

Étude des blooms toxiques à cyanobactéries dans trois lacs réservoirs du Maroc : résultats préliminaires

Study of toxic cyanobacteria blooms in three lake-reservoirs of Morocco: preliminary results

B. OUDRA^{* 1}, M. LOUDIKI¹, B. SABOUR², B. SBIYYAA¹, V. VASCONCELOS³

SUMMARY

During the first part of the toxic cyanobacteria survey program carried out since 1994, *Microcystis* blooms which periodically occurred in Al Massira, Lalla Takerkoust and Oued Mellah reservoirs were studied. These reservoirs were located at a different hydrographic basin and have a various trophic status. The water was used for irrigation, recreational purpose and/or drinking water supply. The bloom-forming species was identified as *Microcystis aeruginosa* in Al Massira and Takerkoust freshwater reservoirs whereas in brackish water Oued Mellah reservoir, the bloom-forming species is *Microcystis ichthyoblabe*.

In complement to this ecological studies and in order to assess the potential health risk, a toxicology and toxinology of these *Microcystis* blooms were undertaken. The hepatotoxicity of lyophilized bloom material collected during bloom periods in 1999 was confirmed by (i. p) mice bioassay. The toxicity assessment revealed that *Microcystis* Takerkoust bloom was highly toxic with LD₅₀ < 100 mg/kg whereas those from Al Massira and Oued Mellah were respectively characterized by a medium and a low toxicities.

The content of microcystins (MCYST) determined by the Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) show that MCYST content ranged between 0.37 to 496 µg/g dry weight. It appears that Takerkoust bloom contain 600 to 1300 fold more MCYST than Oued Mellah and Al Massira blooms. The isolation and identification of microcystins variants from bloom extracts were performed using the high performance liquid chromatography with photo-

-
1. Faculté des sciences Semlalia, Département de biologie, Laboratoire d'algologie, BP 2390, Marrakech, 40 000, Maroc.
 2. Faculté des sciences et techniques Mohammedia, Département de biologie, Mohammedia, Maroc.
 3. Faculdade de Ciências do Porto, Departamento de Zoologia e Antropologia, lab. Ecotoxicologia, 4050 Porto, Portugal.

* Correspondance. E-mails : oudra@ucam.ac.ma.

diode array detection (HPLC-PDA). This technique provided the separation and identification of at least two microcystins variants from each bloom material. The most number of 11 microcystins were detected from *Microcystis ichthyoblabe* bloom of Oued Mellah. However, only two and four variants of microcystins were respectively detected from Al Massira and Takerkoust blooms. Among these variants of microcystins solely Microcystin-LR was identified according to the Mcyst-LR authentic sample from extract of Al Massira and Takerkoust blooms.

The occurrence of toxic cyanobacteria bloom in these drinking and/or recreational water reservoirs lead us to take into consideration the real health hazard which will be induced by these harmful cyanobacterial blooms.

Key-words: cyanobacteria, hepatotoxins, *Microcystis*, microcystins, toxic bloom, Morocco.

RÉSUMÉ

Dans le cadre du programme de recherche sur les blooms toxiques à cyanobactéries dans certains lacs de barrage du Maroc, une étude de ce phénomène a été entreprise sur trois retenues : Lalla Takerkoust, Oued Mellah et Al Massira. L'étude taxonomique montre que dans les lacs Lalla Takerkoust et Al Massira, l'espèce responsable des blooms est *Microcystis aeruginosa* alors que dans la retenue saumâtre et hypereutrophe Oued Mellah, c'est *Microcystis ichthyoblabe*.

En complément, une étude toxicologique et toxinologique a permis d'évaluer les risques sanitaires potentiels qui peuvent être engendrés par ces blooms. L'hépatotoxicité, pour l'ensemble des blooms récoltés en 1999, a été confirmée par le biotest « souris ». L'application de ce test a montré que le bloom de Lalla Takerkoust est hautement toxique ($DL_{50} < 100$ mg/kg) ; celui de Oued Mellah est le moins toxique ($DL_{50} > 500$ mg/kg) et celui d'Al Massira est intermédiaire (DL_{50} comprise entre 100 et 500 mg/kg). Les teneurs en microcystines (hépatotoxines) déterminées par ELISA révèlent des concentrations beaucoup plus importantes pour le bloom de Lalla Takerkoust. L'utilisation de la chromatographie liquide haute performance avec détecteur à barrette photodiode, (CLHP-DBP) a permis la détection et l'identification de 2, 4 et 11 variantes de microcystines, respectivement à partir d'extraits du bloom naturel d'Al Massira, Lalla Takerkoust et Oued Mellah. Cependant, la Microcystine-LR n'a été détectée que dans les extraits d'Al Massira et de Takerkoust. L'apparition des blooms toxiques à cyanobactéries dans ces plans d'eau impose dorénavant la prise en considération des nuisances écologiques et des risques sanitaires liés à la présence des microcystines dans ces eaux.

Mots clés : cyanobactéries, bloom, *Microcystis*, microcystines, Maroc.

1 – INTRODUCTION

Le phénomène d'eutrophisation des eaux douces et l'apparition fréquente des blooms à cyanobactéries est un problème mondialement connu, lié principalement au développement urbain, industriel et agricole. Ce problème est d'autant plus sérieux que les espèces occasionnant ces blooms peuvent produire des substances hydrosolubles qui sont potentiellement hépatotoxiques

et/ou neurotoxiques (CARMICHAEL, 1994). Par inhibition de la phosphatase PPA et PP2A, les hépatotoxines « microcystines » sont actuellement considérées comme promotrices de tumeurs cancéreuses au niveau du foie (NISHIWAKI MATSUSHIMA *et al.*, 1992). En outre, elles ne sont pas éliminées de manière efficace par les techniques conventionnelles de traitement d'eau potable (ROSITANO et NICHOLSON, 1994). Ainsi, leur présence dans les plans d'eau destinés à la production de l'eau potable, l'abreuvement du bétail et aux activités de loisirs, constitue un danger potentiel et une menace sérieuse pour la santé humaine et animale (CARMICHAEL et FALCONER, 1993 ; FALCONER, 1996,1999 ; VASCONCELOS, 1999). Il a été reporté qu'actuellement, 65 variantes de microcystines ont été identifiées (CARMICHAEL, 2000a). Ces variantes ont été à l'origine de la première véritable intoxication humaine à Caruaru, Brésil, qui a causé la mort de 60 personnes (JOSHIMEN *et al.*, 1998). Les blooms toxiques à cyanobactéries se produisent à différents endroits dans le monde à une fréquence moyenne de 59 % (SIVONEN et JONES, 1999), ceux à *Microcystis aeruginosa* sont les plus communément signalés (CARMICHAEL, 1996). Comme exemple de mesures préventives en vue de garantir une qualité d'eau de boisson sans risques sanitaires, une norme provisoire de 1 µg/L de microcystine-LR, a été fixée par l'Organisation mondiale de la santé d'après le rapport préparé par les groupes d'experts OMS sur les substances chimiques dans les eaux de boisson et les cyanobactéries toxiques (FALCONER, 1999 ; FALCONER *et al.* 1999).

Au Maroc, un large programme de « screening » des blooms toxiques à cyanobactéries dans les retenues de barrages a été entamé depuis 1994. L'objectif principal de ce papier est de présenter des résultats préliminaires de toxicologie et toxinologie du matériel des blooms naturels issus de trois réservoirs Al Massira, Lalla Takerkoust et Oued Mellah dont les eaux sont utilisées pour l'irrigation et/ou la production d'eau potable, l'aquaculture et d'autres activités de loisirs (baignade, pêche, sports d'eau...) et de prévenir les risques sanitaires potentiels.

2 – MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Description des lacs – réservoirs étudiés

Les réservoirs étudiés Al Massira, Lalla Takerkoust et Oued Mellah sont localisés, respectivement dans les bassins versants Oum Er-Rbia, Tensift et Côtiers atlantiques de Casablanca (*figure 1*). Leurs caractéristiques morphométriques, hydrologiques, biologiques ainsi que les caractéristiques physicochimiques des eaux de surface sont brièvement résumées dans le *tableau 1*. Les données des variables physicochimiques et biologique utilisées concernent seulement les périodes de prolifération des cyanobactéries (MALKI, 1994 ; SBIYYAA, 1997 ; OUDRA *et al.*, 1998 ; SABOUR *et al.*, 2000).

2.2 Échantillonnage des blooms et confirmation de la toxicité

En 1999, un échantillonnage de bloom naturel à *Microcystis* a été effectué dans les lacs Oued Mellah (le 30 mai), Lalla Takerkoust (le 8 octobre) et Al Mas-

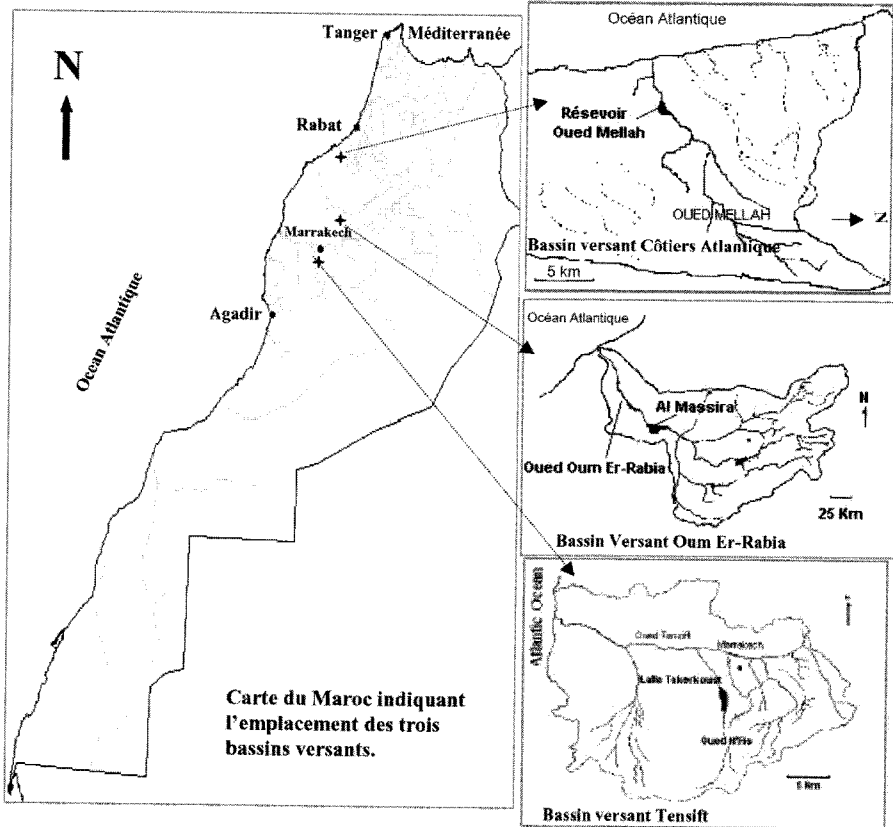


Figure 1 Situation géographique des lacs étudiés.
Geographic localisation of studied reservoirs.

sira (le 24 novembre). Chaque échantillon a été concentré à l'aide d'un filet à plancton (27 μm de vide de maille) au niveau des berges de chaque retenue où se forment des écumes importantes. Les résultats sur la dynamique des blooms à *Microcystis* dans les trois lacs considérés montre que les dates d'échantillonnage correspondent à la période de développement optimale des blooms (MALKI, 1994 ; SBIYYAA, 1997 ; OUDRA *et al.*, 1998 ; SABOUR *et al.*, 2000). Au laboratoire, le matériel algal prélevé a été concentré puis immédiatement lyophilisé et stocké à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en vue de confirmer sa toxicité par le biotest « souris » et analyser les toxines. La procédure suivie pour la réalisation du biotest « souris » est préalablement décrite dans OUDRA *et al.* (1998). L'hépatotoxicité est confirmée par l'examen histopathologique du tissu hépatique. Cette étude a été aimablement réalisée dans le laboratoire spécialisé d'Anatomopathologie par le Dr M. DADI-EL ANDALOUSSI.

2.3 Extraction et détection des microcystines par CLHP-DBP

Selon les recommandations de LAWTON *et al.* (1994a), l'extraction des toxines est réalisée trois fois successives par du méthanol 100 % (50-75 mg du

Tableau 1 Caractéristiques morphométriques, hydrologiques, physicochimiques et biologiques des eaux de surface des réservoirs étudiés (les mesures des variables physicochimiques et biologiques correspondent aux périodes de prolifération de *Microcystis* a, b et c).

Table 1 *Morphometric, hydrographic, physico-chemical and biological characteristics of the reservoir's water surface (the physico-chemical and biological values were measured during Microcystis growth periods a, b and c).*

Réservoir	Al Massira ^a	Lalla Takerkoust ^b	Oued Mellah ^c
Bassin versant	Oum Er-Rbia	Tensift	Côtier de Casablanca
Localisation géographique	31°95'N, 6°72'W	30°36'N, 8°20'W	33°30'N-07°20'W
Date de construction	1979	1929-1930	1928-1931
Sur la rivière	Oum Er-Rbia	N'Fis	Oued Mellah
Capacité globale (Mm ³)	2 760	69	8,8
Profondeur max. (m)	35	25	9
Eau potable (Mm ³)	425	En projet	non
Irrigation	1 100 Mm ³	85 Mm ³	400 ha de surface
Activités de loisirs	Oui	Oui	Oui
Pêche	Oui	Non	Oui
État trophique	Mésotrophe	Eutrophe	Hypereutrophe
Densité maximale de <i>Microcystis</i> Cell·mL ⁻¹	17,6·10 ⁴	10·10 ⁶	21·10 ⁶
Chlorophylle max. (µg·L ⁻¹)	48	575	222
Température eau (°C)	23-25	25-26	25-25,5
pH	8,5	8	8,2-8,3
Oxygène dissous (mg·L ⁻¹)	8-8,5	7-8	7,3-8,5
Conductivité (ms·cm ⁻¹)	1,25-1,3	0,4-0,9	3,8-4,2
Chlorures (g·L ⁻¹)	0,23	—	4-5,6
Salinité (‰)	—	—	6,6-9
Nitrates (µg·L ⁻¹)	250	49-93	0-155
Ammonium (µg·L ⁻¹)	< 50	19-29	239-626
Orthophosphates (µg·L ⁻¹)	10-15	0-5	< limite détection
NT/PT	—	5-44	69

Données extraites des références : a : Malki, 1994 (période d'étude juillet 1989-juin 1992) ; b : Sbiyyaa, 1997 et Oudra *et al.* 1998 (période d'étude juin 1994-décembre 1996) ; c : Sabour *et al.* 2000 (période d'étude avril-juillet 1999).

matériel lyophilisé par mL du méthanol). Chaque fois, les extraits sont centrifugés à 4 000/g (10 min, 4 °C), les surnageants sont retenus alors que le culot est réextrait à nouveau. Les trois extraits sont finalement recombinaés et dilués dans l'eau ultrapure (Milli-Q plus, Millipore) de façon à obtenir un extrait à 20 % du méthanol. Pour une prépurification des microcystines, l'extrait final est versé dans une colonne de gel de silice ODS (Sep-Pak[®] Vac C18, Waters corporation, Millipore USA). Cette colonne est préalablement activée par du méthanol 100 % et de l'eau ultrapure. Le lavage de la colonne se fait ensuite par du méthanol 20 % et l'eau ultrapure. Les microcystines sont finalement éluées par 40 mL du méthanol 100 %. Cette fraction est ensuite évaporée totalement dans un évaporateur (MEYER N-EVAP, USA). Le résidu ainsi obtenu est resuspendu dans 1 mL du méthanol 50 % et filtré par un filtre 0,2 µm (Acrodisc.,

Nylon, Gelman Sciences Inc.), en vue de la purification finale par chromatographie liquide haute performance équipée d'un détecteur à barrette photodiode (CLHP-DBP).

La séparation des microcystines est réalisée par le système CLHP (Lachrom FL détecteur L-7480, Merck, Hitachi) équipé par deux pompes L-7100, un auto-échantillonneur D-7200, une interface D-7000 et un détecteur à barrette photodiode L-7450 réglé à 238 nm. La purification des microcystines est achevée sur une colonne analytique LiChrospher R 100, 5 µm ODS (LiChro CART® 250-4 colonne, Merck, Germany) sous des conditions non isocratiques en utilisant un gradient (28 % à 100 %) de solution mobile d'acétonitrile et eau ultra-pure (Milli-Q plus, Millipore) contenant chacune 0,05 % d'acide Trifluoroacétique (TFA) (LAWTON *et al.*, 1995 ; MERILUOTO *et al.*, 1999). L'identification des variantes de microcystines est effectuée grâce à la comparaison des chromatogrammes obtenus sous les mêmes conditions et les spectres à ultraviolet (UV : 200-400 nm) des fractions purifiées avec ceux de la microcystine-LR standard qui montre une absorbance maximale à 238-240 nm et un temps de rétention d'environ 16, 21 mn.

2.4 Quantification des microcystines par ELISA

La détermination des teneurs en microcystines est réalisée par le test immunologique ELISA en utilisant des microplaques de type « Enviro Gard® Microcytins Plate Kit, Strategic Diagnostic Inc. » Suivant la procédure décrite dans CHU *et al.* (1990). Après extraction, pendant une nuit, de 50 mg du matériel lyophilisé dans 2 mL d'eau ultra-pure (Milli-Q plus, Millipore) et centrifugé pendant 5 mn à 10 000/g, le surnageant est ensuite filtré sur 0,2 µm (Acrodisc., Nylon, Gelman Sciences Inc.), la lecture de l'absorbance à 450 nm est ensuite réalisée par DENLEY we-Scan ELISA lecteur.

3 – RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Dynamique des blooms

Le suivi de la dynamique du phytoplancton dans le lac réservoir Lalla Takerkoust laisse apparaître que les blooms à cyanobactéries apparaissent en été pour atteindre leur prolifération maximale en octobre avec une variabilité annuelle importante en biomasse (SBIYYAA, 1997). La principale espèce responsable des blooms est *Microcystis aeruginosa f. aeruginosa* associée à un autre morphotype *M. aeruginosa f. flos-aquae* et à *Pseudanabaena muscicola* (synonyme *Phormidium muscicola*) (OUDRA *et al.*, 1998). Au moment de la prolifération massive, le bloom devient spectaculaire surtout au niveau des berges du lac où le vent conduit à son accumulation. L'étude de la dynamique pluriannuelle de croissance ainsi que l'évolution de la biomasse cyanobactérienne ont été présentées et largement discutées dans des travaux antérieurs (SBIYYAA, 1997 ; OUDRA *et al.*, 1998).

Dans la retenue Al Massira, *Microcystis aeruginosa* prolifère régulièrement et domine chaque année le phytoplancton en novembre-décembre avec une

densité maximale de $17,6 \cdot 10^4$ cell·mL⁻¹ dans le secteur profond du lac (MALKI, 1994). En raison des vents fréquents dans la région et la situation fortement exposée du lac, les blooms à *Microcystis* ne sont réellement observables qu'au niveau des zones littorales abritées. Malgré la prolifération de *Microcystis*, l'observation d'une véritable accumulation du bloom n'a pas été signalée auparavant dans ce réservoir. L'échantillonnage du bloom effectué en novembre 1999 coïncide avec une forte accumulation de la biomasse au niveau des berges, ce qui laisse supposé que la cyanobactérie est en pleine phase de croissance dans le lac. L'examen microscopique de l'échantillon du bloom confirme l'existence de deux morphotypes de *Microcystis aeruginosa* associés à des petits filaments de *Pseudanabaena muscicola*.

Dans le lac Oued Mellah, qui se présente comme un milieu particulier d'eau saumâtre, on assiste à une succession de blooms à cyanobactéries et même à Haptophycées. Selon les années, ces blooms sont variables aussi bien par leur composition spécifique que par leur importance quantitative. Un suivi rapproché *in situ* de la dynamique de *Microcystis* a été effectué toutes les semaines pendant la période de sa prolifération. En 1999, *Microcystis ichthyoblabe* a commencé sa prolifération en avril pour atteindre son optimum de croissance le 30 mai avec une densité maximale de $21 \cdot 10^6$ cell·mL⁻¹ (SABOUR *et al.*, 2000).

La prolifération de *Microcystis aeruginosa* dans les réservoirs du Maroc a été déjà signalée auparavant (GAYRAL, 1954 ; ABOUZAIID *et al.*, 1984 ; LOUDIKI *et al.*, 1995 ; DERRAZ, 1995). Cependant, la production massive de *Microcystis ichthyoblabe* dans le réservoir saumâtre de Oued Mellah, constitue à notre connaissance la première référence marocaine pour cette espèce (SABOUR *et al.*, 2000). En général, dans les réservoirs Takerkoust et Oued Mellah à degré trophique élevé, les blooms à *Microcystis* apparaissent de façon spectaculaire, plus persistante et étalée dans le temps. Il est évident que l'urbanisation, l'activité agricole intense au niveau des bassins versants et l'âge des retenues, sont à l'origine de l'accélération du phénomène d'eutrophisation et de l'apparition de blooms à *Microcystis*, espèce la plus fréquemment reportée dans différentes régions du monde (WATANABE *et al.*, 1996).

Afin d'avoir plus d'informations écologiques déterminantes dans l'apparition des blooms à *Microcystis*, les caractéristiques physicochimiques et biologiques mesurées en période de développement des blooms dans les trois lacs sont synthétisées dans le *tableau 1*. En période de bloom, les eaux de surface se caractérisent généralement par une température élevée comprise entre 23 et 26 °C, une grande stabilité hydrologique, un pH alcalin et surtout une déficience nette en nitrates et en orthophosphates (*tableau 1*).

3.2 Confirmation de l'hépatotoxicité des blooms à *Microcystis*

La réalisation du biotest « souris » a permis, d'une part, la mise en évidence et l'évaluation de la toxicité des extraits cyanobactériens et, d'autre part, la détermination des signes principaux d'intoxication. En se basant sur l'évolution de la biomasse de *Microcystis*, les échantillons des blooms ayant servi aux tests correspondent à la phase de développement optimal. La comparaison entre des doses létales pour 50 % du lot d'animaux testé (DL₅₀) obtenues pour chaque échantillon (*tableau 2*), montre que le bloom naturel de Lalla Takerkoust (BN-Tak) est quatre fois plus toxique que celui d'Al Massira (BN-Mass) et 14 fois plus que celui de Oued Mellah (BN-OM). En se basant sur les normes

de toxicité proposées par LAWTON *et al.* (1994b), les valeurs déterminées permettent de classer BN-Tak dans la gamme des blooms hautement toxiques ($DL_{50} < 100$ mg/kg), BN-Mass avec une toxicité moyenne ($DL_{50} > 100 < 500$ mg/kg) et BN-OM à la limite inférieure de la gamme de faible toxicité (> 500 mg/kg). En général, les valeurs des DL_{50} obtenues pour les trois blooms sont comparables à celles citées pour certains blooms à *Microcystis* observés au Portugal (VASCONCELOS *et al.*, 1996), en Grèce (LANARAS *et al.*, 1989) et au Japon (SHIRAI *et al.*, 1991). Pour l'ensemble des blooms, l'injection aux souris par voie intrapéritonéale (i.p), d'une dose létale d'extrait de bloom provoque une mort relativement rapide avec un temps de survie de 15 à 250 mn. Les signes principaux d'intoxication les plus apparents sont : ataxie, léthargie, pâleur et tachypnée/dyspnée. L'autopsie des animaux morts révèle une hypertrophie du foie sous l'effet d'engorgement par le sang. L'étude histopathologique du tissu hépatique montre une dilatation microkystique, une congestion des capillaires sinusoidaux et un décollement des lames endothéliales des travées hépatiques, entraînant une dissociation des hépatocytes. Cette description est similaire à celle induite par l'injection à la souris par voie (i.p) d'une pure cyanotoxine hépatotoxique (FALCONER *et al.*, 1981). De ce fait, cette hépatotoxicose serait le résultat de l'effet des cyanotoxines hémorragiques de nature « microcystines » produites par les cyanobactéries, en particulier le genre *Microcystis*. Ainsi, l'apparition des blooms toxiques à cyanobactéries au Maroc devient de plus en plus fréquente et géographiquement plus répandue. Dans le monde, la fréquence des blooms toxiques varie de 22 % à 95 % (SIVONEN et JONES, 1999). Pour certains pays méditerranéens cette fréquence est de 60 % et 73 % respectivement pour le Portugal (VASCONCELOS, 1994) et la région de Bretagne en France (VEZIE *et al.*, 1997). L'observation fréquente des blooms toxiques à cyanobactéries dans différents régions du monde est due à plusieurs facteurs qui sont essentiellement l'eutrophisation, le changement climatique et le développement de la recherche scientifique dans ce domaine (CARMICHAEL, 2000b).

Tableau 2 Résultats de toxicologie et toxinologie des trois blooms à *Microcystis*
Table 2 Toxicological and toxinological results of *Microcystis* blooms.

Lacs-réservoirs	Al Massira	Lalla Takerkoust	Oued Mellah
Périodes de bloom	Automne	Été-Automne	Printemps-Automne
Cyanobactéries dominantes et responsables des blooms	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Microcystis ichthyoblabe</i>
Date d'échantillonnage du bloom	24 -11-1999	8-10-1999	30-5-1999
DL_{50} par biotest Souris (i.p)	142 mg/kg	34 mg/kg	502 mg/kg
Signes d'intoxication	Hépatotoxicité	Hépatotoxicité	Hépatotoxicité
Teneurs en microcystines	0,37 µg/g (% CV : 0,5)	496 µg/g (% CV : 6,7)	0,79 µg/g (% CV : 0,3)
Nombre de microcystines	2 variantes	4 variantes	11 variantes
Présence de Microcystin-LR	Oui	Oui	Non

3.3 Quantification et identification des microcystines

Les teneurs en microcystines (MCYST) déterminées par ELISA sont comprises entre 0,37 et 496,00 µg/g de poids sec (*tableau 2*). La concentration maximale correspond au bloom de Takerkoust qui est 600 à 1 300 fois plus important que ceux de Oued Mellah et d'Al Massira, ce qui explique en partie sa forte toxicité (*tableau 2*). Pour certains lacs réservoirs d'Afrique du sud, WICKS and THIEL (1990) et SCOTT *et al.* (1991) rapportent des valeurs comprises entre 5 et 630 µg/g. Pour les blooms à cyanobactéries dans les lacs-réservoirs au Portugal ces valeurs sont comprises entre 1 000 et 7 100 µg/g (VASCONCELOS *et al.*, 1996) et en France les valeurs varient de 30 à 3 970 µg/g (VEZIE *et al.*, 1997 ; VEZIE *et al.*, 1998). Il est évident qu'un suivi pluriannuel des teneurs en microcystines apporterait beaucoup plus d'informations, ce genre de travaux sont encore rares (WICKS et THIEL, 1990 ; SIVONEN *et al.*, 1995 ; PARK et WATANABE, 1996 ; VEZIE *et al.*, 1998). Les teneurs en MCYST montrent généralement une forte variabilité qui dépend de la situation géographique et des conditions environnementales.

Quant à la variabilité qualitative des microcystines, l'utilisation de la chromatographie liquide haute performance avec détecteur à barrette photodiode, (CLHP-DBP) a permis la séparation de 2, 4 et 11 fractions, respectivement à partir d'extraits du bloom naturel d'Al Massira, Takerkoust et Oued Mellah (*figure 2*). Ces fractions présentent des spectres dans l'ultraviolet (220-300 nm) avec une absorbance maximale entre 236 et 240 nm. Ces spectres sont presque similaires au spectre type de la microcystine-LR standard (M cyst-LR) qui présente une absorbance maximale à 238-240 nm (*figure 3*). Par cette comparaison, une identification préliminaire de ces fractions comme étant des microcystines pourrait être avancée. À partir d'extraits de blooms des trois lacs réservoirs étudiés, au moins deux variantes de microcystines ont pu être purifiées et identifiées. En se basant sur le chromatogramme de CLHP-DBP de la M cyst-LR standard obtenu sous les mêmes conditions, seules les fractions n° 2 des chromatogrammes d'Al Massira et de Takerkoust (*figure 2*) correspondent à la variante Microcystine-LR. Cette identification définitive est basée sur le spectre UV et le temps de rétention de ces fractions qui est parfaitement identique à celui de la M cyst-LR standard. Cependant, la M cyst-LR n'a pas été détectée dans l'extrait du bloom à *Microcystis ichthyoblabe* de Oued Mellah. Il est bien évident que le nombre de variantes de toxines détectées varie d'un bloom à l'autre. NAMIKOSHI *et al.* (1992) ont rapporté qu'un bloom à *Microcystis* peut produire 12 variantes de microcystines.

En comparaison avec certaines blooms étudiés en Afrique et dans la région méditerranéenne, le nombre de microcystines détectées pour les trois blooms du Maroc est comparable à celui déjà rapporté. En Afrique du Sud, WICKS et THIEL (1990) et SCOTT (1991) ont identifié la M cyst-LR avec cinq autres variantes alors que dans le lac de Grand Lieu en France, seules trois variantes de microcystines, deux analogues de la M cyst-RR et la M cyst-LR, ont été identifiées (VEZIE *et al.*, 1998). Au Portugal, VASCONCELOS *et al.* (1996) ont rapporté la détection de dix microcystines dont la M cyst-LR représente en proportion 45,5 à 99,5 %. La M cyst-LR a été aussi détectée à partir d'extrait de bloom à *Microcystis* et *Anabaenopsis* dans le lac Kastoria en Grèce (LANARAS *et al.*, 2000) et à partir d'extraits de bloom à *Microcystis wesenbergii* du réservoir Santillana en Espagne (QUESADA *et al.*, 2000).

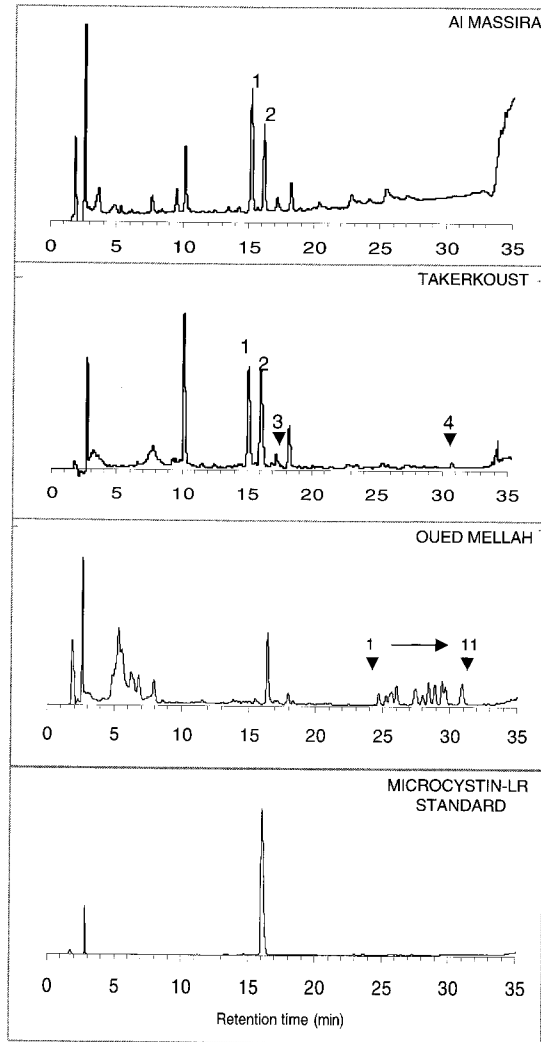


Figure 2 Chromatogrammes (CLHP-DBP) des extraits de bloom à *Microcystis* et de la Microcystine-LR standard suivant les conditions de CLHP décrites dans matériel et méthodes.

The HPLC-PDA elution profile obtained from Microcystis bloom extracts and Microcystin-LR standard according to HPLC conditions described in Material and methods.

4 - CONCLUSION

Ce travail apporte des données de toxicologie et toxinologie des blooms à *Microcystis*, qui se produisent dans trois réservoirs marocains ayant des caractéristiques morphométriques et trophiques différentes (Al Massira, Lalla Taker-

koust et Oued Mellah). Ces résultats montrent une variabilité de la toxinogénèse des souches responsables des blooms qui est fonction des conditions environnementales *in situ*. L'analyse par HPLC-DBP a permis l'identification d'au moins deux variantes d'hépatotoxines heptapeptidiques « microcystines » de chaque extrait de bloom. La microcystine-LR a été détectée dans les échantillons des blooms à *Microcystis aeruginosa* issus des lacs réservoirs Takerkoust et Al Massira alors que cette variante n'est pas produite par le bloom à *Microcystis ichthyoblabe* du lac Oued Mellah, malgré l'identification dans celui-ci de 11 variantes de microcystines. En raison des risques sanitaires que ces cyanotoxines peuvent engendrer, l'apparition de blooms toxiques à cyanobactéries, devient un problème majeur auquel il faut faire face. La lutte contre ce fléau nécessite la mise en place de moyens adéquats de prévention et une stratégie de lutte, surtout lorsqu'il s'agit de production d'eau potable. De ce fait, la mise en place d'un programme de « monitoring » des cyanobactéries et des cyanotoxines, surtout dans les réservoirs destinés à l'alimentation en eau potable, devient une nécessité.

REMERCIEMENTS

Ces recherches sont menées dans le cadre du Programme d'appui à la recherche scientifique PARS biologie n° 189 et projet de la convention de coopération CNCPRST-Maroc/ICCTI-Portugal.

Nous remercions Dr M. Dadi-El Andaloussi, Dr A. Amorim et Mr, Mme E.F Conrado.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABOUZAID H., LANDNER L., FALKOWSKI T., 1984. L'eutrophisation de la retenue du barrage SMBA. *Bulletin de la qualité des eaux*, 9 (1), 35-39.
- CARMICHAEL W.W., FALCONER I.R., 1993. Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. In: FALCONER I.R. (Ed.), *Algal toxins in seafood and drinking water*, 187-209.
- CARMICHAEL W.W., 1994. The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*, 270, 78-86.
- CARMICHAEL W.W., 1996. Toxic Microcystis and the environment. In: WATANABE M. F., HARADA H., CARMICHAEL W. W., FUJIKI H. (Ed), *Toxic Microcystis*, 1-11.
- CARMICHAEL W.W., 2000a. Determining water management guidelines and regulations for toxic cyanobacteria. *Comptes rendus Eurocyan Workshop "Europe facing toxic cyanobacterial blooms"*, Toulouse, France, 12-14 décembre 2000.
- CARMICHAEL W.W., 2000b. Preparing for the future: Algal toxins and their relationship to aquatic ecosystem health. *Comptes rendus International conference on toxic cyanobacterial blooms (ICTCB)*, Rabat, Morocco, 4-6 May 2000.
- DERRAZ M., 1995. Étude de l'eutrophisation de la retenue du barrage El Kansera (Maroc). *Th. Doct. Univ. Moulay Ismail, Mekhès*, 120 p.

- FALCONER I.R., JACKSON A.R.B., LARGLEY J., RUNNEGAR H.T., 1981. Liver pathology in mice in poisoning by the blue green alga *Microcystis aeruginosa*. *Aust. J. Biol. Sci.*, 34, 179-187.
- FALCONER I.R., 1996. Potential impact on human health of toxic cyanobacteria. *Phycologia*, 35(6 supplement), 6-11.
- FALCONER I.R., 1999. An overview of problems caused by toxic blue-green algae (Cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environ. Toxicology*, 14 (1), 5-12.
- FALCONER I.R., BARTRAM J., CHORUS I., KUIPER-GOODMAN T., UTKILEN H., BURCH M., CODD G.A., 1999. Safe levels and safe practice. In: CHORUS I., BARTRAM J. (Ed.), *Toxic cyanobacteria in water, a guide of their public health consequences, monitoring and management*, 155-176.
- GAYRAL P., 1954. Recherches phytolimnologiques au Maroc. *Th. Doct. Univ. Paris*, 301 pp.
- JOSHIMEN E.M., CARMICHAEL W.W., AN J.S., CARDO D.M., COOKSON S.T., HOLMES C.E., ANTUNES M.B., DE MELO FIHO D.A., BARRETO V.S., AZEVEDO S.M., JAVIN W.R., 1998. Liver failure in death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.*, 338 (13), 873-878.
- LANARAS T., TSITTSAMIS S., CHLICHLIA C., COOK C.M., 1989. Toxic cyanobacteria in Greek freshwaters. *J. Applied Phycol.*, 1, 67-73.
- LANARAS T., VARDAKA E., COOK C.M., 2000. Toxic cyanobacteria in Greek freshwaters: the current situation. *Comptes rendus International conference on toxic cyanobacterial blooms (ICTCB)*, Rabat, Morocco, 4-6 May 2000.
- LAWTON L.A., EDWARDS C., CODD G.A., 1994a. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst.*, 119, 1525-1530.
- LAWTON L.A., BEATTIE K.A., HAWSER S.P., CAMPBELL D.L., CODD G.A., 1994b. Evaluation of assay methods for the determination of cyanobacterial hepatotoxicity. In: CODD G.A., KEEVIL T.M., POTTER E. (Ed.), *Detection methods for cyanobacterial toxins*, 111-116.
- LAWTON L.A., EDWARDS C., BEATTIE K.A., PLEASANCE S., DEAR G.J., CODD G.A., 1995. Isolation and characterization of microcystins from laboratory cultures and environmental samples of *Microcystis aeruginosa* and from an Associated Animal toxicosis. *Nat. toxins*, 3, 50-57.
- LOUDIKI M., OUDRA B., SBIYYAA B., MOUHRI K., 1995. Inventaire et bioécologie des cyanobactéries toxiques occasionnant des blooms dans divers plans d'eau douce du Maroc. *Comptes rendus des Premières Journées Franco-Maghébines sur les Phycotoxines*. Univ. Hassan II, Faculté de Médecine, Casablanca, Maroc, 1-2 décembre 1995.
- MALKI M., 1994. Étude de la communauté phytoplanktonique et des caractéristiques physicochimiques des eaux du lac réservoir Al Massira (Maroc). *Th. Doct. Univ. Hassan II, Faculté des Sciences Ain Chock Casablanca*, 288 p.
- MERILUOTO J., LAWTON L., HARADA K., 1999. Isolation and detection of Microcystins and Nodularins, cyanobacterial peptide hepatotoxins. In: HOLST O. (Ed.), *Methods in Molecular Biology, Bacterial toxins: methods and protocols*, 145, 65-99.
- NAMIKOSHI M., RINEHART K.L., SAKAI R., STOTT R R., DAHLEM A.M., BEASLEY V.R., CARMICHAEL W.W., EVANS W.R., 1992. Identification of 12 hepatotoxins from a Homer lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis* and *Microcystis wesenbergii*: nine new microcystins. *J. Org. Chem.*, 57, 661-666.
- NISHIWAKI-MATSUSHIMA R., OTHA T., NISHIWAKI S., SUGANUMA M., KOYAMA K., ISHIKAWA T., CARMICHAEL W.W., FUJIKI H., 1992. Liver cancer promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 118, 42-424.
- OUDDRA B., LOUDI KI M., SBIYYAA B., VASCONCELOS V., ZERROUK H., EL-ANDALOUSSI M., DARLEY J., 1998. Occurrence of hepatotoxic *Microcystis aeruginosa* blooms in eutrophic Moroccan lake - reservoir. In: REGUERA B., BLONCO J., FERNANDEZ M.L., WYATT T. (Ed.), *Harmful Algae*, Xunta de Galicia & IOC of Unesco, 29-31.
- PARK H.D., WATANABE M.F., 1996. Toxic *Microcystis* in eutrophic lakes. In:

- WATANABE M.F., HARADA H., CARMICHAEL W.W., FUJIKI H. (Ed.), *Toxic Microcystis*, 57-77.
- QUESADA A., SANCHIS D., CARRASCO D., PADILLA C., LEGANÈS F., FERNANDEZ-VALIENTE E., FERNANDEZ-DEL-CAMPO F., 2000. Ecological succession of cyanobacterial blooms in Santillana reservoir. *Comptes rendus International conference on toxic cyanobacterial blooms* (ICTCB), Rabat, Morocco, 4-6 May 2000.
- ROSITANO J., NICHOLSON B.C., 1994. Water treatment techniques for the removal of cyanobacterial toxins from water. *Australian center for water quality research report*, 2/94, 53.
- SABOUR B., LOUDIKI M., OUDRA B., OUBRAIM S., FAWZI B., FADLAOUI S., CHLAIDA M., 2000. First data on *Microcystis ichthyoblable* Kützing. toxic blooms in Morocco: case of oued Mellah hyper-eutrophic lake. *Comptes rendus International conference on toxic cyanobacterial blooms* (ICTCB), Rabat, Morocco, 4-6 May 2000.
- SBIYYAA B., 1997. Déterminisme, écophysiologie, toxicité et implications écologiques du bloom toxique à *Microcystis aeruginosa* Kütz. (Cyanobactérie) dans le lac du barrage Lalla Takerkoust (Maroc). *Th. 3^e cycle, Univ. Cadi Ayyad, FSS Marrakech*, 219 p.
- SCOTT W.E., BARLOW D.J., HAUMAN J.H., 1981. Studies on the ecology, growth and physiology of toxic *Microcystis aeruginosa* in South Africa. In: CARMICHAEL W.W. (Ed.), *The water environmental algal toxins and health*, 49-69.
- SHIRAI M., OHTAKE A., SANO T., MATSUMOTO S., SAKAMOTO T., SATO A., AIDA T., HARADA K., SHIMADA T., SUZIKI M., NAKAMO M., 1991. Toxicity and toxins of natural blooms and isolated strains of *Microcystis* sp. (Cyanobacteria) and improved procedure for purification of cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1241-1245.
- SIVONEN K., NAMIKOSHI M., LUUKKAINEN R., FÄRDIG M., ROUHIAINEN L., EVANS W.R., CARMICHAEL W.W., RINEHART R., NIEMELÄ S.I., 1995. Variation of cyanobacterial hepatoxins in Finland. In: MUNAWAR M., LUOTOLA M. (Ed.), *The contamination on the Nordic Ecosystem, Dynamics, processes and Fate*, 163-169.
- SIVONEN K., JONES G., 1999. Cyanobacterial Toxins. In: CHORUS I., BARTRAM J. (Ed.), *Toxic cyanobacteria in water, a guide of their public health consequences, monitoring and management*, 41-111.
- VASCONCELOS V.M., 1994. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Portuguese fresh waters. *Arch. Hydrobiol.*, 130, 439-451.
- VASCONCELOS V.M., SIVONEN K., EVANS W., CARMICHAEL W.W., NAMIKOSHI M., 1996. Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in Portuguese freshwaters. *Wat. Res.*, 30 (10), 2377-2384.
- VASCONCELOS V.M., 1999. Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32 (3), 249-254.
- VEZIE C., BRIENT L., SIVONEN K., BETRU G., LEFEUVRE J.C., SALKINOJA-SALONEN M., 1997. Occurrence of microcystin containing cyanobacterial blooms in freshwaters of Brittany (France). *Arch. Hydrobiol.*, 139, 401-413.
- VEZIE C., BRIENT L., SIVONEN K., BETRU G., LEFEUVRE J.C., SALKINOJA-SALONEN M., 1998. Variation of microcystin content of cyanobacterial blooms and isolated strains in Grand-Lieu lake (France). *Microbiol. Ecol.*, 35, 126-135.
- Watanabe M.F., Harada H., Carmichael W.W., Fujiki H., 1996. *Toxic Microcystis*, 262 p.
- WICKS R.J., THEIL P.G., 1990. Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertrophic African reservoir. *Environ. Sci. Technol.*, 24, 1413-1418.