



« Cette opération est cofinancée par l'Union Européenne. L'Europe s'engage sur le bassin de la Loire avec le Fonds Européen de Développement Régional. »

Projet DIVERSITOX (DIVERSité des cyanoTOXines dans différents milieux aquatiques ligériens et relation avec la biodiversité microbienne)

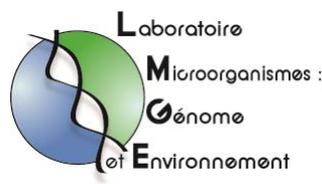
cofinancé dans le cadre du Plan Loire Grandeur Nature par le FEDER et l'Établissement public Loire

Note d'avancement du projet

Novembre 2016

Marion SABART

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement
Université Blaise Pascal - UMR CNRS 6023
Campus Universitaire des Cézeaux 63178 Aubière
marion.sabart@univ-bpclermont.fr



Rappel du contexte et des objectifs du projet

Au cours des dernières décennies, les écosystèmes aquatiques ont été soumis à de fortes perturbations anthropiques. L'eutrophisation des milieux aquatiques (enrichissement en azote et phosphore) s'est accompagnée de l'observation grandissante de proliférations estivales de cyanobactéries. Ces proliférations constituent un problème environnemental, socio-économique et sanitaire. En effet, la majorité des espèces qui se développent sont capables de produire des toxines impliquées dans des cas d'intoxications humaines et animales. Il existe une grande diversité de cyanotoxines qui sont classées en fonction du type de toxicité (neurotoxine, dermatotoxine, hépatotoxine). En France, seule la microcystine (hépatotoxine) est prise en compte dans le cadre de la surveillance de la qualité des eaux de baignade et de boisson par les Agences Régionales de Santé. C'est également la toxine la plus étudiée alors que les connaissances concernant les autres cyanotoxines sont limitées, notamment en milieu lacustre. Par ailleurs, des études récentes suggèrent que les changements globaux conduiraient à une augmentation de la fréquence, de l'ampleur et de la toxicité des proliférations de cyanobactéries. Enfin, ces cyanotoxines peuvent avoir un impact non négligeable sur les autres communautés aquatiques et notamment sur les communautés bactériennes qui jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement des écosystèmes.

Dans ce contexte, le projet DIVERSITOX est un projet de recherche dont l'objectif général est d'améliorer nos connaissances concernant les toxines cyanobactériennes et leur impact sur le fonctionnement des écosystèmes aquatiques dans un contexte de changement global. Plus spécifiquement, le projet DIVERSITOX se propose :

- d'améliorer nos connaissances concernant les toxines cyanobactériennes inexplorées, les cyanobactéries qui les produisent et leurs modalités de production dans le bassin ligérien.
- d'évaluer l'impact de ces toxines sur le fonctionnement écologique des milieux et sur la composante microbienne en particulier
- d'identifier des bactéries capables de dégrader les cyanotoxines
- de mesurer les effets de la température sur la production de cyanotoxines

Les travaux du projet s'organisent en 4 axes de travail :

- **Axe 1** : Déterminer les modalités de production de l'anatoxine-a
- **Axe 2** : Explorer la diversité des cyanotoxines du bassin ligérien
- **Axe 3** : Evaluer l'impact des cyanobactéries et des cyanotoxines sur les bactéries lacustres
- **Axe 4** : Evaluer le potentiel de dégradation des cyanotoxines par les bactéries

Travaux engagés en 2016

1- Première campagne d'échantillonnage

- **Echantillons planctoniques**

Dans le but d'explorer la diversité des cyanotoxines dans le bassin ligérien, 3 sites d'étude ont fait l'objet d'un suivi bimensuel ou hebdomadaire pendant toute la période de développement planctonique des cyanobactéries, entre juin et octobre 2016. Au total, ce sont 49 échantillons qui ont été collectés : 19 pour le lac d'Aydat, 17 pour la retenue de Villerest et 13 pour la retenue du Mas

d'Armand. Deux échantillons ont également été prélevés dans la retenue de Naussac (un en juin et un en octobre). En plus de ces 3 sites d'étude, le Gour de Tazenat (lac volcanique situé dans le Puy-de-Dôme) a également été échantillonné compte-tenu de la pertinence de ce site dans le cadre du projet. En effet, une efflorescence importante et exceptionnelle de la cyanobactérie *Planktothrix rubescens* (connue sous le nom de « sang des Bourguignons ») est apparue en juillet 2016 dans ce lac réputé pour la qualité de ses eaux. Trois prélèvements y ont été réalisés en juillet, août et septembre.

A chaque sortie, des mesures *in situ* ont été réalisées : transparence de l'eau (disque de Secchi), concentration en oxygène et température, biomasse des groupes phytoplanctoniques (sonde fluorimétrique BBE) sur toute la colonne d'eau. Deux types d'échantillon ont été collectés sur les 3 premiers mètres de la colonne d'eau : un échantillon d'eau brute prélevé à l'aide d'un tuyau intégrateur et un échantillon concentré prélevé à l'aide d'un filet à plancton de 20 µm de maille. Les échantillons prélevés feront l'objet d'analyses chimiques et moléculaires permettant de rechercher et/ou quantifier les cyanotoxines et les gènes impliqués dans leur biosynthèse. Une partie des échantillons a également été stockés pour analyser les communautés bactériennes associées aux cyanobactéries.

- **Echantillons benthiques**

Le site de Naussac n'a pas été étudié dans le cadre des précédents projets PROFECY et ANATOX. Pour cette raison et dans le but de compléter les résultats des échantillons planctoniques, une campagne de carottage y a donc été réalisée en juin 2016. Deux carottes de sédiment ont été prélevées : une dans la retenue de Naussac et une dans la retenue du Mas d'Armand. Les carottes ont été découpées en tranche de sédiment de 2 cm afin d'y rechercher les gènes impliqués dans la biosynthèse des cyanotoxines. Les extractions d'ADN ont été réalisées en octobre et les analyses moléculaires permettant de mettre en évidence un des gènes de synthèse de l'anatoxine-a (gène *anaC*) sont en cours.

2- Détection et quantification de l'anatoxine-a

L'un des résultats marquants du projet PROFECY était la mise en évidence de l'anatoxine-a et/ou des gènes impliqués dans sa synthèse dans plusieurs lacs d'Auvergne. Dans la continuité de ce projet, l'anatoxine-a est la cyanotoxine qui est prioritairement étudiée dans le cadre du projet DIVERSITOX. Grâce à plusieurs améliorations méthodologiques (utilisation d'un spectromètre de masse de meilleure résolution, échantillons environnementaux concentrés), nous espérons pouvoir quantifier cette molécule dans les échantillons, ce qui n'avait pas été possible lors du projet PROFECY (seule la détection avait été possible). Les résultats devraient permettre d'évaluer les variations spatiales et temporelles des concentrations en anatoxine-a. Les premières mises au point et analyses d'échantillons planctoniques de la campagne de prélèvement de l'été 2016 ont démarré à l'automne.

3- Impact de l'anatoxine-a sur les bactéries et potentiel de dégradation

Une expérience en laboratoire a été menée au printemps 2016 dans le but d'étudier l'impact de l'anatoxine-a sur les microorganismes et les capacités de biodégradation de cette molécule. Nous avons réalisé une culture d'enrichissement avec une communauté microbienne issue du lac d'Aydat exposée à une forte concentration en anatoxine-a purifiée. La diversité bactérienne a été étudiée par une technique d'empreinte génétique (DGGE). Ces travaux n'ont pas montré d'impact significatif de l'anatoxine-a sur l'abondance et la diversité bactérienne. En revanche, une diminution significative de

la concentration en anatoxine-a a été observée après quelques jours d'exposition des bactéries à cette toxine, suggérant une dégradation de la molécule par les microorganismes. Suite à ces résultats, une 2^{ème} expérience vient de débiter à partir des bactéries mises en culture lors de la 1^{ère} expérience dans le but d'isoler une ou plusieurs souches bactériennes dégradantes.

Une partie de ce travail a fait l'objet du stage de Julie Maloron, étudiante en 2^{ème} année de DUT Génie biologique à Clermont-Ferrand.

4- Isolement de souches cyanobactériennes productrices d'anatoxine-a

Fin 2015 et dans la continuité des travaux initiés dans le précédent projet ANATOX, nous avons mis en œuvre une approche culturale à partir de sédiment de plusieurs lacs d'Auvergne collectés au cours de la campagne de prélèvements du projet PROFECY dans le but d'isoler des souches cyanobactériennes productrices d'anatoxine-a. A ce jour, nous avons réussi à mettre en culture de nombreuses espèces de cyanobactéries et nous avons confirmé pour plusieurs d'entre elles la présence d'un des gènes de biosynthèse de l'anatoxine-a (*anaC*). Suite à ces résultats, les cyanobactéries d'intérêt ont fait l'objet d'une nouvelle étape de purification et elles seront remises en culture dans le but de confirmer la capacité de production de l'anatoxine-a par détection en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Une partie de ce travail a fait l'objet du stage de Gaël Paris, étudiant en 1^{ère} année de Master Biologie et Environnement, spécialité FREMAC à Clermont-Ferrand.

Valorisation et communication

1- Auprès de la communauté scientifique

Communication orale à l'[ICTC10](#) (10th International Conference on Toxic Cyanobacteria) du 23 au 28 octobre 2016 à Wuhan (Chine)

Lors de ce congrès triennal qui rassemble la communauté scientifique internationale spécialiste des cyanobactéries toxiques, une présentation orale intitulée « *Anatoxin-a in several freshwater lakes in France: occurrence and phylogeny of biosynthesis genes* » a été réalisée par Marion Sabart. Cette communication a été l'occasion de présenter une synthèse des résultats marquants obtenus sur l'anatoxine-a au cours des 3 projets successifs PROFECY, ANATOX et DIVERSITOX.

2- Auprès des gestionnaires

Présentation d'un poster à la [rencontre science-gestion](#) organisée par l'ONEMA les 22 et 23 novembre 2016 à Aix-en-Provence

Une communication par affiche a été réalisée par Marion Sabart conjointement avec l'Établissement public Loire (Agathe Lemaire, chargée de mission qualité des eaux et poissons migrateurs) pour présenter les projets PROFECY, ANATOX et DIVERSITOX et les retombées opérationnelles attendues pour les gestionnaires des plans d'eau concernés par les proliférations de cyanobactéries.

Participation au comité de suivi de la qualité du Gour de Tazenat initié par le Parc Naturel Régional des Volcans d'Auvergne

Suite à l'exceptionnelle prolifération cyanobactérienne qui a eu lieu au Gour de Tazenat en juillet 2016, Marion Sabart et Delphine Latour ont été associées à un groupe de travail réunissant les collectivités et organismes publics concernés par ce lac, dans le but de comprendre les causes qui ont conduit à l'efflorescence et trouver des solutions pour enrayer ce phénomène.

Participation à la première réunion de l'étude financée par l'Etablissement Public Loire « Etude de solutions pérennes pour améliorer la qualité de l'eau de la retenue du Mas d'Armand »

Réunion organisée le 03/10/2016 au barrage de Naussac en présence des partenaires privés et institutionnels concernés par la retenue du Mas d'Armand.

3- Dans les médias

Suite à l'efflorescence cyanobactérienne au Gour de Tazenat en juillet 2016

Un [article](#) dans le quotidien La Montagne (édition du 27 juillet 2016) et un [reportage](#) au journal télévisé de France 3 Auvergne (édition de 19h du 26 juillet 2016) ont mentionné les travaux de recherche menés dans le cadre du projet DIVERSITOX (interview de Marion Sabart et Anne-Hélène Lejeune).

4- Création d'une page internet

Une [page internet dédiée au projet DIVERSITOX](#) a été créée sur le site internet du LMGE. Elle comporte une fiche d'identité du projet, le contexte, les objectifs et l'ensemble des éléments de communication du projet. Une mise à jour régulière est prévue jusqu'à la fin du projet.

Organisation du projet

1- Moyens humains

Personnels de l'Université Blaise Pascal affectés au projet :

- 4 enseignants-chercheurs (6 jours/mois)
- 2 ingénieurs d'étude (3 jours/mois)
- 1 technicien (2 jour/mois)
- 1 ingénieur de recherche (1 jour/mois)

Recrutement de personnels grâce à la subvention allouée au projet DIVERSITOX :

- Une chercheuse, Marion Sabart, recrutée à compter du 01/12/2015 pour une durée de 36 mois
- Une technicienne, Amélie Lamarque, recrutée à compter du 01/10/2016 pour une durée de 12 mois

2- Suivi du projet

Réunions de travail des personnes impliquées dans le projet DIVERSITOX :

- Réunions réunissant tous les personnels impliqués : une réunion de lancement du projet a eu lieu le 20/01/2016 pour rappeler le contexte, les objectifs et les axes de travail du projet, pour définir les travaux et les intervenants prévus dans chaque axe de travail et pour définir un calendrier prévisionnel des tâches. Une réunion d'avancement est prévue le 20 janvier 2017 pour faire le bilan des travaux réalisés en 2016 et définir les objectifs et calendrier prévisionnel de l'année 2017.
- Des réunions spécifiques à certains travaux permettant aux personnes concernées de planifier les travaux et discuter des résultats sur une tâche particulière.

Rédaction de l'avancement du projet DIVERSITOX à destination des financeurs :

- Une note d'avancement de l'année 1 (novembre 2016)
- Un rapport à mi-parcours (juin 2017)
- Une note d'avancement de l'année 2 (novembre 2017)

3- Synthèse des travaux réalisés en 2016 et travaux prévus en 2017

Les travaux initiés en 2016 et ceux prévus en 2017 sont synthétisés dans le calendrier ci-dessous.

