

«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'Etablissement public Loire

## Rapport intermédiaire Septembre 2018

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement
Université Clermont-Auvergne - UMR CNRS 6023
Campus Universitaire des Cézeaux 63178 Aubière
marion.sabart@uca.fr







#### 1- Contexte scientifique

Au cours des dernières décennies, les écosystèmes aquatiques ont été soumis à de fortes perturbations anthropiques. La dégradation de la qualité des milieux naturels qui en découle est observée à l'échelle mondiale et touche l'ensemble du réseau aquatique ligérien (fleuve, annexe fluviales, retenues de barrage,...). Parmi ces perturbations, l'eutrophisation des milieux aquatiques (enrichissement en azote et phosphore) s'est accompagnée de l'observation grandissante de proliférations estivales de cyanobactéries (figure 1). Ces proliférations constituent un problème environnemental car elles perturbent le fonctionnement des écosystèmes (impasse trophique, mortalité d'animaux aquatiques,...). Elles occasionnent des problèmes socio-économiques lorsque les plans d'eau dans lesquels elles prolifèrent sont le siège d'activités récréatives (baignade, nautisme) ou utilisés pour la production d'eau potable, d'hydroélectricité ou encore la production piscicole. Enfin, les proliférations cyanobactériennes représentent un risque sanitaire important car 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). Plusieurs études récentes ont mis en évidence que les changements globaux (l'augmentation de la température en particulier) conduiraient à une augmentation de la fréquence, de l'ampleur et de la toxicité des proliférations de cyanobactéries. A l'heure actuelle, 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 (contrairement à d'autres pays comme la Nouvelle Zélande, le Brésil ou l'Australie). La microcystine est également la toxine la plus étudiée alors que les connaissances concernant les autres cyanotoxines (occurrence, évolution spatiale et temporelle des concentrations, facteurs de régulation de leur synthèse...) sont limitées, notamment en milieu lacustre. Enfin, si l'impact des cyanotoxines sur les macroorganismes aquatiques (poissons, invertébrés) a été étudié, un nombre limité de travaux se sont intéressés à l'impact des cyanotoxines sur les microorganismes, et notamment sur les communautés bactériennes qui jouent pourtant un rôle essentiel dans le fonctionnement des écosystèmes. La récurrence et l'abondance des proliférations cyanobactériennes sur certains sites modifient certainement les équilibres écologiques à l'échelle microbienne et leurs conséquences à l'échelle de l'écosystème sont encore mal identifiées.



Figure 1: Efflorescence cyanobactérienne au lac d'Aydat (63) en octobre 2014 (photo : B. Legrand)

#### 2- Objectifs et motivations du projet

Dans ce contexte, l'objectif général du projet DIVERSITOX 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 :

- 1) d'améliorer nos connaissances des toxines cyanobactériennes, des cyanobactéries productrices et des modalités de production dans le bassin ligérien. Cet objectif est motivé par les résultats obtenus dans le cadre du projet PROFECY précédemment financé dans le cadre du Plan Loire Grandeur Nature 2007-2013. L'un des résultats marquants de ce projet de recherche a été la mise en évidence d'une neurotoxine cyanobactérienne, l'anatoxine-a, dans plusieurs lacs de la région Auvergne. Bien qu'elle ne soit pas prise en compte dans la surveillance de la qualité des eaux de baignade et de boisson, cette toxine suscite un intérêt grandissant de la part des gestionnaires et de la communauté scientifique car elle est potentiellement produite par cyanobactéries fréquemment rencontrées voire dominantes dans les plans d'eau (Anabaena, Aphanizomenon). Elle est également responsable de cas avérés de mortalités de chiens dans des cours d'eau, en France et en Nouvelle-Zélande (Gugger et al. 2005¹; Cadel-Six et al. 2007²; Wood et al. 2007³).
- 2) d'évaluer l'impact de ces toxines sur le fonctionnement écologique des milieux et sur la composante microbienne en particulier. Les molécules produites naturellement par les organismes vivants peuvent structurer les relations entre les organismes, affecter l'allocation des ressources, influencer la compétition et la distribution des espèces et sélectionner des traits biologiques conduisant à la diversification des espèces. Les cyanobactéries, par leur importante production de métabolites secondaires, participent également à la structuration des interactions biotiques. L'objectif est ici de déterminer dans quelle mesure et à quel niveau les cyanotoxines interviennent.
- 3) d'identifier des bactéries capables de dégrader les cyanotoxines. Certaines cyanotoxines peuvent être biodégradées par voie bactérienne et générer ainsi de nouveaux métabolites dont la toxicité et les impacts sur la structuration des réseaux trophiques sont actuellement ignorés. L'objectif sera donc ici de rechercher des bactéries au sein de communautés naturelles capables de bio-transformer les cyanotoxines.
- 4) de mesurer les effets de la température sur la production de toxines. Comme de nombreux procaryotes, les cyanobactéries atteignent un taux maximal de croissance à des températures élevées. Ainsi, le réchauffement climatique jouerait un rôle déterminant dans leur expansion et leur persistance. Des travaux récents tendent également à montrer qu'en conditions expérimentales, une augmentation de température favoriserait la dominance de génotypes toxiques. Les conditions naturelles apportent cependant d'autres contraintes et les différentes espèces cyanobactériennes peuvent également réagir de façon variable. A l'heure actuelle, trop peu d'études existent pour conclure réellement sur le lien entre température et toxicité. Il s'agira donc ici de comparer l'effet de l'augmentation de la température sur la production de différentes cyanotoxines produites par différents genres cyanobactériens.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. Toxicon, 45(7):919-928

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Different genotypes of anatoxin-producing cyanobacteria coexist in the Tarn River, France. Appl. Environ. Microbiol., 73(23): 7605-7614

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> First report of homoanatoxin-a and associated dog neurotoxicosis in New Zealand. Toxicon, 50(2):292-301

#### Etat d'avancement des travaux et premiers résultats

Le projet DIVERSITOX se caractérise par la complémentarité d'approches expérimentales, culturales et en milieu naturel pour mener à bien les axes de travail présentés. Tous les échantillons expérimentaux et environnementaux font l'objet de différentes analyses dont les premiers résultats sont présentés dans cette section.

#### 1- Sites d'étude et échantillonnage

#### Suivi régulier

4 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 et 2017.

Le choix de ces sites a reposé sur leur intérêt scientifique et socio-économique (tourisme, activités nautiques, production d'hydro-électricité...), appuyé par les résultats obtenus dans le cadre de projets de recherche précédents :

- Lac d'Aydat (63) : une station suivie au point le plus profond (point d'échantillonnage de référence du LMGE)
- Lac de Villerest (42) : une station d'échantillonnage proche du barrage (point d'échantillonnage du suivi environnemental de l'Etablissement public Loire)
- Lac de Naussac (48) : une station d'échantillonnage à proximité du barrage (point d'échantillonnage du suivi environnemental de l'Etablissement public Loire)
- Retenue du Mas d'Armand (48) : une station d'échantillonnage proche de la digue

Les principales caractéristiques de ces lacs sont données dans le **tableau 1** et leur situation géographique dans la **figure 2**.

#### Suivi ponctuel

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 », **figure 4**) 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 (**figure 3**).

#### Mesures et prélèvements d'eau

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 ont ou feront l'objet d'analyses chimiques et moléculaires permettant de rechercher et/ou quantifier les cyanotoxines et les gènes impliqués dans leur biosynthèse (parties 3 et 4). Une partie des échantillons a également été stockée pour analyser les communautés bactériennes associées aux cyanobactéries (partie 7). Une fraction du prélèvement d'eau brute (environ 200 mL) a été fixée au lugol puis conservée à l'obscurité et à 4°C afin de réaliser l'identification et le dénombrement des espèces phytoplanctoniques (partie 2).

Tableau 1 : Principales caractéristiques des principaux lacs étudiés

	Localization	Ago	Fonctions		
Lac d'Aydat	Localisation	Age	ronctions		
	Retenue naturelle sur la Veyre (origine volcanique) - Proche de la ville de Clermont-Ferrand (63)	8500 ans	Tourisme : baignade, activités nautique		
Lac de Villerest					
	Retenue de barrage sur la Loire - Proche de la ville de Roanne (42)	1983	Ecrêtement de crues Soutien d'étiages Production d'hydroélectricité Tourisme		
Lac de Naussac	Retenue de barrage sur le Donozau (affluent de l'Allier) - Proche de la ville de Langogne (48)	1983	Soutien d'étiages Production d'hydroélectricité Tourisme (baignade, activités nautiques) Pêche		
Retenue du Mas d'Armand					
	Retenue séparée du lac de Naussac par une digue et alimentée par la ruisseau de la Gazeille	1983	Tourisme (baignade, activités nautiques) Pêche		

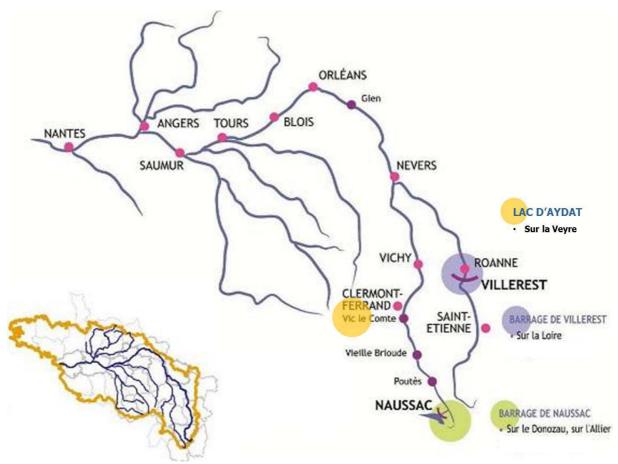


Figure 2 : Localisation des sites d'étude dans le bassin de la Loire (image modifiée de <a href="http://www.eptb-loire.fr/category/exploitation-des-ouvrages/">http://www.eptb-loire.fr/category/exploitation-des-ouvrages/</a>; Etablissement Public Loire)

Au total, ce sont 92 échantillons qui ont été collectés : 49 en 2016 et 43 en 2017. Les dates d'échantillonnage dans les différents sites sont représentées dans la **figure 3**.

#### Prélèvements de sédiment

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 a ainsi 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. Le projet a également bénéficié d'une carotte de sédiment prélevée dans le plan d'eau de Cournon d'Auvergne dans le cadre du projet de recherche AKINET.

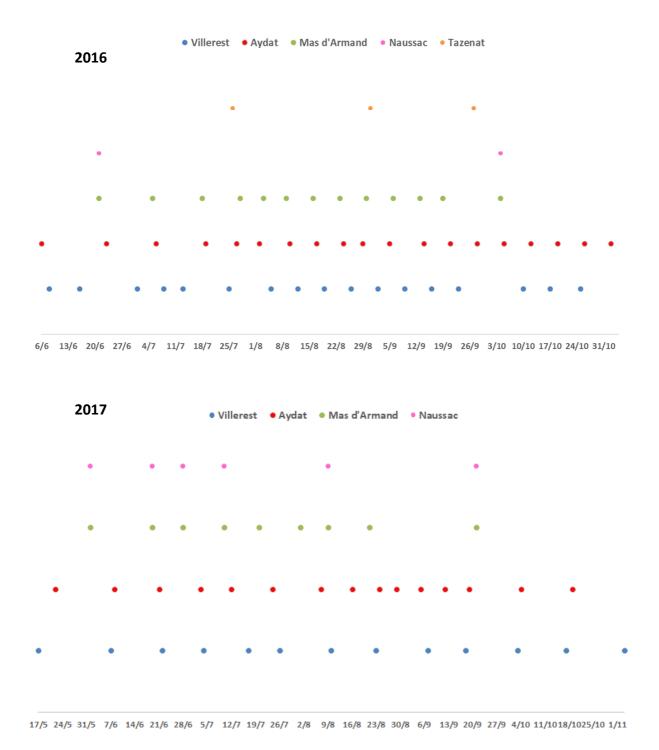


Figure 3 : Dates d'échantillonnage pour chaque site en 2016 et 2017



Figure 4 : Efflorescence à Planktothrix rubescens au Gour de Tazenat, juillet 2016 (photos : M. Sabart)

#### 2- Diversité et dynamique cyanobactérienne sur les quatre sites d'étude

Sur l'ensemble des quatre sites suivis, l'année 2016 a révélé des concentrations cyanobactériennes beaucoup plus importantes qu'en 2017. Les plus fortes valeurs sont observées sur la retenue de Villerest avec des chiffres dépassant 350 000 cellules.ml<sup>-1</sup> en août 2016. A l'opposé, les plus faibles concentrations cyanobactériennes ont été observées sur la retenue de Naussac où elles n'ont pas atteint 45 000 cellules.ml<sup>-1</sup>. La valeur critique des 100 000 cellules.ml<sup>-1</sup>, limitant les activités nautiques, a été dépassée en 2016 et 2017 sur la retenue de Villerest et sur le Mas d'Armand en 2016 uniquement.

La composition du cortège cyanobactérien s'avère par ailleurs très différente en fonction du site d'étude et même selon l'année suivie pour certain site. Ainsi, à Aydat, le genre *Anabaena* a largement dominé la communauté de mi-septembre à fin octobre 2016. En revanche, en 2017, cette cyanobactérie est très peu présente et laisse place à un mélange composé de 5 genres dont l'abondance totale ne dépasse pas 25 000 cellules.ml<sup>-1</sup>. Concernant les autres sites d'étude, la composition cyanobactérienne est très proche d'une

année à l'autre avec la dominance d'un ou deux genres. Ainsi, au Mas d'Armand et sur la retenue de Naussac, c'est la cyanobactérie *Cyanobium* qui domine en 2016 et 2017, même si les abondances entre les deux sites sont très différentes. Sur la retenue de Villerest, c'est le genre *Microcystis* qui domine largement en 2016. En 2017, son abondance est moindre et elle est accompagnée de *Cyanobium*.



Figure 5 : Dynamique temporelle des différentes cyanobactéries présentes sur les quatre sites d'étude du projet en 2016 et 2017

Les pointillés bleus indiquent la valeur seuil de 20 000 cellules.ml<sup>-1</sup>, les rouges, celle de 100 000 cellules.ml<sup>-1</sup>

#### 3- Détection et quantification de l'anatoxine-a

Ce travail a été réalisé en collaboration avec la plateforme de Spectrométrie de masse du service UCA-PARTNER (Plateformes Assistance à la Recherche, aux Technologies et aux Entreprises) de l'Université Clermont Auvergne (http://iccf.univ-bpclermont.fr/spip.php?article498).

#### 3-1. Mise au point de la méthode de préparation et d'analyse des échantillons

La détection et la quantification de l'anatoxine-a dans les échantillons environnementaux concentrés, a nécessité la mise au point d'une méthode d'extraction avec une étape de purification et de concentration de l'extrait pour son analyse en UHPLC-MS.

Les concentrats environnementaux ont donc été extraits avec une solution d'acide acétique à 50mM. L'extrait est ensuite purifié et concentré par extraction sur phase solide (SPE) avec une cartouche contenant une phase polymérique greffé avec un échangeur faible de cation (STRATA-X-CW; **figure 6**).

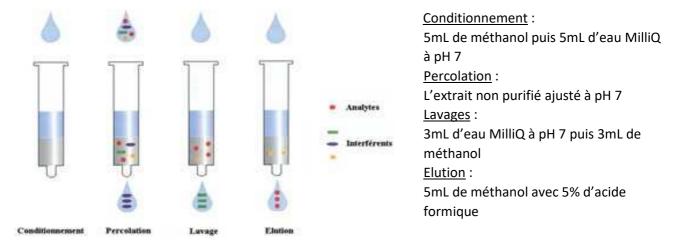


Figure 6 : Principe de fonctionnement d'une cartouche STRATA X-CW (200mg)

Puis, les différentes molécules de l'extrait purifié sont ensuite séparées par chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC) puis détectées par spectrométrie de masse à haute résolution (Orbitrap – Q Exactive).

Les conditions analytiques sont optimisées de manière à avoir la meilleure sensibilité et déceler la présence d'anatoxine-a et d'homoanatoxine-a à de très faibles concentrations.

Face à la complexité des matrices environnementales la quantification se fait de manière spécifique sur les masses précises des cyanotoxines et la méthode de l'étalonnage interne (ajout de la varenicline) est utilisée pour permettre d'uniformiser l'effet matrice et fiabiliser le dosage.

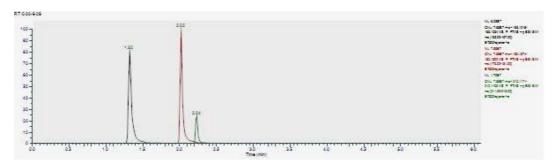


Figure 7 : Mélange de standards d'anatoxine-a (500μg.L<sup>-1</sup>) + d'homoanatoxin-a (500μg.L<sup>-1</sup>) + varenicline (100μg.L<sup>-1</sup>)

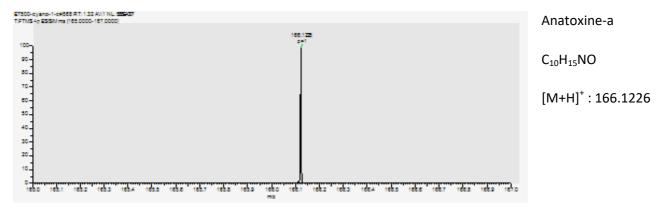


Figure 8 : Spectre de masse du pic d'anatoxine-a (Tr : 1,32 min)

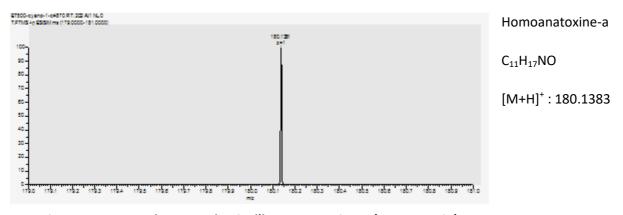


Figure 9 : Spectre de masse du pic d'homoanatoxine-a (Tr : 2,02 min)

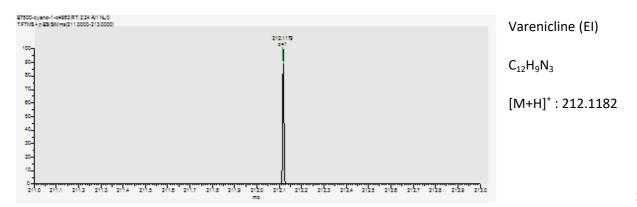


Figure 10 : Spectre de masse du pic de varenicline (Tr : 2,24 min)

#### 3-2. Analyse d'échantillons

Cette méthode de préparation d'échantillons et d'analyse a été réalisée pour le suivi des échantillons planctoniques des campagnes de prélèvement de 2016 et 2017. En 2016, l'anatoxine-a et son homologue l'homoanatoxine-a n'ont été détectés dans aucun échantillon. Les résultats pour la campagne de 2017 sont en cours d'analyse.

La capacité de production de l'anatoxine-a est également recherchée par cette méthode dans des isolats de souches cyanobactériennes potentiellement productrices de cette toxine (voir partie 5 ci-après).

#### 4- Recherche des gènes impliqués dans la biosynthèse des cyanotoxines

#### 4-1. Compartiment planctonique

#### 4-1.a. Anatoxine-a

La recherche de gènes impliqués dans la biosynthèse de l'anatoxine-a a été réalisée sur les échantillons des deux années de suivi sur les lacs d'Aydat, Villerest, Naussac et du Mas d'Armand. A chaque date, nous avions deux types d'échantillons correspondant à deux fractions de taille différentes :

- l'une comprenant les particules de taille supérieure à 20 μm
- l'autre les particules de taille inférieure à 20 μm

Nous avons pu confirmer la présence d'un des gènes de biosynthèse de l'anatoxine-a (anaC) pour l'ensemble des lacs étudiés. Cependant, la présence de ce gène varie au court du temps et dépend de la fraction étudiée.

Ainsi, pour la fraction supérieure à 20  $\mu$ m, le gène anaC a été retrouvé uniquement dans le lac d'Aydat en 2016 et dans la totalité des échantillons de tous les lacs en 2017. Des analyses complémentaires concernant la fraction inférieure à 20  $\mu$ m, ont révélé la présence du gène anaC dans tous les lacs pour les deux années.

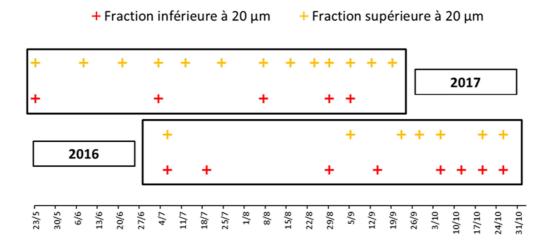


Figure 11 : Présence du gène anaC sur deux fractions différentes et au cours du temps sur deux années d'échantillonnage sur le lac d'Aydat

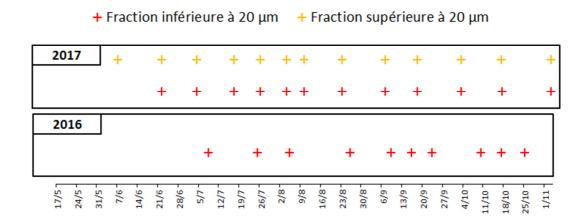


Figure 12 : Présence du gène anaC sur deux fractions différentes et au cours du temps sur deux années d'échantillonnage sur le retenue de Villerest

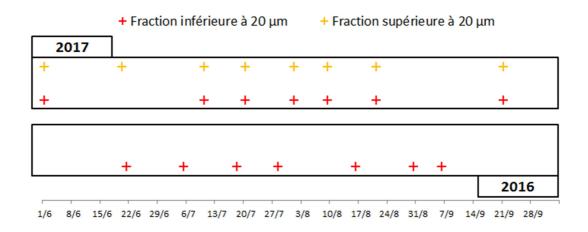


Figure 13 : Présence du gène anaC sur deux fractions différentes et au cours du temps sur deux années d'échantillonnage sur le lac du Mas d'Armand

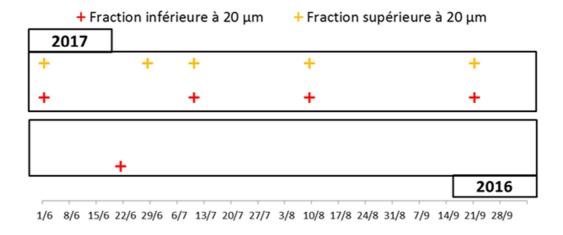


Figure 14 : Présence du gène anaC sur deux fractions différentes et au cours du temps sur deux années d'échantillonnage sur la retenue de Naussac

#### 4-1.b. Microcystine

Parallèlement nous avons effectué la recherche d'un gène impliqué dans la biosynthèse de la microcystine : le gène *mcy*A. Concernant cette cyanotoxine, le gène *mcy*A a été retrouvé pour au moins une date de chaque lac que ce soit en 2016 ou 2017 et dans les deux fractions étudiées.

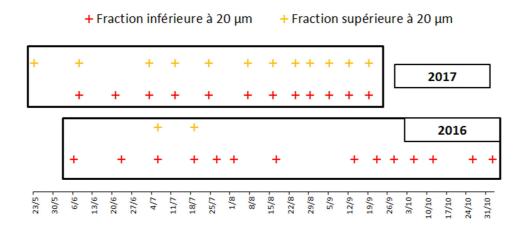


Figure 15 : Présence du gène *mcy*A sur deux fractions différentes et au cours du temps sur deux années d'échantillonnage sur le lac d'Aydat

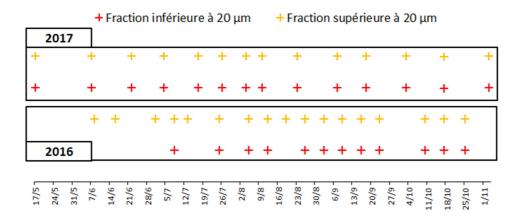


Figure 16 : Présence du gène *mcy*A sur deux fractions différentes et au cours du temps sur deux années d'échantillonnage sur la retenue de Villerest

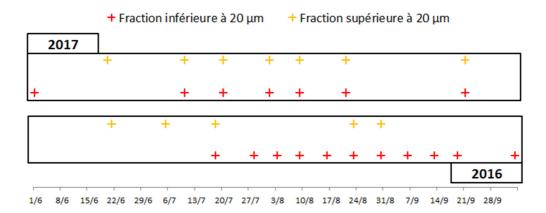


Figure 17 : Présence du gène mcyA sur deux fractions différentes et au cours du temps sur deux années d'échantillonnage sur le lac du Mas d'Armand

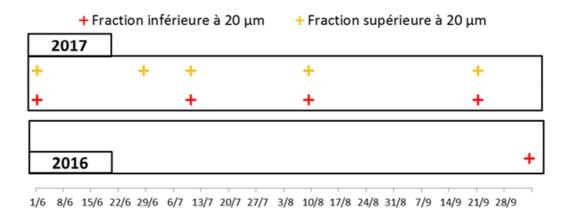


Figure 18 : Présence du gène *mcy*A sur deux fractions différentes et au cours du temps sur deux années d'échantillonnage sur la retenue de Naussac

Il est également possible de mettre en parallèle les présences des gènes avec les efflorescences cyanobactériennes. Grâce aux données acquises lors des sorties terrain, nous pouvons voir des différences entre les blooms cyanobactériens sur les deux années de prélèvements pour chaque lacs. A savoir que les efflorescences de 2017 ont été moins intenses et plus précoces que celles de 2016.

#### 4-2. Compartiment benthique

Une recherche de gènes a également été réalisée sur le compartiment benthique des lacs de Naussac et du Mas d'Armand et le plan d'eau de Cournon d'Auvergne. Pour cela, des carottes sédimentaires ont été prélevées. Le compartiment sédimentaire constitue en effet une « archive » du passé car il accumule par sédimentation les organismes qui se développent dans la colonne d'eau. De plus, les cyanobactéries présentes dans le sédiment de surface participent à l'ensemencement de la colonne d'eau (processus de recrutement benthique).

Nous avons obtenu des carottes sédimentaires de 34, 14 et 58 cm de longueur pour Naussac, Mas d'Armand et Cournon, respectivement.

Afin de pouvoir étudier les gènes de cyanotoxines, une extraction d'ADN génomique total a été réalisée pour chaque tranche de 2 cm de carotte par un kit commercial « FastDNA® SPIN Kit for soil ». Sur les 34 cm de sédiment prélevé sur la retenue de Naussac, aucun échantillon ne s'est révélé positif pour les gènes anaC et mcyA. En revanche, pour le lac du Mas d'Armand (**Tableau 2**), nous avons identifié la présence du gène mcyA sur les 10 premiers centimètres de sédiment.

Concernant le plan d'eau de Cournon (**tableau 3**), le gène *ana*C a été retrouvé à plusieurs profondeur, de 0-4 cm ; 28-34 cm ; 36-38 cm et de 52-56 cm. On remarque donc une récurrence du gène *ana*C sur le plan d'eau de Cournon depuis de nombreuses années.

Les gènes recherchés, présents dans le sédiment « récent », indiquent un potentiel de réensemencement de la colonne d'eau par des cyanobactéries potentiellement toxiques.

Tableau 2: Présence/abscence des gènes anaC et mcyA dans le sédiment du lac du Mas d'Armand

Mas d'Armand										
Profondeur (cm)	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-14			
ana C	-	-	-	-	-	-	-			
mcy A	+	+	+	+	+	-	-			

Tableau 3 : Présence/absence des gènes anaC et mcyA dans le sédiment du plan d'eau de Cournon

Cournon															
Profondeur (cm)	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-14	14-16	16-18	18-20	20-22	22-24	24-26	26-28	28-30
ana C	+	+	-	•	-	1	•	1	-	•	-	•	-	-	+
mcy A	-		-	•	-	•	-	•	-	-	-	-	-	•	-
Profondeur (cm)	30-32	32-34	34-36	36-38	38-40	40-42	42-44	44-46	46-48	48-50	50-52	52-54	54-56	56-58	
ana C	+	+	×	+	•	ï	-	•	-	•	-	+	+	•	
mcy A	•	,	-	•	1	•	-		•	,	•	1	1	-	

#### 5- 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. Ainsi, 46 isolats cyanobactéries par site ont été mis en culture sur 5 sites d'études (Aydat, Les Fades, Villerest et Saint Rémi). La caractérisation génétique de ces 230 isolats de culture a révélé la présence d'un gène de biosynthèse de l'anatoxine-a (anaC) sur l'un d'entre eux, issu du lac d'Aydat. Suite à ces résultats, seul ce consortium de cyanobactéries d'intérêt issu du sédiment du lac d'Aydat a fait l'objet d'une nouvelle étape de purification afin d'isoler les différentes souches le composant et d'obtenir des cultures pures (c'est-à-dire composé d'une seule espèce cyanobactérienne).

Cette seconde étape d'isolement a généré à nouveau 46 isolats, révélant tous la présence de picocyanobactéries unicellulaires, c'est-à-dire des cyanobactéries dont la taille est inférieure à 3 micromètres. Tous les isolats se sont révélés positif pour le gène *mcy*A (correspondant à la microcystine) et 27 isolats pour le gène *ana*C (correspondant à l'anatoxine-a). A notre connaissance, aucune picocyanobactérie n'est actuellement connue comme potentielle productrice d'anatoxine-a et de microcystine. Une étape de production en grande quantité de ces cellules a permis la détection d'anatoxine-

a sur 3 isolats issus du lac d'Aydat. Cependant, la quantité de biomasse fournie s'est révélée trop faible pour parvenir à quantifier correctement cette molécule. Ainsi, un nouvel effort de production en plus grande quantité est actuellement en cours afin de pouvoir quantifier la capacité de production de l'anatoxine-a par ces picocyanobactéries.

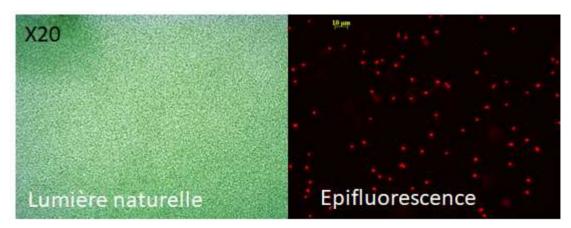


Figure 19 : Photos de picocyanobactéries mises en culture à partir du sédiment du lac d'Aydat

Parallèlement, le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S des 46 isolats a permis d'identifier plus précisément ces picocyanobactéries et de toutes les affilier au genre Cyanobium, communément retrouvé dans les plans d'eau mais non suspecté de porter des gènes de cyanotoxines et de produire ces molécules.

Afin de connaître plus précisément les conditions environnementales favorisant le développement de ce genre cyanobactérien, une expérimentation en milieu contrôlé a été réalisée. Nous avons choisi de tester l'effet de la température et de la lumière sur la croissance de ces picocyanobactéries. Trois isolats de picocyanobactéries ont été sélectionné : 1) cellules avec forte présence du gène *ana*C mais sans détection de la molécule d'anatoxine-a (G+M-) ; 2) cellules avec présence du gène *ana*C et détection de la molécule (G+M+) ; 3) pas de présence du gène *ana*C ni de la molécule (G-M-). La croissance a été estimée *via* un comptage des cellules en cytométrie en flux et est exprimée en cellules.mL<sup>-1</sup>.

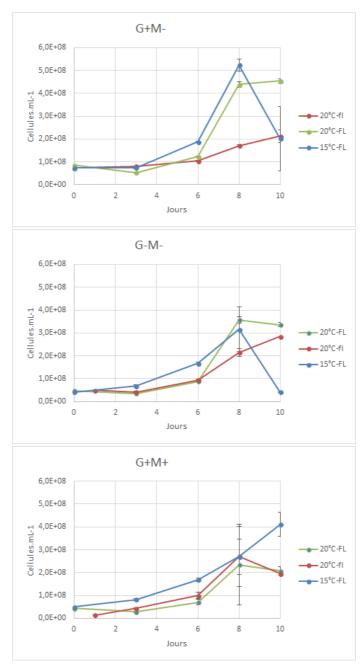


Figure 20 : Dynamique de l'abondance de 3 isolats de picocyanobactéries en fonction de la température et de la lumière

Sur 10 jours d'expérience, l'ensemble des cultures a montré une croissance dans toutes les conditions expérimentales testées, excepté en fin d'expérimentation pour deux isolats placés à 15°C où les concentrations cellulaires ont diminué. Il semble que l'isolat possédant les gènes d'anatoxine-a mais sans détection de la molécule (G+M-) ait une croissance plus forte que les deux autres, notamment à 20°C avec une forte intensité lumineuse. Les deux autres isolats (G+M+ et G-M-) montrent une dynamique similaire lorsqu'ils sont placés à 20°C sous forte ou faible intensité lumineuse. Des sensibilités environnementales légèrement différentes semblent donc apparaître en fonction des isolats testés et témoignent vraisemblablement d'une diversité de génotypes possédant des adaptations différentes. Des expérimentations de plus longue durée et impliquant une plus grande diversité de paramètres sont maintenant nécessaire pour caractériser finement ces picocyanobactéries.

#### 6- 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<sup>ème</sup> expérience vient de débuter à partir des bactéries mises en culture lors de la 1<sup>ère</sup> 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<sup>ème</sup> année de DUT Génie biologique à Clermont-Ferrand.

Parallèlement, un échantillon de la culture précédente a été exposé à des concentrations croissantes d'anatoxine-a (1,5 puis 3 mg.L<sup>-1</sup>), dans le but d'enrichir la culture en bactéries dégradantes. Les dosages chimiques ont montré une dissipation de l'anatoxine-a au cours du temps, ce qui suggère la présence de bactéries dégradantes, même à forte concentration d'anatoxine-a. Parallèlement, des échantillons ont été prélevés pour détecter par LCMS l'apparition d'éventuels produits de dégradation. Ce travail est actuellement en cours.

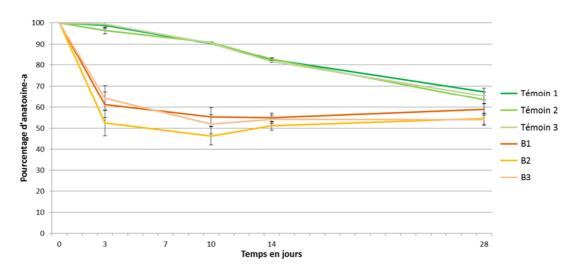


Figure 21 : Anatoxine-a présente (en %) au cours du temps

Témoin: Milieu minimum + anatoxine-a 3 mg.L<sup>-1</sup>; B: Milieu minimum + anatoxine-a 3mg.L<sup>-1</sup> + bactéries

De nouveaux isolements de souches ont été réalisés, à partir de la culture contenant la plus forte concentration en anatoxine-a (3 mg.L<sup>-1</sup>). Une vingtaine de colonies ont été sélectionnées et sont actuellement en cours de test pour leur capacité à dégrader l'anatoxine-a.

Si une de ces bactéries s'avère capable de dégrader l'anatoxine-a, celle-ci sera alors identifiée et utilisée pour caractériser les voies de dégradation de l'anatoxine-a. Dans le cas contraire, la diversité du consortium bactérien dégradant sera étudiée.

#### 7- Evolution des communautés bactériennes associées aux cyanobactéries

Comme vu précédemment, les efflorescences cyanobactériennes sont donc influencées par des facteurs abiotiques (température, apports en phosphore, etc.), mais peuvent aussi l'être par des facteurs biotiques. Ces facteurs sont la présence et l'action directe ou indirecte d'autres organismes vivants dans le même environnement. Les communautés microbiennes, et notamment bactériennes, sont ainsi déjà connues pour avoir un impact sur les cyanobactéries. Il a par exemple été observé lors d'une efflorescence de *Microcystis* une régulation de cette efflorescence par des bactéries dites « algicides » et des virus (cyanophages)<sup>4</sup>. La présence de certaines communautés bactériennes peut donc participer à la mise en place ou au contraire au déclin de l'efflorescence. Les cyanobactéries peuvent également, par leur présence ou par la production de toxines mais également d'autres composés, voire par la création d'un micro environnement spécifique, définis sous le nom de cyanosphère, influencer à l'inverse les communautés microbiennes<sup>5</sup>. Un événement de ce type a par exemple déjà été observé sur le lac Brome au Québec, où des bactéries connues pour lyser les cyanobactéries ont subi une forte augmentation de population au moment du déclin de l'efflorescence<sup>6</sup>. Il y a donc ici un intérêt double, celui de l'étude fondamentale des populations présentes, mais également, dans une optique plus appliquée, de la connaissance de communautés bactériennes qui pourraient potentiellement accélérer le déclin de l'efflorescence.

Notre objectif était de chercher à mettre en évidence l'existence potentielle de communautés bactériennes spécifiques à la cyanosphère du lac d'Aydat, ainsi que de suivre une éventuelle évolution temporelle dans ces communautés, qui serait fonction de l'évolution de l'efflorescence.

Cette composition des communautés bactériennes associées aux efflorescences de cyanobactéries a été étudiée durant l'efflorescence à *Anabaena macrospora* observée en 2016 au lac d'Aydat. Des échantillons d'eau de surface (0-3m) ont été prélevés à six dates, encadrant cet évènement : 14 septembre, 21 septembre, 12 octobre, 19 octobre, 26 octobre et 2 novembre 2016.

Les échantillons d'eau ont subi deux filtrations successives afin de séparer les bactéries directement associées aux cyanobactéries des bactéries libres (figure 22). Les échantillons d'eau sont d'abord filtrés sur un filtre de 8µm afin de retenir les cyanobactéries et les bactéries associées ou attachées. Ces échantillons représentent ce qui sera nommé ensuite la Fraction Attachée. Le filtrat, dans lequel se trouvent les bactéries non retenues sur le premier filtre, est ensuite filtré sur 0,2µm afin de retenir les bactéries « libres ». Ces échantillons représentent la Fraction Libre.

L'analyse de la structure (abondance relative et diversité) des populations bactériennes qui composent les fractions attachée et libre, a été réalisée par séquençage haut débit (Illumina Miseq, plateforme de séquençage GeT-PLaGe, INRA, Toulouse) de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S bactérien.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Manage, P. M. (2001). Dynamics of cyanophage-like particles and algicidal bacteria causing *Microcystis aeruginosa* mortality, 73–78.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Dziallas, C., & Grossart, H. (2011). Temperature and biotic factors influence bacterial communities associated with the cyanobacterium Microcystis sp., 13, 1632–1641.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Rashidan, K. K., & Bird, D. F. (2001). Role of predatory bacteria in the termination of a cyanobacterial bloom. Microbial Ecology, 97–105

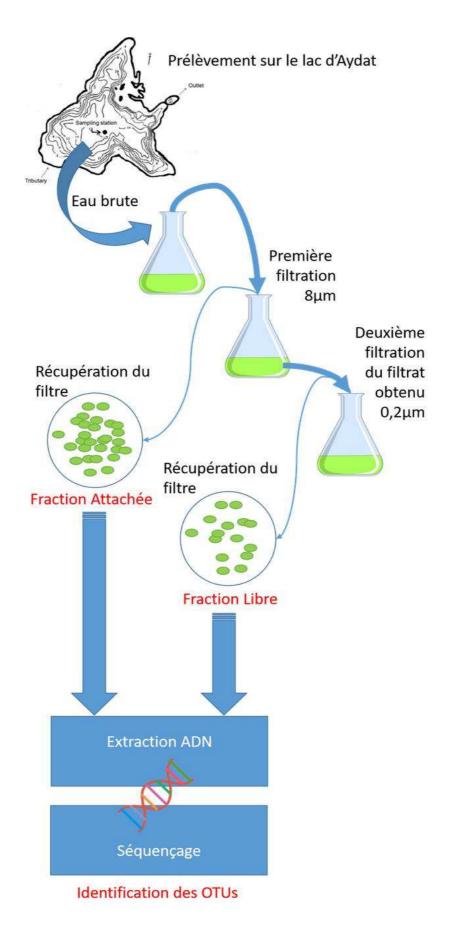


Figure 22 : Schéma représentant les méthodes utilisées pour obtenir la composition des deux fractions étudiées

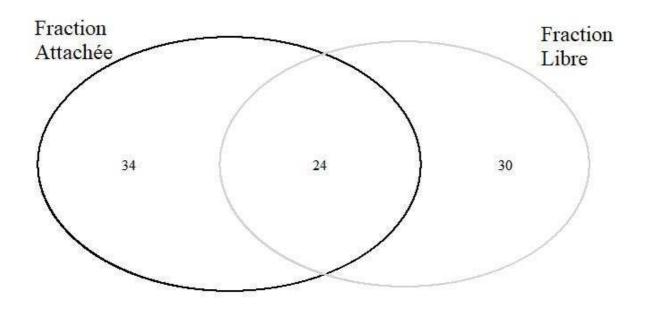


Figure 23 : Diagramme de Venn représentant la répartition des OTUs identifiés entre ceux présents uniquement dans la fraction attachée (noir, 34), uniquement dans la fraction libre (gris, 30), et ceux présents dans les deux fractions (24)

En nombre total d'OTUs identifiés (unité taxonomique opérationnelle, qui regroupe des séquences phylogénétiquement proches à >97%), il n'y a pas de différence majeure entre la fraction attachée (58 OTUs identifiés, dont 34 spécifiques) et la fraction libre (54 OTUs identifiés, dont 30 spécifiques) (**figure 23**). Les deux fractions partagent plus de la moitié des OTUs qu'elles contiennent. Cependant, cela souligne que plus de la moitié des OTUs identifiés pour chacune des fractions est spécifique à cette fraction ; il existe donc de fortes différences entre les communautés de la fraction attachée et de la fraction libre.

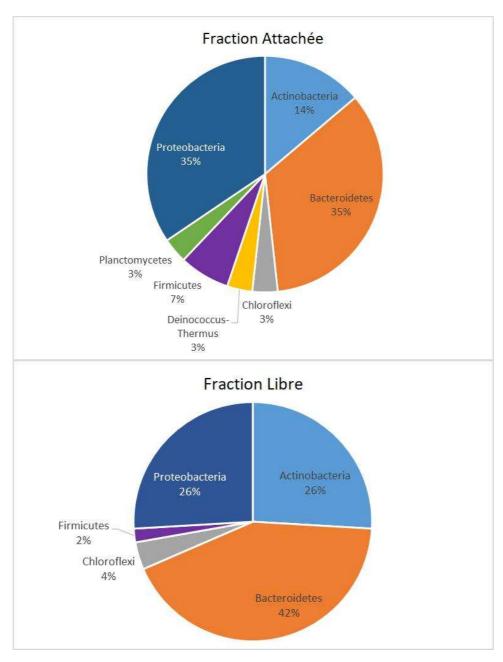


Figure 24 : Diagrammes représentant les proportions relatives (%) au sein de chaque fraction, attachée (A) ou libre (B), des OTUs représentant plus de 0,3% des séquences observées, pour chacun des phyla bactériens

Chacun des OTUs obtenus s'est vu attribuer un phylum bactérien; nous les avons donc répartis selon ces phyla. On peut déjà observer qu'un nombre plus grand de phyla est représenté dans la fraction attachée que dans la fraction libre (figure 24). Les deux fractions possèdent des OTUs qui représentent les phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes et Chloroflexi; cependant la fraction attachée possède deux phyla supplémentaires qui lui sont spécifiques, les Planctomycetes et les Deinococcus-Thermus. On observe également que la répartition des OTUs dans les phyla est différente. En effet, dans la fraction attachée, la proportion des Proteobacteria et des Bacteroidetes est égale (35%), et ils représentent donc ici les phyla dominants, avec en plus faible les Actinobacteria (14%). Les presque 20% restants sont partagés entre les Firmicutes (7%), puis les Planctomycetes, Deinococcus-Thermus et Chloroflexi (3% chacun). Dans la fraction libre, en revanche, on a une très forte dominance des Bacteroidetes (42%) qui

représentent à eux seuls presque la moitié des OTUs identifiés. La seconde moitié se réparti principalement entre les Proteobacteria et les Actinobacteria (26% chacun). Ne reste ensuite que très peu d'OTUs minoritaires, partagés entre les Chloroflexi (4%) et les Firmicutes (2%).

Les communautés bactériennes des deux fractions sont donc dominées par les mêmes phyla (Bacteroidetes, Proteobacteria et Actinobacteria). Cependant on observe bien une diversité plus importante, avec des OTUs répartis plus équitablement dans les différents phyla de la fraction attachée, tandis que la fraction libre est dominée de façon écrasante par les Bacteroidetes.

Cette répartition et différence de diversité est d'autant plus visible lorsque l'on sépare les échantillons afin d'observer l'évolution des communautés bactériennes au cours du temps (figure 25).

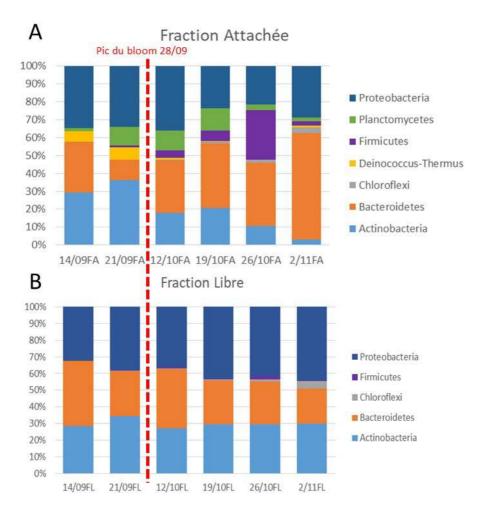


Figure 25 : Histogrammes représentant les proportions relatives (%) des OTUs représentant plus de 0,3% des séquences observées, par phyla pour chaque jour de prélèvement, au sein de chaque fraction, attachée (A) ou libre (B)

Dans la fraction attachée (**figure 25A**) on observe des changements graduels dans la composition en phyla de la communauté au cours du temps. Le pic de l'efflorescence (ou bloom) se situant le 28/09, nous pouvons ici observer les successions bactériennes qui s'effectuent autour de ce bloom. En effet, il semblerait qu'il y ait une succession entre les Actinobacteria (bleu ciel), présents en début de bloom et diminuant ensuite, et les Bacteroidetes (orange), dont la proportion augmente comparativement au cours du temps après le pic. On observe également une apparition des Chloroflexi (gris) après le pic, le 19/10, qui subissent également

une augmentation au cours du temps, à l'inverse de Deinococcus-Thermus (jaune), qui sont présents en début d'échantillonnage puis diminuent voire disparaissent après le pic. Les Firmicutes (violet) apparaissent avant mais augmentent fortement surtout après le pic. Les Proteobacteria semblent se maintenir, leurs proportions étant cependant relativement plus fortes autour du pic (21/09 et 12/10). Les phyla sont donc présents en proportions différentes spécifiques à chacun, avant, pendant, et après le pic du bloom dans cette fraction attachée.

A l'inverse, la fraction libre garde globalement la même composition tout au long de l'échantillonnage (figure 25B). La relative diminution de l'abondance des Bacteroidetes permet à celle des Proteobacteria d'augmenter, ce qui est l'inverse de ce que l'on a pu observer dans la fraction attachée.

Nous avons donc pu atteindre notre objectif et observer que l'efflorescence d'Anabaena macrospora sur le lac d'Aydat en 2016 a permis le développement de communautés bactériennes spécifiques. Ces communautés spécifiques attachées aux cyanobactéries contiennent notamment des phyla absents dans la fraction libre, tels que les Planctomycetes et les Deinococcus-Thermus. Les Planctomycetes notamment, sont un signe de l'abondance forte de phosphore ; en effet, tout comme les cyanobactéries, elles sont de mauvaises compétitrices pour cet élément. Le fait qu'elles puissent se développer ici en plus des cyanobactéries démontre que le phosphore n'est pas limitant. Les Deinococcus-Thermus, eux, contiennent en grande parties des bactéries extrémophiles, capable de vivre dans des conditions variées (radiations, hautes températures, UV, etc). La présence de ces phyla supplémentaires change également les proportions des phyla présents dans les deux fractions, qui se retrouvent proportionnellement moins dominants. Concernant ces proportions, nous avons également pu observer que celles de chacun des phyla de la fraction attachée varient au cours du temps, suivant l'évolution de l'efflorescence. Notamment, l'augmentation des Bacteroidetes au cours du temps pourrait être expliquée par les propriétés algicides connues de certaines d'entre elles<sup>7</sup>. Certaines Proteobacteria et des Firmicutes, également, ont été observées comme impactant négativement la croissance de certaines cyanobactéries ; on pourrait supposer que leur apparition lors du pic puis leur augmentation durant son déclin est liée à cet impact négatif<sup>8</sup>. A l'inverse, seules des variations temporelles minimes ont été observées dans la fraction libre, ce qui nous prouve que les variations observées dans la fraction attachée sont bien liées à l'efflorescence.

Nous avons donc décidé d'aller plus loin dans l'analyse de ces communautés, notamment en affinant l'identification des OTUs obtenus, afin de tenter d'observer plus spécifiquement des ordres, voire des genres bactériens. Leur dynamique autour du pic de l'efflorescence cyanobactérienne serait ainsi potentiellement explicable s'ils correspondent effectivement à des genres connus comme pouvant dégrader les cyanobactéries, voire certains composés produits par les cyanobactéries, telles que les toxines<sup>9</sup>. Ces analyses sont en cours.

D'autres perspectives telles que la répétition de cette expérience lors d'une nouvelle efflorescence sur ce même lac d'Aydat, et/ou dans un autre lac seraient intéressantes. Ces différents lacs peuvent d'autant plus abriter des communautés cyanobactériennes différentes, ce qui permettrait potentiellement de connaître les fractions attachées à d'autres genres cyanobactériens dominants, et de les comparer à celles obtenues ici avec *A. macrospora*.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Gerphagnon, M., Macarthur, D. J., Latour, D., Gachon, C. M. M., Ogtrop, F. Van, Gleason, F. H., & Sime-ngando, T. (2015). Minireview Microbial players involved in the decline of filamentous and colonial cyanobacterial blooms with a focus on fungal parasitism, 17, 2573–2587

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> Salomon, P. S., Janson, S., & Granéli, E. (2003). Molecular identification of bacteria associated with filaments of Nodularia spumigena and their effect on the cyanobacterial growth, 2, 261–272

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> Lemes, G. A. F., Kersanach, R., Pinto, S., & Dellagostin, O. A. (2008). Biodegradation of microcystins by aquatic Burkholderia sp. from a South Brazilian coastal lagoon, 69, 358–365.

#### Valorisation et communication

#### 1- Auprès de la communauté scientifique

## Communication orale à l'<u>ICTC10</u> (10<sup>th</sup> 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.

#### Publication en cours de rédaction

Sur la base des résultats obtenus sur l'évolution des communautés bactériennes associées aux proliférations de cyanobactéries (paragraphe 7 de la partie « Résultats »), une publication est en cours de rédaction, dont le titre provisoire est « Structural diversity of bacterial communities associated with an *Anabaena macrospora* bloom on Lake Aydat, France ».

#### 2- Auprès des gestionnaires

### Présentation d'un poster à la <u>rencontre science-gestion</u> 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'Etablissement 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 3 octobre 2016 au barrage de Naussac en présence des partenaires privés et institutionnels concernés par la retenue du Mas d'Armand. Plus d'informations ici : <a href="http://www.eptb-loire.fr/etude-de-solutions-perennes-ameliorer-qualite-de-leau-de-retenue-mas-darmand/">http://www.eptb-loire.fr/etude-de-solutions-perennes-ameliorer-qualite-de-leau-de-retenue-mas-darmand/</a>

#### Présentation à la CLIC (Commission Locale d'Information et de Concertation) du barrage de Villerest

Réunion organisée le 16 novembre 2017 à la sous-préfecture de Roanne. Plus d'informations ici : http://www.eptb-loire.fr/clic-du-barrage-de-villerest-et-commission-du-barrage-de-naussac/

#### 3- Dans les médias

#### Médias locaux

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

Un <u>article</u> dans le quotidien La Montagne (édition du 27 juillet 2016 ) et un <u>reportage</u> 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).

#### **Sur internet**

#### Page internet dédiée au projet

Une <u>page internet dédiée au projet DIVERSITOX</u> 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.

Sur le site internet de l'Etablissement public Loire, financeur du projet : <a href="http://www.eptb-loire.fr/soutien-projets-recherche/">http://www.eptb-loire.fr/soutien-projets-recherche/</a>

#### 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 :

- Marion Sabart recrutée en tant que chercheur du 01/12/2015 au 30/11/2018
- Amélie Lamarque recrutée en tant que technicienne du 01/10/2016 au 30/09/2017 puis ingénieure d'étude du 01/01/2018 au 30/11/2018
- Marianne Coulon recrutée en tant que chercheure du 01/01/2018 au 30/11/2018

#### Stages effectués dans le cadre du projet DIVERSITOX :

- Julie Maloron, DUT Génie Biologique option Analyses Biologiques et Biochimiques, avril-juin 2016
   "Impact de l'anatoxine-a sur une communauté bactérienne lacustre et potentiel de dégradation"
- Gaël Paris, Master 1 Biologie et Environnement spécialité Fonctionnement et Restauration des Ecosystèmes Aquatiques Continentaux, mai-juillet 2016
  - "Culture de cyanobactéries à partir de sédiment lacustre et recherche des gènes de biosynthèse de l'anatoxine-a (cyanotoxine)"
- Antonin Prijac, Master 2 recherche Biologie et Environnement spécialité Fonctionnement et Restauration des Ecosystèmes Aquatiques Continentaux, février-juin 2017
  - "Structure et dynamique des communautés bactériennes hétérotrophes associées aux cyanobactéries au cours d'une prolifération de Dolichospermum sur le lac d'Aydat, France"
- **Mélanie Clément**, Master 1 Biologie et Environnement spécialité Fonctionnement et Restauration des Ecosystèmes Aquatiques Continentaux, mai-juillet 2017

#### 2- Suivi du projet

#### Réunions de travail des personnes impliquées dans le projet DIVERSITOX :

- Réunions réunissant tous les personnels impliqués :
  - o une **réunion de lancement** du projet a eu lieu le **20 janvier 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.
  - o une **réunion d'avancement** le **20 janvier 2017** pour faire le bilan des travaux réalisés en 2016 et définir les objectifs et calendrier prévisionnel de l'année 2017.
  - Une réunion d'avancement le 17 janvier 2018 pour le faire le bilan des travaux réalisés en 2017 et planifier la fin du projet
  - O Une réunion d'avancement le 3 mai 2018 pour identifier les travaux à terminer
  - Une réunion de « valorisation » le 27 juin 2018 pour rassembler et organiser les éléments pertinents du projet en vue de la rédaction de plusieurs publications scientifiques et d'un rapport à destination des gestionnaires.
- 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 d'avancement au cours de la dernière année (septembre 2018)
- Un rapport final (mai 2019)

<sup>&</sup>quot;Potentiel toxique des lacs d'Auvergne"