

DECLIC : Diversité génétique et épidémiologie de *Cylindrospermopsis raciborskii*, cyanobactérie toxique

Coordinateur : Philippe DUFOUR
IRD, UR 167 *CYROCO*

Participants

J. F. HUMBERT, C. LÉBOULANGER, J. C. DRUART, B. LE BERRE, E. MENTHON & R. MOLICA,
INRA - UMR *CARTELE*, Thonon les Bains

G. SARAZIN, C. QUIBLIER & E. DUVAL, Laboratoire de Géochimie des Eaux, Université Denis
Diderot - Paris 7

C. BERNARD & A. COUTE, Equipe *Systématique et écotoxicologie des microalgues*, MNHN, Paris

Mots clés : *Cylindrospermopsis raciborskii* – cyanobactéries - diversité génétique –
écophysiologie - épidémiologie

Summary

The tropical bloom-forming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* is causing increasing concern because of its potential toxicity and invasive behaviour at mid latitudes. The *DECLIC* project involves four research teams from INRA, IRD, MNHN and Paris 7 University and is intended to answer the following questions:

What is the phylogenetic origin of *C. raciborskii* in France?

How effectively is this tropical species adapting to temperate climates?

Where is the species found in France, and what environmental conditions are conducive to its growth?

A collection of 61 strains, isolated from 7 countries and four continents has been used to compare tropical and temperate strains.

Sequencing at 4 loci, 16S rRNA, ITS1, rpoC1 and nifH, has shown that the French strains are very similar to one another and to the other European strains. At a larger scale, it appeared that strains were grouped in three clusters: 1) America, 2) Europe, and 3) Africa and Australia. These results suggested a recent spread of *Cylindrospermopsis* across the American and European continents from restricted warm refuge areas, instead of exchanges between continents. On the other hand, they also suggested a recent colonization of Australia by African strains.

The *in vitro* growth parameters (μ and T_{opt}) were the same for the tropical and temperate strains. All strains displayed positive net growth over a surprisingly wide range of temperatures (from 20 to 35°C) and light intensities (from 30 to 400 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), with maximum growth rates at around 30 °C and 80 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. This suggests that the colonization of mid-latitudes by *C. raciborskii* may result from a combination of its ability to tolerate a very wide range of climatic conditions plus the global warming phenomenon, which is providing this species with more favourable environmental conditions for growth.

The species has been identified at 9 sites in the Paris Basin, Indre and Belfort areas. It has not been detected in 140 other sites in the Ile de France, Nord-Pas de Calais, Bretagne, Limousin, Rhône-Alpes, Franche-Comté, Languedoc-Roussillon and Midi-Pyrénées regions sampled during the summers of 2002 and 2003. *C. raciborskii* populations peak at the end of summer (August and September). All the contaminated sites identified are small areas of shallow water. This is related to a high enough temperature of the sediment to allow the akinetes to germinate.

Résultats

1. Isolement et collection de souches

Les objectifs étaient l'isolement et le maintien des souches de *Cylindrospermopsis raciborskii* de diverses origines géographiques pour les études en génétique et physiologie. En janvier 2004, à la fin de l'étude, 61 souches ou clones en provenance de 7 pays et 4 continents étaient entretenus dans l'allothèque du laboratoire de Cryptogamie du MNHN.

2. Taxonomie moléculaire, origine de l'invasion

L'objectif était de déterminer l'origine phylogénétique des souches de *C. raciborskii* présentes en France et de rechercher si la présence de ces souches résultait d'un ou de plusieurs événements de colonisation.

La méthode employée est celle classiquement utilisée pour ce type de problématique du séquençage à plusieurs loci. Au total 18 souches ont été génétiquement caractérisées, françaises (3), hongroise (1), allemande (1), mexicaines (2), brésiliennes (5), australiennes (3) et sénégalaises (3).

A la lumière des résultats obtenus sur l'ITS1 et sur un fragment du gène *nifH*, les souches européennes apparaissent très proches génétiquement, ce qui suggère une origine commune. Ces souches sont en revanche génétiquement bien différenciées des souches africaines et australiennes ce qui suggère leur isolement ancien d'avec ces souches. Contrairement aux hypothèses initiales de Padisák (1997), les souches européennes n'apparaissent pas résulter d'un transfert récent à partir des continents africains ou australiens. En revanche, un tel transfert récent semble être attesté aussi bien au niveau de l'ITS1 que du gène *nifH*, entre le continent africain et le continent australien.

L'hypothèse proposée est une colonisation de l'Europe à partir de sites refuges en Europe ou Asie où l'espèce aurait pu survivre pendant les grandes glaciations du quaternaire. De même que l'Amérique du Nord serait colonisée par des souches ayant survécu à ces ères glaciaires dans des zones refuges tropicales d'Amérique du Sud. Les faibles distances génétiques observées entre les souches au sein de chaque continent (Europe, Amérique, Australie / Afrique) appuient cette hypothèse d'une extension récente (récente au sens géologique) de l'aire de répartition de l'espèce à partir de zones tropicales refuges du quaternaire.

Enfin, cette hypothèse globale sur les voies de dispersion de *C. raciborskii* est en accord avec les résultats obtenus sur la caractérisation physiologique des souches de *C. raciborskii* isolées en Europe (voir § suivant) puisque ces derniers montrent que ces souches isolées en France ont des optimum de croissance correspondant à des conditions tropicales. L'existence, chez cette espèce, d'une structuration génétique marquée en fonction de l'origine géographique des souches constitue un des rares exemples chez les procaryotes de différenciation phylogéographique.

3. Ecophysiologie, phénomènes adaptatifs

L'objectif était d'évaluer les capacités de *Cylindrospermopsis raciborskii*, espèce tropicale à s'adapter à des conditions tempérées.

L'étude a focalisé sur les capacités d'adaptation vis à vis de la température et de la lumière, paramètres choisis pour caractériser les différences entre les environnements tropicaux et tempérés. L'invasion pouvait être basée sur 3 hypothèses:

1^{ère} hypothèse: Des clones de *C. raciborskii*, adaptés au climat tempéré, ont été sélectionnés lors de la progression de l'espèce vers le Nord.

2^{ème} hypothèse : *C. raciborskii* a une grande tolérance vis à vis de la lumière et de la température, ce qui lui permet de prospérer des latitudes tropicales aux moyennes latitudes.

3^{ème} hypothèse : Les changements climatiques (le réchauffement global) favorisent le développement de *C. raciborskii* aux moyennes latitudes.

Les expérimentations ont consisté à placer des souches d'origine tempérée et des souches d'origine tropicale dans des gradients de température et de lumière et de comparer leur croissance. Dix souches ont été utilisées d'origine françaises (2), hongroise (1), allemande (1), mexicaine (1), brésiliennes (2), australiennes (1) et sénégalaises (2).

Les 10 souches testées se développent bien dans une large gamme de lumière, entre 30 et 400 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les croissances (les productions nettes) maximales s'observent autour de 80 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Il n'y a pas de différences significatives de croissance entre les souches tropicales et tempérées.

Les 10 souches testées se développent sur une large amplitude de température (de 15 à 35 °C). Les croissances maximales s'observent autour de 30 °C. Comme pour la lumière, il n'y a pas de différences significatives entre les souches tropicales et françaises.

Nos résultats ne permettent pas de distinguer les souches tempérées et tropicales qui ont des exigences thermiques et lumineuses de croissance identiques. L'hypothèse 1 supposant que des clones de *C. raciborskii* adaptés au climat tempéré ont été sélectionnés au cours de l'invasion est contredite.

Nos résultats permettent de classer *C. raciborskii* parmi les espèces tropicales, mais avec des tolérances thermiques et lumineuses étendues, lui permettant de s'adapter aux conditions tempérées, ce qui correspond à la deuxième hypothèse.

Nos résultats suggèrent, conformément à la 3^{ème} hypothèse que *C. raciborskii*, espèce tropicale, est en train de tirer avantage du réchauffement des eaux douces continentales au printemps pour proliférer en été.

En conclusion, le succès de *C. raciborskii*, espèce tropicale, dans les régions tempérées est donc vraisemblablement lié à la combinaison d'une grande tolérance physiologique et du réchauffement global.

4. Epidémiologie, extension de l'invasion et typologie des sites contaminés

Les objectifs initialement prévus étaient de déterminer l'extension de l'invasion en France et les variations saisonnières dans les abondances et les dynamiques de population, d'établir la typologie des sites contaminés et d'indiquer les types de plans d'eau menacés.

La prospection a été menée au cours des étés 2001 (15 sites échantillonnés de la Région Parisienne), 2002 (88 sites des régions Ile de France, Nord-Pas de Calais, Bretagne, Limousin, Rhône-Alpes, Languedoc-Roussillon et Midi-Pyrénées) et 2003 (53 sites des régions Ile de France, Limousin, Rhône-Alpes et Franche Comté).

Lorsque le projet a été soumis, 3 sites, tous du Bassin Parisien, étaient connus pour abriter *C. raciborskii*. A l'issue du projet DECLIC, 9 sites sont reconnus en France contaminés par *C. raciborskii*, répartis sur 3 régions différentes : région parisienne, Indre et Territoire de Belfort. Il s'agit d'une liste non exhaustive et si une faible proportion de sites sont apparus comme contaminés parmi les plans d'eau que nous avons échantillonnés, il est en réalité difficile d'estimer quel peut-être le nombre des sites où *C. raciborskii* se développe réellement et ce d'autant plus que les gestionnaires ou les utilisateurs de plans d'eau qui peuvent avoir été, ou pourrait être confrontés à sa présence, ne sont généralement pas en mesure de l'identifier.

Le développement maximal de *C. raciborskii* en France a toujours été observé en fin de période estivale (août-septembre). L'espèce est apparue dans des plans d'eau de faibles profondeurs. Deux observations ont également été faites en milieu lotique (Seine et Claise dans l'Indre).

Actions de transfert

Publications

- Briand J.-F., Robillot C., Quiblier-Lloberas C., Humbert J.-F., Couté A. & Bernard C. (2002). Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. *Water Research* 36 : 3183-3192.
- Briand J.F., Humbert J.F., Leboulanger C., Bernard C. & Dufour P. (2004). *Cylindrospermopsis raciborskii* invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance or global warming? *Journal of Phycology* 40 (2): 231-238.
- Gugger M.F., Molica R., Le Berre B., Dufour P., Bernard C. & Humbert J.F. Genetic Diversity of *Cylindrospermopsis* and *Raphidiopsis* strains (cyanobacteria) isolated from four continents. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (2):1097-1100.

Stages et rapports

Quatre stages dans le cadre du projet dont les rapports sont cités p. 48 du rapport final

Communications à colloques

- Cinq communications scientifiques ont été montées à partir des résultats du projet.
- Xth Intern Conf. on Harmful algae. St Pet. Beach USA. Oct. 21-25 2002.
- Séminaire, Invasion biologique, 19 mai 2003, E.N.P.C., Paris.
- Colloque d'Ecologie Microbienne (CEM), 26 au 28 mai 2003 à Carry le Rouet, France.
- International conference on *The impact of global environmental problems on continental and coastal marine waters*, Genève (CH), juillet 2003.
- Réunion annuelle du GIS Cyanobactéries, AFSSA Paris, 26 et 27 novembre 2003.
- Séminaires de restitution en fin de projet.
- A l'adresse des scientifiques du réseau cyanobactérie GRISCYA, le 25 juin 2003 au MNHN Paris.
- A l'adresse des scientifiques de l'UR FLAG du 28 au 30 janvier 2004 à l'IRD Paris.
- A l'adresse des scientifiques du programme *Invasions biologiques* du 17 au 19 octobre 2006 à Molliets, Landes

Rapport final

- Dufour P., Bernard C., Humbert J.F & Quiblier C. (2004). Diversité génétique et épidémiologie de *Cylindrospermopsis raciborskii*, cyanobactérie toxique. Rapport final du projet *DECLIC*, Programme *Invasions Biologiques*, Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, Paris, D4E / SRP, n° Contrat 01123: 71 pp.

Recommandations aux gestionnaires

Nécessité d'une surveillance

La toxicité de *Cylindrospermopsis raciborskii*, son aptitude à former des efflorescences, sa grande tolérance aux conditions de milieu, son caractère invasif et sa présence avérée dans un nombre croissant de sites en France (1 en 1994, 3 en 1999, 9 en 2003), invitent à rester vigilant. Il semble indispensable de poursuivre la surveillance des plans d'eau ayant été contaminés par *C. raciborskii* et de suivre l'extension éventuelle de son développement.

Sites et époques à surveiller

Actuellement (fin 2003), 9 sites sont connus en France pour abriter *C. raciborskii*. Ils sont répartis dans 3 Régions différentes, la Franche Comté, l'Île de France et la région Centre. Leur seul point commun est leur faible profondeur. Ils n'ont pas de ressemblance manifeste des autres caractéristiques morphométriques, pas plus que de leur physicochimie. Il n'est pas possible d'exclure que de nombreux autres sites soient contaminés. De plus, qu'un site ne soit pas contaminé n'exclut pas la contamination de sites proches, voire communiquant, comme cela a été observé à deux reprises. La plupart des efflorescences de l'espèce, recensées en Europe, ont eu lieu entre la fin de l'été et le début de l'automne, plus rarement au début ou au cours de l'été. C'est donc en septembre et octobre qu'il convient de surveiller les plans d'eau peu profonds.

Identification de l'espèce

Il est difficile de reconnaître une efflorescence à *C. raciborskii* qui ne se distingue pas, au premier regard, d'autres efflorescences algales. Les plans d'eau contaminés prennent une couleur verte à brune sur toute l'épaisseur de la colonne d'eau. Une efflorescence à *C. raciborskii* ne peut guère être identifiée que par examens microscopiques. Les gestionnaires des plans d'eau doivent donc apprendre à reconnaître l'espèce (cf. figure en fin d'article) ou transmettre des prélèvements aux laboratoires compétents. On trouvera des éléments d'identification de l'espèce dans Couté *et al.* 1997 (Cryptogamie Algol. 18: 57-70.), sans oublier que l'espèce est polymorphe.

Protocoles de prélèvements.

En cas d'efflorescence algale manifeste (eau verte à orange) opérer les prélèvements et observations selon les recommandations du rapport final, page 70. S'adresser aux DDASS pour les coordonnées des laboratoires experts.

Risques connus et atteintes aux usages.

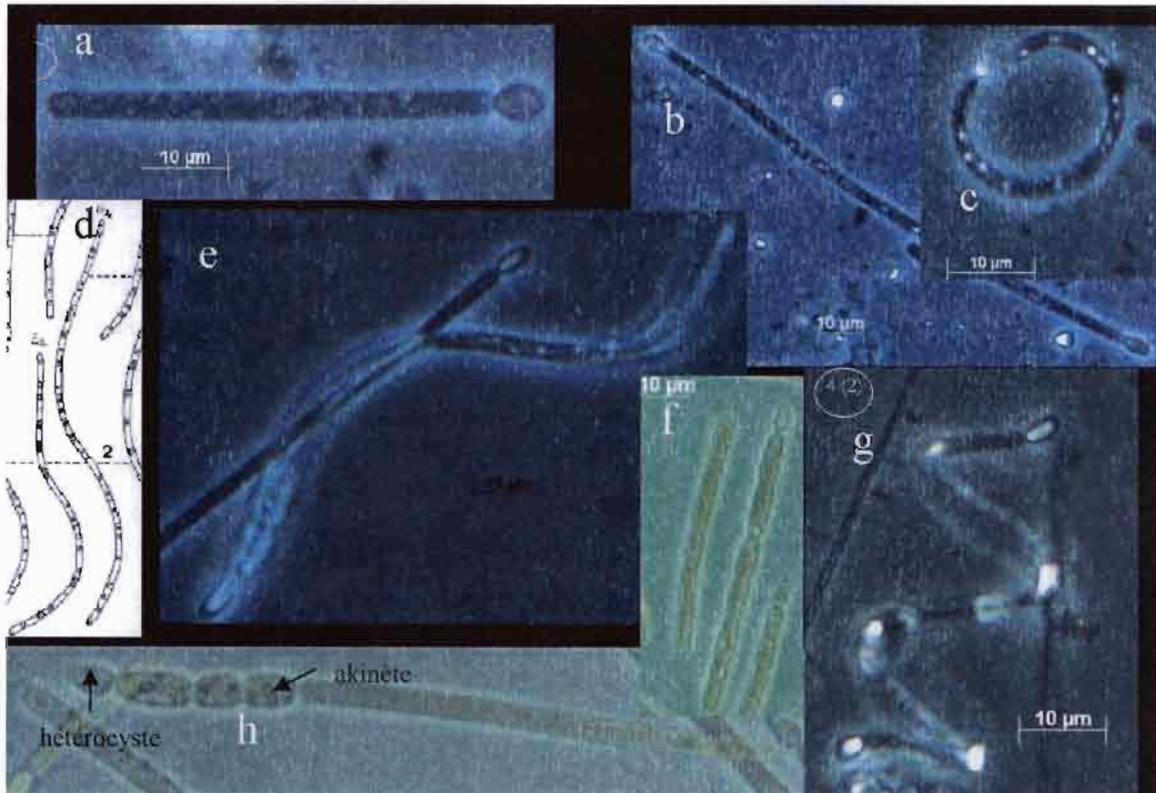
La toxicité de l'espèce en France est avérée (Bernard *et al.* 2003, Environ. Toxicol. 18 : 176-186). Cette toxicité s'ajoute aux autres désagréments communs aux efflorescences algales :

- aspect rébarbatif et odeurs qui ont un impact économique via les activités de loisirs,
- baisse de la diversité spécifique et désorganisation du réseau trophique qui ont un impact sur la pêche et la pisciculture,
- biomasses abondantes qui colmatent les filtres et ont un impact sur l'efficacité des stations de potabilisation de l'eau.

Conclusions et perspectives

En l'état des connaissances, il n'est pas question de conclure à une invasion des eaux de surface françaises par *Cylindrospermopsis raciborskii*. Néanmoins, la toxicité de l'espèce, sa capacité à former des efflorescences et la seule présence de cette espèce initialement tropicale, sur notre territoire, invite à rester vigilant. L'opération « Ecophysiologie » a montré sa grande tolérance à des environnements variés et donc ses capacités adaptatives importantes. Ces observations ajoutées aux connaissances déjà acquises concernant sa capacité à former des cellules de résistance, les akinètes, concernant son potentiel concurrentiel, lié entre autre à la possibilité de fixer l'azote atmosphérique et à une grande capacité de stockage du phosphore, laissent supposer que *C. raciborskii* pourrait progressivement s'installer en France aux côtés des autres cyanobactéries déjà régulièrement responsables, dans de très nombreux plans d'eau, de proliférations importantes.

D'autres études, effleurées ou non prévues dans ce projet devraient permettre de mieux connaître *C. raciborskii* et les risques de sa présence. La toxicité de l'espèce, ainsi que les conditions environnementales ou génétiques de sa manifestation méritent d'être poursuivies pour une meilleure évaluation des risques sanitaires. Une meilleure connaissance des conditions de formation et de germination des akinètes permettrait d'améliorer notre maîtrise des sites et époques vulnérables. Des études des conditions et performances de la diazotrophie et du stockage de phosphore par *C. raciborskii* ainsi que des études la mettant en concurrence avec d'autres espèces de cyanobactéries capables de proliférer devraient contribuer à mieux évaluer ses capacités à devenir dominante dans les écosystèmes aquatiques continentaux.



Exemple de la variabilité morphologique des souches de *Cylindrospermopsis raciborskii* observée au cours du projet. Photos de A. Saint Olive, Magali Anthonioz et Amandine Caruana. d : dessin d'Alain Couté.

Dufour Philippe (2006)

DECLIC : diversité génétique et épidémiologie de
Cylindrospermopsis raciborskii, cyanobactérie toxique

In : Programme de recherche invasions biologiques : résumé
des principaux résultats

Paris (FRA) ; Toulouse : CNRS ; Université Paul Sababier, 49-54

Colloque de Restitution : Programme de Recherche Invasions
Biologiques