

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Étude sur les mésocosmes au Petit-Lac-Saint-François et à la Baie Missisquoi :
influence des nutriments azotés sur les cyanobactéries**

KIM GARIÉPY

Département de Génies civil, géologique et des mines

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie Civil

Mai 2019

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé:

Étude sur les mésocosmes au Petit-Lac-Saint-François et à la Baie Missisquoi : influence des nutriments azotés sur les cyanobactéries

Présenté par **Kim GARIÉPY**

en vue de l'obtention du diplôme de Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Michèle PRÉVOST, présidente

Sarah DORNER, membre et directrice de recherche

Arash ZAMYADI, membre et codirecteur de recherche

Nicolas TROMAS, membre externe

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier ma directrice de recherche professeure Sarah Dorner, mon co-directeur de recherche professeur Arash Zamyadi, les membres du jury professeure Michèle Prévost et Nicolas Tromas, ainsi qu'à toute l'équipe de recherche du projet ATRAPP pour m'avoir permis d'apprendre à travers ce projet. Merci à Barry Husk pour son aide au Petit-Lac-Saint-François et à l'usine de traitement des eaux de Bedford/Philipsburg pour leur assistance à la baie Missisquoi.

Je suis également reconnaissante envers tous les membres du personnel des laboratoires de recherche participants à Polytechnique Montréal, à l'UdeM, à l'UQAM et au CNRC pour leur aide dans l'accomplissement des expériences.

J'aimerais aussi exprimer ma gratitude envers les autres étudiants (collègues et stagiaires) pour leur participation tout au long de mon parcours dans ce projet.

Finalement, merci à ma famille et mes amis bien sûr pour leur soutien inconditionnel!

RÉSUMÉ

Les algues bleu-vertes, ou cyanobactéries, peuvent envahir les sources d'eau en se multipliant pour former des fleurs d'eau et devenir toxiques. Les conclusions ne sont toutefois pas unanimes sur les facteurs déclencheurs de la production de toxines par les cyanobactéries. L'objectif de cette recherche était de déterminer l'impact de certaines formes d'azote sur la production de cyanotoxines. Pour se faire, des mésocosmes ont été installés dans deux lacs au sud-est du Québec en 2017 et 2018, à la fin de l'été, période où les fleurs d'eau sont le plus présentes.

Cinq séries d'essais ont été conduites dans le cadre de cette recherche : 2 au Petit-Lac-St-François (PLSF) et 3 à la Baie Missisquoi. Chaque série d'essais incluait des mésocosmes de contrôle dans lesquels aucun nutriment n'avait été ajouté et des mésocosmes dans lesquels des formes de nutriments azotés avaient été injectées : nitrate, nitrite, ammonium ou urée. Des échantillons ont été prélevés au début de l'expérience (temps zéro) et 48 heures après l'ajout des nutriments azotés. Les échantillons ont été analysés pour obtenir : les concentrations de toxines, les comptes taxonomiques, les concentrations de certains nutriments et, pour les tests en 2017, le nombre de copies de gènes toxiques.

Les blooms des deux lacs ont eu des réactions différentes lors des essais. L'ajout de nutriments azotés a été lié à un biovolume de cyanobactéries plus élevés au PLSF comparativement aux essais à la baie Missisquoi. Au PLSF, l'ajout de nutriments azotés a augmenté l'abondance et le biovolume des espèces de cyanobactéries, sans avoir d'impact significatif sur les concentrations de toxines mesurées. À une seule occasion, une augmentation de production de cylindrospermopsine a été observée après l'ajout de nitrite. Aucune corrélation n'a pu être établie entre les concentrations de gènes toxiques *mcyD* et *mcyE* avec les concentrations de toxines mesurées. La présence de gènes toxiques n'était pas suffisante pour prédire la toxicité des fleurs étudiées. Il est donc nécessaire de suivre l'activation de ces gènes afin de déterminer leur lien avec les facteurs environnementaux et la production des toxines. Lors des essais à la Baie Missisquoi, la diminution des concentrations de toxines suite à l'apport artificiel d'ammonium et d'urée semble indiquer que la compétitivité des cyanobactéries ait diminué par-rapport aux autres espèces présentes. Des valeurs de ratios TN:TP variant autour de 12 étaient reliées à des biovolumes de cyanobactéries élevés.

L'utilisation de mésocosmes peut générer des résultats hautement variables. L'usage de plusieurs répliques est indispensable et la répétition des expériences est fortement recommandée. Il est aussi préférable de faire les essais lorsque les conditions météorologiques sont stables (absence de vent et de pluie durant toute la durée des essais) afin d'assurer le maintien de l'intégrité des mésocosmes.

ABSTRACT

Blue-green algae, or cyanobacteria, can dominate plankton communities to form blooms, which can be toxic. However, the factors that trigger the production of toxins by cyanobacteria are not fully understood. The objective of this study was to assess and compare the impact of various forms of nitrogen on the production of cyanotoxins. To achieve this, mesocosms were installed in two lakes in the Southeast region of Quebec province in 2017 and 2018 at the end of the summer, when blooms were more present.

Five experiments were conducted for this research: 2 at Petit-Lac-St-François (PLSF) and 3 at Missisquoi Bay. Each test included control mesocosms with no added nutrients and mesocosms injected with one of the following forms of nitrogen: nitrate, nitrite, ammonium or urea. Samples were taken at the beginning of the experiment (time zero) and 48 hours after the addition of nutrients. Samples were analyzed for: toxin concentrations, taxonomic counts, specific nutrient concentrations and, for the 2017 tests, toxic gene copy numbers.

Blooms at both studied lakes had different reactions during the tests. Adding nitrogen was related to a high cyanobacteria biovolume at PLSF, but not at Missisquoi Bay. At PLSF, the addition of the selected nutrients increased the abundance and biovolume of the cyanobacteria species but had no impact on the toxin concentrations. In one trial only, cylindrospermopsin increased after the addition of nitrite. Toxic gene concentrations of *mcyD* and *mcyE* did not correlate with toxin concentrations indicating that these biomarkers are not predictive of bloom toxicity at PLSF in 2017. Gene expression will be important for establishing relationships between environmental factors and toxin production. At Missisquoi Bay, artificial injection of nitrogen reduced the competitiveness of cyanobacteria to other organisms by decreasing their total abundance and biovolume after 48 hours of contact time. Toxin concentrations increased after 24 hours but were lower after 48 hours in mesocosms with added nitrogen. TN:TP ratios around 12 were related to high biovolumes of cyanobacteria over the two seasons of tests.

The use of mesocosms can generate highly variable results. The use of multiple replicates and repeating the experiments is therefore suggested to reduce variability. Also, it is preferable to

conduct the experiments when the weather conditions are favorable (absence of wind and rain for all the duration of the tests) in order to maintain the integrity of the mesocosms.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XV
LISTE DES ANNEXES.....	XVI
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Mise en contexte.....	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	4
2.1 Les cyanobactéries	4
2.2 Utilisation de l'azote par les cyanobactéries	6
2.3 Impact de l'apport d'azote sur la production de cyanotoxines.....	10
2.3.1 L'apport en N peut diminuer la production de toxines	17
2.3.2 L'apport en N peut favoriser la production de toxines.....	17
2.4 Influence d'autres facteurs sur la production de toxines.....	18
2.5 Génomique	18
2.5.1 Gènes liés à la production de toxines chez les cyanobactéries	19
2.6 Objectif général de recherche.....	25
2.7 Objectifs spécifiques de recherche	25
2.8 Hypothèses	26

CHAPITRE 3	MÉTHODOLOGIE	27
3.1	Sites d'échantillonnage	27
3.2	Mésocosmes	29
3.3	Préparation des échantillons et analyses	32
3.3.1	Analyse des cyanotoxines	35
3.3.2	Analyse génétique	36
3.3.3	Analyse de la taxonomie	37
3.3.4	Analyse des nutriments	37
CHAPITRE 4	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	39
4.1	Nutriments.....	40
4.1.1	Essais au PLSF	40
4.1.2	Essais à la baie Missisquoi	41
4.2	Cyanotoxines.....	45
4.2.1	Essais au PLSF	45
4.2.2	Essais à la baie Missisquoi	47
4.3	Taxonomie.....	54
4.3.1	Essais au PLSF	54
4.3.2	Essais à la baie Missisquoi	60
4.4	Analyse génétique	74
4.5	Analyses statistiques	80
4.5.1	Diagramme de quartiles	80
4.5.2	Analyse des composantes principales	83
CHAPITRE 5	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	89

5.1	Conclusions principales.....	89
5.2	Résultats à venir	91
5.3	Recommandations	92
RÉFÉRENCES.....		93
ANNEXES		100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Seuils proposés pour les cyanotoxines et les cyanobactéries dans les eaux potables et récréatives.....	6
Tableau 2.2 : Études sur l’impact de N sur la production de cyanotoxines par des cyanobactéries provenant de sources d’eau douce.....	11
Tableau 2.3 : Fonctions des gènes mcyD, mcyE et ntcA liés au caractère toxique des cyanotoxines.....	21
Tableau 2.4: Plage de concentrations de nombre de copies de gènes mcyE de <i>Microcystis</i> et des concentrations de microcystines (MC) des études recensées.....	24
Tableau 3.1 : Description des sites d’échantillonnage.....	29
Tableau 3.2 : Concentrations de formes d’azote ajoutées dans les mésocosmes pour les lacs du PLSF et de la baie Missisquoi.	31
Tableau 3.3 : Liste des échantillonnages effectués en 2017 et 2018 et des nutriments utilisés pour chaque expérience.	31
Tableau 3.4 : Liste des analyses et laboratoires impliqués	33
Tableau 3.5 : Caractéristiques des filtres utilisés lors des filtrations préliminaires.....	34
Tableau 3.6 : Caractéristiques des échantillons des nutriments analysés.	38
Tableau 4.1 : Résumé de l’état de complétion des analyses pour les essais de 2017 et 2018	39
Tableau 4.2 : PLSF 29-31 août 2017 – Cyanotoxines dans chaque mésocosmes (en ng/L) à T0 et T48.	45
Tableau 4.3 : PLSF 12-14 sept. 2017 – Cyanotoxines dans chaque mésocosmes (en ng/l) dans chaque mésocosme à T0 et T48.	46

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 : Photo d'un bloom de cyanobactéries à la baie Missisquoi (12 septembre 2018).	4
Figure 2.2 : Schéma de l'utilisation des formes d'azote par la cyanobactérie pour synthétiser des composés organiques. Les perméases (en orange) facilitent le transport actif des molécules à travers la membrane cytoplasmique. Les enzymes utilisées pour la conversion en NH_4^+ sont indiquées en mauve. Figure adaptée de Flores & Herrero (2005).	7
Figure 2.3 : Structure de la cyanotoxine microcystine-LR (MC-LR) avec en vert le groupe Adda et en rouge l'acide aminé D-Glutamate liés à la toxicité de la molécule. Figure dessinée à partir du logiciel ChemSketch, adaptée de Neumann et al. (2016).	20
Figure 3.1 : Sites d'échantillonnage situés en Montérégie dans le Sud-Est du Québec. Image libre de droits.	28
Figure 3.2 : Exemple d'installation des mésocosmes à la baie Missisquoi en 2018.	30
Figure 4.1 : PLSF 31 août 2017 - Concentrations d'azote total ($\mu\text{g N/L}$) et de phosphore total ($\mu\text{g P/L}$) dans chaque mésocosme à T48.	40
Figure 4.2 : Baie Missisquoi 31 juil.-2 août 2018 - Concentrations d'azote total ($\mu\text{g N/L}$) et de phosphore total ($\mu\text{g P/L}$) dans chaque mésocosme à T0 et T48.	42
Figure 4.3 : Baie Missisquoi 10-12 sept. 2018 - Concentrations d'azote total ($\mu\text{g N/L}$) et de phosphore total ($\mu\text{g P/L}$) dans chaque mésocosme à T0 et T48.	43
Figure 4.4 : Baie Missisquoi 31 juil.-2 août 2018 – Concentrations ($\mu\text{g/l}$) moyennes de microcystine totale intracellulaire à T0 et T48.	48
Figure 4.5 : Baie Missisquoi 10-12 sept. 2018 – Concentrations ($\mu\text{g/l}$) moyennes de microcystine-LR (MC-LR) et de cylindrospermopsine (CYN) extracellulaires à T0 et T48.	49
Figure 4.6 : Baie Missisquoi 24-25-26 sept. 2018 – Concentrations ($\mu\text{g/l}$) moyennes de microcystine-RR et -LR extracellulaires à T0, T24 et T48. L'écart-type sur la moyenne des concentrations de MC-RR du mésocosme avec ajout d'ammonium n'était pas disponible pour T48.	51

- Figure 4.7 :** PLSF 29-31 août 2017 – Abondance des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0 et T48. L'abondance totale de cyanobactéries dans chaque mésocosme est inscrite en haut de chaque barre (cellules/ml). 55
- Figure 4.8 :** PLSF 29-31 août 2017 – Biovolume des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0 et à T48. Le biovolume total de cyanobactéries de chaque mésocosme est inscrit en haut de chaque barre (mm³/l). 56
- Figure 4.9 :** PLSF 12-14 sept. 2017 – Abondance des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0 et T48. L'abondance totale de cyanobactéries dans chaque mésocosme est inscrite en haut de chaque barre (cellules/ml). 58
- Figure 4.10 :** PLSF 12-14 sept. 2017 – Biovolume des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0 et à T48. Le biovolume total de cyanobactéries de chaque mésocosme est inscrit en haut de chaque barre (mm³/l). 59
- Figure 4.11 :** Baie Missisquoi 31 juil.-2 août 2018 – Abondance des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0 et T48. L'abondance totale de cyanobactéries dans chaque mésocosme est inscrite en haut de chaque barre (cellules/ml). 61
- Figure 4.12 :** Baie Missisquoi 31 juil.-2 août 2018 – Biovolume des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0 et T48. Le biovolume total de cyanobactéries de chaque mésocosme est inscrit en haut de chaque barre (mm³/l). 62
- Figure 4.13 :** Baie Missisquoi 10-12 sept. 2018 – Abondance des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0 et T48. L'abondance totale de cyanobactéries dans chaque mésocosme est inscrite en haut de chaque barre (cellules/ml). 64
- Figure 4.14 :** Baie Missisquoi 10-12 sept. 2018 – Biovolume des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0 et à T48. Le biovolume total de cyanobactéries de chaque mésocosme est inscrit en haut de chaque barre (mm³/l). 65
- Figure 4.15 :** Baie Missisquoi 24-25-26 sept. 2018 – Abondance des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0, T24 et T48. L'abondance totale de cyanobactéries dans chaque mésocosme est inscrite en haut de chaque barre (cellules/ml). 67

- Figure 4.16 :** Baie Missisquoi 24-25-26 sept. 2018 – Biovolume des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0 et à T48. Le biovolume total de cyanobactéries de chaque mésocosme est inscrit en haut de chaque barre (mm³/l). 68
- Figure 4.17 :** Ratios TN:TP et biovolume total des cyanobactéries sur l'ensemble des échantillons pris dans les mésocosmes pour les essais de 2017 et 2018, suite au temps de contact de 48 heures. 72
- Figure 4.18 :** Moyennes par mésocosme à T48 des concentrations de copies de gènes *mcyD* et *mcyE* (copies/ml) et des concentrations de microcystine totale intracellulaire (ng/l) mesurées lors des essais du 29-31 août 2017, au PLSF. Les concentrations des copies de gènes sont présentées au centre des barres d'erreur. 75
- Figure 4.19 :** Diagramme de quartile des valeurs de biovolume des cyanobactéries pour chaque mésocosme testé en 2017 et 2018. Les médianes sont indiquées dans les boîtes. Les points extrêmes sont présentés. 81
- Figure 4.20 :** Diagramme de quartile des ratios TN:TP selon les mésocosmes testés. Les médianes sont indiquées dans les boîtes ou au-dessus de celles-ci. 82
- Figure 4.21 :** PLSF, essais du 29-31 août 2017 – Diagramme d'analyse des composantes principales incluant les biovolumes des 5 espèces de cyanobactéries principales (mm³/l), les concentrations de microcystines intracellulaires (ng/l), d'azote total (TN), de phosphore total (TP), de carbone organique total (COT) et le nombre de copies de gènes (copies/ml) à T48 pour les six mésocosmes étudiés. 85
- Figure 4.22 :** Diagramme d'analyse des composantes principales incluant les différents mésocosmes étudiés. Les variables sont le biovolume total de cyanobactéries et les nutriments testés dans les mésocosmes à T48. 87

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ACP	Analyse des composantes principales
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ana-a	Anatoxine-a
ARN	Acide ribonucléique
ATRAPP	Projet <i>Algal blooms, treatment, risk assessment, prediction and prevention through genomics</i>
C	Carbone
CNRC	Conseil national de recherche Canada
CO ₂	Dioxyde de carbone
COD	Carbone organique dissous
COT	Carbone organique total
CYN	Cylindrospermopsine
ddPCR	Digital droplet polymerase chain reaction
DIN	Azote inorganique dissous
DN	Azote dissous
DP	Phosphore dissous
ECCC	Ministère de l'environnement et des changements climatiques du Canada
LOD	Limite de détection
MC	Microcystine
N	Azote
N ₂	Diazote (azote atmosphérique)
NH ₃	Ammoniac
NH ₄ ⁺	Ammonium
NO ₂ ⁻	Nitrites
NO ₃ ⁻	Nitrates
PLSF	Petit-Lac-Saint-François
SPD	Sous produit de désinfection
T0	Temps zéro de l'expérience
T24	Temps 24 heures après le début de l'expérience
T48	Temps 48 heures après le début de l'expérience
TN	Azote total
TP	Phosphore total

LISTE DES ANNEXES

Annexe A	Concentrations des cyanotoxines dans les mésocosmes, au PLSF, en 2017	100
Annexe B	Concentrations des cyanotoxines dans les mésocosmes, à la Baie Missisquoi, en 2018	103
Annexe C	Concentrations des nutriments dans les mésocosmes, au PLSF, en 2017	112
Annexe D	Concentrations des nutriments dans les mésocosmes, à la Baie Missisquoi, en 2018	113
Annexe E	Biovolumes totaux de cyanobactéries vs phytoplancton.....	114

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte

La présence élevée d'azote et de phosphore dans les écosystèmes d'eau douce peut être une source de pollution et causer la dégradation de la qualité de l'eau. L'apport de nutriments peut en effet provoquer l'eutrophisation d'un lac menant à la prolifération des cyanobactéries qui apparaissent sous forme de fleurs d'eau, communément appelées *blooms* (Donald et al. , 2011). L'intensification de l'utilisation de fertilisants pour accroître les rendements agricoles rend les différentes formes d'azote (nitrite, nitrate, ammonium, etc.) plus accessibles aux microorganismes. La présence de phosphore est souvent attribuée à l'activité humaine. Au Canada, on cherche davantage à limiter l'apport du phosphore que de l'azote dans les sources d'eau. La présence de ces nutriments dans les plans d'eau favorise l'apparition d'espèces toxiques de cyanobactéries (Levy, 2017).

Les blooms de cyanobactéries toxiques et leur multiplication liée à l'apport de nutriments causent une augmentation des concentrations de cyanotoxines dans les plans d'eau, rendant cruciale l'étude de ce phénomène (Orihel et al., 2013). Ces toxines peuvent en effet affecter le système neurologique (neurotoxines) et le foie (hépatotoxines) des humains et des animaux (Chorus & Bartram, 1999).

La présence de blooms dans une source d'eau potable représente un enjeu pour les usines de traitement qui doivent traiter l'eau avant de l'envoyer dans le réseau de distribution des municipalités. Il leur est nécessaire de non seulement filtrer les cellules de cyanobactéries, mais également de traiter l'eau pour les cyanotoxines extracellulaires. La lyse d'une cellule peut également relâchée des toxines intracellulaires dans l'eau telles les microcystines (MC), ajoutant à la difficulté du traitement. Le traitement avec le chlore s'avère efficace pour neutraliser les microcystines dissoutes dans l'eau, toutefois il peut y avoir production de sous-produits de désinfection (SPD) suite à ce traitement. Zong et al. (2015) ont démontré qu'il y avait présence de SPD suite à la chloration d'une eau contenant des microcystines. Les SPD formés demeurent toxiques, bien que moindre que les microcystines (Zong et al., 2015). Ceci indique bien l'importance de limiter les blooms de cyanobactéries dans les sources d'eau potable.

De plus, Santé Canada recommande une limite de 1.5 µg/L pour les microcystines totales pour les usines d'eau potable afin de préserver la santé de la population, notamment celle des enfants (Santé Canada, 2016). Le gouvernement canadien recommande également aux municipalités d'avertir la population lorsque des microcystines sont détectées afin de protéger les nourrissons qui sont plus vulnérables que le reste de la population. La norme québécoise pour l'eau potable est également de 1.5 µg/L pour la microcystine (Groupe scientifique sur l'eau, 2017). L'organisation mondiale de la santé (OMS) recommande une concentration maximale plus conservatrice de 1 µg/L, basée sur l'ensemble de leurs données récoltées sur la toxicité de la variante microcystine-LR (OMS, 1998).

Il faut ainsi maintenir les concentrations de microcystines au minimum dans les eaux de surface pour respecter les recommandations et normes pour protéger la population. Il est donc essentiel de déterminer des paramètres mesurables qui permettent de détecter et d'anticiper de manière juste la présence d'un bloom toxique de cyanobactéries. L'étude de facteurs qui influencent la production de toxines est fondamentale pour y parvenir.

Dans cette optique, cette recherche présente les résultats d'une étude de mésocosmes qui a été faite aux étendues d'eau du Petit-Lac-Saint-François (PLSF) en 2017 et de la baie Missisquoi en 2018. Les mésocosmes ont été installés dans ces plans d'eau et ont été remplis d'un mélange d'eau et de cyanobactéries provenant du lac. Des concentrations de différentes formes d'azote ont été injectées dans ces mésocosmes afin d'en étudier l'impact sur la production de toxines par les cyanobactéries. La méthode et les matériaux utilisés pour l'installation des mésocosmes étaient basés sur une expérience néo-zélandaise effectuée par l'équipe de Susanna Wood en 2010 (Wood et al., 2012). Dans cette étude, l'utilisation de ce système de mésocosmes dans un lac eutrophe a permis de démontrer qu'il existait une corrélation positive entre les concentrations de cyanobactéries *Microcystis* et les concentrations de microcystine, une des toxines les plus étudiées.

L'eau utilisée pour les expériences dans les mésocosmes provenait directement du lac étudié. Tous les zooplanctons, phytoplanctons et microorganismes naturellement présents dans l'eau

étaient donc inclus. L'interaction entre les cyanobactéries et ceux-ci était donc poursuivie de manière naturelle lors des tests.

Les mésocosmes permettaient non seulement d'utiliser l'eau naturelle pour les tests, mais également d'exposer les cyanobactéries aux conditions d'ensoleillement et de températures extérieures. Les mésocosmes avaient donc l'avantage d'offrir un environnement naturel dans lequel les microorganismes pouvaient interagir lors des essais. Il était alors possible d'observer leur comportement typique, non influencé par des conditions contrôlées dans les laboratoires. Ces dernières sont souvent critiquées comme n'étant pas assez représentatives des conditions en environnement naturel. Par exemple, dans son étude, Palkova (2004) a observé des modifications dans le comportement des microorganismes provenant d'échantillons d'eau d'un lac utilisés dans des expériences en laboratoire. Les communautés (ou colonies) présentes s'adaptaient aux nouvelles conditions et réagissaient différemment que dans la nature, rendant difficile l'évaluation de leur « vrai » comportement (Palkova, 2004). Il est impossible de reproduire exactement les conditions environnementales en laboratoire, car il y a trop de facteurs à considérer (p. ex. des changements de températures, d'ensoleillement, d'apports de nutriments). L'utilisation d'un système de mésocosmes permet d'imposer des conditions contrôlées (tel l'apport de nutriments azotés) dans un environnement naturel pour en observer les impacts sur le comportement plus réaliste des cyanobactéries.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Les cyanobactéries

Les cyanobactéries (aussi appelées algues bleu-vert, ou *Cyanophyceae*) sont des microorganismes procaryotes pouvant utiliser la photosynthèse pour convertir l'énergie lumineuse en matière organique. Elles possèdent des caractéristiques à la fois de bactéries et d'algues (Chorus & Bartram, 1999). Leur capacité d'adaptation leur permet de survivre à différents stress environnementaux. Sous certaines conditions, elles peuvent former de larges masses appelées fleurs de cyanobactéries (connues sous le terme *blooms*, voir **Figure 2.1**) et produire des toxines (cyanotoxines) qui peuvent nuire à l'utilisation des plans d'eau. Le ministère de l'environnement du Québec stipule qu'une densité de plus de 20 000 cellules de cyanobactéries/ml est caractéristique de la présence d'une fleur d'eau (Groupe scientifique sur l'eau, 2017).



Figure 2.1 : Photo d'un bloom de cyanobactéries à la baie Missisquoi (12 septembre 2018).

Les cyanotoxines sont des métabolites secondaires, elles ne servent pas au métabolisme primaire de la cellule (Kurmayer & Christiansen, 2009). Donc elles ne sont pas directement impliquées dans la croissance et la reproduction. Par contre, ces toxines pourraient être utiles à la survie des cyanobactéries puisqu'elles peuvent nuire à certains prédateurs et/ou compétiteurs qui nuiraient à leur prolifération (Whitton, 2012). Les cyanotoxines peuvent également avoir un rôle dans le mécanisme lié au *quorum sensing*. Les toxines extracellulaires pourraient être indicatrice d'une communication entre les cellules, les toxines agiraient ainsi en tant que signaux moléculaires (Wood et al., 2011).

Des stress environnementaux (p. ex. changement de température, d'ensoleillement, apport de nutriments, etc.) et biotiques (liés aux organismes vivants) peuvent moduler la production de métabolites secondaires pour aider la cellule à faire face à ces stress et/ou à obtenir un avantage compétitif au sein de la communauté de plancton (Holland & Kinnear, 2013). Aucune raison définitive et globale n'a encore été établie pour justifier la nécessité des toxines pour les cyanobactéries. Holland et Kinnear (2013) ont indiqué qu'une approche systémique permettrait de mieux définir le rôle des cyanotoxines, en permettant d'étudier les interactions entre les différents facteurs qui stimulent leur production. La recherche de tous les systèmes impliqués dans ce processus sort du cadre de ce mémoire de maîtrise. Cette revue de littérature porte sur l'impact de l'apport de nutriments azotés sur la production de toxines.

Le **Tableau 2.1** montre les limites de concentrations de cyanotoxines et d'abondance de cellules de cyanobactéries créant un risque pour la santé. Il existe des seuils pour les eaux récréatives étant donné que les toxines peuvent entrer dans le corps par la peau et via ingestion involontaire lors d'activités aquatiques (EPA, 2017; Groupe scientifique sur l'eau, 2017; INSPQ, 2005; OMS, 2000). Les seuils sont plus stricts pour les usines d'eau potable, étant donné que les toxines ingérées suite à la consommation d'eau potable sur une base régulière peuvent être très dangereuses pour les humains.

Tableau 2.1 : Seuils proposés pour les cyanotoxines et les cyanobactéries dans les eaux potables et récréatives.

Source d'eau	Indicateur	Seuils à ne pas dépasser	Références
Eau potable	Cyanotoxines	1,0 à 1,5 µg/L microcystine 3,7 µg/L anatoxine	(INSPQ, 2005; OMS, 1998; Santé Canada, 2016)
	Cellules de cyanobactéries	20,000 cellules/ml	(Groupe scientifique sur l'eau, 2017)
Eaux récréatives	Cyanotoxines	4 à 20 µg/L microcystine 40 µg/L anatoxine 8 µg/L cylindrospermopsine	(EPA, 2017; INSPQ, 2005; OMS, 2000)
	Cellules de cyanobactéries	20,000 à 100,000 cellules/ml	(OMS, 2000)

2.2 Utilisation de l'azote par les cyanobactéries

La synthèse de cyanotoxines peut être causées par de nombreux facteurs dont la température, l'ensoleillement, la structure de la communauté de phytoplancton et/ou la présence de nutriments tels le phosphore et l'azote (Boopathi & Ki, 2014). Les cyanobactéries peuvent assimiler différentes formes d'azote telles que : l'urée ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), l'ammonium (NH_4^+), les nitrites (NO_2^-) et les nitrates (NO_3^-) (**Figure 2.2**).

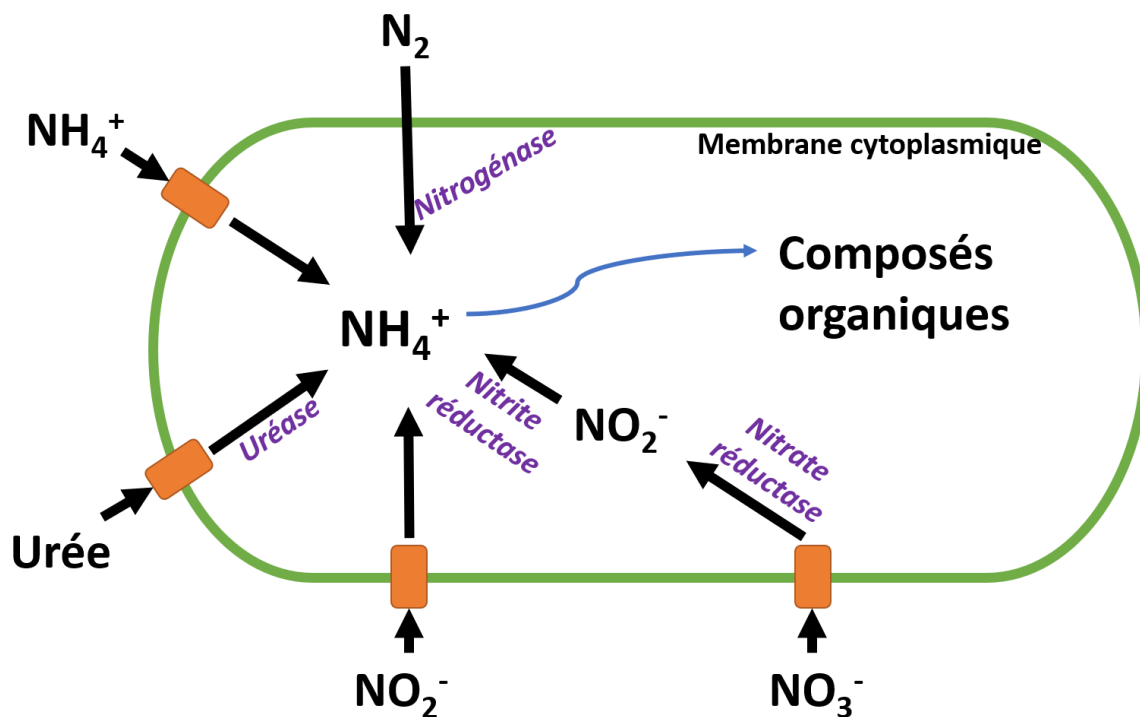
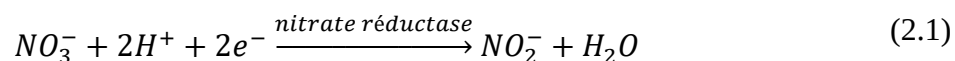


Figure 2.2 : Schéma de l'utilisation des formes d'azote par la cyanobactérie pour synthétiser des composés organiques. Les perméases (en orange) facilitent le transport actif des molécules à travers la membrane cytoplasmique. Les enzymes utilisées pour la conversion en NH_4^+ sont indiquées en mauve. Figure adaptée de Flores & Herrero (2005).

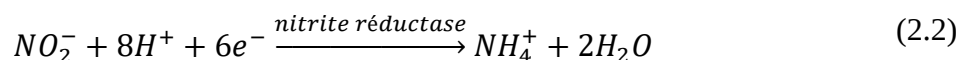
Les perméases permettent aux différentes formes d'azote de traverser la membrane cytoplasmique. Différents procédés enzymatiques permettent à la cellule de réduire ces molécules en forme ammoniacale ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$). Le NH_4^+ est généralement la forme privilégiée de source d'azote pour les cyanobactéries. L'urée, les nitrites et nitrates qui pénètrent la cellule sont métabolisés en NH_4^+ intracellulaire afin d'être utilisé par la cellule (Flores & Herrero, 2005).

De plus, l'azote atmosphérique (N_2) peut être fixé par certaines cyanobactéries qui sont hétérocystes. Lorsque la présence d'azote est limitée dans un lac, la présence ou même la dominance de cyanobactéries fixatrices d'azote peut être observée puisqu'un lac limité en azote donne ainsi un avantage compétitif à ce type de cyanobactéries. Sous cette condition, N_2 traverse la membrane cellulaire puis est réduit en NH_4^+ pour être incorporé à la cellule (Muro-Pastor, Reyes, & Florencio, 2005).

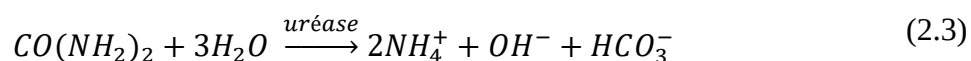
L'assimilation du NO_3^- se fait en deux étapes. Il est d'abord réduit en NO_2^- par l'enzyme nitrate réductase lors de la réaction d'oxydoréduction suivante :



Puis, le NO_2^- est réduit en NH_4^+ par l'enzyme nitrite réductase lors de la réaction d'oxydoréduction suivante :



L'équation générale de la réduction de l'urée ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) en NH_4^+ se fait par l'enzyme uréase comme suit :



L'équation générale de fixation de N_2 pour obtenir l'azote ammoniacal, par l'enzyme nitrogénase, est :



Dans l'environnement, l'azote ammoniacal se présente sous deux formes en équilibre : l'ammoniac (NH_3), qui est toxique pour la vie aquatique, et l'ion NH_4^+ . Cet équilibre dépend grandement du pH de l'eau. Lorsque le pH est élevé, l'équilibre se déplace vers la forme NH_3 tandis que si le pH est neutre ou faible, il y a plutôt présence de NH_4^+ (Campbell & Reece, 2005).

Les cyanobactéries utilisent donc principalement la forme réduite de l'azote ammoniacale pour métaboliser des composés organiques tels les métabolites primaires essentiels à la cellule pour la croissance et la reproduction, et les métabolites secondaires (p. ex. les cyanotoxines) (Muro-Pastor et al., 2005). En présence de différentes formes d'azote, les formes réduites sont généralement préférées par les cyanobactéries, car le coût énergétique est moindre. Il n'y a pas d'enzyme réductase à utiliser, ce qui diminue le temps d'assimilation de l'azote en comparaison aux formes oxydées (p. ex. NO_2^- , NO_3^-) (Harris et al., 2016).

L'intensité lumineuse affecte l'assimilation de l'azote, grâce à l'activité photosynthétique. Hu et al. (2000) ont montré que le taux d'assimilation de NO_3^- augmente de manière proportionnelle avec l'augmentation de l'intensité lumineuse. De plus, lors de leurs essais, le taux d'assimilation de NO_3^- était maximisé lors de l'ajout de phosphore et de dioxyde de carbone CO_2 (en aérant l'eau), deux composés essentiels à la cellule. Ils ont également observé que le taux d'assimilation de NO_3^- était reliée directement avec le taux de croissance des cyanobactéries (Hu et al., 2000).

L'assimilation de l'azote dépend également de la présence de carbone (C) dans l'environnement de la cellule. Flores et Herrero (2005) ont déterminé qu'à des ratios élevés de C:N, davantage de perméases permettaient d'accroître l'assimilation des différentes formes d'azote. Par contre, à des ratios N:C élevés (lorsqu'il y a des hautes concentrations de NH_4^+), les perméases étaient

inhibées par la présence élevée de N ce qui limitait l'assimilation de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ (Flores & Herrero, 2005).

2.3 Impact de l'apport d'azote sur la production de cyanotoxines

L'augmentation de l'utilisation de fertilisants à base d'azote impacte les concentrations de nutriments azotés dans les plans d'eau. En effet lors d'évènements de pluie, l'eau ruisselle sur les surfaces agricoles et les fertilisants s'écoulent dans les cours d'eau avoisinants, altérant la qualité de l'eau. En 2007 aux États-Unis, des séries d'échantillonnages faits dans 1156 lacs ont permis d'établir un lien entre les concentrations de microcystines dans un plan d'eau et l'utilisation du territoire de son bassin versant (Beaver et al., 2014). La majorité (65,8 %) des lacs étudiés ayant une concentration de microcystine élevée ($\geq 1\mu\text{g/L}$) était localisée sur des territoires dédiés à une agriculture intensive telle que la culture du maïs ou la production de bétail. Le bassin versant de la baie Missisquoi (étudiée dans ce mémoire) est occupé à un tiers de zones agricoles desquelles la majorité se consacrent à la culture du maïs (Chouinard, 2015b). La baie Missisquoi est également sujette à l'éclosion de fleurs de cyanobactéries à chaque été. Ces dernières seraient liées à l'usage intensif de fertilisant pour l'agriculture, la cause principale de contamination en azote des cours d'eau (Chouinard, 2015a). L'effet de l'azote sur la production de cyanotoxines demeure controversé étant donné les conclusions mixtes parmi les études recensées, démontrant que d'amples études doivent être menées sur le sujet.

Le **Tableau 2.2** montre les conclusions d'études qui ont analysé l'impact de l'azote sur la production de cyanotoxines. Le tableau comporte quatre types d'étude : 1) mésocosmes *in situ*, 2) microcosme *in vitro*, 3) microcosme *in situ* et 4) pleine échelle. Chacune des études présentées ont utilisé de l'eau provenant de sources d'eau douce. Ceci est fait afin de pouvoir comparer ces études avec les résultats présentés dans ce mémoire qui sont basés sur des tests faits avec des cyanobactéries provenant de sources d'eau douce. Ce sont donc toutes des analyses de données prises sur le terrain.

Tableau 2.2 : Études sur l'impact de N sur la production de cyanotoxines par des cyanobactéries provenant de sources d'eau douce.

Type d'étude	Lac à l'étude (Pays)	Conclusions de l'étude	Commentaires des discussions de l'étude	Références
Mésocosme <i>in situ</i>	Réservoir Willow Creek, Oregon (États-Unis)	• Les concentrations de MC et le ratio TN:TP (azote total sur phosphore total) étaient reliés de manières inversement proportionnelles • L'ajout de NH_4^+ a diminué les concentrations de MC • Échantillonnage : hebdomadaire ou bimensuel, dans chaque mésocosme, sur une durée de 3 mois	• L'ajout d'azote peut d'abord augmenter les concentrations de MC, puis favoriser d'autre microorganismes (tels les algues vertes), diminuant au final les concentrations de toxines	(Harris et al., 2014)
	Lac Wascana, (Saskatchewan, Canada)	• L'ajout de N a augmenté la production de MC • L'ajout de NO_3^- et d'urée a augmenté de 10 à 13 fois les concentrations de microcystines (en fin août) • L'ajout de NH_4^+ a augmenté de 5 fois les concentrations de MC (en mi-septembre) • Temps de contact : 3 semaines	• L'apport de NH_4^+ a stimulé davantage la production de biomasse que les formes plus oxydés de N (NO_3^-) • L'urée et l'ammonium ont un avantage énergétique lors de l'assimilation d'azote par la cellule	(Donald et al., 2011) et (Finlay et al., 2010)

Tableau 2.2 (suite)

Type d'étude	Lac(s) à l'étude (Pays)	Conclusions de l'étude	Commentaires des discussions de l'étude	Références
Microcosme <i>in situ</i>	Fishery Bay, Lac Érié (Ontario, Canada)	• L'ajout d'urée a grandement augmenté les concentrations de microcystines comparé à l'ajout de NH_4^+ • La présence plus élevée de NH_4^+ et d'urée a augmenté le développement de certains gènes synthétase de MC • Temps de contact : 48 heures	• L'abondance de l'expression génétique d'inhibiteurs de protéase a augmenté suite à l'augmentation d'azote • Les inhibiteurs synthétisés en grandes quantité ont pu diminuer le broutage par le zooplancton, favorisant l'émergence des cyanobactéries	(Harke et al., 2016)
Microcosme <i>in vitro</i>	Baie de Sandusky, Lac Érié (Ontario, Canada)	• L'ajout de NH_4^+ en combinaison avec l'ajout de phosphore a augmenté significativement les concentrations de MC • Temps de contact : 48 heures	• La synthèse de MC pourrait générer de plus hautes demandes en azote par les cellules de <i>Microcystis</i> puisque les MC sont composés de plusieurs molécules azotées	(Davis et al., 2015)

Tableau 2.2 (suite)

Type d'étude	Lac(s) à l'étude (Pays)	Conclusions de l'étude	Commentaires des discussions de l'étude	Références
Pleine échelle <i>in situ</i>	Lac Supérieur et Lac Michigan (États-Unis)	- Les concentrations de MC sont corrélées positivement avec les concentrations de TN - Échantillonnage : ponctuel sur 21 sites sur 2 ans en saison estivale (2012-2013)	Les concentrations de MC variaient significativement entre les lacs, aux dates respectives étudiées et pouvaient être présentes même lorsque les blooms n'étaient pas visibles	(Fuller et al., 2017)
	Quatre Réservoirs: Cheney (Kansas, États-Unis), Eagle Creek, Gest et Morse (Indiana, États-Unis)	- Les concentrations de métabolites secondaires tels que les MC étaient plus élevées lorsqu'ils augmentaient l'apport d'azote sous forme d'azote ammoniacale - La concentration de métabolites secondaires était plus élevée lorsque le ratio TN:TP était plus faible - Échantillonnage: mensuel ou bimensuel sur 2 ans (été)	- L'augmentation de la concentration de NH_4^+ a favorisé la croissance des cyanobactéries et par le fait même, la production des métabolites secondaires - La différence de coût énergétique et de temps d'assimilation pour la cellule entre les formes d'azote a pu influencer la production de microcystine, un métabolite secondaire riche en azote	(Harris et al., 2016)

Tableau 2.2 (suite)

Type d'étude	Lac(s) à l'étude (Pays)	Conclusions de l'étude	Commentaires des discussions de l'étude	Références
Pleine échelle in situ	Lac Mendota (Wisconsin, États-Unis)	• Les concentrations de MC ont augmenté lorsque les concentrations de NH_4^+ étaient plus faibles. • Les concentrations de MC ont diminué lorsque les concentrations de NH_4^+ augmentaient. • Échantillonnage : Avril à octobre de 2009 à 2011	• Une diminution en NH_4^+ a créé un stress sur le lac qui est devenu limité en N, ce qui a pu déclencher la production de toxines. • Une augmentation de NH_4^+ (lié au renversement du lac causé par les changements de température de l'eau) a probablement induit un changement dans la communauté de cyanobactéries, favorisant les espèces non-toxiques	(Beverdors et al., 2015)

Tableau 2.2 (suite)

Type d'étude	Lac(s) à l'étude (Pays)	Conclusions de l'étude	Commentaires des discussions de l'étude	Références
Pleine échelle in situ	1156 lacs (États-Unis)	- De plus hautes concentrations de MC ont été observées dans des bassins versants à forte occupation agricole - Les concentrations de MC ont été corrélées avec des valeurs élevées de TN - Échantillonnage : Mai à septembre 2007	<i>Les conclusions mentionnées proviennent d'un rapport n'offrant pas de commentaires sur les données recueillies</i>	(Beaver et al., 2014)
	Petit-Lac-Saint-François, Lac Bromont, Lac Waterloo, (Québec, Canada)	- La présence de NH_4^+ a favorisé la concentration totale de MC - Échantillonnage : mensuel ou bimensuel pendant 6 mois	- La composition de cyanobactéries a été modifiée par les formes d'azote et leurs concentrations - Des concentrations élevées de N ont favorisé des espèces produisant des toxines, menant à des concentrations plus élevées de MC dans l'eau	(Monchamp et al., 2014)

Tableau 2.2 (suite)

Type d'étude	Lac(s) à l'étude (Pays)	Conclusions de l'étude	Commentaires des discussions de l'étude	Références
Pleine échelle in situ	2073 étendues d'eau (International)	- Les concentrations de MC sont réduites à des ratios TN:TP > 19.3 - Données de la méta-analyse: 5101 points analysés	L'augmentation des ratios TN:TP a avantagé les chlorophytes, des algues vertes non-toxiques, diminuant la dominance des cyanobactéries	(Harris et al., 2014)
	246 étendues d'eau douce (Canada)	- TN est l'indicateur le plus fort pour prédire les concentrations de MC dans les lac étudiés. - Les concentrations de MC sont les plus élevées lorsque TN:TP < 23.	Une biomasse de cyanobactéries élevées provoquait des concentrations de MC élevées	(Scott et al., 2013)
	246 étendues d'eau douce (Canada)	- Les concentrations de MC étaient faibles à des ratios TN:TP élevés. - Les concentrations de MC étaient plus élevées à des ratios TN:TP faibles - Données de la méta-analyse : 3474 points analysés (2001 à 2011)	- Les modulations dans les ratios N:P pourraient être des signaux pour les cyanobactéries pour produire des MC - De faibles ratios N:P pourraient être une conséquence des blooms plutôt qu'une cause	(Orihel et al., 2012)

2.3.1 L'apport en N peut diminuer la production de toxines

Les résultats de l'étude de mésocosme *in situ* de Harris et al. (2014) (**Tableau 2.2**) s'accordent avec une étude statistique menée par le même groupe de recherche de l'Université d'Idaho. Cette étude a analysé 5101 points de données provenant de 2073 lacs et réservoirs à travers le monde (Harris et al., 2014). Selon cette étude statistique, les concentrations de microcystines étaient les plus faibles à des ratios d'azote total et phosphore total (TN:TP) élevés ($TN:TP > 75$). Suite à cette observation, les chercheurs ont conseillé d'augmenter les concentrations de N ou de diminuer les concentrations de P pour réduire la production de microcystines dans les lacs et réservoirs. Leurs résultats concordaient avec ceux d'une autre méta-analyse menée avec des données datant de 2010 à 2011 au Canada. Dans cette étude, Orihel et al. (2012) ont démontré que plus le ratio TN:TP était élevé, moins les concentrations de microcystines étaient élevées.

Harris et al. (2014) ont démontré que l'apport de N favorisait la croissance de cyanobactéries non-toxiques et non-fixatrices d'azote. Dans leurs expériences, l'ajout de N a augmenté les concentrations de microcystines sur une courte période de temps, mais au long terme les cyanobactéries produisant ces microcystines n'ont pas survécu. Des souches non-toxiques ont alors pris le dessus dans la composition algale.

2.3.2 L'apport en N peut favoriser la production de toxines

Néanmoins, d'autres études ont montré que l'ajout de différentes formes de N peut augmenter la production de cyanotoxines. Dans une étude sur 12 lacs ($n=19$) d'eau douce aux Pays-Bas, Van de Waal et al. (2009) ont démontré que la production de variantes de microcystines riches en N (p. ex. MC-RR) augmentait lorsque N était abondamment disponible. De plus, l'assimilation de l'azote chez les cyanobactéries se faisait dans la cellule par le facteur de transcription NtcA (Flores & Herrero, 2005). Ce facteurs de transcription régulait également la production de microcystines (Ginn et al., 2010; Van De Waal et al., 2009). Le facteur commun (NtcA) entre ces deux activités cellulaires montrait que l'apport de N pouvait augmenter la production de certaines cyanotoxines. Une étude de Ginn et al. (2010) a en effet conclu que l'apport d'azote avait augmenté la transcription du gène *ntcA* menant à la conclusion que l'apport d'azote influencerait la production de microcystines.

Dans une étude de mésocosmes *in situ*, Donald et al. (2011) ont démontré que l'ajout de formes réduites de N, telles que NH_4^+ et l'urée, avait favorisé la dominance de cyanobactéries toxiques non-hétérocystes (p. ex. *Microcystis*). Ces souches produisant des toxines telles que les microcystines, les concentrations de microcystines observées étaient 5 fois plus élevées que dans les mésocosmes de contrôle, où il n'y avait aucun ajout d'azote.

2.4 Influence d'autres facteurs sur la production de toxines

L'augmentation du temps d'ensoleillement en été et subséquemment l'augmentation de la température de l'eau favorisent la croissance des cyanobactéries (Chorus & Bartram, 1999). Il a été démontré que l'augmentation de la biomasse des cyanobactéries peut causer une augmentation des concentrations de cyanotoxines, notamment pour l'espèce *Microcystis* (Orihel et al., 2013; Wood et al., 2012). De plus, les concentrations de cyanotoxines tendent à diminuer lorsqu'il y a une faible intensité lumineuse (Kaebernick & Neilan, 2001). Les conditions de croissance optimales varient cependant d'une espèce à l'autre (Chorus & Bartram, 1999). Par exemple, l'espèce *Planktothrix* croît à des températures et intensités lumineuses plus faibles que d'autres espèces (Dokulil & Teubner, 2000; Kokociński et al., 2010). L'apport de phosphore est aussi globalement reconnu pour causer l'eutrophisation des lacs puisque c'est un nutriment (tout comme N) qui favorise la croissance algale. Une concentration élevée de phosphore a été directement liée à l'augmentation de la formation de blooms et de production de toxines de plusieurs espèces de cyanobactéries (Boopathi & Ki, 2014).

Les facteurs mentionnés dans cette sous-section ne sont pas considérés dans cette étude, car notre recherche porte seulement sur l'impact de nutriments azotés sur la production de cyanotoxines.

2.5 Génomique

La génomique regroupe les analyses des génomes (ou l'ensemble des gènes formant l'acide désoxyribonucléique (ADN)) des organismes vivants (Campbell & Reece, 2005). Le génome contient par conséquent l'information nécessaire pour la totalité des fonctions de l'organisme, le génome contient aussi tous les gènes de l'organisme. La disposition et la séquence des bases (A, T, G et C) composent chacun de ces gènes. Grâce à des logiciels informatiques, les bio-

informaticiens classent ces gènes selon leurs séquences de bases grâce à celles déjà annotées avec des fonctions cellulaires précises. L'ensemble de ces informations est classé dans des banques de données. Déterminer le génome permet donc d'identifier des gènes associés à des fonctions et de déterminer l'organisme auquel ils appartiennent.

La métagénomique permet d'étudier le métagénome, ou l'ensemble des gènes présents dans un échantillon donné (Zhaurova, 2008) qui est composé de divers microorganismes. Le métagénome comporte donc les gènes d'espèces différentes présentes dans un échantillon, contrairement au génome qui inclut l'information génétique d'un seul organisme. La métagénomique permet donc de déterminer plusieurs des espèces présentes dans des échantillons environnementaux, grâce à des analyses qui comparent les gènes des échantillons aux gènes dans les banques de données existantes.

Notre étude porte sur les gènes qui sont responsables de la synthèse de toxines chez les cyanobactéries. L'analyse des échantillons d'eau recueillis permet, à travers diverses techniques (voir section 3.3.2 pour d'amples détails), de mesurer les concentrations de gènes présents. Les concentrations des gènes liés à la production de toxines ont le potentiel de devenir des indicateurs d'un bloom toxique et sont donc importants à étudier et à mesurer dans les sources d'eau potable.

2.5.1 Gènes liés à la production de toxines chez les cyanobactéries

Faire une revue de l'ensemble des gènes liés aux cyanotoxines sort du contexte de ce mémoire. Ainsi, seuls certains gènes sont ciblés dans cette revue littéraire.

Une famille de gènes liés à la biosynthèse de la toxine microcystine se nomme *mcy* et est généralement composé de dix gènes (*mcyA*, *mcyB*, *mcyC*, jusqu'à *mcyJ*) (Tillett et al., 2000). Les microcystines ont une forme cyclique d'heptapeptide (sept acides aminés) et il existe plusieurs structures de microcystines dépendant des variantes d'acides aminés. La plus connue est Microcystine-LR (**Figure 2.3**) qui inclue les acides aminés leucine (L) et arginine (R) (Kurmayer & Christiansen, 2009).

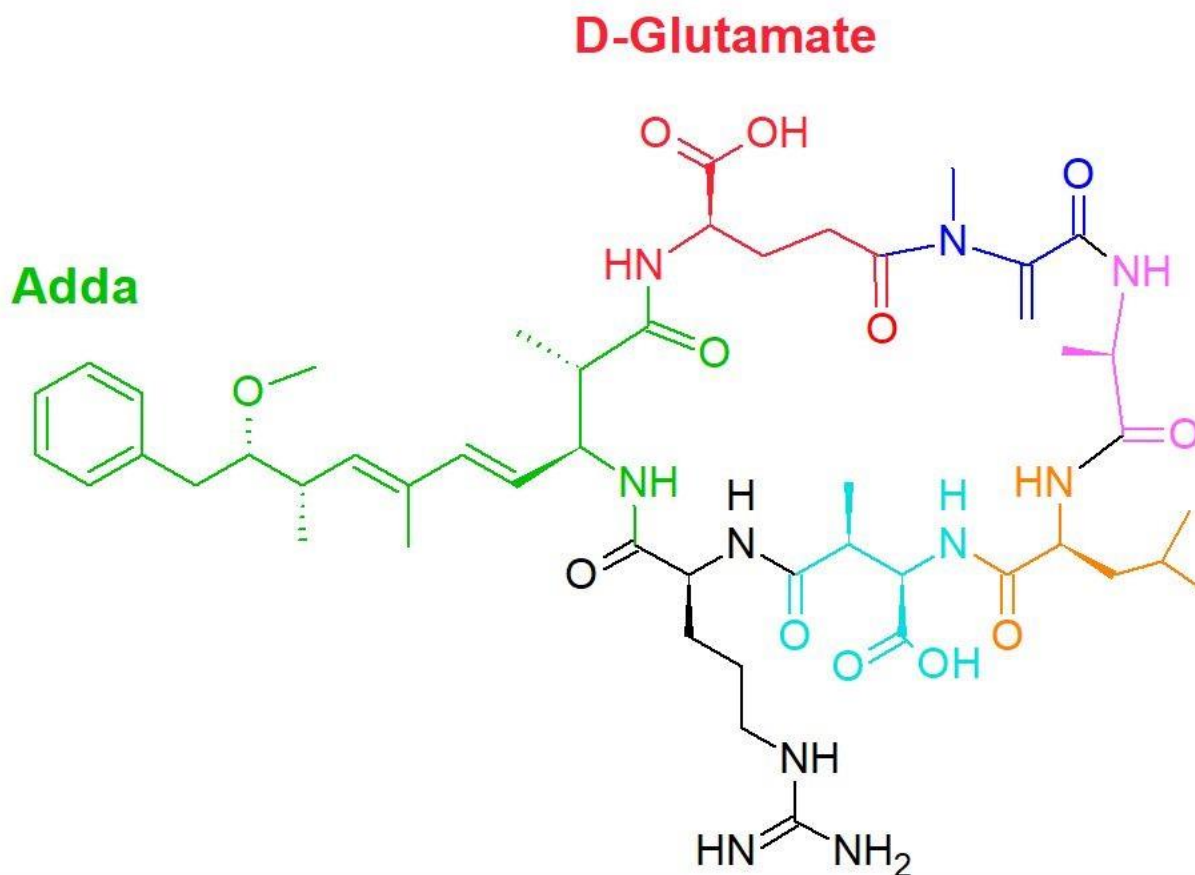


Figure 2.3 : Structure de la cyanotoxine microcystine-LR (MC-LR) avec en vert le groupe Adda et en rouge l'acide aminé D-Glutamate liés à la toxicité de la molécule. Figure dessinée à partir du logiciel ChemSketch, adaptée de Neumann et al. (2016).

Les gènes *mcyD* et *mcyE* présentés au **Tableau 2.3** sont responsables de la production de la toxine microcystine, la plus connue et la plus étudiée. Le gène *ntcA* peut s'exprimer dans toutes les espèces de cyanobactéries.

Tableau 2.3 : Fonctions des gènes *mcyD*, *mcyE* et *ntcA* liés au caractère toxique des cyanotoxines.

Gènes	Fonction(s) principale(s)	Référence
<i>mcyD</i>	Participe à la synthèse du groupe Adda présent dans les microcystines (Figure 2.3). L'acide aminé Adda est caractéristique de la toxicité des microcystines.	(Tillett et al., 2000)
<i>mcyE</i>	- Participe à l'activation du groupement amine D-Glutamate (D-Glu) nécessaire à la synthèse de microcystines (Figure 2.3). - Participe à la synthèse du groupe Adda présent dans les microcystines (Figure 2.3).	(Sielaff et al., 2003) (Tillett et al., 2000)
<i>ntcA</i>	- Régule la synthèse de microcystine. - Contrôle l'expression des gènes responsables de l'assimilation de l'azote dans la cellule de cyanobactérie.	(Scott et al., 2013) (Van De Waal et al., 2009) (Flores & Herrero, 2005)

Les rôles clés des gènes *mcyD* et *mcyE* dans la synthèse de microcystines toxiques sont indiqués dans le tableau 2.3, démontrant la pertinence de les analyser durant les expériences. En effet, leur présence dans les échantillons d'eau peut suggérer une production de microcystines par les cyanobactéries. Le groupe Adda (**Figure 2.3**) est présent dans toutes les variantes de microcystines et sa présence est responsable du caractère toxique de cette molécule (Campos & Vasconcelos, 2010).

Pacheco et al. (2016) ont fait une revue des articles publiés entre 2003 et 2015 qui associent les analyses quantifiant les gènes *mcy* et les concentrations de microcystines recensées. Ils ont trouvé une corrélation positive entre la quantité de microcystine mesurée et le nombre de copies de *mcyE* dans 80 % des études (Pacheco et al., 2016). Ceci suggère à croire que l'étude de l'abondance des gènes *mcyE* permettrait d'évaluer le potentiel toxique d'un échantillon.

Le rôle du facteur de transcription NtcA dans la production de cyanotoxines montre qu'il serait intéressant d'étudier la présence de ce gène dans les blooms toxiques. Ce facteur peut activer ou réprimer l'expression de gènes régulant l'assimilation de l'azote. Le facteur NtcA contrôlerait donc l'utilisation de l'azote chez les cyanobactéries, en plus de réguler la synthèse de microcystine dans la cellule (Flores & Herrero, 2005). Ginn et al. (2010) ont également indiqué que l'activateur transcriptionnel NtcA pourrait se fixer sur le promoteur des gènes *mcyD* et *mcyA*. Ainsi, puisque ce facteur contrôlerait également l'assimilation de l'azote dans les cyanobactéries, la transcription de gènes qui synthétisent les microcystines pourrait être régulée par l'apport d'azote (Ginn et al., 2010). Ils ont également observé que la transcription des gènes *ntcA* et *mcyB* augmente lorsque l'azote était en quantité limitée lors de leurs tests avec l'espèce *M. aeruginosa*.

Lindell et Post (2001) ont montré que le nombre de transcrits de *ntcA* avait diminué en présence de NH_4^+ lors de leurs expériences sur l'espèce *Synechococcus*, alors qu'en présence d'autres formes d'azote (tel NO_2^- et NO_3^-), la quantité de transcrits de *ntcA* avait augmenté. Ils ont aussi observé que l'augmentation de l'expression du gène *ntcA* était d'abord une réponse à un environnement limité en azote et qu'elle était amplifiée à des températures entre 18 à 25°C, une

condition généralement retrouvée en saison estivale où les blooms apparaissaient (Lindell & Post, 2001).

Le **Tableau 2.4** indique des plages de concentrations de gènes retrouvés dans divers lacs, ainsi que les concentrations de microcystines mesurées. Il est difficile de voir un rapport clair entre les ordres de grandeur des concentrations de gènes et de toxines, il n'est pas possible de conclure qu'à un nombre précis de gènes par millilitre d'eau, une concentration exacte de microcystines est attendue. Par contre, il est possible de voir que plus le nombre de gènes est élevé, plus il semble y avoir des concentrations de microcystines élevées.

Tableau 2.4: Plage de concentrations de nombre de copies de gènes *mcyE* de *Microcystis* et des concentrations de microcystines (MC) des études recensées.

Lacs étudiés et références		Plages des concentrations de gènes <i>mcyE</i> (copies/mL)	Plages des concentrations MC (µg/L)	Méthodes de quantification des MC
Baie Missisquoi (Ngwa et al., 2013)		min : < 1 max : ≈ 6440 moy 2010 : ≈ 287 moy 2011 : ≈ 895	MC totales : min : 0.01 max : 24.0 moy 2010 : 0.39 moy 2011 : 4.16	- Méthode immuno-enzymatique (ELISA), - Concentrations de MC présentées en équivalent de MC-LR
Lac Klamath (Eldridge et al., 2017)		min : <1.4 max : 47,000	MC intracellulaires : min : <0.1 max : 51.9 MC totales : min : 0.03 max : 53.7	- Méthode immuno-enzymatique (ELISA), - Concentrations de MC totales ont été mesurées indépendamment des congénères
Bassin versant Yahara, Wisconsin (Beversdorf et al., 2015)	Lac Mendota	moy : 50,000	MC totales : moy : 7.1	- Méthode de chromatographie liquide (LC) suivie de la méthode d'ES-MS (ou Electrospray-Mass Spectrometry) - Concentrations de MC présentées sont la somme des variantes : MC-LA, MC-LR, MC-RR et MC-YR
	Lac Monona	moy : 30,000	MC totales : moy : 10.7	
	Lac Kegonsa	moy : 95,000	MC totales : moy : 13.2	
	Lac Wingra	moy : 5,000	MC totales : moy : 3.4	

Les valeurs minimales, maximales et moyennes sont des valeurs estivales.

2.6 Objectif général de recherche

L'objectif général de notre recherche était de comparer l'impact de différentes sources d'azote sur la production de toxines des cyanobactéries provenant d'eaux douces naturelles (baie Missisquoi et Petit-Lac-Saint-François) à l'aide de mésocosmes.

2.7 Objectifs spécifiques de recherche

- 1) Conception, construction et installation de mésocosmes au Petit-Lac-Saint-François (en 2017) et à la baie Missisquoi (en 2018) où des nutriments azotés seront mélangés avec de l'eau contenant un bloom du lac en question.
- 2) Évaluer et comparer les effets de différentes formes d'azote (nitrite, nitrate, ammonium, urée) sur les biovolumes des cyanobactéries et les concentrations de cyanotoxines.
- 3) Déterminer si la production de cyanotoxines est liée à la présence de certains gènes toxiques.

2.8 Hypothèses

Hypothèses	Objectif spécifique	Rejet de l'hypothèse	Nouveauté
I. L'apport de nutriments azotés dans les mésocosmes devrait stimuler la prolifération des cyanobactéries.	#1	Cette hypothèse sera rejetée si l'ajout d'azote ne cause aucune augmentation dans les comptes taxonomiques des cyanobactéries.	Il est possible d'établir une relation entre les formes d'azote et la production de cyanotoxines et les concentrations de gènes toxiques dans les plans d'eau du Petit-Lac-Saint-François et de la baie Missisquoi, en utilisant des mésocosmes. Peu d'études ont considéré des effets à court terme simulant un apport soudain de nutriments (p. ex. les charges suivant un événement de pluie).
II. La prolifération des cyanobactéries devrait provoquer une augmentation de la production de cyanotoxines (si la/les souche(s) dominante(s) sont toxiques).	#1	Cette hypothèse sera rejetée si l'augmentation des biovolumes n'est pas liée à l'augmentation des concentrations de cyanotoxines.	
III. Les formes plus réduites d'azote devraient provoquer une augmentation plus accrue des concentrations de toxines et des concentrations de gènes toxiques.	#2	Cette hypothèse sera rejetée si les formes d'azote ont un toutes un comportement similaires sur les concentrations de toxines et de gènes toxiques.	
IV. La présence de gènes liés à la production de toxines sera plus élevée suite à l'augmentation des concentrations de cyanotoxines.	#3	Cette hypothèse sera rejetée si l'augmentation des concentrations de toxines ne corrèle pas avec les concentrations de gènes toxiques.	

CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE

Cette recherche fait partie du projet *Algal blooms, treatment, risk assessment, prediction and prevention through genomics* (ATRAPP), qui travaille depuis 2016 à développer des stratégies pour lutter contre les fleurs de cyanobactéries dans les plans d'eau. Les essais pour notre étude ont eu lieu dans deux lacs au Québec (Petit-Lac-Saint-François et baie Missisquoi) à la fin des étés de 2017 et 2018 au moment où les blooms étaient présents. Des mésocosmes ont été installés sur le bord de quais à environ 1 à 2 mètres de la berge dans des zones ensoleillées, afin d'évaluer l'ajout de différentes formes d'azote sur la production de toxines par les cyanobactéries. Pour ce faire, des échantillons ont été prélevés dans chaque mésocosme puis ils ont été analysés en laboratoire pour déterminer les concentrations de toxines, le nombre de copies de gènes liés à la toxine microcystine, les comptes taxonomiques ainsi que les concentrations de certains nutriments.

3.1 Sites d'échantillonnage

Les deux sites sélectionnés pour les événements d'échantillonnage étaient : la source d'approvisionnement en eau potable à la baie Missisquoi pour l'été 2018 et le lac récréatif Petit-Lac-Saint-François (PLSF) pour l'été 2017 (**Figure 3.1**) (Québec, Canada).

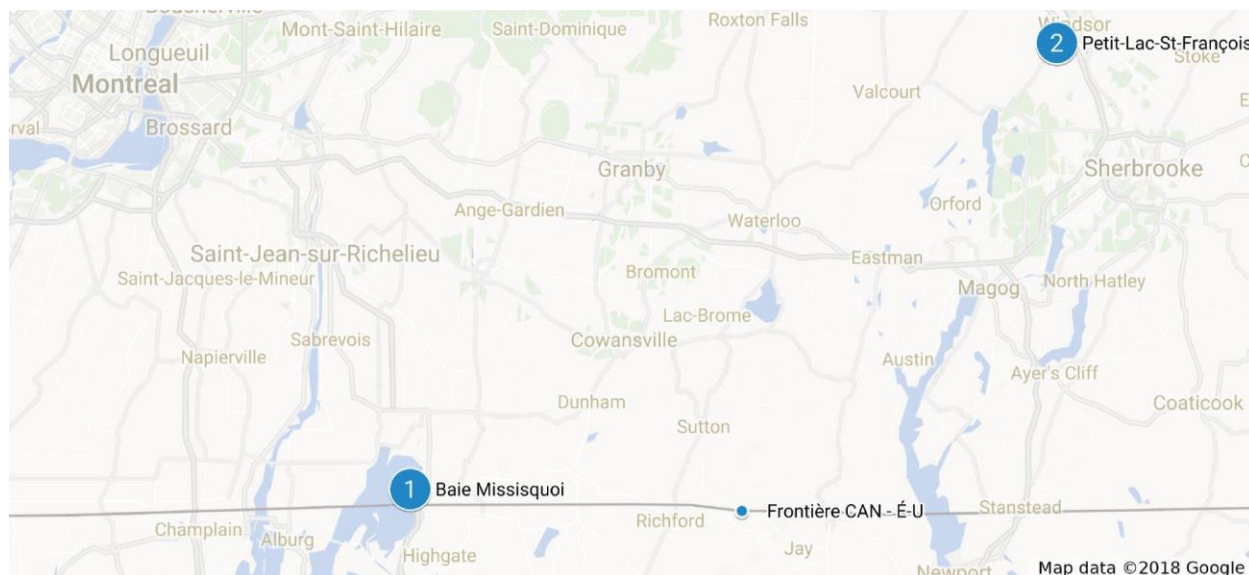


Figure 3.1 : Sites d'échantillonnage situés en Montérégie dans le Sud-Est du Québec. Image libre de droits.

Le lac PLSF a été choisi étant donné la présence de plusieurs blooms observés lors des dernières années. L'absence de blooms à la baie Missisquoi pour l'été 2017 a forcé le report des essais à 2018. Le secteur agricole étant important autour des deux étendues d'eau (**Tableau 3.1**), les charges en nutriment liées à l'utilisation de fertilisants ont pu augmenter dû au relargage lié à l'écoulement des eaux de surface vers les lacs. Les deux sites recevaient des charges de phosphore et d'azote favorisant la croissance de blooms de cyanobactéries. Le lac PLSF est classé hyper-eutrophe étant donné l'accumulation de fleurs d'algues et les concentrations élevées de phosphore, de chlorophylle-a, de carbone organique dissous (Monchamp et al., 2014). La baie Missisquoi est eutrophe considérant les mêmes facteurs (Chouinard, 2015b), démontrant l'importance d'étudier ces deux étendues d'eau. La faible profondeur de ces deux lacs (**Tableau 3.1**) peut également accélérer le processus d'eutrophisation étant donné le réchauffement plus rapide de la colonne d'eau.

Une description des deux plans d'eau étudiés est présentée au tableau 3.1. Pour la baie Missisquoi, les données considèrent les portions canadienne et américaine puisque le bassin versant s'étend sur les deux pays. Deux expériences ont été faites au PLSF (fin août et mi-septembre 2017) et trois ont été faites à la baie Missisquoi (fin juillet, mi-septembre et fin septembre 2018).

Tableau 3.1 : Description des sites d'échantillonnage

Lac		Baie Missisquoi	PLSF
Utilisation		Lac récréatif	Lac récréatif
		Source d'eau potable	
Profondeur maximale (m)		4,5	1,8
Superficie du lac (km²)		77,5	0,87
Superficie du bassin versant (km²)		3 101	19,5
Bassin	Zone agricole (%)	28	48
versant	Zone forestière (%)	63	23

3.2 Mésocosmes

Le design des mésocosmes utilisés pour les essais (voir **Figure 3.2**) était basé sur le concept développé par l'équipe de S.A. Wood en Nouvelle-Zélande (Wood et al., 2012). Chaque mésocosme était composé d'un sac transparent en polyéthylène de faible densité de 610 mm de profondeur et 508 mm de largeur. Les sacs étaient fixés à une bouée permettant d'assurer leur flottabilité. Les mésocosmes étaient ensuite attachés à un quai près de la berge de chaque lac dans une zone ensoleillée. La capacité d'un mésocosme était de 21 L d'eau.



Figure 3.2 : Exemple d’installation des mésocosmes à la baie Missisquoi en 2018.

Pour les essais conduits en 2017, l’eau du lac PLSF contenant le bloom était directement versée dans les mésocosmes, puis un échantillon d’eau (temps zéro) a été prélevé pour être analysé. En 2018, afin d’uniformiser les conditions, l’eau du lac a été préalablement récoltée dans un baril de 200 L et mélangée avec un bloom naturel pour ensuite être distribuée uniformément dans chacun des mésocosme. Des échantillons d’eau ont été prélevés dans chacun des mésocosmes après l’ajout de nutriments afin de pouvoir caractériser les conditions initiales.

Le **Tableau 3.2** présente les formes de nutriments azotés ajoutés dans des mésocosmes distincts pour chacun des sites. Les détails des essais qui ont été menés en 2017 et 2018 sont décrits dans le **Tableau 3.3**. Les nutriments mentionnés ont été ajoutés séparément aux mésocosmes, installés soit en duplicata ou en triplicata selon les ressources disponibles. Des mésocosmes de contrôle (sans nutriment ajouté) ont également été installés. L’ajout de différentes formes avait pour objectif d’augmenter le ratio TN:TP dans les mésocosmes afin de simuler l’apport d’une charge

élevée, mais réaliste d'azote, selon les données recueillies dans les références citées dans le tableau. Cet apport permettait de simuler un relargage dans le lac survenant suite au ruissellement lié à un événement de pluie important.

Tableau 3.2 : Concentrations de formes d'azote ajoutées dans les mésocosmes pour les lacs du PLSF et de la baie Missisquoi.

Concentrations ajoutées dans les mésocosmes					
Lac	Contrôle	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	Urée
PLSF	-	500 µg/L	500 µg/L	700 µg/L	-
Baie Missisquoi	-	-	-	700 µg/L	15 mg N/L
Références	-	(de Boutray, 2017)	(de Boutray, 2017)	(McCarthy et al., 2013)	(Finlay et al., 2010)

Tableau 3.3 : Liste des échantillonnages effectués en 2017 et 2018 et des nutriments utilisés pour chaque expérience.

Lac	Événements étudiés	Mésocosmes testés
PLSF	29 août 2017	Contrôle, NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺
	12 sept. 2017	Contrôle, NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺
Baie Missisquoi	31 juil. 2018	Contrôle, NH ₄ ⁺ , Urée
	10 sept. 2018	Contrôle, Urée
	24 sept. 2018	Contrôle, NH ₄ ⁺

La durée des essais était de 48 heures. Le choix de la durée correspondait au temps jugé réaliste pour assurer l'intégrité des mésocosmes. Durant les essais, les mésocosmes étaient exposés aux intempéries météorologiques telles que de forts vents, des vagues et des précipitations.

Suite à la période de contact de 48 heures, un échantillon de 2 L a été prélevé dans chaque mésocosme dans des bouteilles de polypropylène étanches et stérilisées. Durant le transport, les échantillons ont été conservés dans le noir, sur de la glace. La préparation et la filtration des échantillons récoltés a été faite la journée même aux laboratoires de Polytechnique Montréal.

3.3 Préparation des échantillons et analyses

Les analyses faites pour cette expérience ont été conduites dans des laboratoires externes (Tableau 3.4). Cette étude est inscrite dans le projet ATRAPP qui regroupe des équipes de chercheurs provenant de différentes universités et centres de recherche. Afin d'assurer l'uniformité des résultats de l'ensemble du projet ATRAPP, chaque analyse a été conduite avec le même protocole dans le même laboratoire. Les analyses ont porté sur la détermination des concentrations de cyanotoxines dans l'eau, à l'analyse de la génomique des échantillons, au décompte taxonomique et à l'analyse des concentrations des nutriments.

Tableau 3.4 : Liste des analyses et laboratoires impliqués

Type d'analyse	Laboratoire/Université	Personnes responsables
Analyses des cyanotoxines	Université de Montréal (UdeM)	Audrey Roy-Lachapelle Marie-France Morissette Tuc Quoc
Extraction d'ADN	Polytechnique Montréal	Hana Trigui
<i>Digital Droplet Polymerase Chain Reaction (ddPCR)</i>	Conseil national de recherches Canada (CNRC)	Nathalie Fortin
Comptes taxonomiques	Université du Québec à Montréal (UQAM)	Irina Moussikhina
Analyses des nutriments	Université de Montréal (UdeM)	Dominic Bélanger Martin Girard

Les échantillons prélevés nécessitant une filtration ont été filtrés par écoulement gravitaire sous vide avant de procéder à l'analyse des concentrations de toxines dans l'eau, à l'analyse de la génomique des échantillons et à l'analyse des concentrations de nutriments. L'échantillon d'eau a été passé à travers un filtre par écoulement gravitaire, à l'aide d'un système sous vide pour accélérer la filtration. Les caractéristiques des filtres utilisés sont présentés au **Tableau 3.5**. Aucune filtration n'était nécessaire pour l'analyse de la taxonomie des échantillons.

Tableau 3.5 : Caractéristiques des filtres utilisés lors des filtrations préliminaires

Analyses	Diamètre du filtre	Pores du filtre	Particules/microorganismes retenus sur le filtre
Analyse des cyanotoxines	47 mm (filtre GHP)	0,45 µm	Cyanobactéries, protozoaires, diatomées (microalgues)
Analyse génétique	47 mm	0,20 µm	Toutes les bactéries, cyanobactéries, protozoaires, diatomées (microalgues), virus, protéines, ADN et ARN (complets et incomplets)
Analyse des nutriments	47 mm (Filtre HPWP)	0,45 µm	Cyanobactéries, protozoaires, diatomées (microalgues)

Cette filtration préliminaire a permis de retenir sur les filtres les particules et microorganismes dont la taille était supérieure à celle des pores du filtre. Les filtres utilisés étaient perméables à l'eau et aux ions dissous. Pour l'analyse des cyanotoxines, la filtration a permis de retenir les cellules de cyanobactéries sur des filtres GHP afin de pouvoir mesurer les concentrations de toxines intracellulaires. Pour l'analyse de la génomique, des filtres ayant des pores plus petits (0,20 µm) ont été utilisés afin de pouvoir récolter toutes les espèces présentes dans l'échantillon. La filtration pour les échantillons d'analyse de nutriments ont permis de débarrasser le filtrat de particules pouvant interférer avec les tests, les filtres HPWP ont donc été jetés.

3.3.1 Analyse des cyanotoxines

La mesure des cyanotoxines intracellulaires et extracellulaires en $\mu\text{g/L}$ a été faite pour cette étude. Pour cette analyse, 120 ml d'eau échantillonnée ont été filtrés en duplicata sur des filtres de 47 mm de diamètre avec des pores de $0.45\ \mu\text{m}$ (**Tableau 3.5**). Les filtres ont été récupérés afin de mesurer les concentrations de toxines intracellulaires qui étaient présentes dans les cyanobactéries. Suite à la filtration préliminaire, les filtres et les filtrats ont été congelés à -25°C avant d'être envoyés à aux laboratoires de l'Université de Montréal pour êtres analysés. Les cyanobactéries retenues sur le filtre ont dû subir une lyse cellulaire pour extraire les cyanotoxines, à l'aide de cycles de gel-dégel. Les filtrats (ou liquide filtré) ont été récupérés pour mesurer les toxines extracellulaires, qui étaient sous forme dissoute.

Les concentrations de cyanotoxines ont été déterminées à l'aide de méthodes de chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse en tandem, ou CPL-SM/SM (aussi connue sous le nom anglais *LC-MS/MS*). La chromatographie liquide a permis de séparer les composants de l'échantillon avant de les insérer dans des spectromètres de masse en tandem. La spectrométrie de masse a ensuite fourni le spectre des ions contenus selon leurs masses respectives, permettant d'identifier et de quantifier les composants dans les échantillons testés. Ces deux méthodes combinées ont permis de déterminer avec précision quelles toxines étaient présentes dans les échantillons et de les quantifier selon les travaux de Munoz et al. (2017) et Fayad et al. (2015).

Les laboratoires de l'Université de Montréal qui ont effectués les analyses sont conformes aux normes établies par le ISO 17025 qui assurent des résultats fiables pour la calibration des tests en laboratoire (CAEAL, 2002) et les limites de détection (LOD) ont été déterminées à chaque jour d'analyse. Les LOD représentent la concentration de toxines la plus faible pouvant être mesurée lors des analyses et elles ont été déterminées selon les méthodes décrites par Munoz et al. (2017) et Fayad et al. (2015).

Une autre technique couramment utilisée pour détecter la présence de toxines est la méthode immuno-enzymatique ELISA. La méthode ELISA permet de cibler différentes molécules (p. ex. le groupement Adda, voir Figure 2.3) pour détecter la présence de différentes cyanotoxines et les quantifier. En ciblant diverses molécules et/ou acides aminés, il est possible de détecter

différentes variantes des toxines. Bien que l'utilisation de kits ELISA soit moins dispendieuse que l'équipement nécessaire à la méthode CPL-SM/SM, la méthode ELISA peut être moins précise. La méthode utilisant des kits ELISA se sert d'anticorps réagissant aux différentes toxines, mais des réactions peuvent survenir avec des composés ayant des structures moléculaires semblables. Ainsi, une étude par Guo et al. (2017) a comparé les deux méthodes pour la mesure de différentes variantes de microcystines dans des sources d'eau potable et dans l'effluent d'usine de traitement d'eau potable suite à un procédé d'oxydation (pour tester de fortes et de faibles concentrations). Ils ont mesuré une variation de $\pm 25\%$ lors de la quantification des résultats avec la méthode ELISA et font une mise en garde pour la présence de faux-positifs (Guo et al., 2017).

Bien qu'il serait intéressant d'utiliser une deuxième méthode pour supporter les résultats de la méthode par CPL-SM/SM, celle-ci permet de détecter et de quantifier précisément les cyanotoxines des échantillons pris dans les sources d'eau pour nos expériences.

3.3.2 Analyse génétique

Les concentrations du nombre de copies de gènes toxiques par ml dans les échantillons ont été mesurés afin de déterminer le potentiel de toxicité des cyanobactéries. Pour ce faire, les échantillons ont été filtrés en triplicata sur des filtres de 47 mm de diamètre avec des pores de 0.2 μm (**Tableau 3.5**). Les filtres récupérés ont été préservés à -80°C . L'extraction de l'ADN total a été faite dans les laboratoires de Polytechnique Montréal en utilisant le kit de QIAGEN *RNeasy PowerWater Kit*, utile pour les eaux chargées comme celle d'un bloom de cyanobactéries. Par la suite, les échantillons extraits ont été envoyés au laboratoire du CNRC pour être analysés en utilisant la méthode numérique de réaction de polymérisation en chaîne (*Digital Droplet Polymerase Chain Reaction* (ddPCR)).

La méthode ddPCR a permis de diviser l'échantillon en gouttes (*droplets*) qui ont ensuite été placées dans un thermocycleur (machine créant la réaction de PCR) pour amplifier l'ADN, puis chaque goutte a été lue par le lecteur. Les gouttes émettant une fluorescence étaient celles qui contenaient l'ADN ciblé par les amorces sélectionnées. Les amorces permettent la synthèse de molécules d'ADN. Les amorces utilisées pour cette étude ciblaient les gènes *mcyD* et *mcyE* (puisque ceux-ci sont impliqués dans la synthèse de microcystines) (**Tableau 2.3**). Les gènes

présents dans l'échantillon ont donc pu être quantifié précisément (Te et al., 2015). Cette analyse a permis d'obtenir les concentrations de ces gènes dans chaque échantillon en nombre de copies de gènes par ml d'eau.

La réaction de polymérisation en chaîne quantitative (*Quantitative PCR* (qPCR)) est une technique souvent utilisée pour mesurer les quantités d'ADN puisqu'elle permet de faire l'amplification de l'ADN en temps réel (Biosistemika, 2017). Cependant la méthode ddPCR a été choisi pour faire les analyses dans notre étude puisqu'elle offre moins de variabilité que le qPCR, permettant davantage de précision pour des échantillons ayant des concentrations plus faibles de l'ADN ciblé (Taylor et al., 2017). L'utilisation de la méthode qPCR pour comparer les résultats avec ceux de la méthode ddPCR serait intéressante pour les études futures, mais n'a pas pu être faite étant donné les ressources choisies par le CNRC dans le cadre de ce projet.

3.3.3 Analyse de la taxonomie

Des échantillons de 50 mL ont été pris dans chaque mésocosme puis ont été préservés avec du Lugol (concentration finale de 0.1% à 0.5% ou jusqu'à une teinte ambrée-pâle de l'échantillon) avant d'être envoyés aux laboratoires de l'Université du Québec à Montréal. Les comptes taxonomiques ont ensuite été basés sur la méthode par microscopie inverse développée par Utermohl (Lund et al., 1958).

Une incertitude sur les comptes taxonomiques est inévitable avec cette méthode impliquant une personne qui recense et compte directement les espèces à l'aide d'un microscope. Dans cette étude, les comptes taxonomiques ont toujours été faits par la même personne avec la même méthode, l'erreur associée est donc demeurée uniforme sur l'ensemble des échantillons.

3.3.4 Analyse des nutriments

Les concentrations des nutriments présents dans les échantillons ont été analysées à partir des filtrats obtenus suite à la filtration sur un filtre GHP (polypropylène hydrophile) avec des pores de 0.45 µm. Le **Tableau 3.6** résume les analyses qui ont nécessité une filtration et la température de conservation des échantillons avant la livraison aux laboratoires de l'Université de Montréal.

Pour l'analyse de l'azote total (TN), du phosphore total (TP), de l'azote dissous (DN) et du phosphore dissous (DP), 68 µl d'acide sulfurique 96% (H₂SO₄) a été ajouté aux échantillons pour inhiber l'activité bactérienne.

Les analyses pour le phosphore ont été faites à l'aide de méthodes utilisant des analyses en flux micro-segmenté afin de déterminer les concentrations en µg P/L par colorimétrie. Les concentrations de composés azotés ont été déterminées µg N/L en suivant la méthode développée par la compagnie *Lachat Instruments* pour la technique de *flow injection analysis* (FIA) (L. Instruments, 2003). Les concentrations de carbone organique total (COT) et de carbone organique dissous (COD) ont été mesurées par un procédé d'oxydation en milieu liquide qui utilise des températures et pressions élevées pour oxyder la matière organique dans les échantillons d'eau et en déterminer la concentration en mg C/L par spectroscopie infrarouge.

Tableau 3.6 : Caractéristiques des échantillons des nutriments analysés.

Analyses	Filtration, 0.45 µm	Entreposage
TN et TP	Non	4°C
DN et DP	Oui	4°C
NO₂⁻/NO₃⁻ et azote ammoniacal	Oui	-20°C
COT	Non	4°C
COD	Oui	4°C

CHAPITRE 4 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les essais ont été faits dans deux plans d'eau sur deux saisons. Deux séries d'essais ont été conduites en 2017 au PLSF. Trois séries de tests ont été faits à la baie Missisquoi en 2018. Les résultats des analyses des concentrations de nutriments et de cyanotoxines, des comptes taxonomiques sont présentés dans cette section. Les résultats pour les concentrations de gènes toxiques sont disponibles pour les essais du 29-31 août 2017. Des analyses statistiques sont également présentées à la section 4.5.

L'ensemble des analyses pour notre recherche au sein du projet ATRAPP n'était pas complété pour l'année 2018 lors de la rédaction. Le **Tableau 4.1** présente les analyses complétées lors de la rédaction et les résultats à venir après la rédaction de ce mémoire.

Tableau 4.1 : Résumé de l'état de complétion des analyses pour les essais de 2017 et 2018

Analyses	Complétées		Semi complétées		Résultats à venir	
	Essais 2017	Essais 2018	Essais 2017	Essais 2018	Essais 2017	Essais 2018
Cyanotoxines	✓			✓		✓
Génomique	✓					✓
Taxonomie	✓	✓				
Nutriments	✓	✓				

4.1 Nutriments

4.1.1 Essais au PLSF

Les résultats de TN et TP pour les tests du 29-31 août 2017 au PLSF sont indiqués dans la **Figure 4.1** pour les échantillons pris 48 heures après l'injection des nutriments (T48). Cet essai comportait des mésocosmes incluant l'ajout de nitrate, de nitrite et d'ammonium ainsi que des mésocosmes de contrôle.

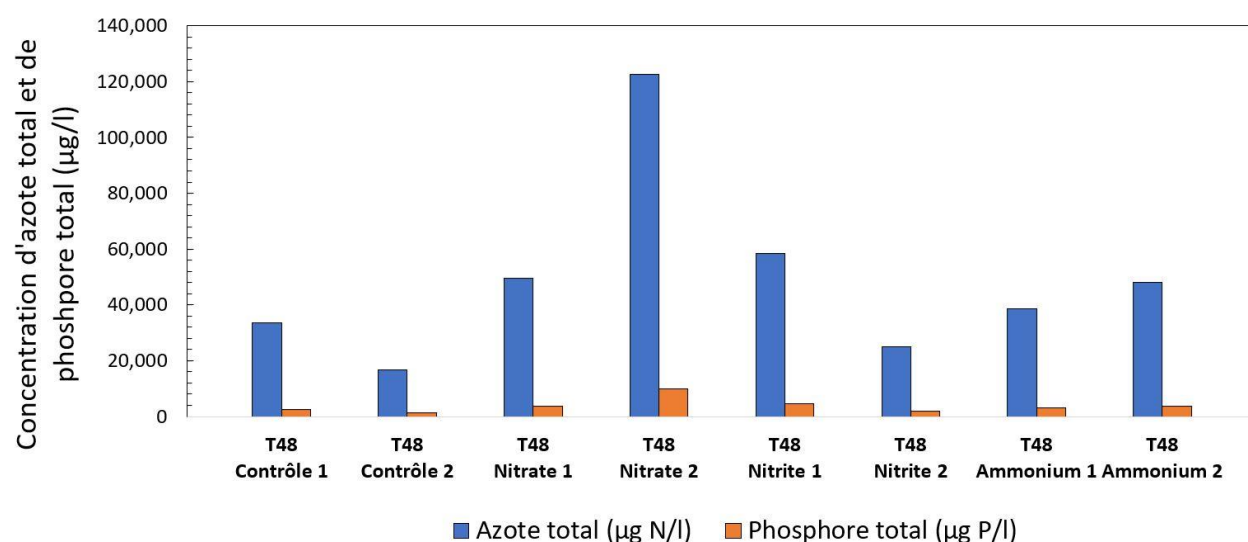


Figure 4.1 : PLSF 31 août 2017 - Concentrations d'azote total (µg N/L) et de phosphore total (µg P/L) dans chaque mésocosme à T48.

Les résultats des concentrations de nutriments pour les essais en fin août 2017 ont été interprétés grâce à une analyse des composantes principales (voir section 4.5.2) afin de mieux discerner les similitudes et variations entre les données, étant donné l'absence d'informations sur les concentrations au début des expériences. Pour améliorer la méthode, lors des essais de 2018, des échantillons ont été pris au temps zéro de l'expérience (T0).

Lors des essais du 12 au 14 septembre 2017 au PLSF, les mêmes mésocosmes que les tests du 29-31 août 2017 ont été installés (contrôle, nitrite, nitrate et ammonium). Ces essais ont montré des résultats de concentrations de nutriments et de toxines plutôt uniformes à travers les mésocosmes (voir Annexes A et C). Ceci suggère qu'il y a pu avoir une dilution probablement due aux vagues qui sont entrées dans les mésocosmes. Pour cette raison les données ne sont pas utilisées dans les analyses et les figures.

Les données climatiques recensées par le ministère de l'environnement et des changements climatiques du Canada (ECCC) durant les 48 heures de ce test ont montré des vents de 19 km/h à une station à proximité du lac (ECCC, 2018). Il est donc possible qu'il y ait eu des échanges d'eau entre le lac et les mésocosmes dû aux vagues. Ces résultats ont démontré l'importance d'effectuer les essais lors de journées où le vent est limité, voire inexistant.

4.1.2 Essais à la baie Missisquoi

Les essais en 2018 ont été conduits en triplicata tel que mentionné dans la méthodologie. Les nutriments ont été analysés en duplicatas étant donné les ressources limitées, puis les toxines et les comptes taxonomiques ont été analysés en triplicatas. Les analyses génomiques n'étaient pas encore complétées lors de la rédaction de ce mémoire pour l'année 2018. À noter que les résultats pour les concentrations de nutriments dans les échantillons ne sont pas disponibles pour les essais du 24-26 septembre 2018 due à une perte d'échantillons hors de notre contrôle.

Pour les tests du 31 juillet au 2 août 2018, les concentrations d'azote total au début (T0) et à la fin des essais (après 48 heures, soit T48) sont présentées à la **Figure 4.2**. Les quantités de nutriments azotés ajoutées ont permis d'augmenter leurs concentrations à des valeurs élevées pour ce lac.

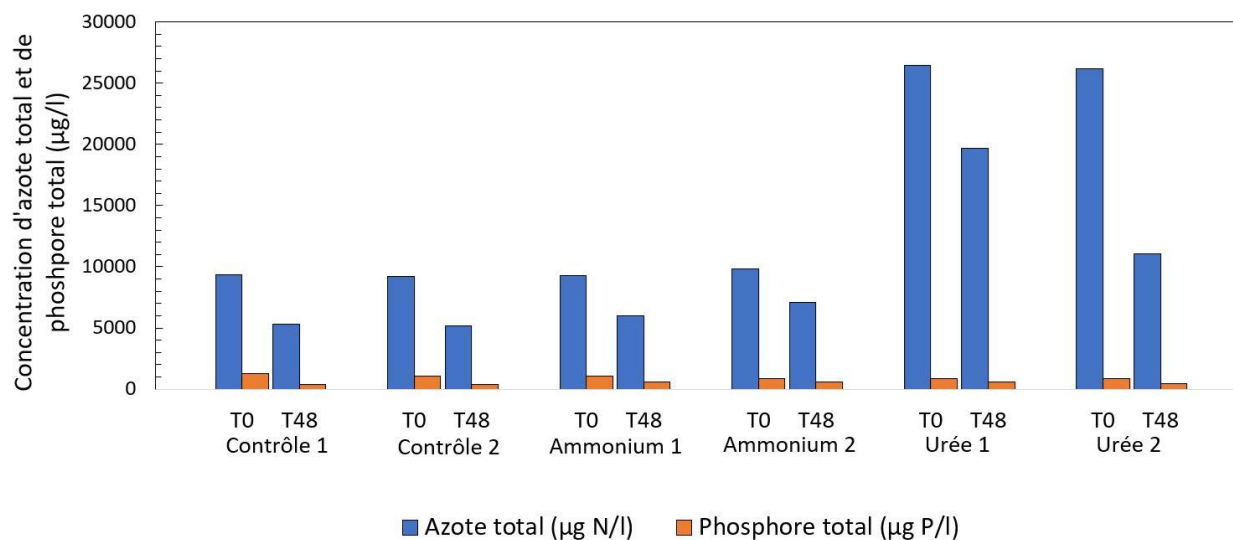


Figure 4.2 : Baie Missisquoi 31 juil.-2 août 2018 - Concentrations d'azote total ($\mu\text{g N/L}$) et de phosphore total ($\mu\text{g P/L}$) dans chaque mésocosme à T0 et T48.

On a constaté que les concentrations d'azote total déjà présentes dans l'eau du lac au début des expériences étaient très élevées (5000 à 10 000 $\mu\text{g N/L}$, tiré de l'Annexe D). Les concentrations d'azote total n'ont pas augmenté dans les mésocosmes avec ajout d'ammonium, étant donné la présence élevée de nitrites et nitrates (voir Annexe D) qui ont formé à eux seuls la majorité des concentrations d'azote total. Les concentrations d'azote ammoniacal étaient toutefois plus élevées dans ces mésocosmes, en comparaison avec les mésocosmes de contrôle. Il aurait été préférable d'avoir mesuré la teneur en azote total de l'eau du lac avant le début des expériences afin d'obtenir la quantité d'azote à rajouter.

Contrairement à l'injection d'urée, l'apport artificiel d'ammonium n'a pas permis d'augmenter de façon marquée les ratios TN:TP. Les concentrations de nutriments durant 48 heures ont diminué, montrant qu'il y a eu activité biologique par les microorganismes présents dans les mésocosmes.

Les essais du 10-12 septembre 2018 à la baie Missisquoi ont été faits afin de tester l'effet de l'ajout d'urée dans les mésocosmes. Des mésocosmes de contrôle ont également été installés. La **Figure 4.3** montre que l'ajout d'urée avait augmenté de façon marquée la concentration d'azote total dans les duplicatas, en comparaison avec les mésocosmes de contrôle.

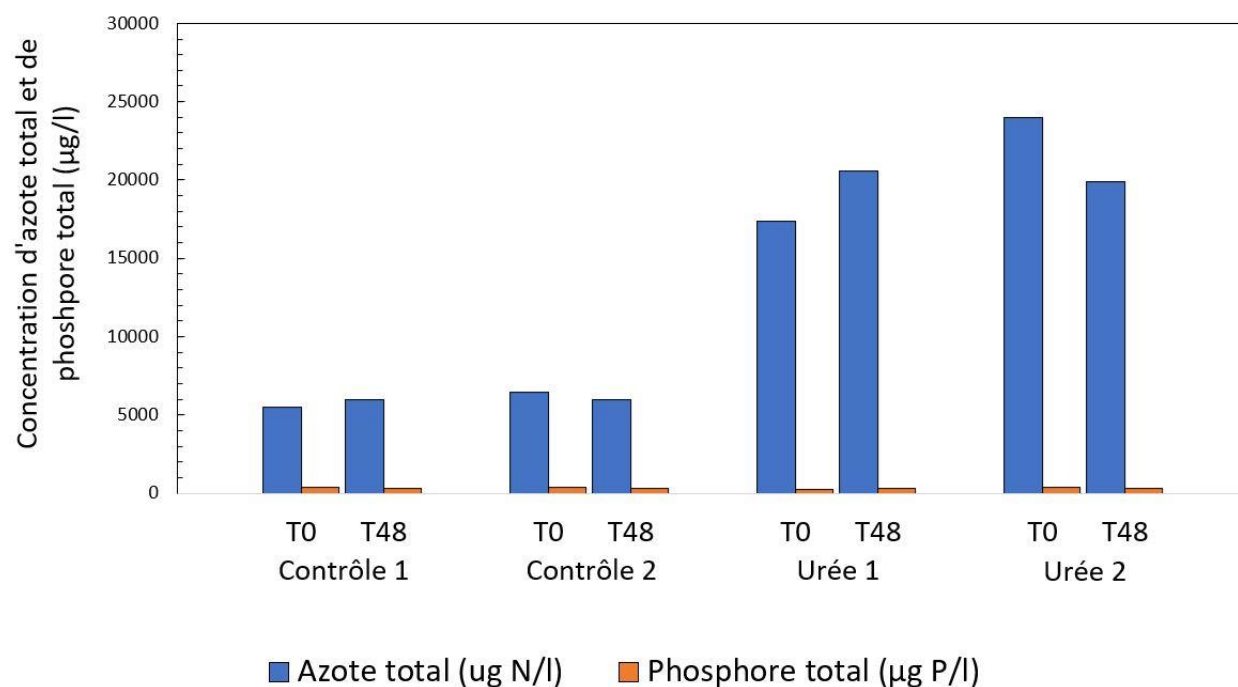


Figure 4.3 : Baie Missisquoi 10-12 sept. 2018 - Concentrations d'azote total ($\mu\text{g N/L}$) et de phosphore total ($\mu\text{g P/L}$) dans chaque mésocosme à T0 et T48.

Tout comme dans les essais du 31 juillet 2018, les concentrations de phosphore n'ont pas significativement changé entre le début et la fin des essais. Lors de la période de contact, les concentrations d'azote total ont diminué, démontrant une assimilation de l'azote par les organismes présents dans un des deux duplicatas de mésocosmes. Le manque de similitude entre les duplicatas montre encore l'importance de répéter les expériences plusieurs fois puisque les réactions ne semblent pas uniformes.

Les résultats ont pu être influencés par des changements chimiques et/ou biologiques au sein des échantillons. Des difficultés inhérentes au travail sur le terrain concernant la préservation des échantillons d'eau ont pu modifier les valeurs obtenues. L'activité biologique due aux microorganismes a pu créer des changements dans les cycles d'azote et de phosphore. Par exemple, les formes d'azote ont pu être réduites par des bactéries réductrices, et l'azote ammoniacal a pu être oxydée par d'autres bactéries pour former des nitrates avant la préservation des échantillons (suite à l'ajout d'acide ou à l'entreposage à 4°C, une température qui ne pouvait être 100 % garantie dans les glacières utilisées durant les étés chauds lors des essais).

4.2 Cyanotoxines

Les résultats pour les concentrations de toxines mesurées dans les échantillons sont complets pour les tests en 2017, mais incomplets encore pour les essais de 2018 lors de la rédaction de ce mémoire.

4.2.1 Essais au PLSF

Pour les essais du 29-31 août 2017 au PLSF, les résultats des concentrations de toxines sont montrés au **Tableau 4.2** (et plus en détails à l'Annexe A) au début de l'expérience (T0) et dans chaque mésocosme deux jours après que les nutriments ont été injectés (T48). Plusieurs valeurs étaient sous les limites de détection, c'est-à-dire que les concentrations étaient trop faibles pour être mesurées (voir section 3.3.1 pour plus de détails).

Tableau 4.2 : PLSF 29-31 août 2017 – Cyanotoxines dans chaque mésocosmes (en ng/L) à T0 et T48.

Mésocosmes	MC Totale intra ¹	Ana-a intra ²	Ana-a extra ³	CYN extra ⁴
T0	nd ⁵	nd	nd	nd
T48 Contrôle 1	27.25	<LOD	<LOD	<LOD
T48 Contrôle 2	23.23	<LOD	<LOD	63.53
T48 Nitrite 1	34.91	<LOD	<LOD	<LOD
T48 Nitrite 2	16.54	<LOD	<LOD	<LOD
T48 Nitrate 1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
T48 Nitrate 2	nd	nd	nd	nd
T48 Ammonium 1	36.08	<LOD	<LOD	<LOD
T48 Ammonium 2	11	<LOD	<LOD	16.1

1 : Microcystine totale intracellulaire

2 : Anatoxine-a intracellulaire

3 : Anatoxine-a extracellulaire

4 : Cylindrospermopsine extracellulaire

5 : non disponible

Les résultats du **Tableau 4.2** ne montrent pas que l'ajout des nutriments azotés aient eu un impact significatif sur les concentrations de toxines mesurées. Il ne semble pas y avoir eu de tendance et les concentrations étaient très faibles, suggérant la présence de fleurs de cyanobactéries non toxiques. Il est possible que des erreurs de manipulations aient fait en sorte qu'il n'y ait aucune toxine détectée sur les filtres et/ou dans les filtrats. Les valeurs non disponibles proviennent d'échantillons qui n'ont pas pu être utilisés lors des analyses (erreurs lors des essais ou des analyses, pertes d'échantillons, etc.).

Les concentrations de toxines mesurées lors des essais en 2017 au PLSF à la mi-septembre sont présentées au **Tableau 4.3** (et en détails à l'Annexe A).

Tableau 4.3 : PLSF 12-14 sept. 2017 – Cyanotoxines dans chaque mésocosmes (en ng/l) dans chaque mésocosme à T0 et T48.

Mésocosmes	MC Totale intra ¹	Ana-a intra ²	Ana-a extra ³	CYN extra ⁴
T0	nd ⁵	<LOD	<LOD	<LOD
T48 Contrôle 1	4.13	<LOD	<LOD	<LOD
T48 Contrôle 2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
T48 Nitrite 1	<LOD	<LOD	<LOD	4.73
T48 Nitrite 2	<LOD	<LOD	<LOD	3.67
T48 Nitrate 1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
T48 Nitrate 2	n/d	<LOD	<LOD	<LOD
T48 Ammonium 1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
T48 Ammonium 2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

1 : Microcystine totale intracellulaire

2 : Anatoxine-a intracellulaire

3 : Anatoxine-a extracellulaire

4 : Cylindrospermopsine extracellulaire

5 : non disponible

En 2017, au PLSF, les concentrations de microcystines intracellulaires mesurées (qui étaient plus élevée que la limite de détection) dans les mésocosmes ne concordaient pas avec les plages de concentrations attendues pour un bloom dit *toxique*. Les valeurs des tests du 29 août et du 12 septembre 2017 sont beaucoup moins élevées que les valeurs observées par Monchamp et al. (2014) qui ont trouvé des concentrations variant autour de 1.4 µg/l lors de leurs échantillonnages au PLSF en septembre 2011. Les concentrations moyennes de toxines n'ont pas dépassé les normes établies pour les usines de traitement d'eau potable (de 1,5 µg/l).

Lors des essais du 12 au 14 septembre 2017 au PLSF, les concentrations de toxines étaient soit très faibles ou sous la limite de détection. Les concentrations de nutriments pour ce test étaient également très uniformes (voir Annexe C), ce qui suggère qu'il y a eu des vagues qui sont entrées dans les mésocosmes étant donné qu'à proximité de l'emplacement des tests de forts vents ont été mesurés, d'environ 19 km/h (ECCC, 2018).

4.2.2 Essais à la baie Missisquoi

En 2018, des échantillons pris dans chacun des mésocosmes (aux temps T0 et T48) ont permis un suivi plus précis des variations des concentrations cyanotoxines qu'en 2017. Pour les essais du 31 juillet au 2 août 2018, les moyennes des concentrations de microcystine totale intracellulaires sont présentées à la **Figure 4.4**. Les barres d'erreur ont été ajoutées afin de présenter la variation entre les mésocosmes ayant subi le même traitement. L'ordre de grandeur des résultats était similaire aux résultats de l'échantillonnage par Ngwa et al. (2013) faites à la baie Missisquoi.

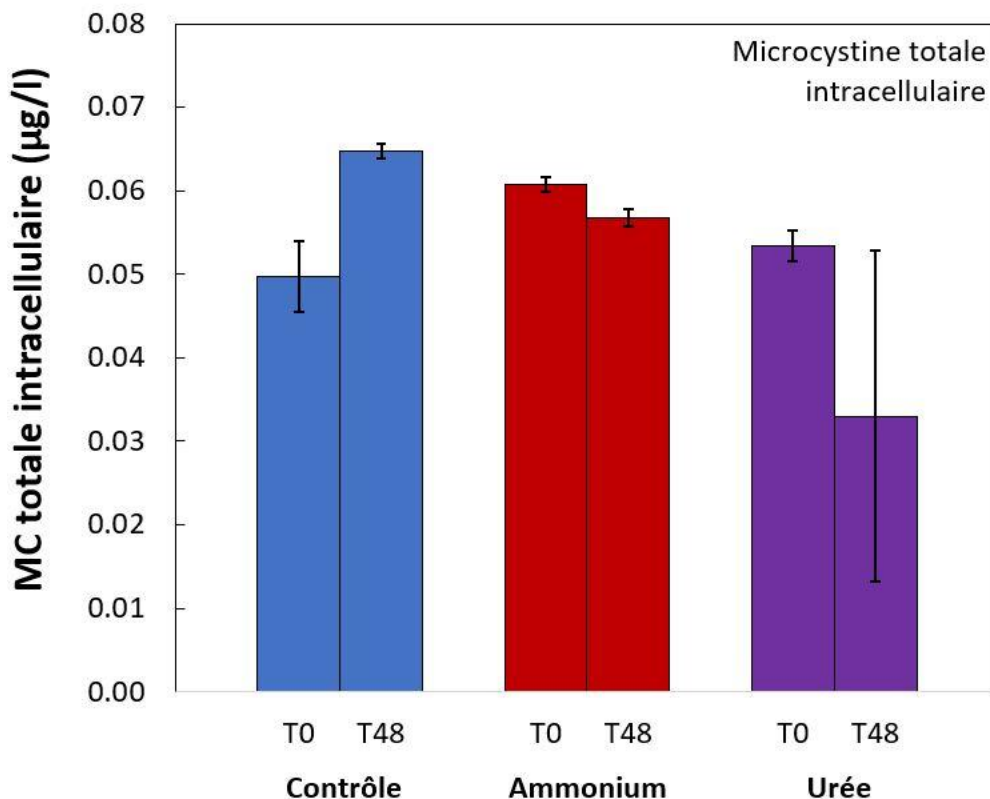


Figure 4.4 : Baie Missisquoi 31 juil.-2 août 2018 – Concentrations (µg/l) moyennes de microcystine totale intracellulaire à T0 et T48.

Les essais du 31 juillet 2018 ont montré une diminution de microcystine intracellulaire suite à l'ajout d'ammonium et d'urée. L'apport de ces nutriments aurait donc freiné la production de cette toxine, puisque dans les mésocosmes de contrôle, une augmentation de microcystine intracellulaire a été observée. De plus, des concentrations de toxines plus élevées ont montré que les blooms qui ont été étudiés pour les tests en 2018 à la baie Missisquoi étaient plus toxiques que ceux de 2017 au PLSF. Une augmentation des concentrations des microcystines totales extracellulaires (non disponibles lors de la rédaction du mémoire) pourrait confirmer que les toxines ont été sécrétées hors des cellules. Ceci pourrait alors expliquer les diminutions des concentrations observées à la **Figure 4.4**.

La **Figure 4.5** démontre, pour les essais du 10-12 septembre 2018, les concentrations de deux toxines extracellulaires qui ont été mesurées dans les mésocosmes : microcystine-LR et cylindrospermopsine.

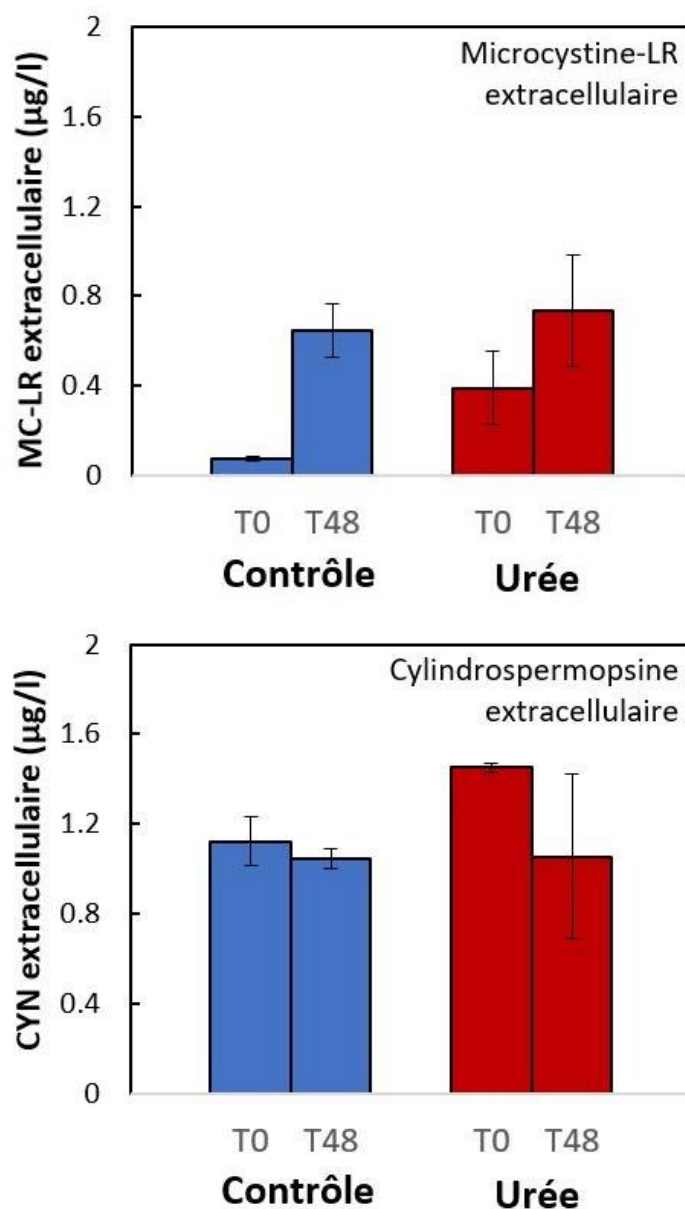


Figure 4.5 : Baie Missisquoi 10-12 sept. 2018 – Concentrations ($\mu\text{g/l}$) moyennes de microcystine-LR (MC-LR) et de cylindrospermopsine (CYN) extracellulaires à T0 et T48.

Lors des tests du 10 septembre 2018, l'ajout d'urée n'a pas augmenté les concentrations de MC-LR significativement en comparaison avec les résultats des tests de contrôle. L'ajout d'urée a été associé avec une baisse de la concentration de cylindrospermopsine extracellulaire après 48 heures.

Les concentrations de deux variantes de microcystine dans les échantillons prélevés lors des essais du 24-25-26 septembre 2018 sont présentées à la **Figure 4.6** : microcystine-RR (MC-RR) et microcystine-LR (MC-LR). Au temps T24, l'ajout d'ammonium a corrélé avec l'augmentation des concentrations de toxines MC-RR et MC-LR. Puis, les concentrations de toxines mesurées étaient plus faibles au temps T48.

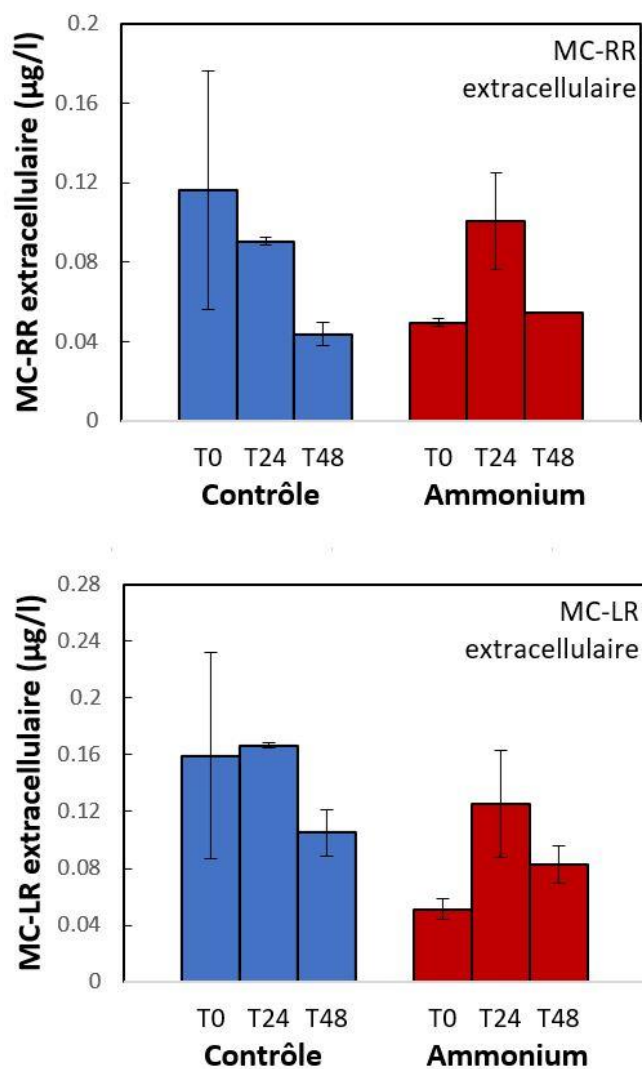


Figure 4.6 : Baie Missisquoi 24-25-26 sept. 2018 – Concentrations (µg/l) moyennes de microcystine-RR et -LR extracellulaires à T0, T24 et T48. L'écart-type sur la moyenne des concentrations de MC-RR du mésocosme avec ajout d'ammonium n'était pas disponible pour T48.

Les résultats des essais en 2018 ont montré que l'ajout d'urée a provoqué des diminutions plus importantes des concentrations de toxines au temps T48, lorsque comparé à l'ajout d'ammonium, après 48 heures. Des échantillons aux temps T0, T24 et T48, ont permis de voir une variation dans les concentrations de toxines mesurées, d'où l'intérêt de poursuivre cette méthode d'échantillonnage pour les tests futurs.

Similairement à nos résultats, Harris et al. (2014), dans leurs essais, ont observé une augmentation à court terme des concentrations de microcystine suite à l'ajout d'azote. Par contre, les cyanobactéries produisant cette toxine étaient au final désavantagées par l'augmentation du ratio TN:TP par-rapport aux autres microorganismes qui prenaient le dessus dans la communauté planctonique. Dans nos essais de 2018, les résultats des comptes taxonomiques n'ont pas montré de fortes augmentations des biovolumes de phytoplancton autre que les cyanobactéries (Annexe E). Il est donc possible que ce soit le zooplancton qui aurait eu un avantage compétitif suite à l'ajout d'azote dans les mésocosmes, notamment en se nourrissant du phytoplancton.

Il est probable que l'ajout de nutriments azotés ait stimulé la production des toxines chez les cyanobactéries (T24). L'ajout d'ammonium et d'urée dans les mésocosmes aurait pu donner un avantage compétitif à des microorganismes pouvant dégrader les cyanotoxines, justifiant la diminution des concentrations mesurées au temps T48. Plusieurs bactéries, telles certaines protéobactéries, ont en effet la capacité de dégrader ou d'assimiler les métabolites secondaires des cyanobactéries, dont les variantes de microcystines et la cylindrospermopsine extracellulaires mesurées dans nos échantillons (Kormas & Lympieropoulou, 2013). Certaines bactéries peuvent même dégrader des chaînes polypeptidiques, telles les microcystines, en moins de 12 heures (Kato et al., 2009). Ceci semble être la raison la plus probable pouvant expliquer le phénomène qui a été observée lors des essais. Les variations obtenues dans nos résultats ont montré la pertinence de prendre des échantillons à intervalles réguliers au cours de la durée de la période de contact avec les nutriments azotés.

Les valeurs pour les concentrations de toxines à travers les essais demeurent très faibles et les barres d'erreur sur les moyennes ne peuvent être négligées étant donné la variabilité observée entre les réplicas de mésocosmes ayant subis le même traitement. Les résultats obtenus pour les

tests de 2017 et 2018 sont donc à prendre sous réserve. Il est fortement recommandé d'augmenter le nombre de réplicas afin de mieux prendre en compte la variabilité observée et d'effectuer plusieurs séries d'essais à chaque saison d'échantillonnage.

4.3 Taxonomie

Les comptes taxonomiques sont présentés dans cette section sous forme d'abondance (en cellules/ml) et de biovolume (en mm^3/L). Les résultats ont permis d'évaluer comment ces deux mesures pouvaient changer les résultats de pourcentage des espèces présentes. Certaines espèces étaient présentes en grandes quantités (abondance plus élevée), d'autres avaient des cellules plus grandes qui influençaient le biovolume.

4.3.1 Essais au PLSF

Il a été démontré qu'une concentration élevée de cyanobactéries et la présence de fleurs d'eau pouvaient augmenter le potentiel de toxicité et par conséquent le risque à la santé humaine (Chorus & Bartram, 1999; Wood et al., 2012), d'où l'intérêt d'évaluer les comptes taxonomiques des cyanobactéries dans les plans d'eau.

La **Figure 4.7** et la **Figure 4.8** présentent les comptes taxonomiques des principales espèces présentes lors des essais du 29 au 31 août 2018 au PLSF. Les échantillons étaient majoritairement composés par une espèce en particulier. Donc les axes Y des figures ont été ajustés afin d'obtenir une meilleure vue d'ensemble de la diversité au sein des échantillons. La composition de chaque mésocosme est démontrée au début des expériences, immédiatement après l'injection de nutriments (T0) et 2 jours après (T48).

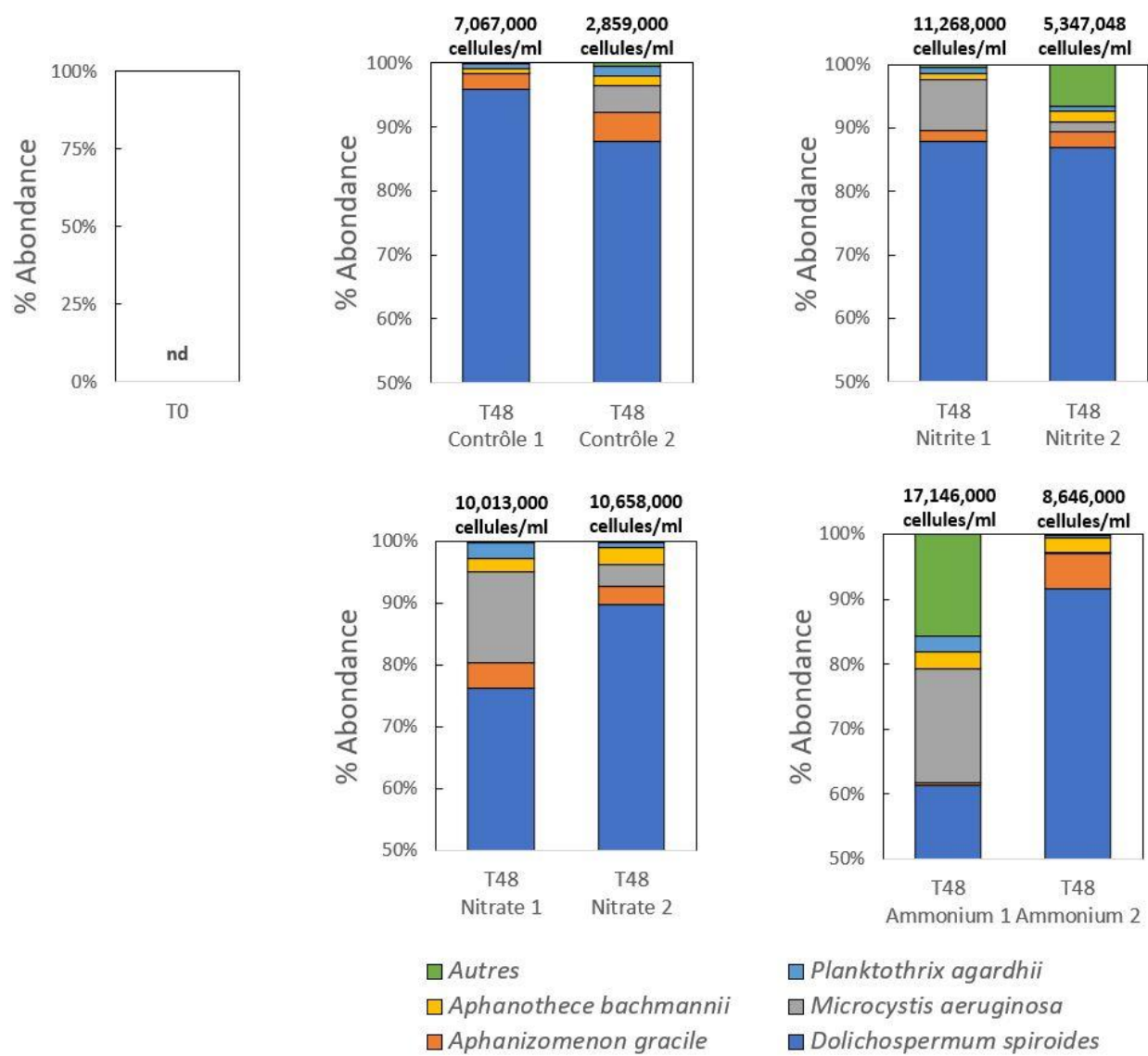


Figure 4.7 : PLSF 29-31 août 2017 – Abondance des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0 et T48. L'abondance totale de cyanobactéries dans chaque mésocosme est inscrite en haut de chaque barre (cellules/ml).

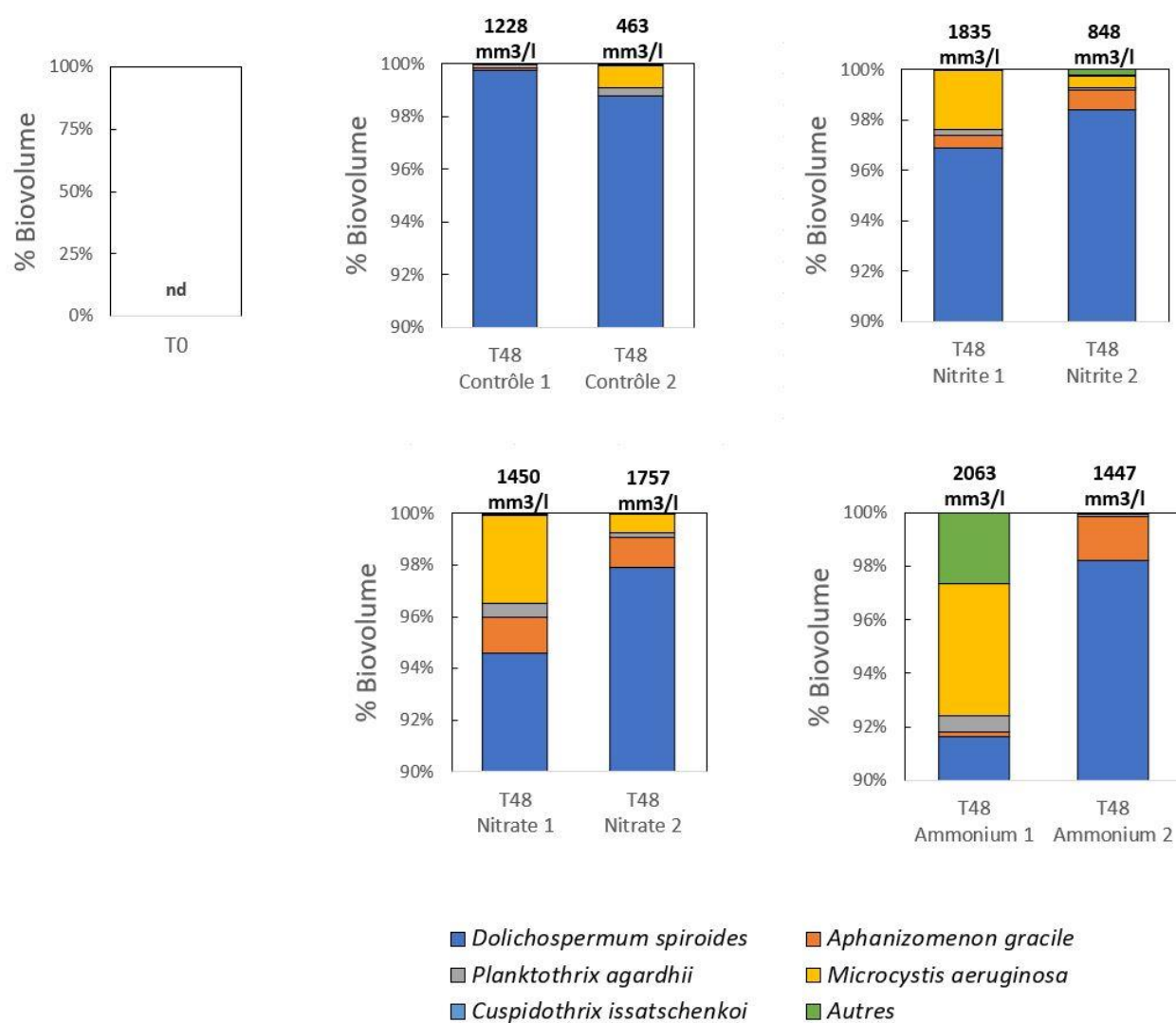


Figure 4.8 : PLSF 29-31 août 2017 – Biovolume des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0 et à T48. Le biovolume total de cyanobactéries de chaque mésocosme est inscrit en haut de chaque barre (mm3/l).

Dans cet essai, l'ajout d'ammonium a provoqué plus de croissance de cyanobactéries que l'ajout de nitrite ou de nitrate après 48 heures. L'espèce *D. spiroides* est celle qui se retrouvait en plus grande proportion dans chaque mésocosme (> 90% du biovolume total de cyanobactéries). L'abondance totale et le biovolume total des cyanobactéries ont augmenté lors de l'ajout des 3 différentes formes d'azote, en comparaison aux mésocosmes de contrôle, qui n'avaient eu aucun ajout d'azote. Les cellules auraient donc profité de l'apport de ces nutriments pour non seulement croître, mais pour se multiplier également. Les concentrations très élevées de cellules (2,9 à 17,1 x 10⁶ cellules/ml) dans les mésocosmes en fin août 2017 (**Figure 4.7**) montrent que ces tests ont été faits en présence de blooms importants, accompagnés d'une présence d'écume.

La **Figure 4.9** et la **Figure 4.10** montrent que lors des essais du 12 au 14 septembre 2017, les ajouts de nitrite et de nitrate ont avantage augmenté l'abondance et le biovolume en moyenne que l'ajout d'ammonium. Les espèces dominantes ont varié par-rapport à celles des essais en fin août 2017. Ceci peut s'expliquer par la succession d'espèces, puisque ce ne sont pas les mêmes espèces qui étaient présentes lors des deux mois d'échantillonnage. Tout comme les essais du 29-31 août 2017, les échantillons étaient composés par une espèce en majorité, et les axes Y des figures ont été ajustés pour mieux visualiser la diversité des espèces dans les échantillons.

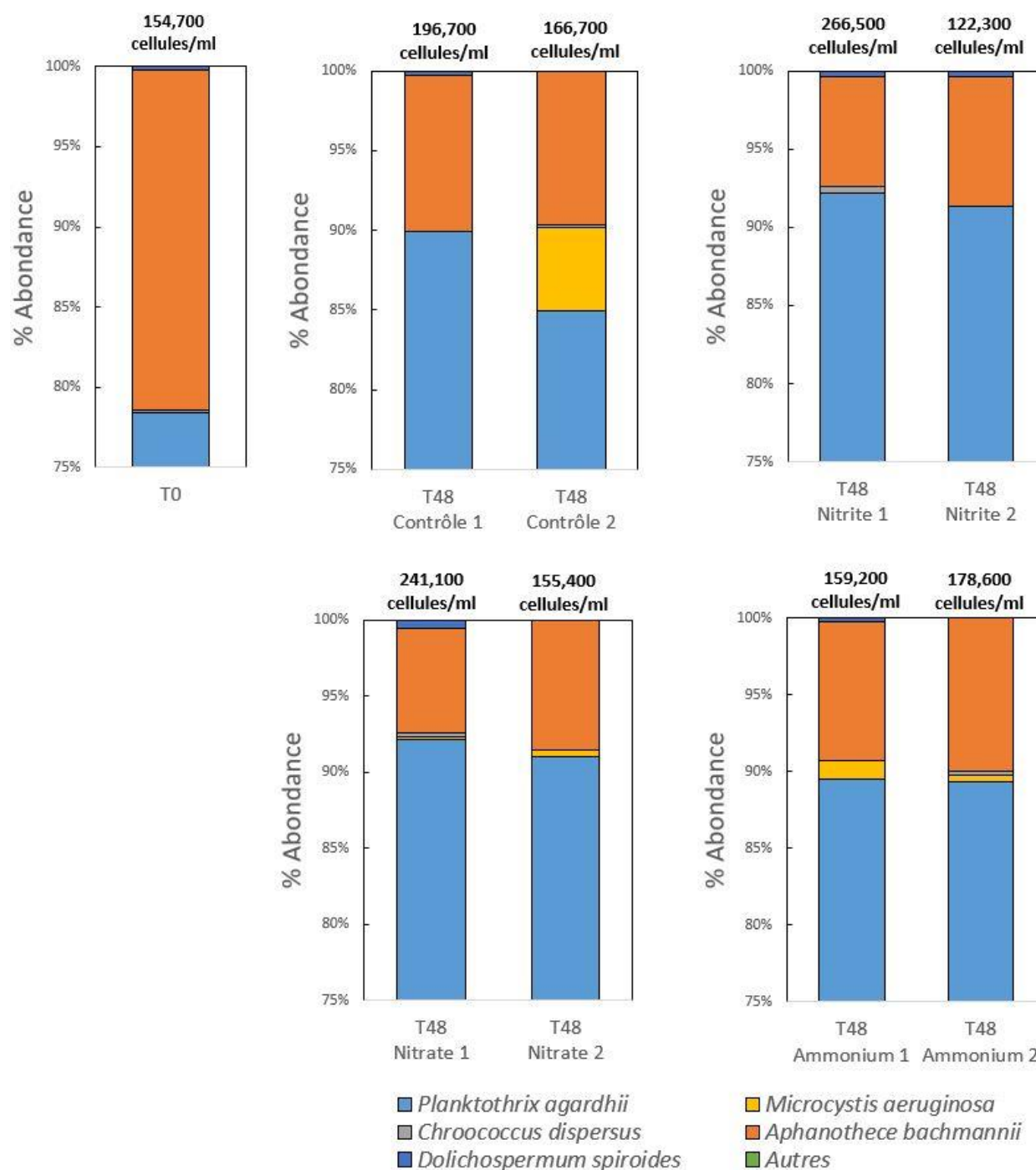


Figure 4.9 : PLSF 12-14 sept. 2017 – Abondance des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0 et T48. L'abondance totale de cyanobactéries dans chaque mésocosme est inscrite en haut de chaque barre (cellules/ml).

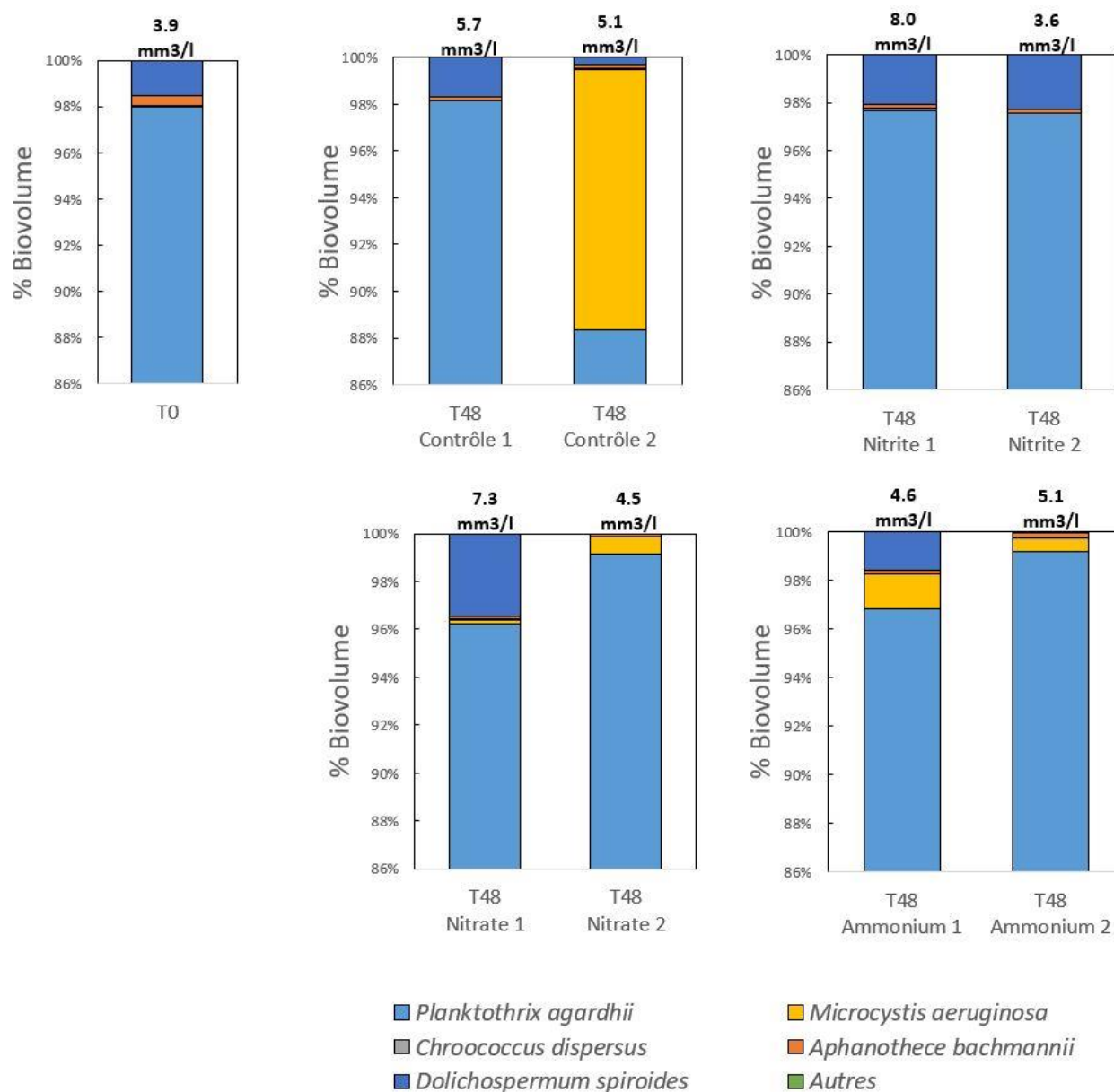


Figure 4.10 : PLSF 12-14 sept. 2017 – Biovolume des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0 et à T48. Le biovolume total de cyanobactéries de chaque mésocosme est inscrit en haut de chaque barre (mm³/l).

Lors des essais du 12-14 septembre 2017, aucune écume n'a été observée dans les mésocosmes contrairement aux essais de fin août 2017. Lors des tests en septembre, il y avait toujours présence de fleurs d'eau ($> 20\,000$ cellules/mL), mais en concentration bien inférieure qu'en fin août (environ 10 fois moins élevée). Une succession des espèces s'observe alors qu'à cette période l'espèce *P. agardhii* prédominait largement contrairement à *D. spiroides* lors des essais en fin août 2017. L'ensoleillement moindre en fin de saison et la baisse des températures peuvent expliquer que *P. agardhii* est devenue dominante, cette espèce étant reconnue pour croître à des températures plus faibles (Dokulil & Teubner, 2000; Kokociński et al., 2010).

La variabilité des résultats des comptes taxonomiques au sein de deux duplicatas de mésocosmes a montré que davantage de tests sont nécessaires pour uniformiser les résultats. L'ajout de tests en triple et même en quadruple serait avantageux pour ce type d'expériences, si les ressources nécessaires sont suffisantes, ce qui n'était pas le cas lors de ces tests en 2017. Les résultats pour la saison d'échantillonnage en 2017 ont également montré la pertinence de prendre des échantillons au temps zéro dans chacun des mésocosmes. Ces résultats ont donc provoqué des modifications dans le protocole des essais pour les tests de 2018, où l'ajout de triplicata et la prise d'échantillon au temps zéro dans chacun des mésocosmes ont été implémentés.

4.3.2 Essais à la baie Missisquoi

Pour les résultats des essais du 31 juillet au 2 août 2018 à la baie Missisquoi, les abondances et les biovolumes des cyanobactéries sont montrés à la **Figure 4.11** et à la **Figure 4.12**. L'ajout d'ammonium et d'urée a provoqué une diminution de biovolume et d'abondance totaux, contrairement aux résultats des mésocosmes de contrôle où les comptes taxonomiques ont augmenté. Ceci est contraire à la réaction qui a été observée au PLSF suite à l'ajout de nutriments azotés. L'espèce *D. spiroides* était dominante lors des essais en fin août 2018.

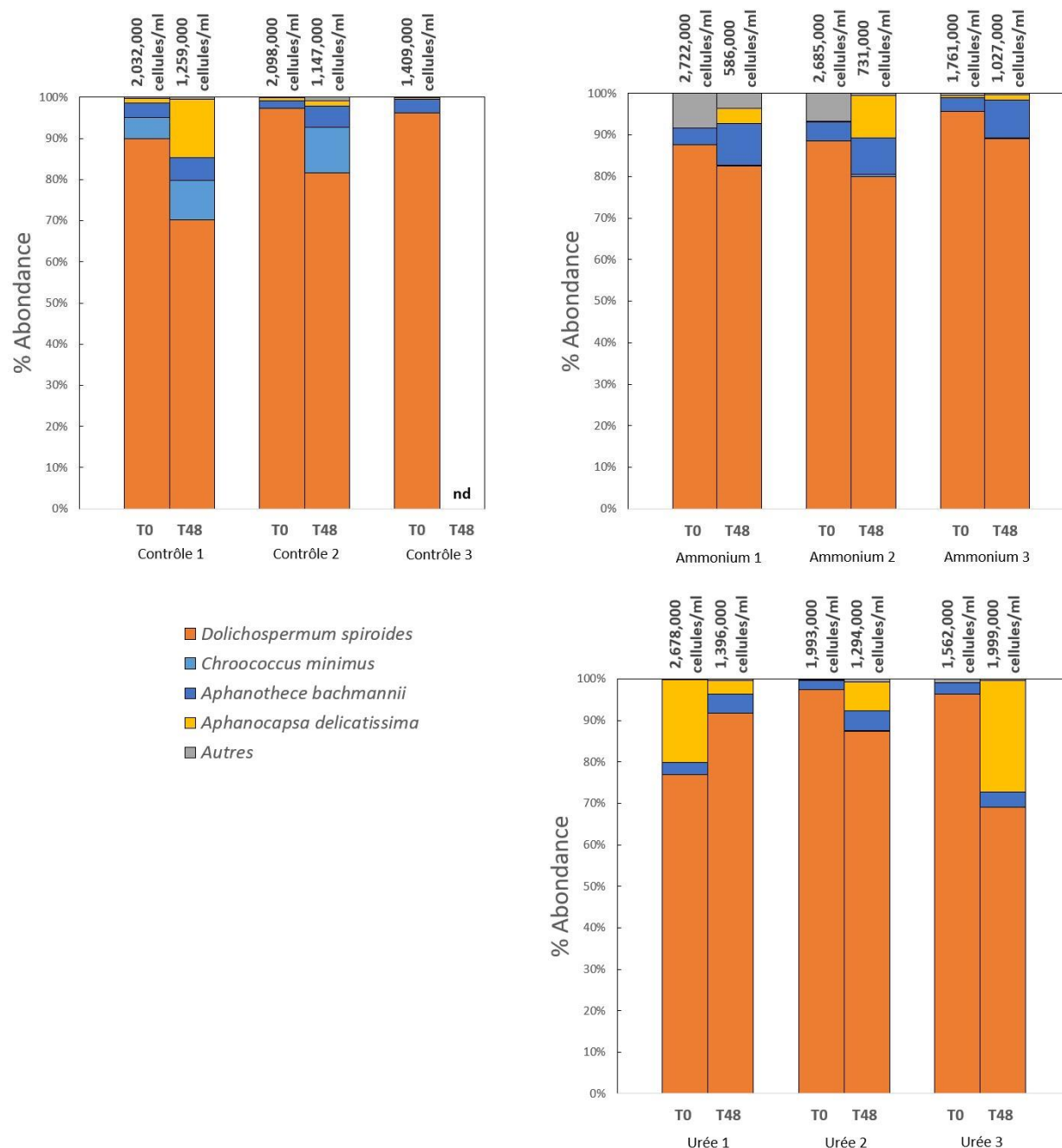


Figure 4.11 : Baie Missisquoi 31 juil.-2 août 2018 – Abondance des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0 et T48. L’abondance totale de cyanobactéries dans chaque mésocosme est inscrite en haut de chaque barre (cellules/ml).

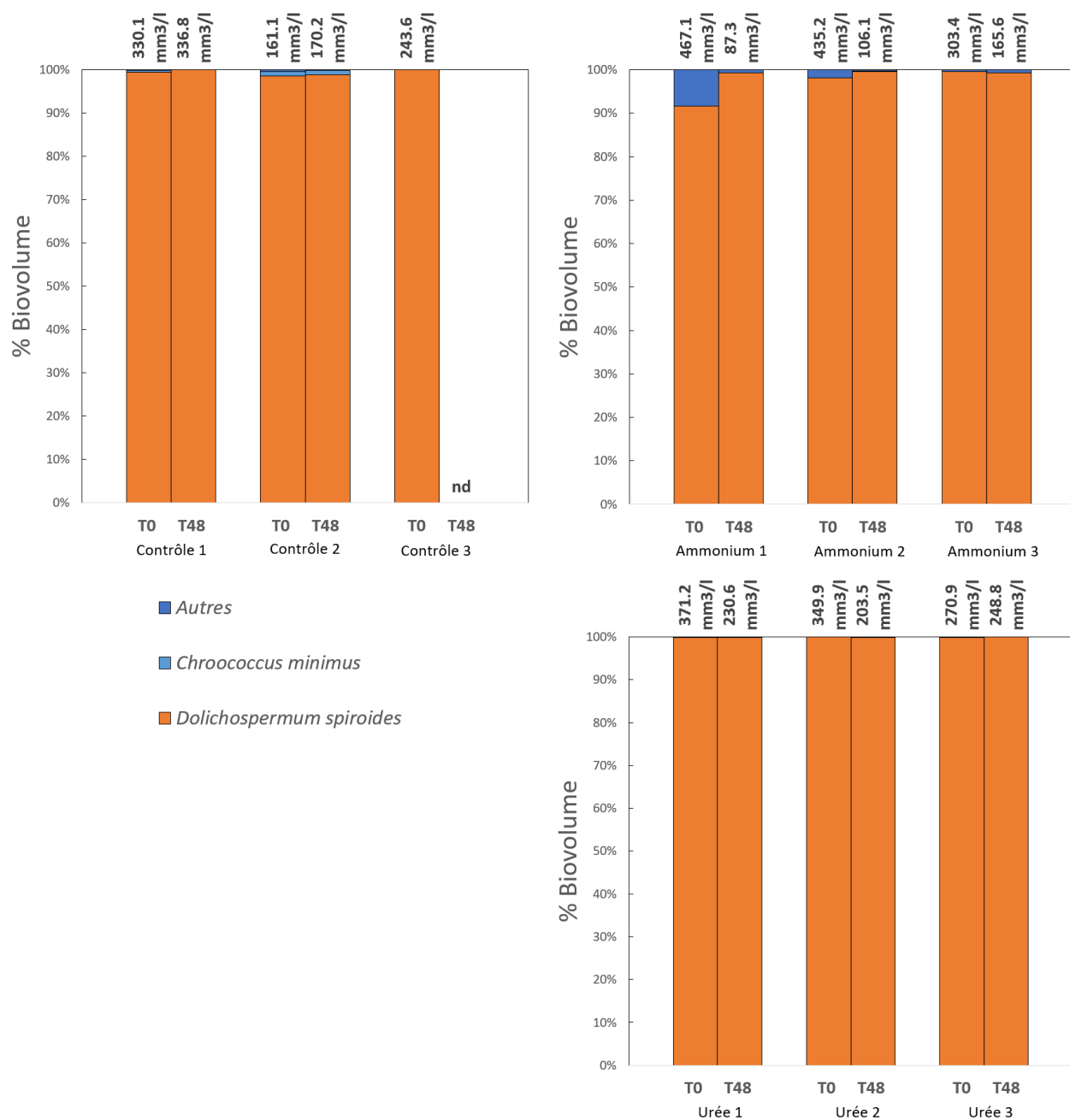


Figure 4.12 : Baie Missisquoi 31 juil.-2 août 2018 – Biovolume des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0 et T48. Le biovolume total de cyanobactéries de chaque mésocosme est inscrit en haut de chaque barre (mm³/l).

On a observé que les valeurs d'abondance et de biovolume étaient très élevées ($1 \text{ à } 3 \times 10^6$ cellules/ml; 87 à 467 mm³/L). La dominance de l'espèce *D. spiroides* durant les tests a concordé avec ce qui est typiquement retrouvé dans ce lac à chaque année à cette période de la saison estivale (de Boutray, 2017). Les résultats des comptes taxonomiques des tests du 31 juillet au 2 août 2018 ont montré que l'ajout d'ammonium avait diminué considérablement l'abondance et le biovolume. Une baisse moins importante a été observée dans les mésocosmes avec ajout d'urée, tandis que les mésocosmes de contrôle ont montré une augmentation des comptes des cyanobactéries. L'espèce *D. spiroides* était dominante pour l'ensemble des tests à ces dates.

L'augmentation des biovolumes et de l'abondance de cyanobactéries dans les mésocosmes de contrôle a coïncidé avec l'augmentation des microcystine totale intracellulaire dans cet essai. De plus, dans les mésocosmes où de l'ammonium et de l'urée ont été ajoutés, le biovolume et l'abondance ont diminué tout comme les concentrations de toxines (**Figure 4.4**). Il y est donc possible qu'il y avait un lien entre les abondances et biovolumes et les concentrations de toxines lors de ce test. Il serait intéressant d'observer les résultats des concentrations de toxines extracellulaires (à venir) afin de valider si la diminution des comptes taxonomiques est liée à la mort des cellules qui ont rejeté leurs toxines intracellulaires dans l'eau. Également, davantage d'essais seront bénéfiques à faire lors des prochaines saisons afin de corroborer et supporter cette conclusion.

Les comptes taxonomiques pour les essais du 10-12 septembre 2018 sont présentés à la **Figure 4.13** pour l'abondance et à la **Figure 4.14** pour le biovolume. Les espèces *D. spiroides* et *M. aeruginosa* étaient dominantes lors des essais en mi-septembre 2018, concordant avec ce qui est typiquement retrouvé à la baie Missisquoi en fin de saison des blooms (de Boutray, 2017).

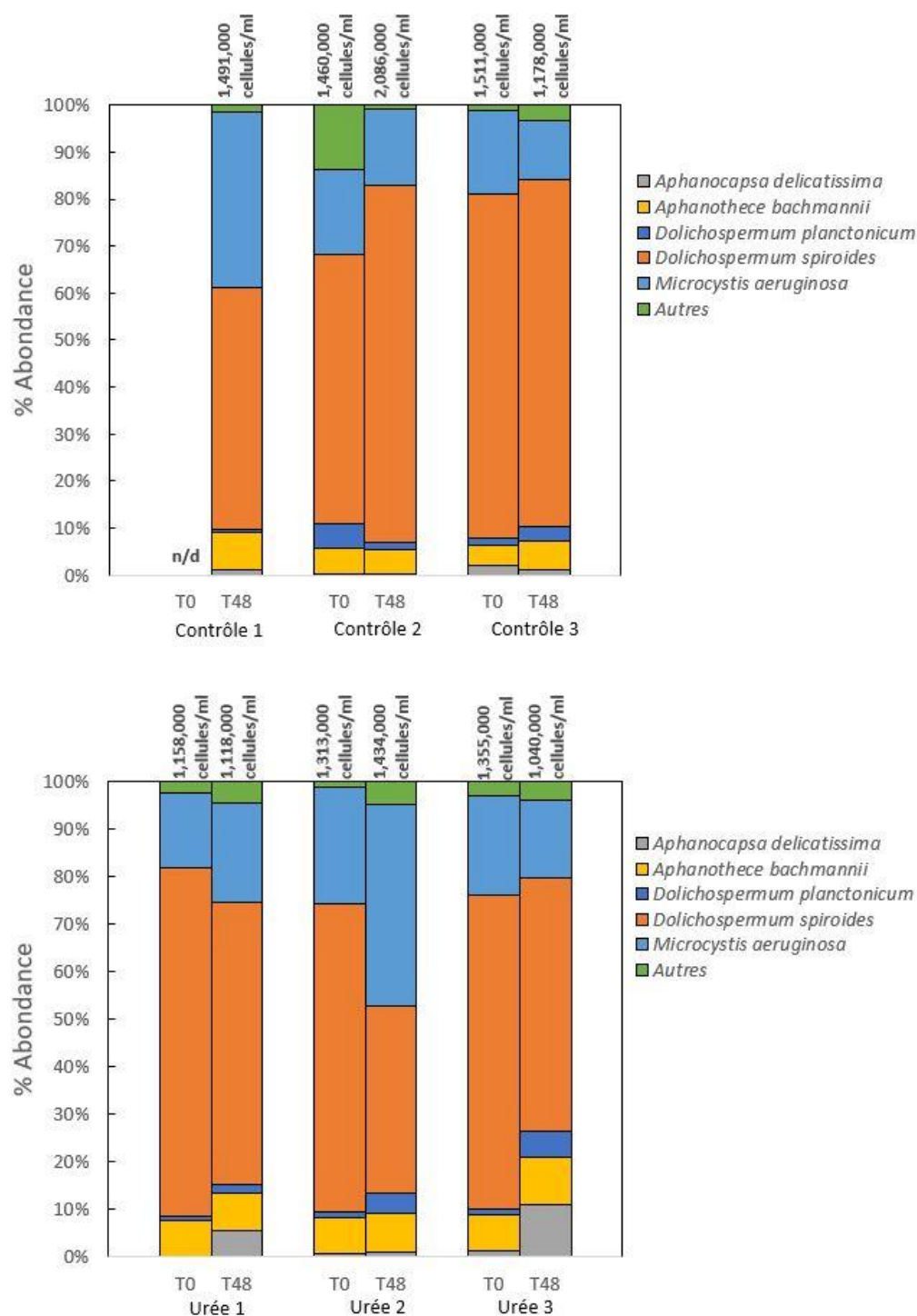


Figure 4.13 : Baie Missisquoi 10-12 sept. 2018 – Abondance des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0 et T48. L'abondance totale de cyanobactéries dans chaque mésocosme est inscrite en haut de chaque barre (cellules/ml).

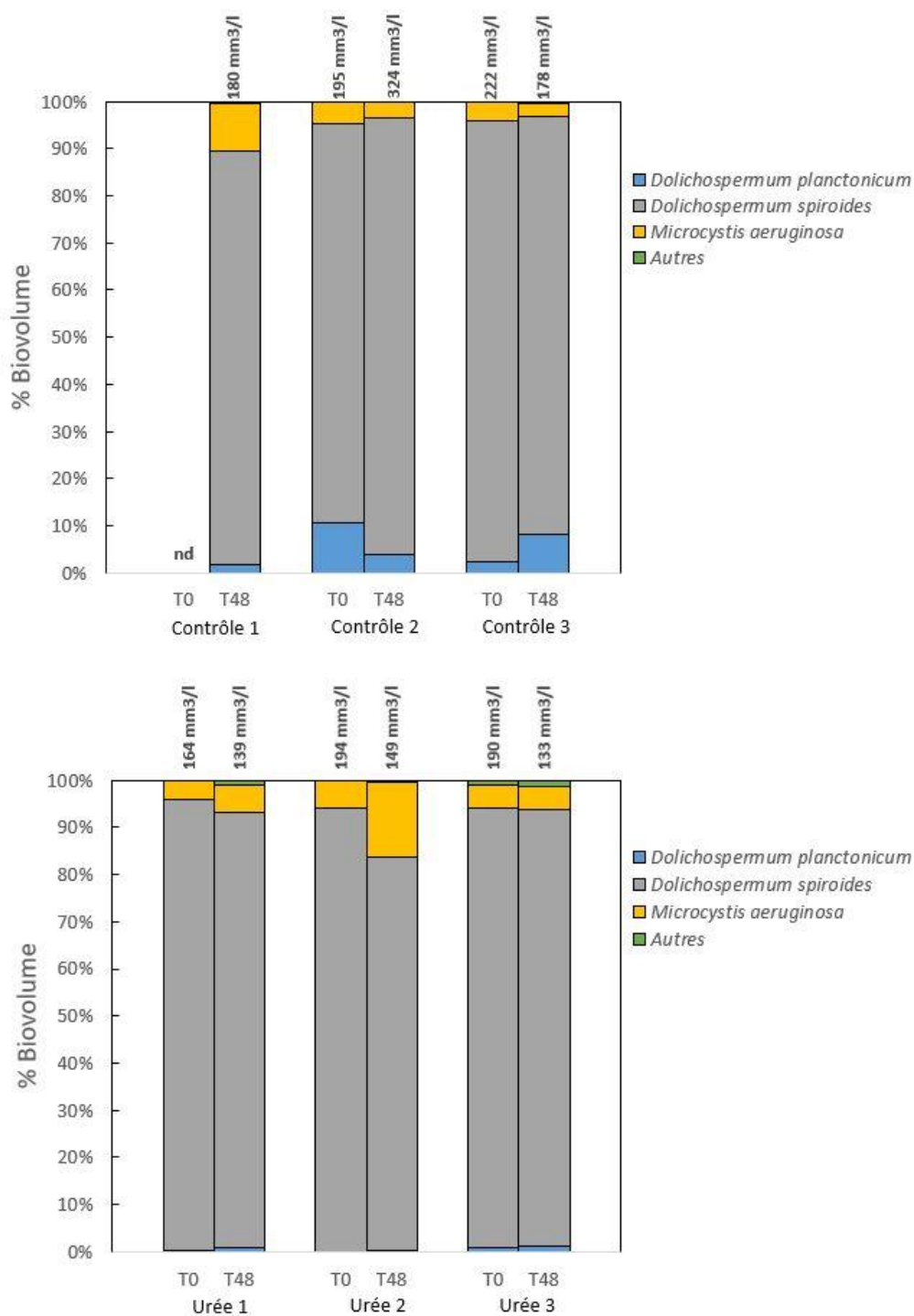


Figure 4.14 : Baie Missisquoi 10-12 sept. 2018 – Biovolume des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0 et à T48. Le biovolume total de cyanobactéries de chaque mésocosme est inscrit en haut de chaque barre (mm³/l).

Lors des tests du 10 au 12 septembre 2018, l'espèce *A. delicatissima* a eu un avantage sur les autres espèces lors de l'ajout d'urée, puisqu'il y a eu augmentation de pourcentage de son abondance au temps T48 (**Figure 4.13**). Par contre, les biovolumes totaux des cyanobactéries dans les mésocosmes avec ajout d'urée pour cet échantillonnage ont diminué (en moyenne de 184 à 140 mm³/L).

Pour les essais du 24 au 26 septembre 2018 à la baie Missisquoi, les résultats des comptes taxonomiques sont présentés à la **Figure 4.15** et à la **Figure 4.16**. Dans les mésocosmes de contrôle les abondances les plus élevées ont été observées à T24 tandis que les biovolumes les plus faibles ont été mesurés au temps T48. Aucune tendance générale sur la progression des abondances et biovolumes n'a pu être déterminée dans les mésocosmes où de l'ammonium a été ajouté. Ceci démontre encore une fois l'importance de faire de multiples essais en triple ou même en quadruple. Lors des essais, l'espèce *M. aeruginosa* a dominé la communauté de cyanobactéries.

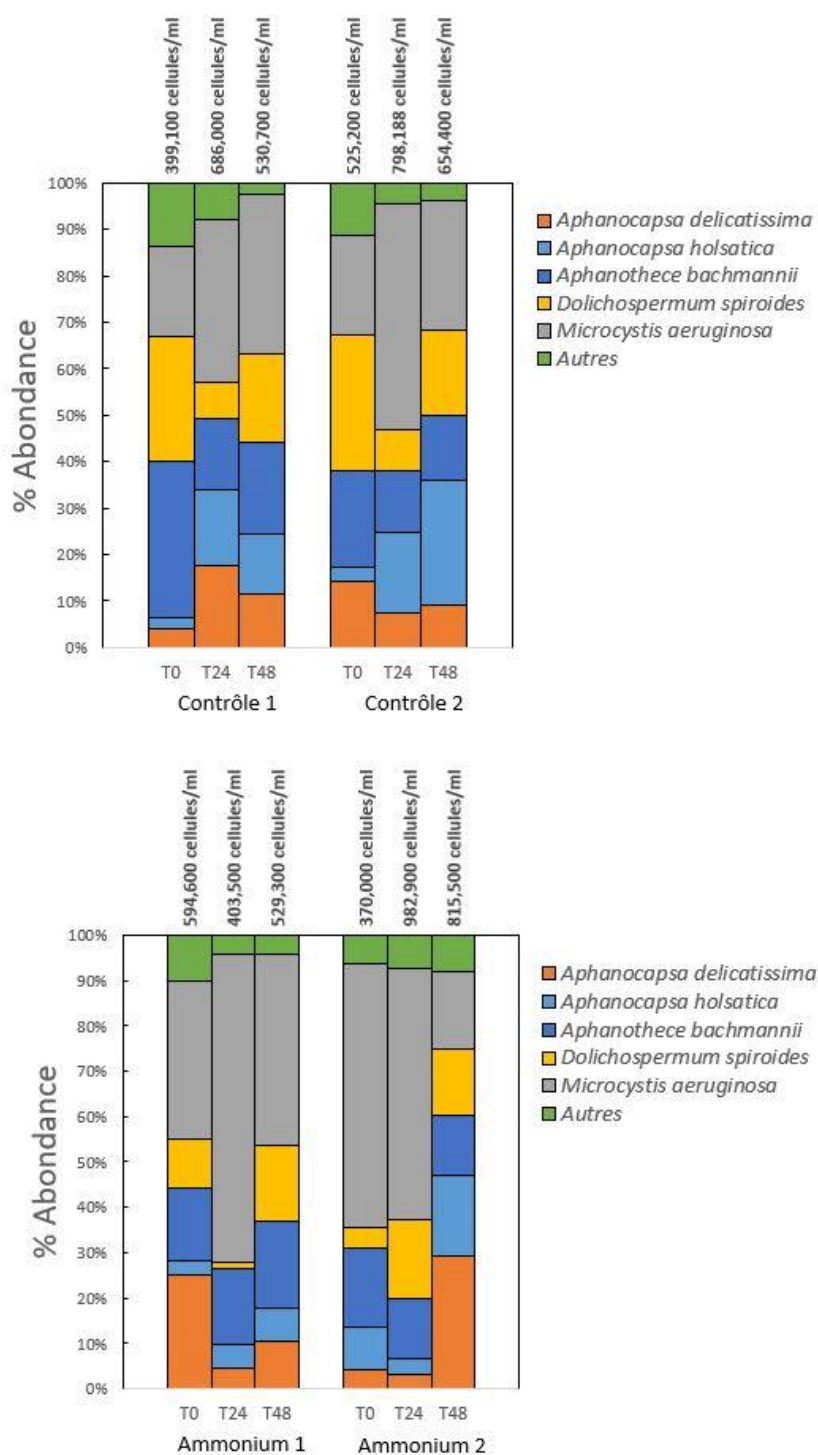


Figure 4.15 : Baie Missisquoi 24-25-26 sept. 2018 – Abondance des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0, T24 et T48. L’abondance totale de cyanobactéries dans chaque mésocosme est inscrite en haut de chaque barre (cellules/ml).

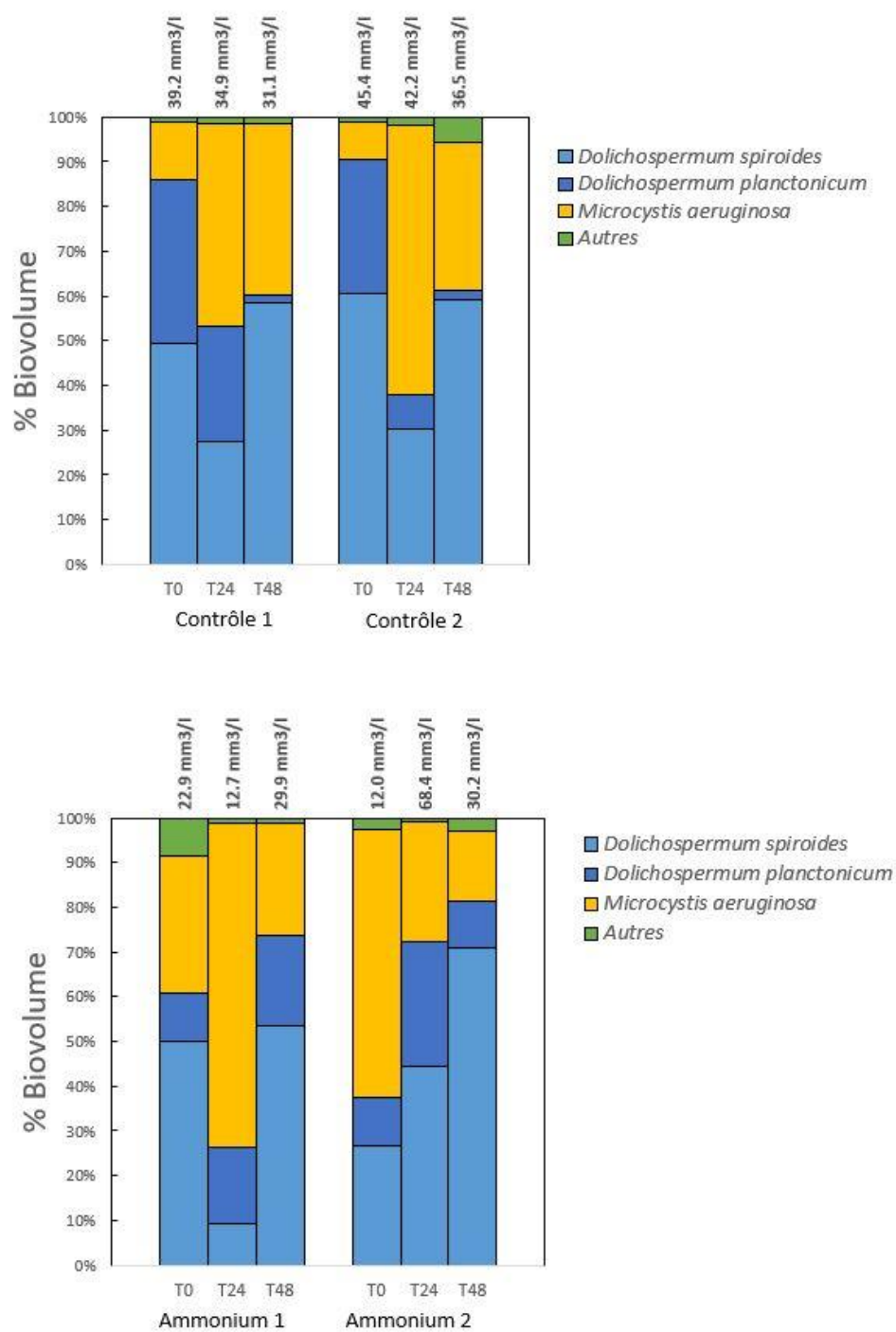


Figure 4.16 : Baie Missisquoi 24-25-26 sept. 2018 – Biovolume des cyanobactéries et composition de chaque mésocosme à T0 et à T48. Le biovolume total de cyanobactéries de chaque mésocosme est inscrit en haut de chaque barre (mm³/l).

Dans les mésocosmes de contrôle, entre le début et la fin de l'essai, on a observé une augmentation en abondance (en moyenne de 4.6 à 5.9×10^6 cellules/ml) et une diminution en biovolume (en moyenne de 42.3 à 33.8 mm³/L). Les cellules se seraient donc multipliées au lieu de croître individuellement. Sous ces conditions, l'espèce *M. aeruginosa* s'est davantage multiplié en 48 heures. Cette espèce avait donc un avantage compétitif dans les conditions des mésocosmes de contrôle sur l'espèce *D. planctonicum* qui avait une abondance bien plus faible après 48 heures (**Figure 4.15**).

D'après les résultats dans les mésocosmes contenant de l'ammonium ajouté, l'espèce *D. planctonicum* aurait ainsi profité de l'apport d'azote pour croître. Le désavantage compétitif de *M. aeruginosa* sous l'ajout d'ammonium est également démontré dans le mésocosme #2 d'ajout d'ammonium (**Figure 4.15**) où son abondance diminue significativement. Les espèces *A. delicatissima* et *A. holsatica* ont eu l'avantage sous ces conditions. Lors des essais du 24 septembre, le comportement des espèces de cyanobactéries était très différent dans les deux mésocosmes avec ajout d'ammonium suggérant qu'il serait préférable d'augmenter le nombre de répliques pour les prochaines saisons.

Des différences d'abondance et de biovolume ont été observées entre les différentes répliques de mésocosmes ayant subis le même traitement. Ceci peut être lié à la présence de bactériophages dans certains répliques, un facteur qui n'a pu être contrôlé lors de l'installation des mésocosmes. Deng et Hayes (2008) ont observé dans leur étude que divers cyanophages pouvaient cibler des espèces de cyanobactéries spécifiques, alors que d'autres phages ont pu infecter plusieurs espèces différentes, par exemple à la fois *Microcystis* et *Dolichospermum*. Les phages pouvant cibler différentes espèces auraient donc un avantage pour se multiplier durant un bloom et ainsi bloquer l'augmentation de l'abondance des cyanobactéries. Manage et al. (2001) ont en effet observé au lac Furuike au Japon, une diminution du nombre de cellules *M. aeruginosa* suite à des augmentations de densité de phages, établissant une relation significative entre ces deux variables. Ce phénomène pourrait expliquer pourquoi l'abondance et le biovolume de cyanobactéries dans certains mésocosmes n'ont pas augmenté.

La présence de prédateurs de cyanobactéries (p. ex. zooplancton) pourrait également freiner la prolifération des cyanobactéries dans les mésocosmes, expliquant les nuances dans les résultats des comptes taxonomiques, entre les répliques. Certaines espèces, par exemple *Daphnia magna*, peuvent développer une tolérance aux cyanobactéries toxiques, telle que *Microcystis aeruginosa*, et peuvent digérer les cyanotoxines (Gustafsson & Hansson, 2004). La baisse du biovolume après 48 heures observée dans certains mésocosmes pourrait donc être attribuable aux différents organismes présents. Il est aussi possible que l'ajout soudain de nutriments ait créé un stress sur la colonie de cyanobactéries présentes qui a cessée de croître. Il se peut également que le temps de contact de 48 heures n'était pas suffisant pour pouvoir observer des changements significatifs dans les comptes taxonomiques.

Il a été démontré qu'une augmentation du ratio d'azote inorganique dissous:phosphore total (DIN:TP) peut diminuer la compétitivité des cyanobactéries par rapport au zooplancton. Dans leur étude sur les blooms à la baie Missisquoi, Ndong et al. (2014) ont observé une corrélation négative entre le ratio DIN:TP et les concentrations de phycocyanine (pigment contenu dans les cyanobactéries). Les cyanobactéries seraient avantagées dans des environnement avec un faible ratio DIN:TP (ratio < 3) puisqu'elles peuvent utiliser plus efficacement de faibles concentrations d'azote inorganique dissous (Ndong et al., 2014).

L'ajout d'urée lors des tests du 10 au 12 septembre 2018 a eu pour effet d'augmenter le ratio DIN:TP jusqu'à 20 (voir Annexe C). Cette augmentation a probablement causé la diminution du biovolume total mesuré des cyanobactéries. Dans les mésocosmes de contrôle, les rapports DIN:TP étaient d'environ 1, favorisant les cyanobactéries. Dans les mésocosmes d'ajout d'urée, lorsque le ratio TN:TP a diminué, l'abondance totale des cyanobactéries a augmenté et vice-versa. Les ratios TN:TP étaient donc probablement trop élevés dans ces mésocosmes pour stimuler la multiplication et production de toxines des cyanobactéries dans cette série de tests.

L'augmentation en biovolume 48 heures après l'ajout d'ammonium a concordé avec une augmentation des cyanotoxines mesurées (**Figure 4.6**). En fait, les modulations des concentrations de cyanotoxines aux temps T0, T24 et T48 ont coïncidé avec les modulations de

biovolume. Lorsqu'il y avait augmentation des toxines mesurées, il y avait augmentation du biovolume. Ces deux paramètres étaient donc reliés.

Les causes d'erreur sont multiples lors d'expériences dans un environnement naturel en comparaison avec un environnement de laboratoire contrôlé. De plus, les conditions auxquelles les mésocosmes étaient exposés durant la période des essais n'étaient pas monitorées. Ainsi, il a pu y avoir contamination de certains mésocosmes sur la période de 48 heures où ils n'étaient pas sous surveillance constante. Il nous était donc impossible d'évaluer l'impact des phénomènes naturels (vent, précipitations) sur l'intégrité des mésocosmes installés dans les plans d'eau.

La **Figure 4.17** rassemble toutes données pour les ratios TN:TP après 48 heures dans les mésocosmes en relation avec le biovolume total de cyanobactéries.

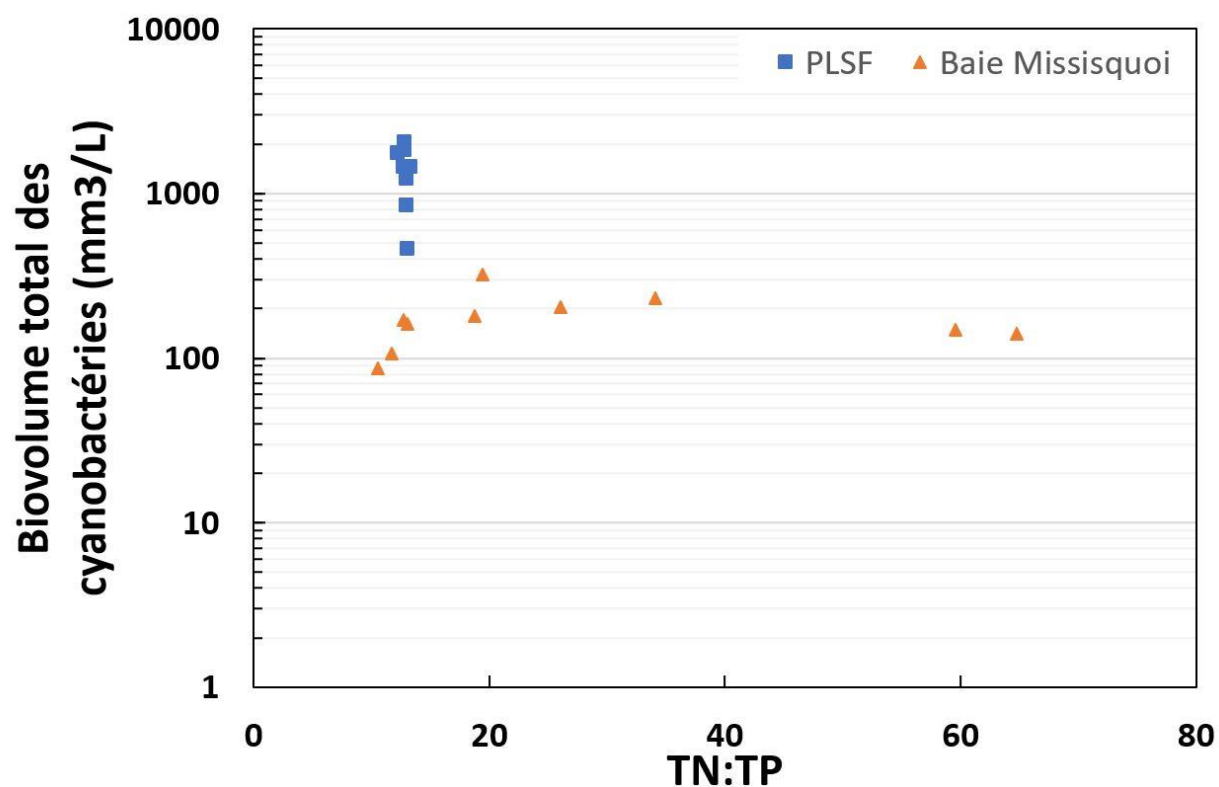


Figure 4.17 : Ratios TN:TP et biovolume total des cyanobactéries sur l'ensemble des échantillons pris dans les mésocosmes pour les essais de 2017 et 2018, suite au temps de contact de 48 heures.

Il est possible de voir que les résultats étaient variables pour les échantillons. Les cyanobactéries ne se sont pas comportées de manière identique entre les deux lacs étudiés. Avec un ratio TN:TP autour de 12, les cyanobactéries du PLSF présentaient des biovolumes plus élevés que celles de la baie Missisquoi. Les résultats au PLSF étaient également plus uniformes, les ratios TN:TP étaient plus constants et étaient liés à des biovolumes similaires. Dans ce lac, il y a donc pu y avoir un lien entre le ratio TN:TP et le biovolume total de cyanobactéries dans les mésocosmes. Au PLSF, on peut poser l'hypothèse qu'un ratio TN:TP d'environ 12 est lié à des biovolumes de cyanobactéries élevées.

L'augmentation du ratio TN:TP à la baie Missisquoi était beaucoup plus variable et n'était pas liée à une augmentation ou une diminution du biovolume selon la **Figure 4.17**. Ceci suggère que l'ajout d'azote ne permettrait pas de résoudre les problèmes de blooms de cyanobactéries dans ce lac, contrairement à ce que proposaient Harris et al. (2014) suite à leurs essais au réservoir de Willow Creek. Ceux-ci avaient suggéré d'augmenter le ratio TN:TP à plus de 75 afin de favoriser des espèces non toxiques dans la communauté de phytoplancton, tels les chlorophytes. Nos résultats n'ont pas offert la même conclusion à la baie Missisquoi puisqu'à des ratios faibles et élevés, le biovolume de cyanobactéries restaient stables (**Figure 4.17**). Davantage d'essais seraient bénéfiques afin de tester plusieurs ratios différents afin de mieux évaluer l'effet du ratio TN:TP sur le biovolume des blooms de cyanobactéries à la baie Missisquoi.

4.4 Analyse génétique

Les concentrations de gènes *mcyD* et *mcyE* ont été mesurées pour les échantillons de l'expérience du 31 août 2017 au PLSF (**Figure 4.18**). Les barres d'erreur ont été calculées à l'aide de l'erreur-type sur la moyenne. Lors des essais de 2017, seules les concentrations de certains échantillons ont montré des valeurs supérieures à la limite de détection. Pour cette raison, l'analyse des toxines dans cette section porte principalement sur la microcystine intracellulaire.

Dans cette expérience, les concentrations mesurées du nombre de copies de gènes *mcyE* par ml étaient inférieures aux valeurs recensées (**Error! Reference source not found.**). On remarque qu'aucune étude recensant le nombre de copies de gènes *mcyD-E* n'a été publiée pour le lac PLSF. La comparaison avec d'autres lacs doit être prise avec réserve. Le bloom utilisé lors des essais était peu toxique, étant donné le faible nombre de gènes toxiques et les faibles concentrations de toxines mesurées en ng/l.

L'ajout d'azote sous forme de NO_3^- a été associé à des concentrations élevées du nombre de copies du gène *mcyE*. De plus, pour ces mésocosmes, les concentrations de copies de gènes *mcyD* et *mcyE* étaient les plus élevées malgré des concentrations de microcystines sous les limites de détection. Ainsi la présence de ces deux gènes ne s'est pas nécessairement traduite par une production de microcystine. L'ajout de NH_4^+ pour cette expérience n'a pas changé les concentrations des gènes *mcyD* et *mcyE* ni la production de microcystines, en comparant aux mésocosmes de contrôle (**Figure 4.18**).

La présence de ces gènes a montré qu'il y avait des cyanobactéries productrices de microcystines dans les échantillons. Les gènes *mcy* peuvent en effet être présents dans les cyanobactéries sans pour autant déclencher la production de toxines (Beverdors et al., 2015). Ils sont simplement indicateurs d'un potentiel toxique des cyanobactéries, leur présence ne révèle pas si les gènes sont activés ou non (Ye et al., 2009).

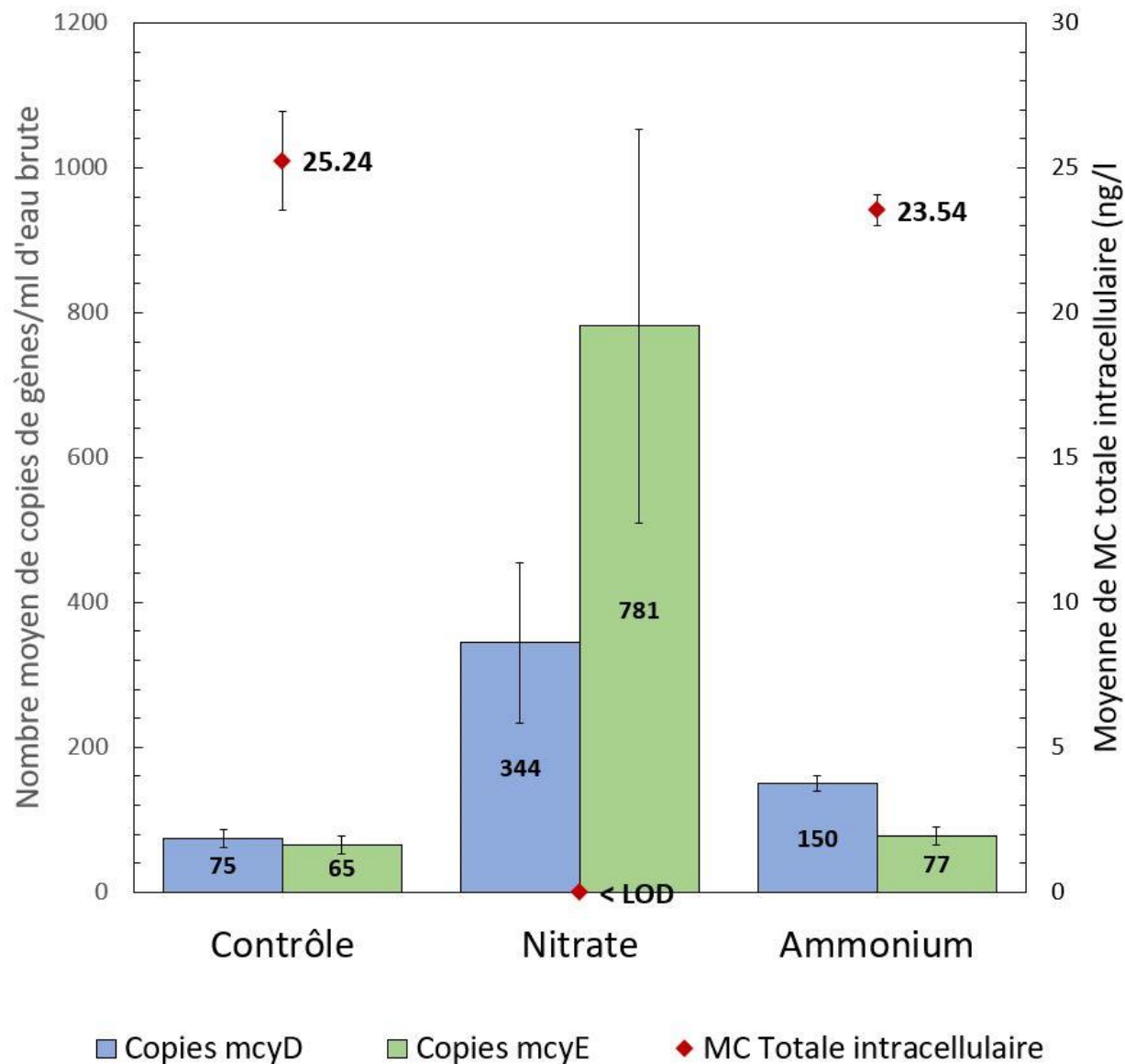


Figure 4.18 : Moyennes par mésocosme à T48 des concentrations de copies de gènes *mcyD* et *mcyE* (copies/ml) et des concentrations de microcystine totale intracellulaire (ng/l) mesurées lors des essais du 29-31 août 2017, au PLSF. Les concentrations des copies de gènes sont présentées au centre des barres d'erreur.

Une étude faite à l'été 2013 au Lac Klamath supérieur en Oregon aux États-Unis a montré un ordre de grandeur similaire pour les concentrations de copies de gènes *mcyE*, mais pas pour les microcystines intracellulaires (**Error! Reference source not found.**). Selon les résultats obtenus en 2017 (**Figure 4.18**), les gènes *mcyD* et *mcyE* ne seraient pas nécessairement de bons indicateurs pour les concentrations de microcystines dans ce test. Une autre étude, dans quatre lacs au Wisconsin, corrobore ces résultats. Dans cette étude, aucune corrélation significative n'avait été démontrée entre les concentrations de microcystines et le gène *mcyE* (Beverdors et al., 2015). Ainsi le nombre de copies de gènes *mcyD* et *mcyE* ne permettrait pas d'expliquer les variations de microcystines.

Par contre, cette observation va à l'encontre de l'expérience menée par Ngwa et al. (2014) à la baie Missisquoi. Ils ont en effet montré qu'il y avait une association positive ($r > 0.8$) entre les concentrations de microcystines et le nombre de copies du gène *mcyE* (Ngwa et al., 2014). Par contre, leur échantillonnage de la baie en 2011 a montré une contradiction entre les concentrations de microcystines et le nombre de copies de gènes avec l'expression des transcrit de *mcyE* provenant de l'extraction de l'ARN. Ils ont trouvé, dans un même échantillon, de hautes concentrations de microcystines, un nombre élevé de copies de gènes *mcyE*, mais un faible niveau de transcription de *mcyE*, et vice-versa. Ils ont émis l'hypothèse que leurs échantillons pour l'extraction de l'ARN (qui a fourni les transcrits de *mcyE*) provenaient peut-être de différentes phases de croissance des cellules.

Il n'est pas possible d'effectuer les tests lors de phases spécifiques de croissance des bactéries, dans leur étude comme dans la nôtre, étant donné l'utilisation d'échantillons environnementaux. Selon l'expérience de Ngwa et al. (2014), une cellule plus âgée aurait des transcrits de *mcyE* plus dégradés. Par contre, la cellule âgée pourrait toujours être en train de produire des microcystines, causant les incohérences mentionnées. Pour cette raison, ils ont même postulé que les transcrits de *mcyE* provenant de l'extraction de l'ARN seraient ainsi un indicateur moins fiable, en comparaison au nombre de copies de gène mesurés suite à l'extraction de l'ADN.

Les résultats de nos essais ont aussi corroboré avec ceux d'une étude de quatre lacs au Wisconsin, aux États-Unis par Beverdors et al. (2015). En effet, dans leur étude, le nombre de copies des

gènes ne pouvaient pas justifier les concentrations de microcystines observées qui étaient trop variables, même en un seul point (Beverdors et al., 2015). Ceci s'observe également dans nos résultats. Ainsi, certains lacs dans leurs tests affichaient une corrélation positive entre les concentrations de microcystines et le nombre de copies de gènes *mcyA* ou *mcyE*, alors que d'autres montraient une corrélation négative ou pas de corrélation. Ils ont donc conclu que ces deux gènes n'étaient pas des indicateurs adéquats pour prédire les concentrations de microcystines.

De plus, durant la période estivale de 2002 et 2003, un échantillonnage hebdomadaire mené au lac Oneida dans l'état de New York a permis d'observer une relation linéaire entre les concentrations de microcystines et l'abondance du gène *mcyD* dans les cyanobactéries *Microcystis* (Hottot et al., 2008). Cette étude indiquerait que la présence de *mcyD* pourrait être un meilleur indicateur de la production de microcystine, contrairement aux conclusions de notre expérience au PLSF.

Ces contradictions parmi les diverses études (dont la nôtre) indiquent clairement que davantage de recherches sont nécessaires afin de déterminer avec certitude si les nombres de copies de *mcyD* et *mcyE* sont des indicateurs fiables ou non pour les risques de microcystines dans les plans d'eau. À noter que les résultats ont pu être influencés par la qualité des échantillons et la complexité de la manutention des échantillons. L'ADN extrait pour les analyses de concentration de gènes a pu être endommagé par diverses manipulations et lors de sa préservation avant l'extraction. De possibles cycles répétés de gel-dégel ont aussi pu créer des déchirures dans les brins d'ADN et falsifier les résultats obtenus (Bellet et al., 2003). L'intégrité de l'ADN a également pu être affectée par des radicaux libres qui peuvent modifier les bases dans la séquence d'ADN, par exemple, ou briser des liens entre les brins de l'ADN (Jena, 2012).

La technique ddPCR permettant l'amplification de l'ADN extrait des échantillons pris dans les mésocosmes a permis de quantifier la présence de gènes pouvant coder des toxines. C'est ainsi qu'il a été possible de mesurer le nombre de gènes de *mcyD* et *mcyE*. Une étude de l'expression des gènes (à travers une étude métatranscriptomique) permettrait de mieux comprendre ce qui déclencherait la production de toxines. Cette approche permettrait de déterminer quels gènes

étaient actifs (ou exprimés) pour voir quel comportement les cyanobactéries avaient. Toutefois, ceci aurait nécessité des échantillons contenant l'ARN des cyanobactéries, qui n'ont pu être extraits en 2017 étant donné les ressources limitées lors des expériences.

De plus, la préservation délicate des échantillons d'ARN et leur caractère instable engendrerait une difficulté supplémentaire et des résultats plus incertains. L'extraction de l'ARN peut en effet être problématique puisque c'est une molécule qui a tendance à être hydrolysée plus facilement que l'ADN (Sharkey et al., 2004). La structure de l'ARN en hélice à simple brin rend cette molécule moins stable que l'ADN qui a une hélice en double brin (Campbell & Reece, 2005). Il est donc plus difficile d'obtenir des échantillons d'ARN intacts et de qualité pour être utilisés dans les techniques de PCR. Travailler avec des échantillons d'ADN extraits s'est donc avéré plus sûr pour nos échantillons en 2017 puisqu'ils n'ont pas été filtrés et préservés dès qu'ils ont été prélevés dans les mésocosmes, contrairement aux échantillons en 2018 (nouvelle méthodologie établie).

L'analyse et la quantification d'autres gènes *mcy* seraient intéressantes étant donné le manque de forte corrélation entre *mcyD* et/ou *mcyE* et les concentrations de microcystines (Figure 4.16). L'étude de ces autres gènes pourrait permettre de voir si les formes d'azote influencent leur abondance. Par exemple, Yoshida et al. (2007) ont utilisé la méthode qPCR pour cibler le gène *mcyA* spécifique à la cyanobactérie *M. aeruginosa* dans des échantillons prélevés au Lac Mikata au Japon, pour déterminer s'il y avait une corrélation avec les nutriments présents dans l'eau. Ils ont observé que des concentrations élevées de nitrate correspondaient à une augmentation de l'abondance de *mcyA*, pouvant être dû au fait que les souches de *M. aeruginosa* produisant des microcystines ont eu l'avantage compétitif à des concentrations élevées de nutriments (Yoshida et al., 2007).

Nos résultats ont montré que l'étude de l'expression du gène *ntcA* pourrait également s'avérer intéressante pour mieux comprendre nos données du nombre de copies de gènes de *mcyE* et *mcyD*. Les expériences de Lindell et Post (2001) (voir section 2.5.1), montrant une diminution du nombre de transcrits de *ntcA* suivant l'apport d'ammonium, pourrait offrir une explication pour le faible nombre de gènes *mcyE* et *mcyD* dans les mésocosmes contenant de l'ammonium ajouté.

D'amples recherches sont nécessaires sur le lien entre l'expression de *ntcA* et l'expression de *mcyE* et *mcyD*.

4.5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques visaient à regrouper l'ensemble des données recueillies durant les deux saisons d'échantillonnage. Des comparaisons entre les variables ont alors été faites à l'aide de deux techniques : 1) par des diagramme de quartiles (ou graphiques de type boîte à moustache) et 2) par l'analyse des composantes principales.

4.5.1 Diagramme de quartiles

Un diagramme de quartiles permet de visualiser la dispersion des données en fournissant les valeurs maximales et minimales, les points discordants et la médiane. Les quartiles inférieurs (premier quartile, Q1) et supérieurs (troisième quartile, Q3) sont également démontrés. Ils permettent de voir le 25^e percentile et le 75^e percentile respectivement. Ainsi, par exemple, la ligne du 25^e percentile montre la valeur où 25% des données sont sous cette valeur. La médiane représente le 50^e percentile et est indiquée par une ligne à l'intérieur de la boîte à moustache. Cette boîte est représenté par l'écart interquartile. Les valeurs maximales et minimales sont présentées à l'aide des tiges, ou moustaches.

La **Figure 4.19** présente le diagramme de quartiles pour le biovolume total des cyanobactéries après 48 heures, selon les mésocosmes testés. Puis la **Figure 4.20** montre le diagramme de quartile avec les ratios TN:TP selon les mésocosmes. Les chiffres indiqués dans les boîtes, ou au-dessus de celles-ci, sont les valeurs des médianes. Les valeurs des essais du 12 septembre 2017 n'ont pas été incluses étant donné que ces essais ont pu être affectés par une dilution causée par des vagues, affectant les résultats.

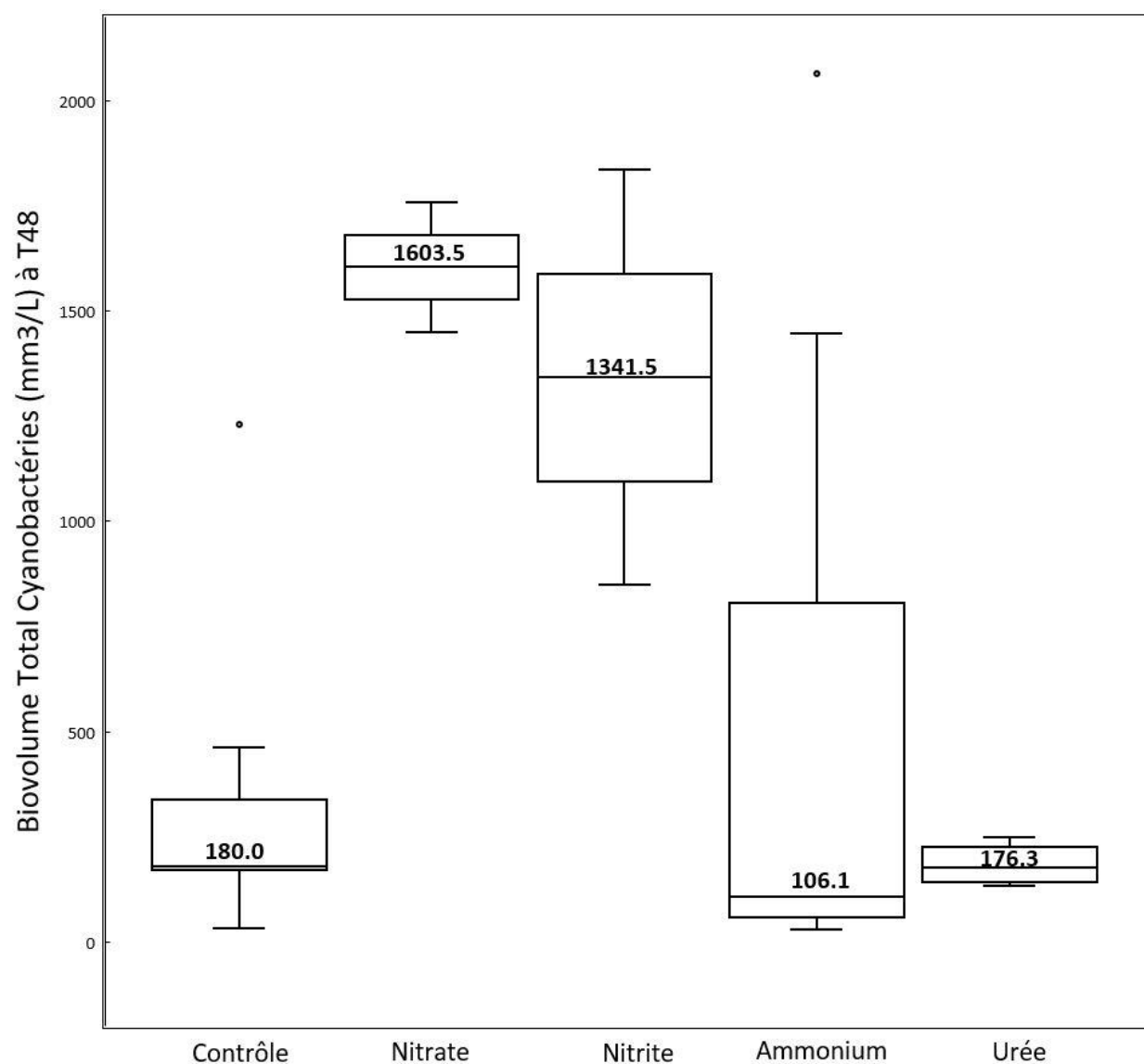


Figure 4.19 : Diagramme de quartile des valeurs de biovolume des cyanobactéries pour chaque mésocosme testé en 2017 et 2018. Les médianes sont indiquées dans les boîtes. Les points extrêmes sont présentés.

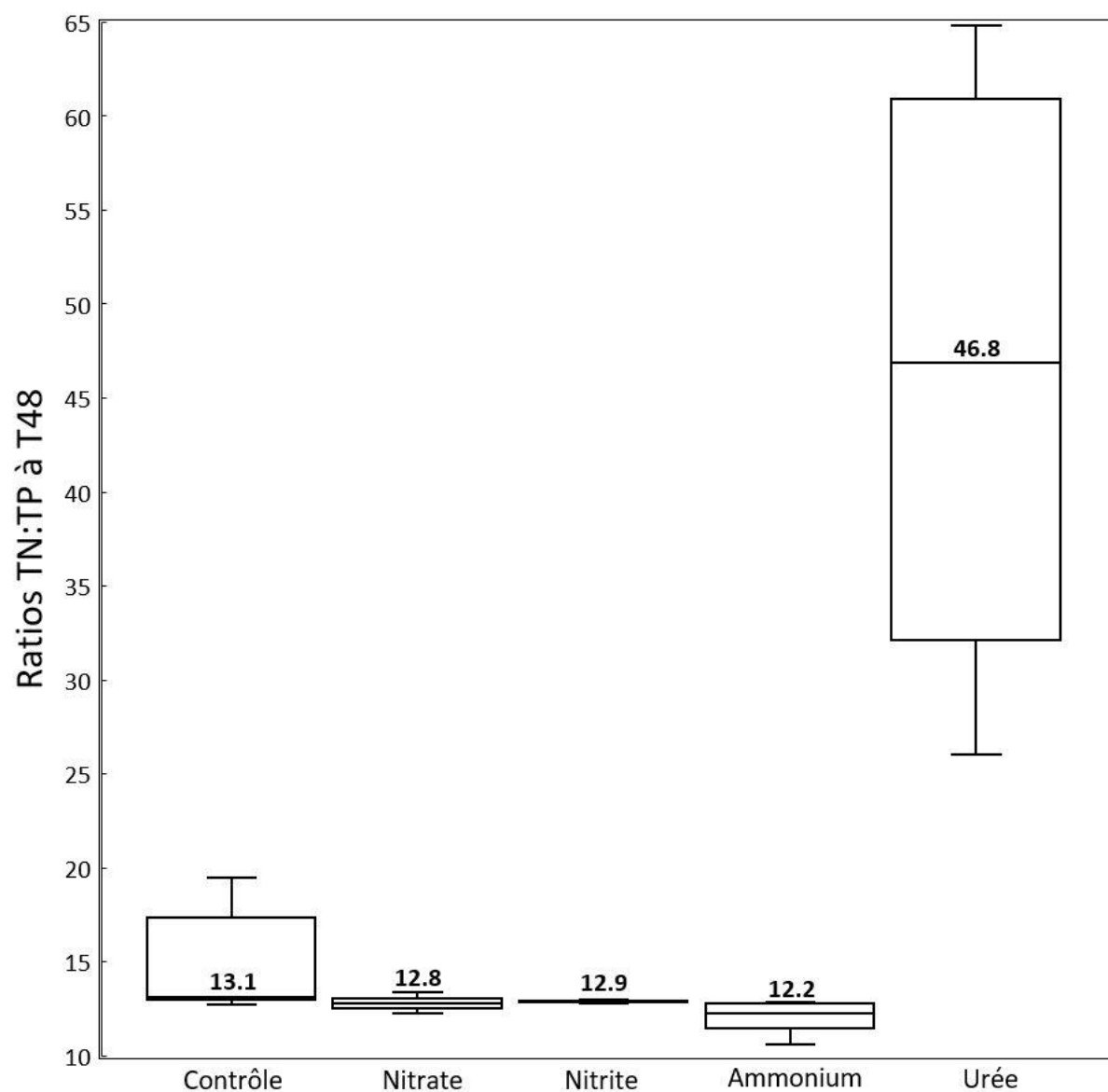


Figure 4.20 : Diagramme de quartile des ratios TN:TP selon les mésocosmes testés. Les médianes sont indiquées dans les boîtes ou au-dessus de celles-ci.

Les diagrammes de quartile ont permis de voir la distribution de l'ensemble de données collectées. Sur la **Figure 4.19** l'ajout de nitrate et de nitrite lors de nos essais est donc lié à des biovolumes plus élevés. La boîte à moustache associée à l'ajout d'ammonium a une plus grande envergure. Ceci est lié au fait que ce nutriment a été testé au cours des deux années d'essais dans les deux lacs. Il est donc normal qu'il y ait davantage de variabilité liée à son biovolume étant donné que les blooms étudiés sur les deux lacs étaient différents. Par contre, on note que les boîtes à moustaches liées aux mésocosmes de contrôle ne sont pas élargies. Ceci montre que nos mésocosmes de contrôle pour les essais en 2017 et 2018 étaient adéquats.

Les médianes sur la **Figure 4.20** montrent des ratios TN:TP semblables pour les mésocosmes de contrôle, d'ajout de nitrate, de nitrite et d'ammonium, mais pas pour la boîte associée à l'ajout d'urée. Les valeurs de TN:TP étaient donc plus variables dans ce type de mésocosmes. Il serait donc important pour les tests futurs de bien monitorer les concentrations d'urée à ajouter pour diminuer la variabilité lors des essais. Il est également montré sur les deux figures qu'une augmentation du ratio TN:TP n'est pas lié à un biovolume plus élevé.

Il sera intéressant lors de l'obtention de tous les résultats pour les cyanotoxines d'analyser les changements de ces concentrations en lien avec les types de mésocosmes testés dans un diagramme de quartile. Il serait alors possible d'observer le lien entre les formes de nutriments azotés et les concentrations de toxines mesurées. Les résultats des analyses de concentrations de gènes (à venir) pourront également offrir un aperçu pertinent sur leur distribution selon les types de mésocosmes testés.

4.5.2 Analyse des composantes principales

L'analyse des composantes principales (ACP) a permis de prendre un ensemble de données à dimensions multiples et de créer des composantes principales qui pouvaient décrire la contribution de chaque variable. Ceci a permis de visualiser s'il y avait des similarités ou des relations dans les données. Les données utilisées pour l'analyse étaient : les concentrations de gènes toxiques *mcyD* et *mcyE*, les biovolumes des 5 espèces principales dans les mésocosmes, les concentrations de microcystines intracellulaires, d'azote total, de phosphore total et de carbone

organique total (COT). Cette analyse a été faite pour l'essai du 29-31 août 2017 au PLSF afin de pouvoir discerner s'il y avait une similitude entre les variables nommées. Les variables ont été choisies selon leur pertinence et selon la disponibilité des résultats. Selon ces critères, 6 mésocosmes sur 8 ont été incorporés dans l'ACP (contrôle, nitrate et ammonium). Les essais sur les mésocosmes avec injection de nitrites ont été exclus, car ils n'ont pas été analysés pour le nombre de copies de gènes *mcyD* et *mcyE*.

Les deux premières composantes avaient la plus grande influence sur le système, car elles représentaient ensemble plus de 87% de la variance des données. Un graphique utilisant les 2 premières composantes principales (PC1 et PC2) comme système de coordonnées XY a donc été créé pour représenter adéquatement les données.

Les composantes principales ont été créées à l'aide du logiciel *Statistica 13.3* à partir d'une combinaison entre chaque variable utilisée. Les valeurs propres ont déterminé la longueur des vecteurs propres (*eigenvector*) des composantes principales. Par la suite, les vecteurs propres ont été tracés sur le graphique de la **Figure 4.21**. Cette approche a permis de déterminer s'il y avait des données qui se regroupaient en amas de points et qui présenteraient donc des similarités. La **Figure 4.21** présente ainsi dans un graphique les *score plot* (soit les points représentant les échantillons) et *loading plot* (soit les vecteurs présentés) pour les mésocosmes des essais du 29 au 31 août 2017.

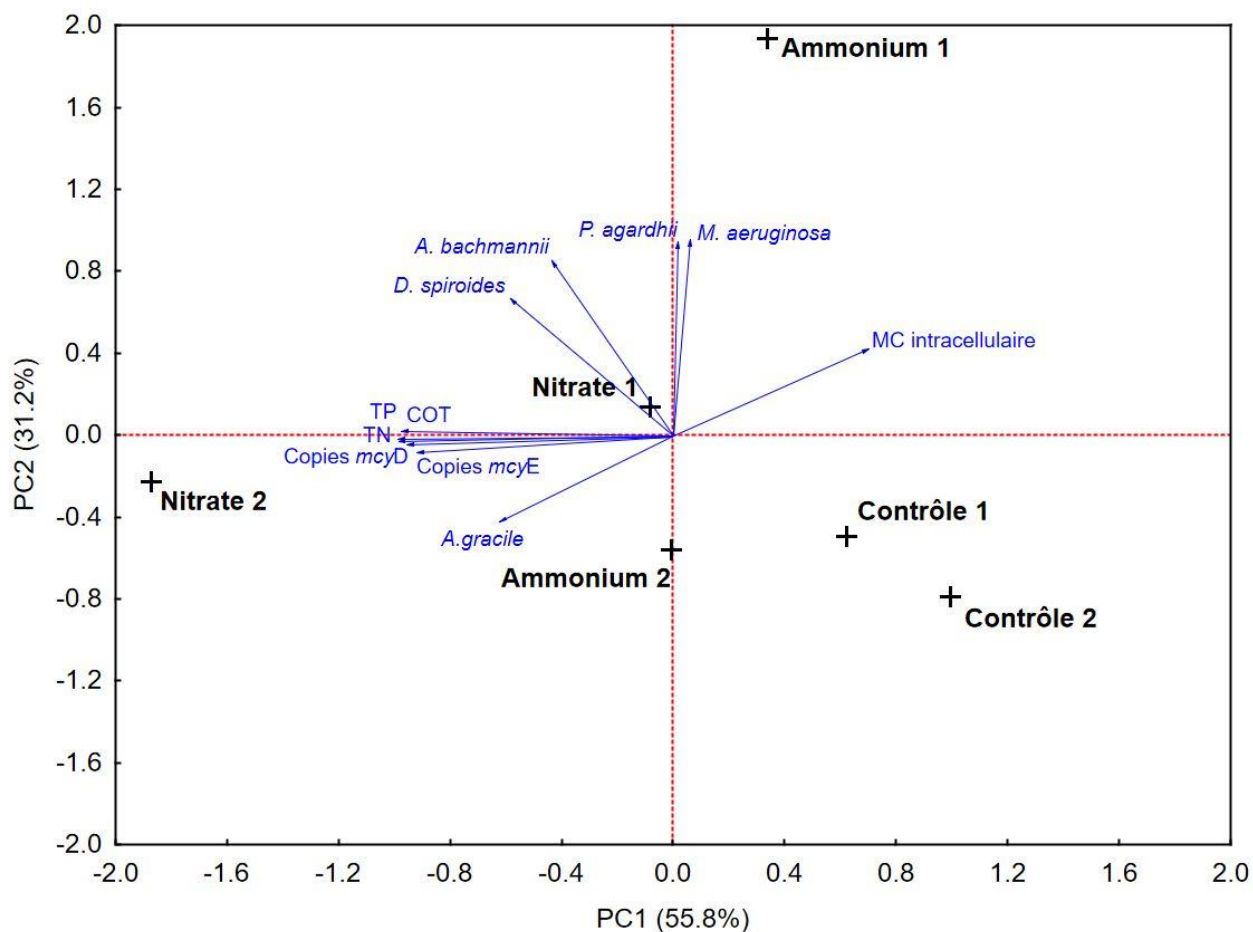


Figure 4.21 : PLSF, essais du 29-31 août 2017 – Diagramme d’analyse des composantes principales incluant les biovolumes des 5 espèces de cyanobactéries principales (mm³/l), les concentrations de microcystines intracellulaires (ng/l), d’azote total (TN), de phosphore total (TP), de carbone organique total (COT) et le nombre de copies de gènes (copies/ml) à T48 pour les six mésocosmes étudiés.

L'ACP a permis de relier les variables entre elles pour former des composantes principales par des combinaisons linéaires. On a observé que la composante principale 1 (PC1) était principalement exprimée par les concentrations de nutriments (TN, TP, COT) et les concentrations de gènes (*mcyD*, *mcyE*) étant donné la proximité de leurs vecteurs à l'axe horizontal. La composante principale 2 (PC2) est quant à elle exprimée par les biovolumes des espèces *P. agardhii* et *M. aeruginosa*.

Le très petit angle entre les copies des gènes *mcyD* et *mcyE* nous a indiqué que ces deux variables étaient corrélées positivement, tout comme pour les concentrations de nutriments TN, TP et COT. Les vecteurs représentant le nombre de copies de gènes toxiques montraient également une plus grande similitude avec la cyanobactérie *A. gracile* qu'avec les autres espèces. Tandis que l'angle de près de 180° entre les microcystines et l'espèce *A. gracile* indiquait une forte corrélation négative entre ces deux variables.

Le regroupement des points Contrôle 1 et Contrôle 2 a démontré la similitude entre le comportement de ces deux mésocosmes. Par contre, les mésocosmes ayant reçus des nutriments étaient plus dispersés indiquant une plus grande variabilité dans leurs comportements. De par l'emplacement de leurs points sur le graphique, les mésocosmes dans lesquels du nitrate avaient été ajoutés étaient associés avec les concentrations de copies de gènes et les concentrations de nutriments.

La **Figure 4.22** regroupe l'ensemble des essais effectués en 2017 et en 2018 aux deux lacs. Afin de ne pas mal interpréter les résultats, l'essai du 12-14 septembre 2017 a été exclus de cette analyse étant donné la dilution possible dans les mésocosmes due aux intempéries (averses et vents). Les deux premières composantes principales représentaient ensemble 88 % de la variance des données. Elles étaient donc adéquates pour représenter le système de coordonnées XY.

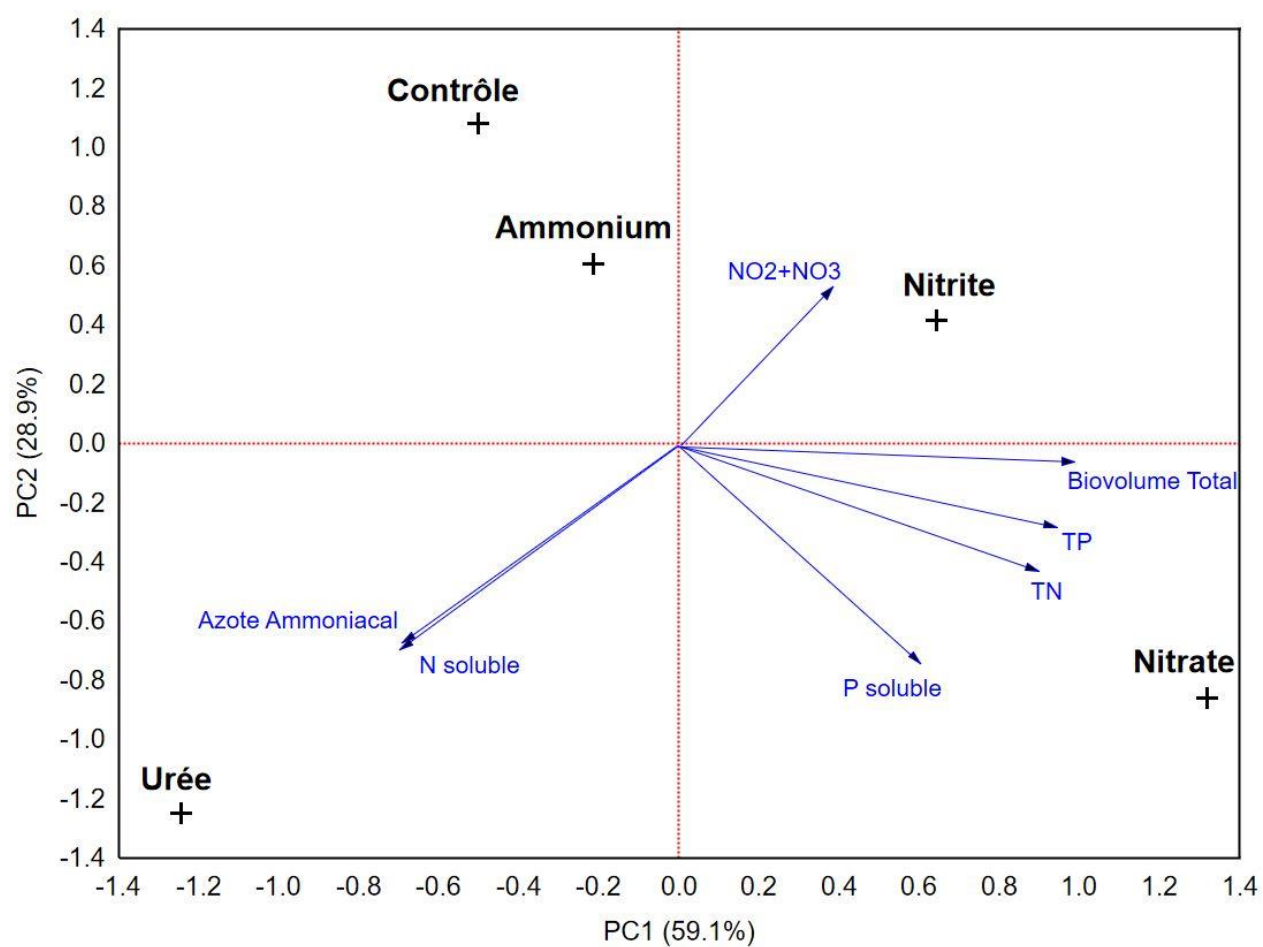


Figure 4.22 : Diagramme d'analyse des composantes principales incluant les différents mésocosmes étudiés. Les variables sont le biovolume total de cyanobactéries et les nutriments testés dans les mésocosmes à T48.

Selon les vecteurs indiqués sur la **Figure 4.22**, la composante principale 1 était représentée surtout par le biovolume total de cyanobactéries, et par les concentrations de TN et de TP. Les 5 points (représentés par des croix) présentent les types de mésocosmes testés dans cette recherche. Les mésocosmes où de l'urée a été ajoutée lors des essais présentent donc des similarités avec les données d'azote ammoniacal et d'azote soluble. Par contre, celles-ci présentent une forte corrélation négative avec les concentrations de nitrites et nitrates recensées dans les mésocosmes. L'emplacement du point « Urée » situé à l'opposé de la variable de biovolume total sur l'axe PC1 indique que les mésocosmes avec ajout d'urée ont corrélés négativement avec le biovolume total de cyanobactéries lors des essais. Tandis que l'emplacement du point « Nitrate » montre un lien entre les mésocosmes où du nitrate a été ajouté avec le biovolume total de cyanobactérie.

Les concentrations de nitrite et de nitrate présentent une similitude avec le point des mésocosmes où du nitrite a été ajouté, ce qui est attendu. Par contre, il n'y a pas de similitude indiqué avec le point représentant les mésocosmes où du nitrate a été ajouté. Il faudrait donc dans de futurs tests essayer de mieux monitorer les concentrations de nitrate ajoutées dans les mésocosmes.

Éventuellement, les concentrations de toxines totales pourraient être incluses dans cette ACP afin de déterminer quel lien elles ont avec les points analysés. Les concentrations de gènes toxiques pourront également être ajoutés tel qu'il a été fait pour les essais de 2017 à la **Figure 4.21**. Il sera alors possible de voir s'il y a une similitude entre le nombre de gènes toxiques et les autres variables mesurées.

CHAPITRE 5 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Le réchauffement climatique cause une augmentation d'espèces variées de cyanobactéries dans les zones tempérées, amplifiant les problèmes de blooms toxiques (Holland & Kinnear, 2013). Des températures plus élevées et des événements de pluie plus intenses, qui créent une hausse de l'apport de nutriments (suite au ruissellement), mèneront plus en plus de lacs à l'eutrophisation. Davantage de sources d'eau se retrouvent alors vulnérables à une contamination par les toxines produites par les cyanobactéries. Il est nécessaire de faire de la recherche afin de comprendre le rôle des facteurs qui régulent la production de cyanotoxines pour mieux contrôler la protection des sources d'eau.

5.1 Conclusions principales

Les expériences présentées dans ce mémoire offrent une perspective sur l'impact des nutriments azotés sur la croissance des cyanobactéries et sur la production des cyanotoxines dans deux plans d'eau douce situés en Estrie (QC, Canada) : PLSF en 2017 et baie Missisquoi en 2018. Les conclusions principales de cette étude sont les suivantes :

- Les deux lacs ont eu des réactions différentes à l'ajout de nutriments azotés. Au PLSF, le biovolume des cyanobactéries a augmenté suite à l'ajout d'azote contrairement aux essais à la baie Missisquoi. (Retour sur l'hypothèse I.)
- Des ratios massiques TN:TP autour de 12 étaient liés à des biovolumes de cyanobactéries élevés. (Retour sur l'hypothèse I.)
- Lors des tests faits en 2018, les baisses d'abondance, de biovolume et de cyanotoxines observées dans les mésocosmes avec ajout d'ammonium ou d'urée ont probablement été dû à une diminution de l'avantage compétitif des cyanobactéries. (Retour sur les hypothèses I et II.)
- Durant les essais de 2018 à la baie Missisquoi, les concentrations de cyanotoxines étaient les plus élevées lorsque l'abondance et le biovolume des cyanobactéries avaient augmenté. De plus, la diminution des biovolumes de cyanobactéries a coïncidé avec la diminution des mesures de cyanotoxines. (Retour sur l'hypothèse II.)

- Les tests du 24 septembre 2018 ont montré que les cyanobactéries pouvaient produire des toxines 24 heures suite à l'injection de nutriments azotés, mais qu'après 48 heures, la production pouvait être inhibée. Ceci pourrait être dû à la perte d'avantage compétitif des cyanobactéries. (Retour sur les hypothèses **II** et **III**.)
- L'ajout de nutriments azotés (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) dans les mésocosmes installés au PLSF en 2017 a augmenté le biovolume et l'abondance des cyanobactéries, mais n'a pas eu d'effet significatif sur les concentrations de toxines. De faibles concentrations de cylindrospermopsine ont été mesurées dans les mésocosmes avec apport de NO_3^- . (Retour sur l'hypothèse **III**.)
- L'analyse génétique faite dans notre étude sur les concentrations du nombre de copies de gènes toxiques (en utilisant l'ADN) n'a permis que de connaître le potentiel de toxicité des cyanobactéries. Les résultats ont indiqué que la présence de gènes toxiques ne reflétait pas nécessairement une production de toxines. (Retour sur l'hypothèse **IV**.)
- Les essais du 12-14 septembre 2017 ont probablement subis une dilution due aux vagues qui sont entrées dans les mésocosmes étant donné les conditions météorologiques défavorables (précipitations et vents).
- L'ajout d'urée lors des essais a créé une plus grande variabilité des rations massiques TN:TP donc il est important de mieux monitorer les concentrations à injecter dans les mésocosmes.
- L'ACP a montré qu'il y a une similitude entre les concentrations de gènes toxiques *mcyD* et *mcyE* et les concentrations de nutriments lors des essais en 2017 au PLSF.

5.2 Résultats à venir

Plusieurs résultats sont encore à venir concernant les essais en 2018 qui pourront enrichir les conclusions qui ont été faites jusqu'à présent. Notamment les résultats de microcystine totale et les analyses de génomique. Cette suite de l'analyse des résultats est recommandée :

- Il pourrait être intéressant d'analyser les résultats de toxines extracellulaires pour les essais à la baie Missisquoi pour voir si la diminution des comptes taxonomiques peut avoir un lien avec la diminution des toxines intracellulaires observée à la section 4.2.2. De plus, si l'on observe une augmentation des toxines extracellulaires, la diminution pourrait être liée à une sécrétion des toxines intracellulaires (expliquant pourquoi celles-ci ont diminué).
- Il sera intéressant d'inclure les données des analyses des toxines dans des diagrammes de quartiles afin d'analyser de manière plus globale l'influence des types de nutriments testés sur les concentrations de toxines. Comparer les concentrations de gènes toxiques selon les types de mésocosmes, dans un diagramme de quartiles, permettra aussi d'analyser l'influence des formes d'azote.
- Les concentrations de toxines et du nombre de copies de gènes pourraient être ajoutés dans l'ACP de l'ensemble des données de 2017 et 2018 afin d'analyser les liens et similitudes entre toutes les variables.
- L'utilisation de données d'analyses métatranscriptomiques peut s'avérer intéressante pour mieux comprendre le comportement des cyanobactéries suite à l'ajout de différentes formes d'azote dans leur écosystème. Ces analyses permettraient d'observer le transcriptome, ou l'ensemble des ARN messagers, qui fournissent de l'information sur quels gènes sont activés et leur rôle. Les stress environnementaux peuvent réguler l'expression génétique lors des phases de transcription et de traduction à travers des facteurs biotiques (incluant les organismes vivants dans l'écosystème) et abiotiques (facteurs physico-chimiques, non-vivants). Ces changements environnementaux, tel l'ajout de nutriments, peuvent avoir un impact sur la synthèse des protéines chez les

cyanobactéries, dont les toxines, d'où l'intérêt d'étudier la régulation de l'expression génétique en analysant des échantillons d'ARN.

5.3 Recommandations

Une méthode par mésocosme a permis d'analyser le comportement de cyanobactéries sous des conditions externes réalistes. Suite aux deux saisons d'essais, des recommandations quant à l'utilisation de cette méthode sont suggérées :

- Il est essentiel d'effectuer les tests lors de journées sans vent, lorsque l'eau est calme afin d'éviter que des vagues entrent dans les mésocosmes.
- Il est également important d'éviter les journées de pluie pour les essais pour éviter la dilution dans les mésocosmes, qui peut être causée par les vagues souvent présentes lors d'événements de précipitations.
- Il est préférable d'augmenter le nombre de réplicas des traitements pour mieux tenir compte de la variabilité entre mésocosmes. De plus, il est nécessaire de récolter l'eau préalablement dans un baril avant de remplir les mésocosmes pour aider à homogénéiser les conditions initiales, mais une grande variabilité peut être tout de même observable entre mésocosmes ayant subi le même traitement.
- Les échantillons doivent être récoltés et analysés minimalement au début de l'expérience, après 24 heures et après 48 heures de l'injection des nutriments azotés.
- Des expériences analogues en laboratoire, simultanément avec les essais sur le terrain, avec la même eau utilisée dans les mésocosmes permettraient de comparer les deux méthodes et de mieux comprendre le comportement des cyanobactéries suite à l'injection de nutriments azotés.

RÉFÉRENCES

- Beaver, J. R., Manis, E. E., Loftin, K. A., Graham, J. L., Pollard, A. I., & Mitchell, R. M. (2014). Land use patterns, ecoregion, and microcystin relationships in U.S. lakes and reservoirs: A preliminary evaluation. *Harmful Algae*, 36, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.03.005>
- Bellete, B., Flori, P., Hafid, J., Raberin, H., & Manh, R. T. (2003). Influence of the quantity of nonspecific DNA and repeated freezing and thawing of samples on the quantification of DNA by the Light Cycler R, 55, 213–219. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00141-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00141-6)
- Beversdorf, L. J., Chaston, S. D., Miller, T. R., & McMahon, K. D. (2015). Microcystin mcyA and mcyE gene abundances are not appropriate indicators of microcystin concentrations in lakes. *PLoS ONE*, 10(5), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125353>
- Beversdorf, L. J., Miller, T. R., & McMahon, K. D. (2015). Long-term monitoring reveals carbon-nitrogen metabolism key to microcystin production in eutrophic lakes. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00456>
- Biosistemika. (2017). Real-Time PCR (qPCR) Technology Basics. Retrieved January 7, 2019, from <https://biosistemika.com/blog/qpcr-technology-basics/>
- Boopathi, T., & Ki, J. S. (2014). Impact of environmental factors on the regulation of cyanotoxin production. *Toxins*, 6(7), 1951–1978. <https://doi.org/10.3390/toxins6071951>
- CAEAL. (2002). PRINCIPLES BEHIND THE REQUIREMENTS OF ISO/IEC 17025.
- Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2005). *Biology* (7th editio). Pearson Education Inc.
- Campos, A., & Vasconcelos, V. (2010). Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(1), 268–287. <https://doi.org/10.3390/ijms11010268>
- Chorus, I., & Bartram, J. (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London and New York.
- Chouinard, F. (2015a). *Le plan directeur de l'eau du bassin versant de la Baie Missisquoi: Diagnostic*.
- Chouinard, F. (2015b). *Le plan directeur de l'eau du bassin versant de la Baie Missisquoi: Portrait*.
- Davis, T. W., Bullerjahn, G. S., Tuttle, T., McKay, R. M., & Watson, S. B. (2015). Effects of Increasing Nitrogen and Phosphorus Concentrations on Phytoplankton Community Growth and Toxicity during Planktothrix Blooms in Sandusky Bay, Lake Erie. *Environmental Science and Technology*, 49(12), 7197–7207. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00799>
- de Boutray, M. (2017). *Cyanobactéries et leur toxines dans les sources d'eau potable*.

Polytechnique Montréal.

- Deng, L. I., & Hayes, P. K. (2008). Evidence for cyanophages active against bloom-forming freshwater cyanobacteria. *Freshwater Biology*, 53, 1240–1252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01947.x>
- Dokulil, M. T., & Teubner, K. (2000). Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia*, 438, 1–12. <https://doi.org/10.1023/A:1004155810302>
- Donald, D. B., Bogard, M. J., Finlay, K., & Leavitt, P. R. (2011). Comparative effects of urea, ammonium, and nitrate on phytoplankton abundance, community composition, and toxicity in hypereutrophic freshwaters. *Limnology and Oceanography*, 56(6), 2161–2175. <https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.6.2161>
- ECCC. (2018). Conditions météorologiques et climatiques passées : Rapport de données horaires pour le 13 septembre 2017. Retrieved February 22, 2019, from <http://climat.meteo.gc.ca/>
- Eldridge, S. L. C., Driscoll, C., & Dreher, T. W. (2017). *Using High-Throughput DNA Sequencing , Genetic Fingerprinting , and Quantitative PCR as Tools for Monitoring Bloom-Forming and Toxigenic Cyanobacteria in Upper Klamath Lake , Oregon , 2013 and 2014*. Reston, Virginia.
- EPA. (2017). *Recommendations for Cyanobacteria and Cyanotoxin Monitoring in Recreational Waters*.
- Finlay, K., Patoine, A., Donald, D. B., Bogard, M. J., & Leavitt, P. R. (2010). Experimental evidence that pollution with urea can degrade water quality in phosphorus-rich lakes of the Northern Great Plains, 55, 1213–1230. <https://doi.org/10.4319/lo.2010.55.3.1213>
- Flores, E., & Herrero, A. (2005). Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Biochemical Society Transactions*, 33(1), 164–167. <https://doi.org/10.1042/BST0330164>
- Fuller, L. M., Brenna, A. K., Fogarty, L. R., Loftin, K. A., Johnson, H. E., VanderMeulen, D. D., & Lafrancois, B. M. (2017). *Detection of microcystin and other cyanotoxins in lakes at Isle Royale National Park, Pictured Rocks National Lake- shore, and Sleeping Bear Dunes National Lakeshore, northern Michigan, 2012–13*. Michigan.
- Ginn, H. P., Pearson, L. A., & Neilan, B. A. (2010). NtcA from microcystis aeruginosa PCC 7806 is autoregulatory and binds to the microcystin promoter. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4362–4368. <https://doi.org/10.1128/AEM.01862-09>
- Groupe scientifique sur l'eau. (2017). Cyanobactéries et cyanotoxines dans l'eau potable et l'eau récréative. Dans Fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine. Retrieved January 24, 2019, from <https://www.inspq.qc.ca/eau-potable/cyanobacteries>
- Guo, Y. C., Lee, A. K., Yates, R. S., Liang, S., & Rochelle, P. A. (2017). Analysis of

- Microcystins in Drinking Water by ELISA and LC/MS/MS. *American Water Works Association*, 109(3), 13–25.
- Gustafsson, S., & Hansson, L. (2004). Development of tolerance against toxic cyanobacteria in *Daphnia*. *Aquatic Ecology*, 38, 37–44.
- Harke, M. J., Davis, T. W., Watson, S. B., & Gobler, C. J. (2016). Nutrient-Controlled Niche Differentiation of Western Lake Erie Cyanobacterial Populations Revealed via Metatranscriptomic Surveys. *Environmental Science and Technology*, 50(2), 604–615. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03931>
- Harris, T. D., Smith, V. H., Graham, J. L., Waa, D. B. V. de, Tedesco, L. P., & Clercin, N. (2016). Combined effects of nitrogen to phosphorus and nitrate to ammonia ratios on cyanobacterial metabolite concentrations in eutrophic Midwestern USA reservoirs. *Inland Waters*, 6(2), 199–210. <https://doi.org/10.5268/IW-6.2.938>
- Harris, T. D., Wilhelm, F. M., Graham, J. L., & Loftin, K. A. (2014). Experimental manipulation of TN:TP ratios suppress cyanobacterial biovolume and microcystin concentration in large-scale in situ mesocosms. *Lake and Reservoir Management*, 30(July 2015), 84–93. <https://doi.org/10.1080/10402381.2013.876132>
- Holland, A., & Kinnear, S. (2013). Interpreting the Possible Ecological Role(s) of Cyanotoxins: Compounds for Competitive Advantage and/or Physiological Aide? *Marine Drugs*, 11(7), 2239–2258. <https://doi.org/10.3390/md11072239>
- Hotto, A. M., Satchwell, M. F., Berry, D. L., Gobler, C. J., & Boyer, G. L. (2008). Spatial and temporal diversity of microcystins and microcystin-producing genotypes in Oneida Lake, NY. *Harmful Algae*, 7(5), 671–681. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.02.001>
- Hu, Q., Westerhoff, P., & Vermaas, W. (2000). Removal of Nitrate from Groundwater by Cyanobacteria : Quantitative Assessment of Factors Influencing Nitrate Uptake. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 133–139.
- INSPQ. (2005). *Propositions de critères d'intervention et de seuils d'alerte pour les cyanobactéries*.
- Jena, N. (2012). DNA damage by reactive species : Mechanisms , mutation and repair. *J. Biosci*, 37(July), 503–517. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9218-2>
- Kaebernick, M., & Neilan, B. A. (2001). Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(00\)00093-3](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(00)00093-3)
- Kato, H., Tsuji, K., & Harada, K. (2009). Microbial degradation of cyclic peptides produced by bacteria, 62(4), 181–190. <https://doi.org/10.1038/ja.2009.8>

- Kokociński, M., Stefaniak, K., Mankiewicz-Boczek, J., Izydorczyk, K., & Soininen, J. (2010). The ecology of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyta) in two hypereutrophic lakes dominated by *Planktothrix agardhii* (Oscillatoriales, Cyanophyta). *European Journal of Phycology*, 45(4), 365–374. <https://doi.org/10.1080/09670262.2010.492916>
- Kormas, K. A., & Lymperopoulou, D. S. (2013). Cyanobacterial Toxin Degrading Bacteria : Who Are They? *BioMed Research International*, 2013.
- Kurmayer, R., & Christiansen, G. (2009). The Genetic Basis of Toxin Production in Cyanobacteria. *Freshwater Reviews*, 2(1), 31–50. <https://doi.org/10.1608/FRJ-2.1.2>
- L. Intruments. (2003). Determination of nitrate/nitrite in surface and wastewaters by flow injection analysis. *QuickChem Method*, 10–107.
- Levy, S. (2017). Microcystis Rising: Why Phosphorus Reduction Isn't Enough to Stop CyanoHABs. *Environmental Health Perspectives*, 125(2), 34–39. <https://doi.org/10.1289/ehp.125-A34>
- Lindell, D., & Post, A. F. (2001). Ecological Aspects of *ntcA* Gene Expression and Its Use as an Indicator of the Nitrogen Status of Marine *Synechococcus* spp . *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3340–3349. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3340>
- Lund, J. W. G., Kipling, C., & Le Cren, E. D. (1958). The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia*, 11(2), 143–170. <https://doi.org/10.1007/BF00007865>
- McCarthy, M. J., Gardner, W. S., Lehmann, M. F., & Bird, D. F. (2013). Implications of water column ammonium uptake and regeneration for the nitrogen budget in temperate, eutrophic Missisquoi Bay, Lake Champlain (Canada/USA). *Hydrobiologia*, 718(1), 173–188. <https://doi.org/10.1007/s10750-013-1614-6>
- Manage, P. M., Kawabata, Z., & Nakano, S. (2001). Dynamics of cyanophage-like particles and algicidal bacteria causing *Microcystis aeruginosa* mortality. *Limnology*, 2, 73–78.
- Monchamp, M. E., Pick, F. R., Beisner, B. E., & Maranger, R. (2014). Nitrogen forms influence microcystin concentration and composition via changes in cyanobacterial community structure. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085573>
- Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C., & Florencio, F. J. (2005). Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, 83(2), 135–150. <https://doi.org/10.1007/s11120-004-2082-7>
- Ndong, M., Bird, D., Nguyen-Quang, T., de Boutray, M. L., Zamyadi, A., Vin??on-Leite, B., ... Dorner, S. (2014). Estimating the risk of cyanobacterial occurrence using an index

- integrating meteorological factors: Application to drinking water production. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.023>
- Ngwa, F. F., Madramootoo, C. A., & Jabaji, S. (2013). Development and application of a multiplex qPCR technique to detect multiple microcystin-producing cyanobacterial genera in a Canadian freshwater lake. *Journal of Applied Phycology*, 26(4), 1675–1687. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0199-9>
- Ngwa, F. F., Madramootoo, C. A., & Jabaji, S. (2014). Comparison of cyanobacterial microcystin synthetase (mcy) E gene transcript levels, mcy E gene copies, and biomass as indicators of microcystin risk under laboratory and field conditions. *MicrobiologyOpen*, 3(4), 411–425. <https://doi.org/10.1002/mbo3.173>
- OMS. (1998). *Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR*. In: *Guidelines for drinking-water quality, Addendum to Volume 2* (Vol. 2). Genève.
- OMS. (2000). Chapter 10: CYANOBACTERIA AND ALGAE. In J. Bartram & G. Rees (Eds.), *Monitoring Bathing Waters - A Practical Guide to the Design and Implementation of Assessments and Monitoring Programmes*.
- Orihel, D. M., Bird, D. F., Brylinsky, M., Chen, H., Donald, D. B., Huang, D. Y., ... Smith, R. E. H. (2012). High microcystin concentrations occur only at low nitrogen-to-phosphorus ratios in nutrient-rich Canadian lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 69(9), 1457–1462. <https://doi.org/10.1139/f2012-088>
- Orihel, D. M., Hadas, O., Pinkas, R., Viner-Mozzini, Y., & Sukenik, A. (2013). Internal nutrient loading may increase microcystin concentrations in freshwater lakes by promoting growth of *Microcystis* populations. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 49(3), 225–235. <https://doi.org/10.1051/limn/2013052>
- Pacheco, A. B. F., Guedes, I. A., & Azevedo, S. M. F. O. (2016). Is qPCR a reliable indicator of cyanotoxin risk in freshwater? *Toxins*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/toxins8060172>
- Palkova, Z. (2004). Multicellular microorganisms: Laboratory versus nature. *EMBO Reports*, 5(5), 470–476. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400145>
- Santé Canada. (2016). *Les toxines cyanobactériennes dans l'eau potable*.
- Scott, J. T., McCarthy, M. J., Otten, T. G., Steffen, M. M., Baker, B. C., Grantz, E. M., ... Paerl, H. W. (2013). Comment: An alternative interpretation of the relationship between TN:TP and microcystins in Canadian lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70(July), 1265–1268. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2012-0490>
- Sharkey, F. H., Banat, I. M., & Marchant, R. (2004). A rapid and effective method of extracting fully intact RNA from thermophilic geobacilli that is suitable for gene expression analysis. *Extremophiles*, 8(1), 73–77. <https://doi.org/10.1007/s00792-003-0363-2>

- Sielaff, H., Dittmann, E., Marsac, N. T. D. E., Bouchier, C., Ohren, H. V. O. N. D., & Orner, T. B. (2003). The *mcyF* gene of the microcystin biosynthetic gene cluster from *Microcystis aeruginosa* encodes an aspartate racemase. *Biochem. J.*, 373, 909–916. <https://doi.org/10.1042/BJ20030396>
- Taylor, S. C., Laperriere, G., & Germain, H. (2017). Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: From variable nonsense to publication quality data. *Scientific Reports*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02217-x>
- Te, S. H., Chen, E. Y., & Gin, K. Y. (2015). Comparison of Quantitative PCR and Droplet Digital PCR Multiplex Assays for Two Genera of Bloom-Forming Cyanobacteria, *Cylindrospermopsis* and *Microcystis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(15), 5203–5211. <https://doi.org/10.1128/AEM.00931-15>
- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T., & Neilan, B. A. (2000). Structural organisation of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chemistry and Biology*, 7(10), 753–764. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00021-1](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00021-1)
- Van De Waal, D. B., Verspagen, J. M. H., Lüring, M., Van Donk, E., Visser, P. M., & Huisman, J. (2009). The ecological stoichiometry of toxins produced by harmful cyanobacteria: An experimental test of the carbon-nutrient balance hypothesis. *Ecology Letters*, 12(12), 1326–1335. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01383.x>
- Whitton, B. A. (2012). Chapter 24 Cyanotoxins. In B. A. Whitton (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time* (1st ed., pp. 651–675). Durham: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3>
- Wood, S. A., Dietrich, D. R., Craig Cary, S., & Hamilton, D. P. (2012). Increasing microcystis cell density enhances microcystin synthesis: A mesocosm study. *Inland Waters*, 2(1), 17–22. <https://doi.org/10.5268/IW-2.1.424>
- Wood, S. A., Rueckert, A., Hamilton, D. P., Cary, S. C., & Dietrich, D. R. (2011). Switching toxin production on and off: Intermittent microcystin synthesis in a *Microcystis* bloom. *Environmental Microbiology Reports*. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00196.x>
- Ye, W., Liu, X., Tan, J., Li, D., & Yang, H. (2009). Diversity and dynamics of microcystin-Producing cyanobacteria in China's third largest lake, Lake Taihu. *Harmful Algae*, 8(5), 637–644. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.10.010>
- Yoshida, M., Yoshida, T., Takashima, Y., Hosoda, N., & Hiroishi, S. (2007). Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. *FEMS Microbiology Letters*, 266(1), 49–53. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00496.x>
- Zhaurova, K. (2008). Genomes of Other Organisms: DNA Barcoding and Metagenomics. *Nature*

Education, 1(1).

Zong, W., Sun, F., Pei, H., Hu, W., & Pei, R. (2015). Microcystin-associated disinfection by-products: The real and non-negligible risk to drinking water subject to chlorination. *Chemical Engineering Journal*, 279, 498–506. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.05.048>

ANNEXE A CONCENTRATIONS DES CYANOTOXINES DANS LES MÉSOCOSMES, AU PLSF, EN 2017

Les tableaux de cette annexe incluent seulement les toxines qui ont été détectées à des concentrations supérieures à la limite de détection. Les listes présentées indiquent l'ensemble des toxines analysées.

Liste des toxines analysées :

- Microcystine totale (MC totale)
- Cyindrospermopsine (CYN)
- Anatoxine-a (ANA-a)

Liste des variantes de microcystines analysées :

- MC-RR
- MC-YR
- MC-Htyr
- MC-LR
- MC-HilR
- MC-WR
- MC-LA
- MC-LY
- MC-LW
- MC-LF

Tableau A1 : Concentrations (en ng/L) de microcystine intracellulaire (MC totale intra), cylindrospermopsine intracellulaire et extracellulaire (CYN intra et CYN extra), au PLSF

Date	Mésocosme	MC totale intra	Écart type	CYN intra	Écart type	CYN extra	Écart type
2017-08-31	Contrôle 1	27.3	3.9				
2017-08-31	Contrôle 2	23.2	2.7			63.5	22.9
2017-08-31	Nitrate 1						
2017-08-31	Nitrate 2	nd		nd		nd	
2017-08-31	Nitrite 1	34.9	5.3			66.6	94.1
2017-08-31	Nitrite 2	16.5	0.7				
2017-08-31	Ammonium 1	36.1	0.6				
2017-08-31	Ammonium 2	11.0	1.4			40.1	16.1
2017-09-12	Temps zéro						
2017-09-14	Contrôle 1	4.1	0.5				
2017-09-14	Contrôle 2						
2017-09-14	Nitrate 1						
2017-09-14	Nitrate 2						
2017-09-14	Nitrite 1			4.7	4.5		
2017-09-14	Nitrite 2			3.7	0.3		
2017-09-14	Ammonium 1						
2017-09-14	Ammonium 2						

Tableau A2 : Concentrations (en ng/L) de variantes de microcystine, au PLSF

Date	Mésocosme	MC- YR intra	Écart type	MC- HtyR intra	Écart type	MC- LR intra	Écart type	MC- LY intra	Écart type
2017-08-31	Contrôle 1								
2017-08-31	Contrôle 2								
2017-08-31	Nitrate 1								
2017-08-31	Nitrate 2								
2017-08-31	Nitrite 1								
2017-08-31	Nitrite 2								
2017-08-31	Ammonium 1								
2017-08-31	Ammonium 2								
2017-09-12	Temps zéro	1.1	1.6						
2017-09-14	Contrôle 1								
2017-09-14	Contrôle 2								
2017-09-14	Nitrate 1					22.6	nd	2.9	nd
2017-09-14	Nitrate 2					5.2	1.0		
2017-09-14	Nitrite 1								
2017-09-14	Nitrite 2								
2017-09-14	Ammonium 1								
2017-09-14	Ammonium 2			1.6	2.2				

ANNEXE B CONCENTRATIONS DES CYANOTOXINES DANS LES MÉSOCOSMES, À LA BAIE MISSISQUOI, EN 2018

Les tableaux de cette annexe incluent seulement les toxines qui ont été détectées à des concentrations supérieures à la limite de détection. Les listes présentées indiquent l'ensemble des toxines analysées.

Liste des toxines analysées :

- Microcystine totale (MC totale)
- Cylindrospermopsine (CYN)
- Anatoxine-a (ANA-a)
- Homoanatoxine-a (HANA-a)

Liste des variantes de microcystines analysées :

- MC-RR
- MC-YR
- MC-Htyr
- MC-LR
- MC-HilR
- MC-WR
- MC-LA
- MC-LY
- MC-LW
- MC-LF

Tableau B1 : Concentrations (en ng/L) de microcystine totale intracellulaire et extracellulaire (MC totale intra et MC totale extra), cylindrospermopsine extracellulaire (CYN extra), à la baie Missisquoi

Date	Mésocosme	MC totale intra	Écart type	MC total extra	Écart type	CYN extra	Écart type
2018-07-31	Contrôle 1						
2018-07-31	Contrôle 2	49.7	4.2				
2018-07-31	Ammonium 1						
2018-07-31	Ammonium 2						
2018-07-31	Ammonium 3	60.7	0.9	57.7	2.4		
2018-07-31	Urée 1						
2018-07-31	Urée 2	53.4	1.9				
2018-07-31	Urée 3						
2018-08-02	Contrôle 1	65.3	1.6				
2018-08-02	Contrôle 2	64.3	0.8				
2018-08-02	Ammonium 1	58.5	1.9				
2018-08-02	Ammonium 2	55.1	0.9				
2018-08-02	Ammonium 3			60.3	1.1		
2018-08-02	Urée 1	61.0	1.2				
2018-08-02	Urée 2	5.0	nd	59.8	1.4		
2018-08-02	Urée 3			61.5	2.0		
2018-09-10	Contrôle 1						
2018-09-10	Contrôle 2					970.1	409.1
2018-09-10	Contrôle 3					1277.0	94.5
2018-09-10	Urée 1					1497.2	162.4
2018-09-10	Urée 2					1437.7	344.8
2018-09-10	Urée 3					1418.0	250.6
2018-09-12	Contrôle 1						
2018-09-12	Contrôle 2					1103.7	249.9
2018-09-12	Contrôle 3					987.7	108.6
2018-09-12	Urée 1					1261.5	190.7
2018-09-12	Urée 2					1710.9	88.9
2018-09-12	Urée 3					191.7	17.6
2018-09-24	Contrôle 1						
2018-09-24	Contrôle 2						
2018-09-24	Ammonium 1						
2018-09-24	Ammonium 2						
2018-09-25	Contrôle 1						

Tableau B1 (suite)

Date	Mésocosme	MC totale intra	Écart type	MC total extra	Écart type	CYN extra	Écart type
2018-09-25	Contrôle 2						
2018-09-25	Ammonium 1						
2018-09-25	Ammonium 2						
2018-09-26	Contrôle 1						
2018-09-26	Contrôle 2						
2018-09-26	Ammonium 1						
2018-09-26	Ammonium 2						

Tableau B2 : Concentrations (en ng/L) de variantes de microcystine, à la baie Missisquoi

Date	Mésocosme	MC- RR extra	Écart type	MC- YR intra	Écart type	MC- HtyR intra	Écart type	MC- HtyR extra	Écart type
2018-07-31	Contrôle 1								
2018-07-31	Contrôle 2								
2018-07-31	Ammonium 1								
2018-07-31	Ammonium 2								
2018-07-31	Ammonium 3								
2018-07-31	Urée 1								
2018-07-31	Urée 2							65.5	7.8
2018-07-31	Urée 3								
2018-08-02	Contrôle 1			4.0	0.2	9.6	2.8		
2018-08-02	Contrôle 2								
2018-08-02	Ammonium 1								
2018-08-02	Ammonium 2								
2018-08-02	Ammonium 3							105.5	68.9
2018-08-02	Urée 1								
2018-08-02	Urée 2			12.8	nd	8.2	nd		
2018-08-02	Urée 3								
2018-09-10	Contrôle 1	71.6	20.6						
2018-09-10	Contrôle 2	56.3	8.3						
2018-09-10	Contrôle 3								
2018-09-10	Urée 1								
2018-09-10	Urée 2								
2018-09-10	Urée 3								
2018-09-12	Contrôle 1	271.1	19.3						
2018-09-12	Contrôle 2							33.3	4.8
2018-09-12	Contrôle 3	61.8	8.7						
2018-09-12	Urée 1								
2018-09-12	Urée 2								
2018-09-12	Urée 3								
2018-09-24	Contrôle 1	115.9	60.0						
2018-09-24	Contrôle 2								
2018-09-24	Ammonium 1	46.8	0.5						
2018-09-24	Ammonium 2	52.2	1.3						

Tableau B2 (suite)

Date	Mésocosme	MC- RR extra	Écart type	MC- YR intra	Écart type	MC- HtyR intra	Écart type	MC- HtyR extra	Écart type
2018-09-25	Contrôle 1	93.2	6.1						
2018-09-25	Contrôle 2	87.6	3.7						
2018-09-25	Ammonium 1	65.9	1.9						
2018-09-25	Ammonium 2	135.1	4.1						
2018-09-26	Contrôle 1	35.8	nd						
2018-09-26	Contrôle 2	51.8	nd						
2018-09-26	Ammonium 1							38.7	10.3
2018-09-26	Ammonium 2	54.2	nd						

Tableau B3 : Concentrations (en ng/l) de variantes de microcystine, à la baie Missisquoi

Date	Mésocosme	MC- LR intra	Écart type	MC- LR extra	Écart type	MC- HilR intra	Écart type	MC- HilR extra	Écart type
2018-07-31	Contrôle 1								
2018-07-31	Contrôle 2								
2018-07-31	Ammonium 1								
2018-07-31	Ammonium 2								
2018-07-31	Ammonium 3								
2018-07-31	Urée 1								
2018-07-31	Urée 2								
2018-07-31	Urée 3								
2018-08-02	Contrôle 1	4.6	0.4			297.1	33.7		
2018-08-02	Contrôle 2								
2018-08-02	Ammonium 1								
2018-08-02	Ammonium 2	6.1	4.7						
2018-08-02	Ammonium 3								
2018-08-02	Urée 1								
2018-08-02	Urée 2			6.3	nd				
2018-08-02	Urée 3								
2018-09-10	Contrôle 1			90.5	57.1				
2018-09-10	Contrôle 2			61.1	22.0				
2018-09-10	Contrôle 3			nd	-				
2018-09-10	Urée 1			189.5	25.5				
2018-09-10	Urée 2			790.6	110.4				
2018-09-10	Urée 3			189.7	40.3				
2018-09-12	Contrôle 1			426.5	221.3				
2018-09-12	Contrôle 2			917.4	301.7				
2018-09-12	Contrôle 3			594.7	378.5				
2018-09-12	Urée 1			879.8	78.0				
2018-09-12	Urée 2			1174.4	89.6			111.8	10.9
2018-09-12	Urée 3			151.2	32.7				
2018-09-24	Contrôle 1			159.3	72.5				
2018-09-24	Contrôle 2								
2018-09-24	Ammonium 1			61.2	17.4				
2018-09-24	Ammonium 2			41.1	3.9				

Tableau B3 (suite)

Date	Mésocosme	MC- LR intra	Écart type	MC- LR extra	Écart type	MC- HilR intra	Écart type	MC- HilR extra	Écart type
2018-09-25	Contrôle 1			163.9	3.3				
2018-09-25	Contrôle 2			169.2	27.8				
2018-09-25	Ammonium 1			72.0	8.1				
2018-09-25	Ammonium 2			179.1	12.7				
2018-09-26	Contrôle 1			128.0	nd				
2018-09-26	Contrôle 2			82.1	nd				
2018-09-26	Ammonium 1			56.7	12.8				
2018-09-26	Ammonium 2			108.4	nd				

Tableau B4 : Concentrations (en ng/L) de variantes de microcystine, à la baie Missisquoi

Date	Mésocosme	MC- LA extra	Écart type	MC- LY extra	Écart type	MC- LW extra	Écart type	MC- LF extra	Écart type
2018-07-31	Contrôle 1								
2018-07-31	Contrôle 2								
2018-07-31	Ammonium 1								
2018-07-31	Ammonium 2								
2018-07-31	Ammonium 3								
2018-07-31	Urée 1								
2018-07-31	Urée 2								
2018-07-31	Urée 3								
2018-08-02	Contrôle 1								
2018-08-02	Contrôle 2								
2018-08-02	Ammonium 1								
2018-08-02	Ammonium 2								
2018-08-02	Ammonium 3								
2018-08-02	Urée 1								
2018-08-02	Urée 2								
2018-08-02	Urée 3								
2018-09-10	Contrôle 1								
2018-09-10	Contrôle 2								
2018-09-10	Contrôle 3							51.6	4.8
2018-09-10	Urée 1							70.9	0.2
2018-09-10	Urée 2							85.4	24.4
2018-09-10	Urée 3								
2018-09-12	Contrôle 1								
2018-09-12	Contrôle 2								
2018-09-12	Contrôle 3								
2018-09-12	Urée 1								
2018-09-12	Urée 2			92.7	14.1	97.6	14.8		
2018-09-12	Urée 3	16.4	1.9						
2018-09-24	Contrôle 1	96.8	61.3						
2018-09-24	Contrôle 2								
2018-09-24	Ammonium 1								
2018-09-24	Ammonium 2								

Tableau B4 (suite)

Date	Mésocosme	MC- LA extra	Écart type	MC- LY extra	Écart type	MC- LW extra	Écart type	MC- LF extra	Écart type
2018-09-25	Contrôle 1	49.6	1.5						
2018-09-25	Contrôle 2	45.5	20.3						
2018-09-25	Ammonium 1	26.2	1.5						
2018-09-25	Ammonium 2	48.8	3.6						
2018-09-26	Contrôle 1	15.9	nd						
2018-09-26	Contrôle 2	43.4	nd						
2018-09-26	Ammonium 1								
2018-09-26	Ammonium 2								

ANNEXE C CONCENTRATIONS DES NUTRIMENTS DANS LES MÉSOCOSMES, AU PLSF, EN 2017

Tableau C1 : Ratios d'azote total et phosphore total (TN:TP) et ratios d'azote inorganique dissous et phosphore total (DIN:TP), au PLSF

Date	Mésocosme	Azote total TN(mg N/L)	Écart type	Phosphore total TP(µg P/L)	Écart type	TN:TP	DIN:TP
2017-08-31	Contrôle 1	33.566	0.703	2593.305	19.368	12.943	0.011
2017-08-31	Contrôle 2	16.567	0.120	1269.088	29.914	13.054	0.077
2017-08-31	Nitrate 1	49.658	0.239	3723.120	315.794	13.338	0.010
2017-08-31	Nitrate 2	122.604	9.925	10029.431	430.018	12.224	nd
2017-08-31	Nitrite 1	58.380	0.752	4562.793	148.178	12.795	0.019
2017-08-31	Nitrite 2	24.910	0.916	1921.883	28.542	12.961	0.006
2017-08-31	Ammonium 1	38.661	0.335	3017.630	111.327	12.812	0.015
2017-08-31	Ammonium 2	48.214	0.668	3794.815	117.316	12.705	0.087
2017-09-12	Temps zéro	1.703	0.021	190.649	2.442	8.932	0.047
2017-09-14	Contrôle 1	1.621	0.012	174.790	12.873	9.274	nd
2017-09-14	Contrôle 2	1.629	0.009	168.830	2.495	9.647	nd
2017-09-14	Nitrate 1	1.859	0.104	168.409	1.786	11.038	nd
2017-09-14	Nitrate 2	1.580	0.026	151.143	9.876	10.453	nd
2017-09-14	Nitrite 1	1.700	0.097	172.200	6.211	9.872	nd
2017-09-14	Nitrite 2	1.649	0.083	150.422	1.337	10.960	nd
2017-09-14	Ammonium 1	2.027	0.079	155.283	2.413	13.052	nd
2017-09-14	Ammonium 2	1.953	0.036	160.198	4.114	12.192	nd

ANNEXE D CONCENTRATIONS DES NUTRIMENTS DANS LES MÉSOCOSMES, À LA BAIE MISSISQUOI, EN 2018

Tableau D1 : Ratios d'azote total et phosphore total (TN:TP) et ratios d'azote inorganique dissous et phosphore total (DIN:TP), à la baie Missisquoi

Date	Mésocosme	Azote total (mg N/L)	Écart type	Phosphore total (µg P/L)	Écart type	TN:TP	DIN:TP
2018-07-31	Contrôle 1	9.375	1.072	1311.601	206.123	7.148	nd
2018-07-31	Contrôle 2	9.244	0.048	1104.240	28.380	8.371	nd
2018-07-31	Ammonium 1	9.307	0.121	1057.316	220.207	8.802	nd
2018-07-31	Ammonium 2	9.825	0.210	888.372	56.252	11.060	nd
2018-07-31	Urée 1	26.435	0.806	844.492	5.765	31.303	nd
2018-07-31	Urée 2	26.207	0.967	851.613	10.390	30.773	nd
2018-08-02	Contrôle 1	5.345	0.016	408.319	5.053	13.090	nd
2018-08-02	Contrôle 2	5.168	0.024	406.236	13.870	12.722	nd
2018-08-02	Ammonium 1	5.989	0.266	566.344	130.473	10.575	nd
2018-08-02	Ammonium 2	7.123	0.258	609.014	59.428	11.697	nd
2018-08-02	Urée 1	19.652	0.242	576.729	26.187	34.075	nd
2018-08-02	Urée 2	11.039	0.121	424.258	3.651	26.020	nd
2018-09-10	Contrôle 1	5.501	0.008	361.107	11.982	15.232	nd
2018-09-10	Contrôle 2	6.450	0.016	364.889	4.180	17.677	0.346
2018-09-10	Urée 1	17.341	24.275	211.585	195.436	81.956	16.695
2018-09-10	Urée 2	23.961	0.564	373.054	12.829	64.228	9.480
2018-09-12	Contrôle 1	5.957	0.395	317.757	18.008	18.745	nd
2018-09-12	Contrôle 2	5.977	0.024	307.241	7.757	19.454	0.080
2018-09-12	Urée 1	20.598	0.322	317.932	3.146	64.786	20.925
2018-09-12	Urée 2	19.914	0.322	334.105	7.998	59.603	20.595

ANNEXE E BIOVOLUMES TOTAUX DE CYANOBACTÉRIES VS PHYTOPLANKTON

Tableau E1 : Biovolumes du phytoplancton des essais du 29-31 août 2017, au PLSF

Mésocosmes	Biovolume cyanobactéries	Biovolume Autre phytoplancton	Biovolume total
T0	nd	nd	nd
Contrôle 1	1228	18	1246
Contrôle 2	463	9	472
Nitrite 1	1835	21	1856
Nitrite 2	848	13	861
Nitrate 1	1450	17	1468
Nitrate 2	1757	22	1779
Ammonium 1	2063	9	2072
Ammonium 2	1447	15	1462

Tableau E2 : Biovolumes du phytoplancton des essais du 12-14 septembre 2017, au PLSF

Mésocosmes	Biovolume cyanobactéries	Biovolume Autre phytoplancton	Biovolume total
T0	3.9	nd	nd
Contrôle 1	5.7	18.5	24.2
Contrôle 2	5.1	14.5	19.6
Nitrite 1	8.0	29.9	37.9
Nitrite 2	3.6	33.9	37.5
Nitrate 1	7.3	39.3	46.6
Nitrate 2	4.5	28.7	33.2
Ammonium 1	4.6	28.3	32.9
Ammonium 2	5.1	26.1	31.2

Tableau E3 : Biovolumes du phytoplancton des essais du 31 juil. -2 août 2018, à la baie Missisquoi

Mésocosmes	Biovolume cyanobactéries	Biovolume Autre phytoplancton	Biovolume total
T0 Contrôle 1	330.1	2.8	332.9
T48 Contrôle 1	161.1	8.1	169.3
T0 Contrôle 2	366.8	10.8	377.6
T48 Contrôle 2	170.2	11.6	181.8
T0 Contrôle 3	243.6	2.1	245.7
T48 Contrôle 3	nd	nd	nd
T0 Ammonium 1	467.0	7.4	474.4
T48 Ammonium 1	87.3	5.7	93.0
T0 Ammonium 2	435.2	8.3	443.5
T48 Ammonium 2	106.1	7.4	113.5
T0 Ammonium 3	303.4	1.1	304.5
T48 Ammonium 3	165.6	14.6	180.2
T0 Urée 1	371.2	2.2	373.3
T48 Urée 1	230.5	4.1	234.7
T0 Urée 2	349.9	2.6	352.5
T48 Urée 2	203.5	6.5	210.0
T0 Urée 3	270.9	2.6	273.5
T48 Urée 3	248.8	6.3	255.1

Tableau E4 : Biovolumes du phytoplancton des essais du 10-12 septembre 2018, à la baie Missisquoi

Mésocosmes	Biovolume cyanobactéries	Biovolume Autre phytoplancton	Biovolume total
T0 Contrôle 1	148.0	9.8	157.8
T48 Contrôle 1	180.6	11.4	191.9
T0 Contrôle 2	195.4	14.2	209.6
T48 Contrôle 2	323.9	11.2	335.1
T0 Contrôle 3	222.6	25.3	247.9
T48 Contrôle 3	178.1	11.8	189.9
T0 Urée 1	164.4	14.0	178.4
T48 Urée 1	140.1	1.4	141.6
T0 Urée 2	194.7	5.5	200.2
T48 Urée 2	149.6	2.2	151.8
T0 Urée 3	192.1	22.7	214.8
T48 Urée 3	134.0	1.5	135.5

Tableau E5 : Biovolumes du phytoplancton des essais du 24-26 septembre 2018, à la baie Missisquoi

Mésocosmes	Biovolume cyanobactéries	Biovolume Autres phytoplancton	Biovolume total
T0 Contrôle 1	39.2	8.6	47.9
T24 Contrôle 1	34.9	24.7	59.6
T48 Contrôle 1	31.1	30.4	61.5
T0 Contrôle 2	45.4	6.3	51.8
T24 Contrôle 2	42.2	42.8	85.0
T48 Contrôle 2	36.5	12.7	49.2
T0 Ammonium 1	22.9	21.5	44.3
T24 Ammonium 1	12.7	12.4	25.1
T48 Ammonium 1	29.9	9.0	38.9
T0 Ammonium 2	12.0	14.5	26.5
T24 Ammonium 2	68.4	17.2	85.6
T48 Ammonium 2	30.2	15.8	46.1