'Eau Seine Normandie. 1-26 p.

Prepas E.E., Murphy T.P., Crosby J.M., Walty D.T., Lim J.T., Babin J. & Chambers P.A., 1990. The reduction of phosphorus, iron and chlorophyll-a following CaCO₃ and Ca(OH)₂ additions to hypereutrophic Figure Eight Lake, Alberta. *Environ. Sci. Technol.* 24, 1252-1258.

Prepas E.E., Murphy T.P., Dinsmore W.P., Burke J.M., Chambers P.A. & Reedyk S., 1997. Lake management based on lime application and hypolimnetic oxygenation : the experience in eutrophic hardwater lakes in Alberta. *Wat. Qual. Res. J. Canada* 32 (2), 273-293.

Prepas E.E. & Murphy T.P., 1998. Sediment-water interactions in farm dugouts previously treated with copper sulfate. *Lake Reservoir Manage.* 4, 161-168.

Prepas E.E., Babin J., Murphy T.P., Chambers A., Sandland G.J., Ghadouanis A. & Serediak M., 2001a. Long-term effects of successive Ca (OH)₂ and CaCO₃ treatments on the water quality of two eutrophic hardwater lakes. *Freshwater Biol.* 46 (8), 1089-1103.

Prepas E.E., Pinel-Alloul B., Chambers P.A., Murphy T.P., Reedyk S., Sandland G.J. & Serediak M., 2001b. Lime treatment and its effects on the chemistry and biota of eutrophic hardwater. *Freshwater Biol.* 46, 1049-1060.

Price D.W., Kizer K.W. & Hansgen K.H., 1991. California paralytic shellfish poisoning program. *J. Shellfish Res.* 10, 119-145.

Queensland Health, 2001. Cyanobacteria in recreational and drinking waters. Queensland Health, Environmental Health Unit. 1-21 p.

Raman K.R., 1995. Controlling Algae in water supply impoundments. *JAWWA* 8, 41-47.

Rao P.V. & Bhattacharya R., 1996. The cyanobacterial toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver *in vivo*. *Toxicology* 114 (1), 29-36.

Rapala J., Issakainen J., Salmela J., Hoppu K., Lahti K. & Lepistö L., 2005a. Finland: The network of monitoring cyanobacteria and their toxins (1998-2004). In *Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*. Chorus I. (ed). Dessau, Umweltbundesamt (Federal Environment Agency). p. 47-53.

Rapala J., Robertson A., Negri A.P., Berg K.A., Tuomi P., Lyra C., Erkomaa K., Lahti K., Hoppu K. & Lepistö L., 2005b. First report of saxitoxin in Finnish lakes and possible associated effects on human health. *Environ. Toxicol.* 20 (3), 331-340.

- Rashash D.M.C., 1996.** Identification and control of odorous algal metabolites. *JAWWA* 89 (4), 131-141.
- Raziuddin S., Siegelman H.W. & Tornabene T.G., 1983.** Lipopolysaccharides of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Eur. J. Biochem.* 137 (1-2), 333-336.
- Rebhun M., Fox M.A. & Sless J.B., 1971.** Chlorination of odorants from algal blooms. *JAWWA* 71, 219-224.
- Reedyk S., Prepas E.E. & Chambers P., 2001.** Effect of single Ca(OH)₂ doses on phosphorus concentration and macrophyte biomass of two boreal eutrophic lakes over 2 years. *Freshwater Biol.* 46, 1075-1087.
- Remontet L., Buemi A., Velten M., Jouglu E. & Estève J., 2003.** Évolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000. *InVS.* 217 p.
- Repavich W.M., Sonzogni W.C., Standridge J.H., Wedepohl R.E. & Meisner L.F., 1990.** Cyanobacteria (blue-green algae) in Wisconsin waters : acute and chronic toxicity. *Wat. Res.* 24, 225-231.
- Reynolds C.S., 1997.** *Vegetation Processes in the Pelagic : A model for Ecosystem Theory.* Oldendorf-Luhe. 371 p.
- Rinehart K.L., Harada K.I., Namikoshi M., Chen C., Harvis C.A., Munro M.H.G., Blunt J.W., Mulligan P.E., Beasley E.R. & Dahlem A.M., 1988.** Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda. *J. Am. Chem. Soc.* 110 (25), 8557-8558.
- Rivasseau C., Martins S. & Hennion M.-C., 1998.** Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 799, 155-169.
- Robertson P.K.J., Lawton L.A., Münch B. & Rouzade J., 1997.** Destruction of cyanobacterial toxins by semiconductor photocatalysis. *Chem. Commun.* 4, 393-394.
- Robertson P.K.J., Lawton L.A., Cornish B.J.P.A. & Jaspars M., 1998.** Processes influencing the destruction of microcystin-LR by TiO₂ photocatalysis. *J. Photochem. Photobiol. A : Chem.* 116 (3), 215-219.
- Robertson P.K.J., Lawton L.A., Munch B. & Cornish B., 1999.** The destruction of cyanobacterial toxins by titanium dioxide photocatalysis. *J. Adv. Oxid. Technol.* 4, 20-26.
- Robillot C. & Hennion M.-C., 2001.** Les principales classes de cyanotoxines et leur détermination. In *Toxines d'algues dans l'alimentation.* Ifremer (ed). Plouzané, Ifremer-Afssa. p. 39-85.
- Robillot C. & Hennion M.-C., 2004.** Issues arising when interpreting the results of the protein phosphatase 2A inhibition assay for the monitoring of microcystins. *Analytica Chim. Acta* 512 (2), 339-346.
- Robinson N.A., Miura G.A., Matson C.F., Dinterman R.E. & Pace J.G., 1989.** Characterization of chemically tritiated microcystin-LR and its distribution in mice. *Toxicon* 27 (9), 1035-1042.
- Robinson N.A., Pace J.G., Matson C.F., Miura G.A. & Lawrence W.B., 1991.** Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256 (1), 176-182.
- Rocha M.F., Sidrim J.J., Soares A.M., Jimenez G.C., Guerrant R.L., Ribeiro R.A. & Lima A.A., 2000.** Supernatants from macrophages stimulated with microcystin-LR induce electrogenic intestinal response in rabbit ileum. *Pharmacol. Toxicol.* 87 (1), 46-51.
- Rositano J. & Nicholson B., 1994.** Water treatment techniques for the removal of cyanobacterial toxins from water. Australian Centre for Water Quality Research p.
- Rositano J., Bond P. & Nicholson B., 1995.** By-products of the destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins using chlorine. Proceedings of the 16th AWWA Federal Convention of the American Water Works Association. Baltimore, MD.
- Rositano J., 1996.** The destruction of cyanobacterial peptide toxins by oxidants used in water treatment. Urban Water Research Association of Australia p.
- Rositano J., 1998.** Characterisation and determination of PSP toxins in neurotoxic cyanobacteria and methods for their removal from water. Urban water Research Association of Australia p.
- Rositano J., Nicholson B. & Pieronne P., 1998.** Destruction of cyanobacteria toxins by ozone. *Ozone Science and Engineering* 20 (3), 223-238.
- Rositano J., Newcombe G., Nicholson B. & Sztajn bok P., 2001.** Ozonation of NOM and algal toxins in four treated waters. *Wat. Res.* 35 (1), 23-32.
- Ross M.R., Siger A., Abbott C. & Hancock A., 1985.** The house fly : An acceptable subject for paralytic shellfish toxin bioassay. Toxic Dinoflagellates, Proceedings of the Third International Conference. New-York.

- Rott H.E., 1981.** Some results from phytoplankton counting intercalibrations. *Schweiz. Z. Hydrol.* 43 (1), 34-62.
- Runnegar M., Berndt N., Kong S.M., Lee E.Y. & Zhang L., 1995a.** *In vivo* and *in vitro* binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216 (1), 162-169.
- Runnegar M.T.C., Falconer I.R. & Silver J., 1981.** Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 317 (3), 268-272.
- Runnegar M.T.C. & Falconer I.R., 1982.** The *in vivo* and *in vitro* biological effects of the peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *S. Afr. J. Sci.* 78 (9), 363-366.
- Runnegar M.T.C., Falconer I.R., Buckley T. & Jackson A.R.B., 1986.** Lethal potency and tissue distribution of labelled toxic peptides from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* 24 (5), 506-509.
- Runnegar M.T.C., Jackson A.R. & Falconer I.R., 1988.** Toxicity of the cyanobacterium *Nodularia spumigena* Mertens. *Toxicon* 26 (2), 143-151.
- Runnegar M.T.C., Gerdes R.G. & Falconer I.R., 1991.** The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicon* 29 (1), 43-51.
- Runnegar M.T.C., Berndt N. & 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 (2), 264-272.
- Runnegar M.T.C., Kong S.M., Zhong Y.Z. & Lu S.C., 1995c.** Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 49 (2), 219-225.
- 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.
- Saker M.L., Metcalf J.S., Codd G.A. & Vasconcelos V.M., 2004.** Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Toxicon* 43 (2), 185-194.
- Santé Canada.** Information: produits à base d'algue bleue. http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/media/nrcp/1999/1999_114bk1_f.html. Consulté le 13/04/2005. Dernière mise à jour: 22/04/2006.
- Santé Canada.** Les algues bleues (cyanobactéries) et leurs toxines. http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/water-eau/drink-potab/cyanobacteria-cyanobacteries_f.html. Consulté le 13/04/2005. Dernière mise à jour: 22/04/2006.
- Santé Canada, 2006.** *Résumé des recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada*, Santé Canada. 16 p.
- Sarazin G., C. Q.-L., Couté A., Bernard C., Hennion M.-C., Robillot C., Bertru G., Brient L., Vézic C. & Tandeau de Marsac N., 2000.** Recherche sur les risques induits par les cyanobactéries d'eau douce. Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement et Ministère de l'emploi et de la solidarité. 37 p.
- Sawyer C.N., 1962.** Causes, effects and control of aquatic growths. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 34.
- Schaeffer D.J., Malpas P.B. & Barton L.L., 1999.** Risk Assessment of Microcystin in Dietary *Aphanizomenon flos-aquae*. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 44 (1), 73-80.
- Schmidt W., Hamsch B. & Petzoldt H., 1998.** Classification of algogenic organic matter concerning its contribution to the bacterial regrowth potential and by-products formation. *Wat. Sci. Tech.* 37 (2), 91-96.
- Schönhuber W., Zarda B., Eix S., Rippka R., Herdman M., Ludwig W. & Amann R., 1999.** *In situ* identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (3), 1259-1267.
- Schrader K.K., Dale G., Naglez D.G. & Wedge E.D., 2002.** Algal and cyanobacterial metabolites as agents for pest management. In *Advances in Microbial Toxin Research and its Biotechnological Exploitation*. Upadhyay R.K. (ed). p. 171-195.
- Seawright A.A., Nolan C.C., Shaw G.R., Chiswell R.K., Norris R.L., Moore M.R. & Smith M.J., 1999.** The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). *Environ. Toxicol.* 14, 135-142.
- SEHD, 2002.** Blue-green algae (*Cyanobacteria*) in inland waters : assessment and control of risks to public health. Scottish Executive Health Department. 47 p.
- Sellner K.G., 1997.** Physiology, ecology, and toxic properties of marine cyanobacteria blooms. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1089-1104.

- Shapiro J. & Wright D.I., 1984.** Blue-green dominance in lakes : the role and management significance of pH and CO₂. *Freshwater Biol.* 14 (2), 371-383.
- Shaw G.R., Seawright A.A., Moore M.R. & Lam P.K.S., 2000.** Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid : evaluation of its toxicologic activity. *Ther. Drug Monit.* 22 (1), 89-92.
- Shawwa A.R. & Smith D.W., 2001.** Kinetics of microcystin-LR oxidation by ozone. *Ozone Sci. Eng.* 23 (2), 161-170.
- Shen P.P., Zhao S.W., Zheng W.J., Hua Z.C., Shi Q. & Liu Z.T., 2003.** Effects of cyanobacteria bloom extract on some parameters of immune function in mice. *Toxicol. Lett.* 143 (1), 27-36.
- Shephard G.S., Stockenström S., De Villiers D., Engelbrecht W.J., Sydenham E.W. & Wessels G.F.S., 1998.** Photocatalytic degradation of cyanobacterial microcystin toxins in water. *Toxicon* 36 (12), 1895-1901.
- Shephard G.S., Stockenström S., De Villiers D., Engelbrecht W.J. & Wessels G.F.S., 2002.** Degradation of microcystin toxins in a falling film photocatalytic reactor with immobilized titanium dioxide catalyst. *Wat. Res.* 36 (1), 140-146.
- Sherman P., Tully I. & Gibson H., 1995.** Removal of cyanobacterial cells and toxins from drinking water with biologically active filters. Proceedings of the Australian Water and Wastewater Association 16th Federal Convention. Sydney.
- Shimizu Y., 2000.** Paralytic shellfish poisoning : Chemistry and mechanism of action. In *Seafood and freshwater toxins : pharmacology, physiology and detection*. Botana L. D., NY (ed). p. 151-172.
- Siegelman H.W., Adams W.H., Stoner R.D. & Slatkin D.N., 1984.** Toxins of *Microcystis aeruginosa* and their hematological and histopathological effects. In *Seafood Toxins*. Ragelis E.P. (ed). Washington D.C., American Chemical Society. p. 407-413.
- Simmons J., 1997.** Algal control and destratification at Hanningfield reservoir. IAWQ congress, Reservoir management and water supply: an integrated system. Prague. 22/05/1997.
- Sipiä V., Kankaanpää H., Lahti K., Carmichael W.W. & Meriluoto J., 2001.** Detection of nodularin in flounders and cod from the Baltic Sea. *Environ. Toxicol.* 16 (2), 121-126.
- Sivonen K., Himberg K., Luukkainen R., Niemälä S.I., Poon G.K. & Codd G.A., 1989.** Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacteria blooms and strains from Finland. *Toxicity Assessment* 4 (3), 339-352.
- Sivonen K. & Jones G., 1999.** Cyanobacterial toxins. In *Toxic Cyanobacteria in Water : a guide to their public health consequences, monitoring and management*. Chorus I. & Bartram J. (eds). London & New-York, Spon, E. & F.N. p. 41-111.
- Smith G.D. & Doan N.T., 1999.** Cyanobacterial metabolites with bioactivity against photosynthesis in cyanobacteria, algae and higher plants. *J. App. Phycol.* 11 (4), 337-344.
- Sneath P.H.A. (ed) 1992.** *International Code of Nomenclature of Bacteria, 1990 Revision*. Washington D.C., American Society for Microbiology p.
- Soldo D. & Behr R., 2000.** Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silice. *Aquat. Toxicol.* 47, 181-189.
- Solheim A.L., 2002.** Two Norwegian case studies - The lake Mjosa and the lake Gjersjoen. Workshop on eutrophication criteria - 28-30 may. Brussels.
- Solter P., Liu Z. & Guzman R., 2000.** Decreased hepatic ALT synthesis is an outcome of subchronic microcystin-LR toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164 (2), 216-220.
- Sontheimer H., 1980.** Experience with riverbank filtration along the Rhine river. *JAWWA* 72, 386-390.
- Sournia A., 1978.** *Phytoplankton manual*. Paris, UNESCO. 337 p.
- Stafford R.G. & Hines B.H., 1995.** Urinary elimination of saxitoxin after intravenous injection. *Toxicon* 33 (11), 1501-1510.
- Steffensen D.A. & Nicholson B.C., 1994.** Toxic cyanobacteria current status of research and management. In *Toxic cyanobacteria current status of research and management*. Steffensen D. & Nicholson E. (eds). Adelaide, American Water Works Association Research Foundation.
- Steinberg C. & Zimmermann G.M., 1998.** Intermittent destratification : a therapy measure against cyanobacteria in lakes. *Environ. Techno. Letters* 9, 337-350.
- Stirling D.J. & Quilliam M.A., 2001.** First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in New Zealand. *Toxicon* 39 (8), 1219-1222.

- Sueoka E., Sueoka N., Okabe S., Kozu T., Komori A., Ohta T., Suganuma M., Kim S.J., Lim I.K. & Fujiki H., 1997. Expression of the tumor necrosis factor alpha gene and early response genes by nodularin, a liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 123 (8), 413-419.
- Sukenik A., Teltch B., Wachs A.W., Shelef G., Nir I. & Levanon D., 1987. Effect of oxidants on microalgal flocculation. *Wat. Res.* 21 (5), 533-539.
- Sullivan J.J. & Wekell M.M., 1987. The application of high performance liquid chromatography in a paralytic shellfish poisoning monitoring program. *Dev. Food Sci.* 15, 357-371.
- Suzuki H., Watanabe M.F., Wu Y., Sugita T., Kita K., Sato T., Wang X., Tanzawa H., Sekiya S. & Suzuki N., 1998. Mutagenicity of microcystin-LR in human RSa cells. *Int. J. Mol. Med.* 2 (1), 109-112.
- Swoboda U.K., Dow C.S., Chaivimol J., Smith N. & Pound B.P., 1994. Alternatives to the mouse bioassay for cyanobacterial toxicity assessment. In *Detection Methods for Cyanobacterial Toxins*. Vol. Special Publication No. 149. Codd G.A., Jefferies T.M., Keevil C.W. & Potter E. (eds). Cambridge, The Royal Society of Chemistry. p. 106-110.
- Takenaka S., 2001. Covalent glutathione conjugation to cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by F344 rat cytosolic and microsomal glutathione S-transferases. *Environ. Toxicol. Phar.* 9 (4), 135-139.
- Tarutani K., Nagasaki K. & Yamaguchi M., 2000. Viral impacts on total abundance and clonal composition of the harmful bloom-forming phytoplankton *Heterosigma akashiwo*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (11), 4916-4920.
- Teixeira M., Costa M., De Carvalho V.L., Pereira M. & Hage E., 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bull. Pan Am. Health Organ.* 27 (3), 244-253.
- Tencala F. & Dietrich D., 1997. Biochemical characterisation of microcystin toxicity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Toxicon* 35 (4), 583-595.
- Terao K., Ohmori S., Igarashi K., Ohtani I., Watanabe M., Harada K.I., Ito E. & Watanabe M., 1994. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon* 32 (7), 833-843.
- Thomas A.D., Saker M.L., Norton J.H. & Olsen R.D., 1998. Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* as a probable cause of death in cattle in northern Queensland. *Aust. Vet. J.* 76 (9), 592-594.
- Tilman D., 1982. *Resource competition and community structure*. Princeton, New Jersey, Princeton University Press. 296 p.
- Tilman D., Kilham S.S. & Kilham P., 1982. Phytoplankton community ecology : The role of limiting nutrients. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 13, 349-372.
- Tilton R.C., Murphy J. & Dixon J.K., 1972. The flocculation of algae with synthetic polymeric flocculants. *Wat. Res.* 6 (2), 155-164.
- Tisdale E.S., 1931. Epidemic of intestinal disorders in Charleston W. VA., occurring simultaneously with unprecedented water supply conditions. *Am. J. Public Health* 21, 98-100.
- Törökné A.K., Palovics A. & Bankine M., 2001. Allergenic (sensitization, skin and eye irritation) effects of freshwater Cyanobacteria - experimental evidence. *Environ. Toxicol.* 16 (6), 512-516.
- Tortora G.J., Funke B.R. & Case C.L., 1992. *Microbiology: an Introduction*. California, Addison-Wesley. 810 p.
- Towner R.A., Sturgeon S.A., Khan N., Hou H. & Swartz H.M., 2002. *In vivo* assessment of nodularin-induced hepatotoxicity in the rat using magnetic resonance techniques (MRI, MRS and EPR oximetry). *Chem. Biol. Interact.* 139 (3), 231-250.
- Tsuji K., Naito S., Kondo F., Watanabe M.F., Suzuki S., Nakazawa H., Suzuki M., Shimada T. & Harada K.I., 1994. A clean-up method for analysis of trace amounts of microcystins in lake water. *Toxicon* 32 (10), 1251-1259.
- Tsuji K., Watanuki T., Kondo F., Watanabe M.F., Suzuki S., Nakazawa H., Suzuki M., Uchida H. & Harada K.I., 1995. Stability of microcystins from cyanobacteria II. Effect of UV light on decomposition and isomerization. *Toxicon* 33 (12), 1619-1631.
- Tsuji K., Setsuda S., Watanuki T., Kondo F., Nakazawa H., Suzuki M. & Harada K.I., 1996. Microcystin levels during 1992-95 for lakes Sagami and Tsukui-Japan. *Nat. Toxins* 4 (4), 189-194.
- Turell M.J. & Middlebrook J.L., 1988. Mosquito inoculation: an alternative bioassay for toxins. *Toxicon* 26 (11), 1089-1094.
- Turner P.C., Gammie A.J., Hollinrake K. & Codd G.A., 1990. Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. *Brit. Med. J.* 300, 1440-1441.

- Ueno Y., Nagata S., Tsutsumi T., Hasegawa A., Watanabe M.F., Park H.D., Chen G.C., Chen G. & Yu S.Z., 1996.** Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 17 (6), 1317-1321.
- Ueno Y., Makita Y., Nagata S., Tsutsumi T., Yoshida F., Tamura S.I., Sekijima M., Tashiro F., Harada T. & Yoshida T., 1999.** No chronic oral toxicity of a low dose of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in female BALB/c mice. *Environ. Toxicol.* 14 (1), 45-55.
- Underdal B., Nordstoga K. & Skulberg O.M., 1999.** Protracted toxic effects caused by saline extracts of *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanophyceae/cyanobacteria). *Aquat. Toxicol.* 46 (3-4), 269-278.
- USEPA, 1998.** Announcement of the Drinking Water Contaminant Candidate List. *Federal Register* 63 (40), 10273-10287.
- USEPA, 2004.** Drinking Water Contaminant Candidate List 2. *Federal Register* 69 (64), 17406-17415.
- Utermöhl H., 1958.** Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Mitteilung Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 9, 1-38.
- Vaitomaa J., Rantala A., Halinen K., Rouhiainen L., Tallberg P., Mokolke L. & Sivonen K., 2003.** Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (12), 7289-7297.
- Van Hullebush E., Deluchat V., Chazal P.M. & Baudu M., 2001.** Environmental impact of two successive chemical treatments in a small shallow eutrophied lake: Part II. Case of copper sulfate. *Environ. Pollut.* 120 (3), 627-634.
- Vasconcelos V.M. & Pereira E., 2001.** Cyanobacteria diversity and toxicity in a wastewater treatment plant (Portugal). *Wat. Res.* 35 (5), 1354-1357.
- Verma S.K. & Singh H.N., 1991.** Evidence for energy-dependant copper efflux as a mechanism of Cu^{2+} resistance in the cyanobacteria *Nostoc Caliccola*. *FEMS Microbiol. Lett.* 84, 291-294.
- Verma S.K., Singh R.K. & Singh S.P., 1993.** Copper toxicity and phosphate utilization in the cyanobacterium *Nostoc Caliccola*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 192-198.
- Vestervik P.S.M. & Meriluoto J.A.O., 2003.** Interaction between microcystins of different hydrophobicities and lipid monolayers. *Toxicon* 41 (3), 349-355.
- Vial V., 2004.** Approche pour caractériser l'exposition aux cyanobactéries dans les plans d'eau à usage récréatif. p.
- Visser P., Ibelings B., Van der Veer B., Koedood J. & Mur R., 1996.** Artificial mixing prevents nuisance blooms of the cyanobacterium *Microcystis* in lake Nieuwe Meer, the Netherlands. *Freshwater Biol.* 36 (2), 435-450.
- Wang T.C., Shih M.C., Markey S.P. & Duncan M.W., 1989.** Quantitative analysis of low molecular weight polar compounds by continuous flow liquid secondary ion tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 61 (9), 1013-1016.
- Wardlaw V.E., Perry R. & Graham N.J.D., 1991.** The role of algae as trihalomethane precursors - A review. *J. Water SRT - Aqua* 40 (6), 335-345.
- Waterbury J.B. & Valois F.W., 1993.** Resistance to co-occurring phages enables marine *Synechococcus* communities to coexist with cyanophages abundant in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (10), 3393-3399.
- Welker M. & Steinberg C., 2000.** Rate of humic substance photosensitized degradation of microcystin-LR in natural water. *Environ. Sci. Technol.* (34), 3415-3419.
- Welté B. & Montiel A., 1995.** La préozonation couplée avec un traitement de flottation-filtration : un succès pour éliminer les algues. *TSM* (10), 732-736.
- Wiberg G.S. & Stephenson N.R., 1960.** Toxicologic studies on paralytic shellfish poison. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2 (6), 607-615.
- Williams D.E., Dawe S.C., Kent M.L., Andersen R.J., Craig M. & Holmes C.F.B., 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 (11), 1617-1625.
- Williamson & Corbet, 1993.** Investigating health risks from riverine blooms of blue-green algae. *NSW Pub Health Bull* 4, 27-29.
- Wolf H.U. & Frank C., 2002.** Toxicity assessment of cyanobacterial toxin mixtures. *Environ. Toxicol.* 17, 395-399.
- Xie L., Xie P., Li S., Tan H. & Liu H., 2003.** The low TN:TP ratio, a cause or a result of *Microcystis* blooms. *Wat. Res.* 37 (9), 2073-2080.

- Xie L., Xie P., Ozawa K., Honma T., Yokoyama A. & Park H.D., 2004. Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. *Environ. Pollut.* 127, 431-439.
- Yea S.S., Kim H.M., Oh H.M., Paik K.H. & Yang K.H., 2001. Microcystin-induced down-regulation of lymphocyte functions through reduced IL-2 mRNA stability. *Toxicol. Lett.* 122 (1), 21-31.
- Yoshida T., Makita Y., Nagata S., Tsutsumi T., Yoshida F., Sekijima M., Tamura S.I. & Ueno Y., 1997. Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice. *Nat. Toxins* 5 (3), 91-95.
- Yoshizawa S., Matsushima R., Watanabe M.F., Harada K., Ichihara A., Carmichael W.W. & Fujiki H., 1990. Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 116 (6), 609-614.
- Yu S.Z., Cheng Z.Q., Liu Y.K., Huang Z.Y. & Zhao Y.F., 1989. The aflatoxins and contaminated water in the etiological study of primary liver cancer. In *Mycotoxins & Phycotoxins #88*. Natori S. Hashimoto K. & Ueno Y. (eds). Amsterdam, Elsevier. p. 37-44.
- Zamir Bin Alam M.D., Otaki M., Furumai H. & Ohgaki S., 2001. Direct and indirect inactivation of *Microcystis aeruginosa* by UV-radiation. *Wat. Res.* 35 (4), 1008-1014.
- Zegura B., Sedmak B. & Filipic M., 2003. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicol.* 41 (1), 41-48.
- Zegura B., Lah T.T. & Filipic M., 2004. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicology* 200 (1), 59-68.
- Zhan L., Sakamoto H., Sakuraba M., Wu D.S., Zhang L.S., Suzuki T., Hayashi M. & Honma M., 2004. Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat. Res. - Gen. Tox. En.* 557 (1), 1-6.
- Zhang Y. & Prepas E.E., 1996a. Regulation of the dominance of planktonic diatoms and cyanobacteria in four eutrophic hardwater lakes by nutrients, water-column stability and temperature. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 53 (3), 621-633.
- Zhang Y. & Prepas E.E., 1996b. Short-term effects of Ca(OH)₂ additions on phytoplankton biomass: a comparison of laboratory and *in situ* experiments. *Wat. Res.* 30 (5), 1285-1294.
- Zhang Y., Ghadouani A., Prepas E.E., Pinel-Alloul B., Reedyk S., Chambers P.A., Robarts R.D., Methot G., Raik A. & Holst M., 2001a. Response of plankton communities to whole lake Ca(OH)₂ and CaCO₃ additions in eutrophic hardwater lakes. *Freshwater Biol.* 46 (8), 1105-1119.
- Zhang Z., Yu S. & Chen C., 2001b. Study on the effects of DNA and natural killer cell damage induced by microcystins LR. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi [Chinese journal of preventive medicine]* 35 (2), 75-78.
- Zilberg B., 1966. Gastroenteritis in Salisbury. European children: a five-year study. *Cent. Afr. J. Med.* 12 (9), 164-168.
- Zurawell R.W., Kotak B.G. & Prepas E.E., 1999. Influence of lake trophic status on the occurrence of microcystin-LR in the tissue of pulmonate snails. *Freshwater Biol.* 42 (4), 707-718.

Création et mise en page : Parimage
Impression : Bialec
ISBN :

[> Sommaire](#)

27-31, avenue du Général Leclerc
94701 MAISONS-ALFORT cedex
www.afssa.fr

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE