

Récolte d'*Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Born. & Flah. var. *flos-aquae* (cyanobactérie) du lac Klamath pour usage alimentaire humain

Wayne W. Carmichael*, Christian Drapeau^{1,2} & Donald M. Anderson³

Department of Biological Sciences, Wright State University, Dayton, Ohio 45435, USA

¹ Cell Tech International, 1300 Main Street, Klamath Falls, Oregon 97601, USA

² Adresse actuelle : Desert Lake Technologies Inc. P.O. Box 489, Klamath Falls, Oregon 97601, USA

³ Biology Department, Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, Massachusetts 02543, USA

(*Contact de l'auteur : tél. : +1-937-775-3173, fax : +1-937-775-3320; e-mail : wayne.carmichael@wright.edu)

Reçu 2000, révisé le 18 avril, accepté 2000

Mots clefs : *Aphanizomenon flos-aquae*, biomasse, algue bleu-vert, cyanobactérie, alimentation, récolte, lac Klamath, contrôle de qualité, efflorescence

Résumé

Dans les cultures occidentales, depuis une trentaine d'années, certaines cyanobactéries sont devenues source admise de micro-algues alimentaires, en particulier *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* et *S. maxima*. Au début des années 1980, une autre espèce, *Aphanizomenon flos-aquae*, fut adoptée pour une utilisation similaire. Elle est recueillie dans l'Upper Klamath Lake, le plus grand système lacustre d'eau douce d'Oregon, aux Etats-Unis. En 1998, la production commerciale annuelle d'*Aphanizomenon flos-aquae* a été d'environ mille tonnes. Etant donné que cette espèce n'est pas cultivée comme la spiruline dans des bassins de plein air ou des étangs de type « champs de course » (raceways), elle nécessite des procédures de récolte et de transformation très différentes. Ces procédures, examinées ici, font appel à de grands filtres, ou tamis, hors du lac ou à des barges posées sur le lac, qui assèchent et concentrent les microalgues. Certains procédés, comme ceux qui sont utilisés pour l'enlèvement des détritiques et des matières minérales et ceux qui permettent de surveiller et de réduire la quantité de certaines cyanobactéries contaminantes susceptibles de produire des neurotoxines ont également pris de l'importance dans le contrôle qualité et la commercialisation.

Introduction

Partout dans le monde et durant des milliers d'années, les algues ont été synonymes de source alimentaire et de traitement contre divers troubles physiques (Hoppe, 1979 ; Richmond, 1990). Dans les régions côtières de l'Extrême-Orient, on a découvert que l'usage de macroalgues (les « algues » du langage courant) comme source alimentaire a commencé vers 6000 avant JC et démontré que de nombreuses espèces étaient utilisées comme nourriture et traitement médical autour de l'an 900 de notre ère (Cannell, 1990). Les Espagnols ont fait état de l'usage de microalgues comme source alimentaire lorsqu'ils ont rapporté que les indigènes du lac Texcoco recueillaient des cyanobactéries dans les eaux du lac pour en faire des gâteaux séchés au soleil (Farrar, 1966 ; Ciferri, 1983). En Afrique aujourd'hui, des tribus locales récoltent des cyanobactéries dans la région du lac Tchad, principalement *Spirulina*, et en font également de solides gâteaux appelés *dihé* (Ciferri, 1983 ; Abdulqader et al., 2000). Dans certaines régions du Tchad, les gens en consomment de 9 à 13 g par repas, ce qui constitue 10 à 60% du repas (Delpuech et al., 1975). Toutefois, la plus longue utilisation de cyanobactéries alimentaires constatée jusqu'à présent est la consommation de *Nostoc flagelliforme* en Chine, une consommation attestée depuis quelque deux mille ans et encore en vigueur aujourd'hui, cette cyanobactérie étant toujours recueillie à grand échelle (Gao, 1998). Dans les cultures occidentales, l'utilisation de microalgues a débuté dans les années 1970 (Becker & Venkataraman, 1980). De nos jours, la plupart des producteurs commerciaux de microalgues se situent dans la région Asie-Pacifique où quelque 110 de ces producteurs ont une production annuelle de 300 à 500 tonnes. Ces microalgues cultivées sont, entre autres, *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*, *Nannochloropsis*, *Nitzschia*, *Cryptocodium*, *Tetraselmis*, *Skeletonema*, *Isochrysis* et *Chaetoceros* (Lee, 1997).

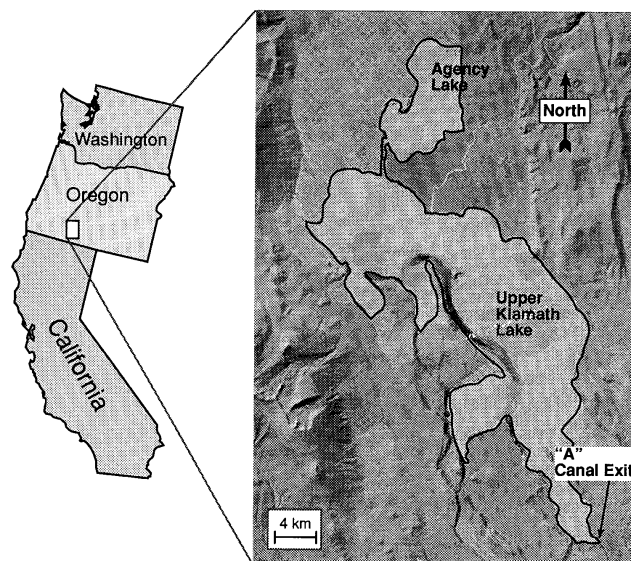


Figure 1. L'Upper Klamath Lake et son lac contigu, Agency Lake, situés dans le sud de l'Oregon, aux Etats-Unis.

Les cyanobactéries *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* et *S. maxima* sont produites à l'échelle commerciale comme complément alimentaire humain et animal et comme colorant depuis une trentaine d'années (Ciferri & Tiboni, 1985 ; Belay et al., 1996). *Spirulina* est cultivée dans des bassins artificiels de plein air en Afrique (Toerien & Grobbelaar, 1980), Californie, Hawaii, Thaïlande, Chine (Li & Qi, 1997), Taiwan (Soong, 1980) et Inde (Becker & Venkataraman, 1984) avec une production mondiale en 1995 d'environ 2 000 tonnes (Belay et al., 1996). Mais la plus récente cyanobactérie pouvant être utilisée comme complément alimentaire est *Aphanizomenon flos-aquae*, dont la production diffère significativement de celle de *Spirulina* car elle est extraite d'un lac naturel au lieu d'être cultivée dans des bassins artificiels. Depuis le début des années 1980, cette algue (le mot « algue » sera repris dans cet article car c'est le terme utilisé par tous les consommateurs de ce produit) est extraite de l'Upper Klamath Lake, en Oregon, et vendu comme aliment et comme complément alimentaire de santé. En 1998, le marché d'*Aph. flos-aquae* comme complément santé a constitué environ \$100 millions avec une production annuelle dépassant les mille tonnes (poids à sec). Cet article examine les techniques de récolte et de transformation actuellement en usage au lac Klamath afin de préparer cette biomasse, ainsi que les questions de contrôle de qualité soulevées par la présence de cyanotoxines.

L'écosystème du lac Klamath

L'Upper Klamath et son lac contigu, l'Agency Lake, est le plus grand système lacustre d'eau douce d'Oregon (surface de 324 km² ; littoral de 161 km de long en moyenne). Il draine un bassin versant de 9 800 km² (figure 1). L'Upper Klamath Lake est peu profond, avec une profondeur moyenne de 2,4 m. Il est flanqué à l'ouest par les Cascade Mountains et à l'est par le Great Basin. Le lac Klamath est alimenté par deux affluents principaux, la Williamson River et la Wood River, ainsi que par de nombreuses sources et cours d'eau moins importants.

Les récits historiques, qui datent de plus d'un siècle, attestent que le lac a toujours été productif, contenant non seulement une grande quantité d'algues mais également des poissons et de nombreuses espèces d'oiseaux d'eau et d'oiseaux prédateurs. Lorsque de la glace du lac fut prélevée pour la première fois (en 1906), on remarqua qu'elle était colorée en vert à cause des algues. Les poissons suceurs (meuniers) étaient si répandus que les gens utilisaient des fourches pour les pêcher. On a rapporté des densités de nids de balbuzards atteignant dix unités par mille carré (Bortleson & Fretwell, 1993). Aujourd'hui, le Klamath Basin est toujours le lieu d'hivernage du plus grand

rassemblement de pygargues à tête blanche des 48 Etats et est également la plus grande halte pour les oiseaux d'eau dans la voie migratoire Pacifique.

Le lac Klamath a vu son eutrophisation augmenter depuis sa découverte par les Américains non-autochtones (Wood et al., 1996 ; Kann, 1997). L'hydrologie du lac a été transformée par les détournements d'eau dans les bassins versants supérieurs et par la construction d'un barrage à la sortie du lac en 1921. Les flux de déversement du lac, essentiels pour l'exportation d'éléments nutritifs, ont été modifiés et le niveau du lac s'est réduit à un niveau inférieur à celui d'avant 1921. Le niveau d'eau plus bas a contribué à une remise en suspension de sédiments du fond, provoquée par le vent, augmentant la biodisponibilité des éléments nutritifs du lac (Laenen & LeTourneau, 1996). Ce facteur, de même que des changements dans les pratiques agricoles dans le bassin versant, induisent des apports en phosphore (P) venant des zones humides de 3 à 10 fois supérieurs aux niveaux trouvés dans les affluents de l'Upper Klamath Basin (entrées dans les affluents de 65 µg/l) (Miller & Tash, 1967 ; Kann, 1997).

Ces changements subis par le lac et son bassin versant ont indubitablement contribué à l'émergence des conditions qui permettent actuellement à *Aph. flos-aquae* de dominer largement le phytoplancton d'environ juin à octobre. La présence d'*Aph. flos-aquae* a été rapportée pour la première fois en 1933. Dès la fin des années 1930, elle fut signalée comme abondante, mais pas dominante, alors que dès le milieu des années 1950, elle était dominante (Bortleson & Fretwell, 1993 ; Phinney & Peek, 1961). Les registres actant la prolifération d'algues au cours des sept dernières années montrent qu'*Aph. flos-aquae* est l'espèce dominante du phytoplancton dans l'Upper Klamath Lake (figure 2). En règle générale, les efflorescences dans le lac Klamath débutent en mars, dominées par les diatomées *Fragilaria* (env. 5 mg/l). De fin mai à début juin, *Aph. flos-aquae* commence à s'épanouir à son tour (3-15 mg/l). Pendant ce temps, une petite floraison d'*Anabaena flos-aquae* peut se produire, constituant moins de 1% de la biomasse. *Microcystis aeruginosa* et *Coelosphaerium* apparaissent souvent en juillet et persistent jusqu'à la fin de l'automne. *Aph. flos-aquae* reste l'espèce dominante jusqu'en octobre ou novembre, atteignant une biomasse pouvant excéder 50 mg/l. Les épanouissements d'*Aph. flos-aquae* sont souvent biphasiques, avec un premier pic fin juin début juillet et un second pic de fin septembre à mi-octobre (Kann, 1997). Les estimations de la capacité de récolte sont rares mais l'une d'entre elles réalisée pour le milieu des étés 1965 et 1966 établit la biomasse d'*Aph. flos-aquae* à environ 30 mille tonnes (Miller & Tash, 1967). Compte tenu de la dynamique de son efflorescence, les récolteurs de la biomasse lacustre font état d'une période de récolte de mi-juin à mi-juillet et de septembre à mi-octobre.

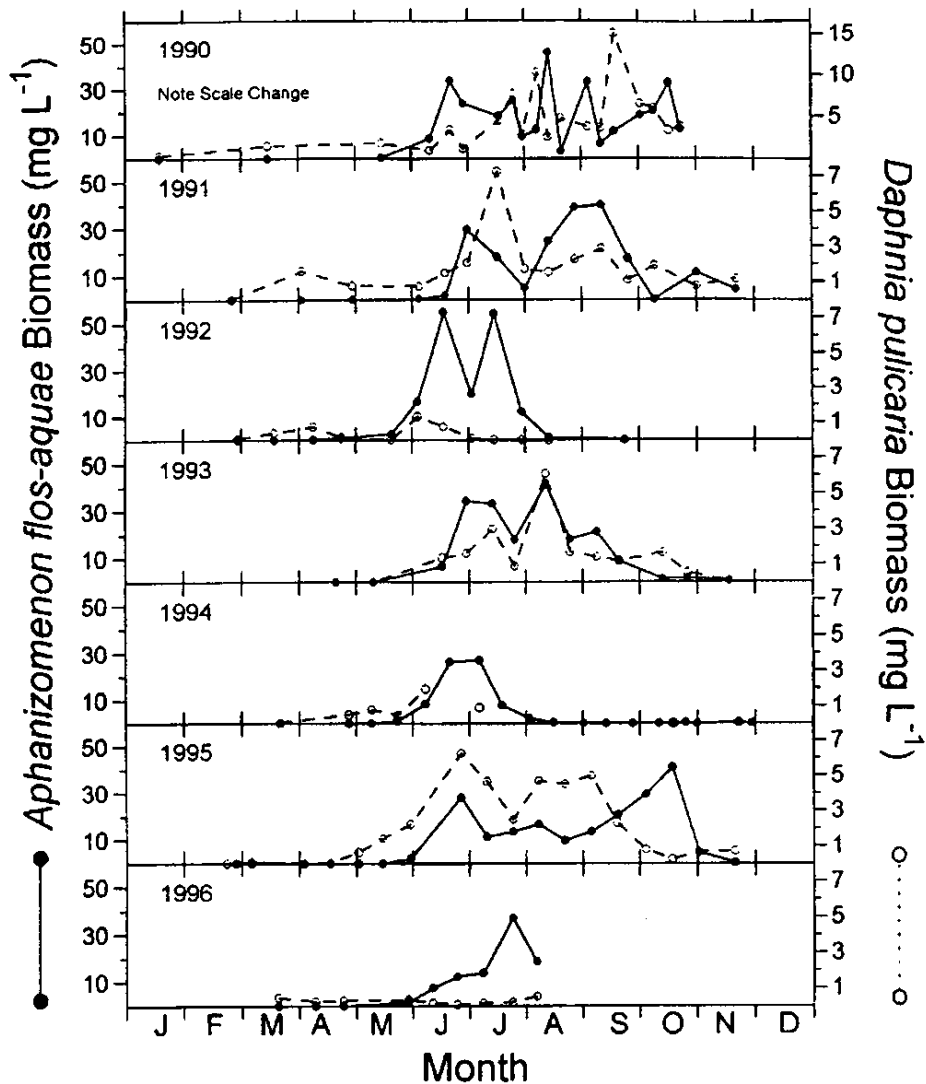


Figure 2. Biomasse totale moyenne d'*Aphanizomenon flos-aquae* (en mg/l de poids humide, ligne continue) et de *Daphnia pulicaria* (en mg/l, ligne pointillée) dans l'Upper Klamath Lake, Oregon, 1990–1996. Reproduit avec la permission de J. Kann (Kann, 1997, p. 21).

Procédés de récolte

Deux procédés de récolte sont majoritairement en usage sur le lac Klamath. Le plus grand récolteur récupère *Aph. flos-aquae* après son passage du lac vers un canal d'irrigation appelé le canal A (figure 1). A partir de ce canal, un grand nombre de filtres sont utilisés pour recueillir la biomasse qui est ensuite nettoyée et séchée (voir détails ci-dessous). Par ailleurs, trois, et parfois quatre, opérateurs recueillent *Aph. flos-aquae* directement depuis la surface du lac. Dans ce cas, deux techniques de récolte sont utilisées, faisant toutes deux appel à des barges autoalimentées. Le premier type de barge dispose de tamis rotatifs que l'on peut abaisser juste en dessous de la surface du lac. Avec l'autre procédé, on pompe l'eau et les algues sous la surface vers les tamis sur la barge. Comme la plupart des algues flottent à une profondeur maximale d'un mètre,

ces méthodes permettent d'obtenir une biomasse plus importante qu'à plus grande profondeur. Le produit récolté de cette manière est conservé sur les barges à température ambiante ou parfois refroidi à environ 4°C jusqu'à ce que la biomasse soit transportée vers une usine de transformation à terre. Aucune donnée n'est actuellement disponible concernant la quantité de produit recueillie par ces opérateurs sur le lac.

Récolte par canal et transformation

Ce qui suit décrit la méthode de récolte et de traitement des cyanobactéries mise en œuvre par Cell Tech International, premier et plus grand opérateur sur le lac Klamath. De 1980 à 1989, cette entreprise ne pratiquait la récolte d'*Aph. flos-aquae* qu'à petite échelle (quelques milliers de kg de poids à sec/an), par gravité, à partir d'un trou percé dans un aqueduc d'irrigation surélevé, en béton, partant du lac Klamath. En 1989, elle a obtenu le droit d'opérer sur son lieu actuel qui reçoit sa matière depuis une zone du système d'aqueducs du lac Klamath appelée canal A. Ce canal débute au sud du lac Klamath (figure 1) et court vers le sud-est sur près de 15 km avant de se diviser en deux canaux séparés : le canal B, qui transporte de l'eau d'irrigation vers l'est, et le canal C qui convoie de l'eau vers le sud de l'Oregon et le nord de la Californie. Le carrefour où le canal A se divise en canaux B et C est le lieu de récolte (figure 3). Le choix de ce lieu fut influencé par la présence d'une usine hydroélectrique abandonnée disposant d'une chute de sept mètres au début du canal C. Cette caractéristique est utilisée pour amener l'eau par gravité dans les tamis de récolte.

Filtres anti-débris

Juste avant les installations de récolte, l'entreprise a placé des filtres anti-débris dont la fonction est de réduire la quantité de débris divers et de poissons atteignant les installations de récolte (figure 3). Ces filtres anti-débris ressemblent à ceux qui sont fréquemment utilisés sur les canaux d'irrigation agricole dans le bassin du Klamath mais en beaucoup plus grand. Les filtres avant et arrière, dont les mailles mesurent de 0,6 à 1,2 cm, sont placés dans des fentes verticales en face du flux entrant dans les installations de récolte. Lorsque les premiers filtres sont remplis de débris, ils sont levés et lavés manuellement depuis le dessous avec de l'eau sous pression. Les filtres arrière sont nettoyés après que les filtres avant ont été remis en place. Au total, 55 filtres anti-débris, présentant une surface d'à peu près 150 m² de surface humide (Gutermuth et al., 1998), permettent à l'eau de passer rapidement et minimisent le différentiel de pression à travers les structures. Etant donné que ces filtres anti-débris ne se trouvent pas au point de sortie de l'Upper Klamath Lake (au début du canal A), ils ne doivent pas être conformes aux directives gouvernementales relatives à la pêche et qui s'appliquent à

tous les « filets à poissons ». Par conséquent, certains petits poissons, de même que des débris, passent tout de même avec les algues et se retrouvent dans la récolte dont on doit les sortir mécaniquement.

Comme ces poissons qui se glissent dans les installations de récolte comprennent deux espèces de poissons suceurs (meuniers) classés en voie de disparition par les autorités fédérales, une attention particulière est accordée au processus de tamisage. En 1996 a commencé la collaboration avec le personnel local du Fish and Wildlife Service pour étudier le piégeage des larves et des poissons plus gros, les modèles de vitesse autour des filtres anti-débris, l'attraction des poissons vers les sorties des installations de récolte et les variations de qualité aquatique résultant des procédés de récolte (Gutermuth et al., 1998).

Tamis de récolte des algues

La première série de tamis destinés à la collecte des algues sur le canal A a été construite en 1990, leur conception permettant de collecter moins d'un tiers du flux du canal C (le canal C débite à 20 m³/s). À l'automne 1996, les installations de récolte furent agrandies afin de traiter l'ensemble du flux du canal A qui peut atteindre 28,3 m³/s. Au total, 46 tamis ont été construits, 8 étant situés sur le canal C supérieur, 28 sur le canal C inférieur et 10 sur le canal B (figure 3). Sur les tamis du canal C, la chute disperse l'eau sur les filets tandis que dans le canal B, l'eau est pompée à travers les tamis. Ceux-ci constituent le premier lieu de déshydratation, les algues étant retenues à leur surface alors que l'eau retombe dans le canal en contrebas.

Les tamis, en nylon, présentent une surface de 20 m². Ils sont fixés à une base métallique et légèrement inclinés par rapport à l'horizontale. Ils fonctionnent comme un filtre, l'eau passant à travers tandis que l'algue reste en surface avant d'être recueillie. Un dispositif à jet d'eau manuel passant au-dessus et à travers chaque tamis déplace la biomasse collectée vers un conduit où elle est pompée vers un filtre secondaire vibrant. Ce tamis vibrant supprime toute matière indésirable qui aurait échappé aux premiers écrans anti-débris. Il permet également de recueillir de petits crustacés comme *Daphnia* (figure 2) qui sont commercialisés comme produit alimentaire destiné au secteur de l'aquaculture. Après avoir passé ces tamis vibrants, la boue d'algue est constituée d'à peu près 0,1% de matière solide.

La biomasse d'*Aph. flos-aquae* disponible sur le site de récolte est très variable mais la surveillance de la biomasse du lac et sur le site de récolte permet un usage plus efficace des installations. Le débit du canal est corrigé des variations saisonnières et régulé par le

Klamath Irrigation District. La décision de récolter et la capacité de production mise en œuvre sont déterminés par le flux de produit passant dans le site de récolte. Ce flux de produit (en mg/min) est calculé en combinant les débits d'eau (en l/min) et de biomasse du produit (en mg/l), mesurés en amont des filtres. La figure 4 montre la variation de la biomasse du phytoplancton et le flux de produit sur le site de récolte durant la saison 1998.

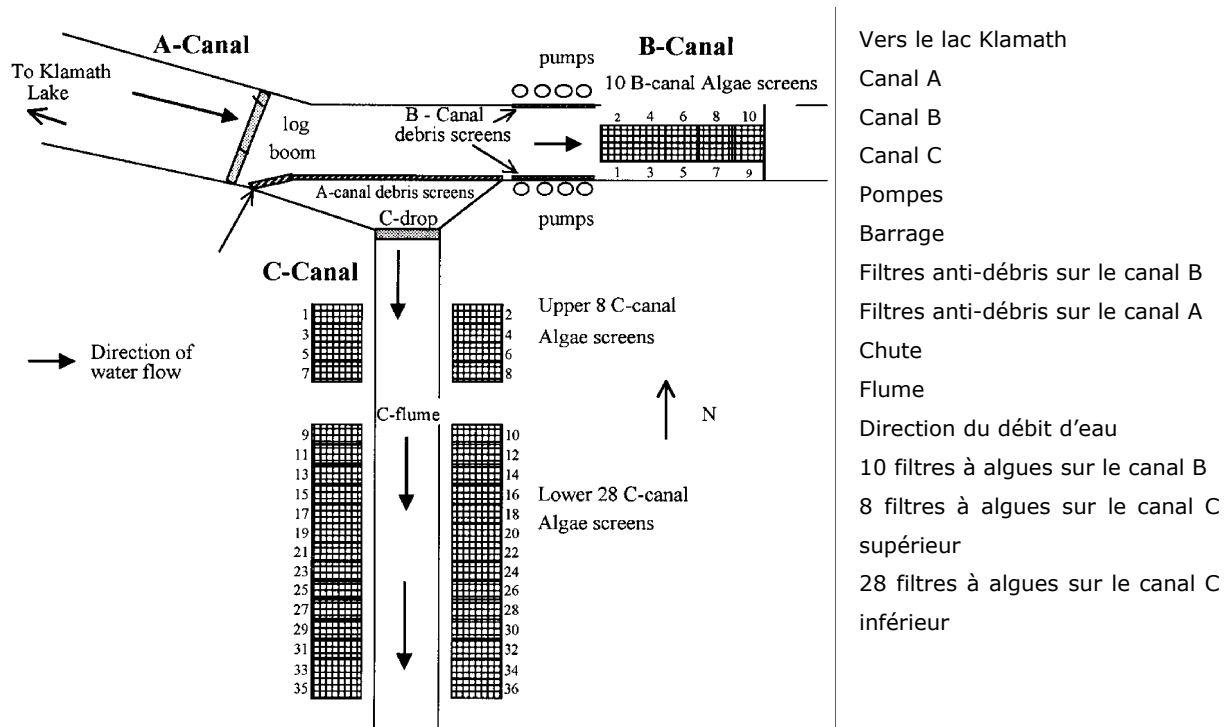


Figure 3. Représentation schématique du site de récolte de Cell Tech. L'eau descend le canal A, lequel se divise ensuite en canal B et canal C. Dans le canal C, l'eau passe par gravité par une série de tamis. Dans le canal B, l'eau est pompée à travers les tamis. Des deux côtés, l'eau est tout d'abord filtrée pour empêcher l'entrée des poissons et des débris sur le site. La biomasse d'algues recueillie sur les deux sites passe ensuite par un pertuis et est pompée vers une centrifugeuse horizontale pour traitement ultérieur.

Traitement et stockage

Le produit passant par le tamis vibrant est pompé vers une série de trois centrifugeuses horizontales à basse vitesse dont le rôle est d'éliminer les petits corps étrangers. Cette étape tire parti du fait que la densité d'*Aph. flos-aquae* est presque égale à celle de l'eau, ce qui permet la séparation par centrifugation du sable, du limon et de tout autre résidu léger. Le concentré d'algues est ensuite conduit par gravité dans une usine de traitement de 1200 m². A l'entrée de cette usine, les algues passent tout d'abord à travers un filtre cylindrique en acier inoxydable afin de réduire la quantité de matières étrangères qui pourraient endommager la centrifugeuse utilisée pour la déshydratation et la

concentration des algues. Cette centrifugeuse est verticale et applique une importante force G pour séparer les cellules et les colonies, supprimant environ 90% de l'eau subsistant encore. A ce stade, le produit est composé de 6 à 7% de matière solide. Une fois concentré, ce produit est réfrigéré à 2°C et stocké avant d'être pompé vers les congélateurs.

Les congélateurs, des cylindres verticaux en acier inoxydable de 6,8 m² avec double enveloppe à l'ammoniac, maintiennent une température de surface de -50°C. Les algues sont réparties sur la surface en inox sur une épaisseur d'environ 3 mm par une série de tubes et gèlent en quelques secondes. Les algues congelées sont ensuite retirées de la surface du tambour du congélateur au moyen d'une lame raclante, formant alors des pièces d'algues surgelées de 5 à 10 cm. Ce produit congelé tombe ensuite du tambour dans des boîtes de stockage. Ces boîtes sont remplies d'environ 450 kg de produit puis sont retirées du congélateur via un système de transport automatisé. Elles sont alors munies d'un code-barres reprenant la date, l'heure et le poids puis expédiées à l'unité de congélation pour stockage. Si nécessaire, le produit congelé est envoyé vers une unité externe sous-traitant sa lyophilisation et sa transformation en une poudre contenant 3 à 5% d'eau. Ce produit final est ensuite transformé en produits consommables comme des capsules ou des comprimés.

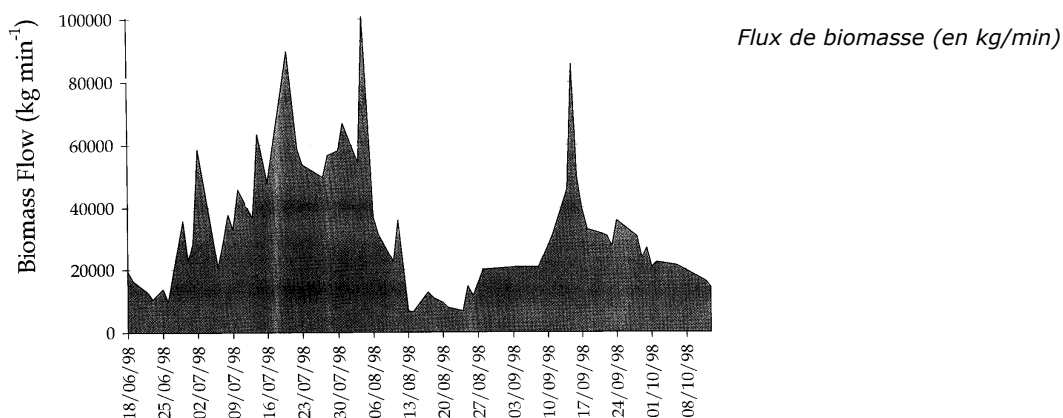
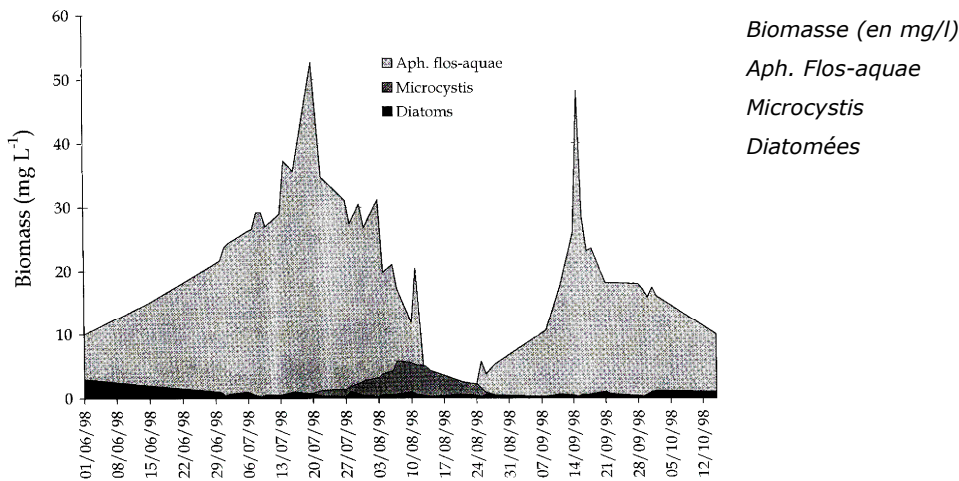


Figure 4. Pics de biomasse (en mg/l) pour les trois éléments majeurs du phytoplancton sur le site de récolte du canal C entre juin et octobre 1998. En dessous, le flux de phytoplancton (en kg/min) après le lieu de récolte entre juin et octobre 1998.

Procédures de contrôle qualité

En général, tous les récolteurs disposent d'un programme d'assurance qualité/contrôle qualité qui leur enjoint d'effectuer divers échantillonnages et tests au cours de la récolte et pendant la production, ceci afin de surveiller la qualité du produit. Des lots d'algues en poudre sont soumis à une série de tests afin de contrôler leur qualité en tant que telle et leur sûreté. Les études menées sur le lieu de récolte de Cell Tech montrent que les changements affectant la floraison des algues sur le lac prennent au moins deux à trois jours avant de se manifester sur le site de récolte. Par conséquent, un lot se compose normalement d'une journée de récolte. En raison du potentiel qu'ont certaines cyanobactéries de produire des cyanotoxines (Carmichael, 1997), la biomasse séchée peut être analysée suivant quatre méthodes de recherche de ces cyanotoxines :

- 1) dosage biologique sur souris pour la détection de neurotoxines (saxitoxine STX, anatoxine-a),
- 2) dosage ELISA (dosage immunoenzymatique sur support solide) pour la détection de microcystines (hépatotoxines),
- 3) dosage enzymatique par spectrophotométrie pour détecter la présence d'une neurotoxine inhibitrice de l'acétylcholinestérase (anatoxine-a(s)) et
- 4) dosage PPIA (inhibition de la protéine phosphatase PP) pour la détection de microcystines (hépatotoxines).

Un lot peut varier de 20 à 300 boîtes (450 kg/boîte) d'algues congelées. Un échantillon d'un kg est prélevé sur chaque boîte et étiqueté avec le numéro du lot et l'heure. Pour chaque lot, un « Acceptance Sampling » (échantillonnage acceptable) (Taylor, 1992) détermine la taille de l'échantillon à prélever pour que l'ensemble échantillonné soit représentatif de tout le lot. Cet ensemble échantillonné, congelé, est lyophilisé, homogénéisé au tamis et envoyé pour analyse. Les échantillons restent congelés jusqu'à l'obtention des résultats des tests. Lorsqu'un lot est accepté, il est lyophilisé puis libéré pour transformation en produit fini.

Recherche de neurotoxines

La littérature scientifique évoquant la neurotoxicité des échantillons d'algues du lac Klamath n'est pas probante et aucune neurotoxine n'a jamais été trouvée dans le phytoplancton du lac Klamath au cours des sept dernières années de tests réguliers. Cependant, l'analyse de la neurotoxicité est nécessaire car deux souches d'*Aphanizomenon* ont été signalées comme productrices de neurotoxines (Mahmood & Carmichael, 1986 ; Rapala et al., 1993). Il a été démontré que l'une de ces souches, NH-5 (qui produit des saxitoxines, Mahmood & Carmichael, 1986) n'est pas la variété *flos-aquae* (Li et al., sous presse) alors que la variété présente dans le lac Klamath est *flos-aquae* Ralfs ex Born. & Flah. var. *flos-aquae* (Li et al., sous presse). Par ailleurs, *Anabaena flos-aquae* peut être trouvée en petite quantité en début de saison, avant le démarrage de la récolte. Or il a été rapporté que cette espèce, dans d'autres régions des Etats-Unis et ailleurs, produit des neurotoxines (saxitoxines STX) et des anatoxines (ANTX). Par conséquent, le biodosage sur souris de l'AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1990), qui est le test le plus généralement utilisé pour détecter les STX dans les coquillages, est utilisé pour détecter la présence de STX neurotoxiques et d'anatoxines-a dans les algues en provenance du lac Klamath. Un autre test mis en œuvre pour les anatoxines-a est le dosage par HPLCFL (chromatographie-fluorescence en phase liquide à haute performance) (James et al., 1998). Un dosage colorimétrique déterminant l'inhibition de l'activité de la cholinestérase est utilisé pour tester la présence d'anatoxines-a(s).

Biodosage sur souris pour la détection de saxitoxines et d'anatoxines-a

Faute de méthode standardisée pour la détection de STX dans les algues séchées, une modification de la méthode de l'AOAC (1990) pour la recherche des STX dans les coquillages a été mise en œuvre. La limite de détection des STX avec cette méthode de l'AOAC est de 3 µg/g d'algues déshydratées. La limite de quarantaine, au-delà de laquelle les mollusques deviennent une préoccupation de santé publique, est de 80 µg de STX par 100 g de chair. On pense généralement que cette limite suppose que 100 g de chair de fruits de mer sont consommés au cours d'un repas, ce qui correspond à l'ingestion possible de 80 µg de STX. Un être humain devrait manger près de 27 g (108 gélules) d'algues contenant 3 µg/g (limite de détection) pour atteindre ce seuil d'alerte. Quant à la dose mortelle pour l'homme, elle est de 6 à 12 fois plus élevée. La limite de détection des anatoxines-a est de 5 µg et le LOAEL (*Lowest observed adverse effect level*, dose d'exposition la plus basse produisant un effet néfaste observé) a été établi à 100 µg/kg de poids corporel. Un homme devrait ingérer près de 1,4 kg d'algues contenant 5 µg/g (limite de détection) pour atteindre un seuil toxique.

Dosage de l'anticholinestérase pour les anatoxines-a(s)

Un autre dosage effectué pour surveiller la possible contamination par les toxines d'*Anabaena flos-aquae* teste la possible présence d'anatoxines-a(s) anticholinestérasiques. La méthode est basée sur un dosage colorimétrique pour la détermination de l'activité cholinestérasique. Mahmood & Carmichael (1987) ainsi que Matsunaga et al. (1989) ont adapté ce test pour la détection de l'anatoxine-a(s). L'inhibition de l'enzyme acétylcholinestérase est mesurée par une diminution de la couleur générée et contrôlée à 412 nm à partir de la réaction de l'enzyme et du substrat acétylthiocholine. Ce pourcentage d'inhibition est comparé à une courbe standard dose/effet (inhibition en pour cent sur dose logarithmique d'anatoxine-a(s) purifiée). Toutes les activités sont comparées aux valeurs obtenues avec l'enzyme sans échantillon et l'échantillon sans enzyme.

Recherche d'hépatotoxines

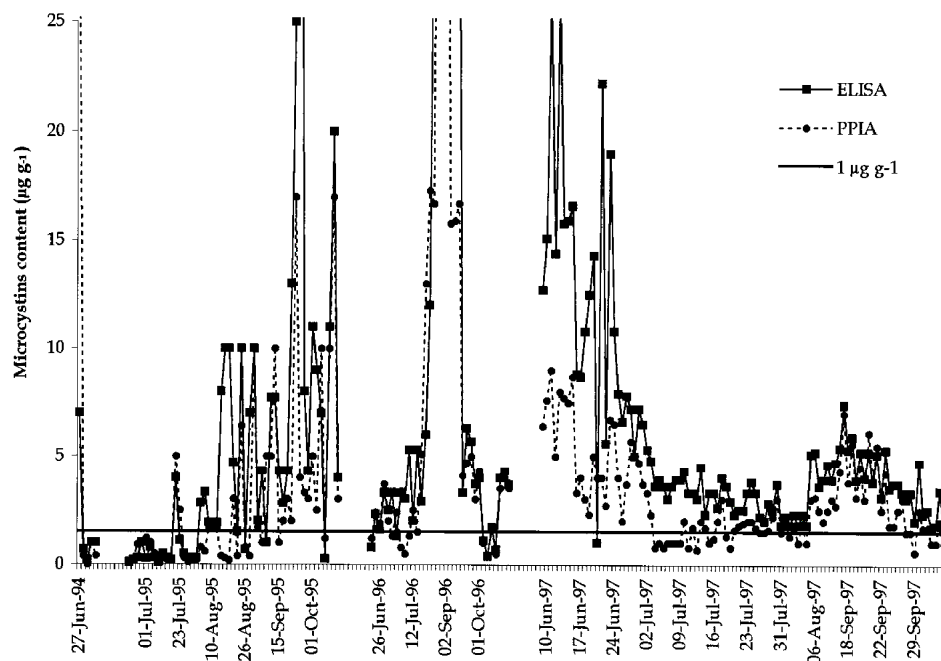
Microcystis et *Oscillatoria* font normalement partie de la population cyanobactérienne du lac Klamath. Ces deux espèces peuvent produire des microcystines dont l'ingestion à forte concentration peut causer des dommages hépatiques aigus et mener à la mort. Quantité et activité des microcystines sont déterminés respectivement par les tests ELISA et PPIA. Le Department of Agriculture de l'Oregon a établi une limite de sécurité de 1 µg de microcystine par gramme de poids sec du produit. Ce niveau a été fixé sur base d'une évaluation du niveau de sécurité récemment établi comme valeur guide pour l'eau potable par une commission travaillant avec l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Cette valeur pour l'eau potable est de 1 µg/l pour une personne buvant en moyenne deux litres par jour (Chorus & Bartram, 1999). Lorsque l'Oregon a fixé ce seuil réglementaire, il a laissé au secteur les détails des analyses et du contrôle de qualité. La plupart des opérateurs ont adopté un immuno-dosage et/ou un dosage enzymatique pour mesurer les niveaux de microcystine.

ELISA et PPIA pour les microcystines

La méthode ELISA (dosage immunoenzymatique sur support solide) est basée sur la méthode des anticorps polyclonaux décrite par Chu et al. (1989, 1990) et le PPIA est décrit par An & Carmichael (1994). Le niveau de sensibilité à la microcystine en utilisant ces méthodes est d'environ 0,05 ng.

Les microcystines ont été identifiées comme de puissants inhibiteurs spécifiques des protéines phosphatases 1 et 2A (PP1 et PP2A). L'inhibition de ces enzymes est en corrélation avec la capacité de ces toxines de favoriser des tumeurs et de provoquer des

dégâts au foie. C'est pourquoi il est utile de combiner le PPIA (test de bioactivité) avec l'ELISA (qui teste la présence de toutes les microcystines alors que toutes ne sont pas bioactives) pour un test de toxicité réelle. Ce dosage est environ 1000 fois plus sensible que le HPLC ou le test de la souris. Le dosage de l'activité PP est réalisé en mesurant le taux de formation de couleur provenant de la libération de P-nitrophénol à partir de P-nitrophénol phosphate en utilisant un lecteur de microplaques. Les résultats de la surveillance des microcystines utilisant des deux méthodes sont donnés à la figure 5. La comparaison/corrélation entre les tests ELISA et PPIA est visible à la figure 6.



Contenu en microcystines (en $\mu\text{g/g}$)

Figure 5. Contenu en microcystines de la biomasse algale sur le lieu de récolte entre 1994 et 1998 mesuré par ELISA et PPIA. La concentration maximale admise (CMA) par l'Etat d'Oregon ($1 \mu\text{g/g}$) est indiquée par une ligne continue sur le graphique. Les lots contenant un niveau de microcystines inférieur à cette CMA sont utilisés pour la fabrication de produits destinés à la consommation humaine.

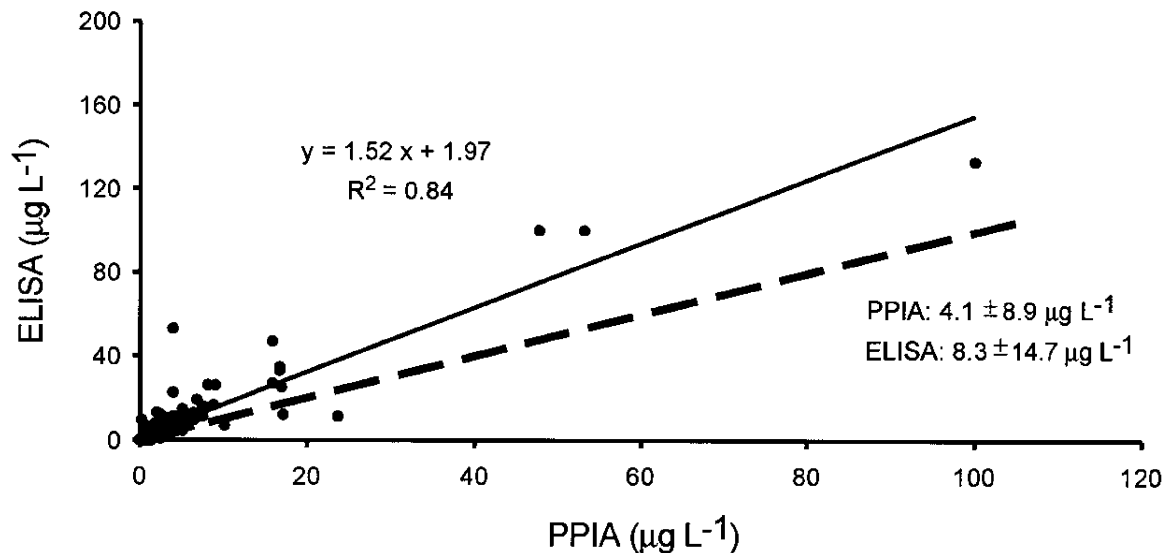


Figure 6. Comparaison entre les tests ELISA et PPIA pour le dosage des microcystines. Les résultats du PPIA sont systématiquement inférieurs à ceux de l'ELISA, le coefficient de corrélation étant de 0,84. La microcystine-LR est le standard utilisé pour l'étalonnage de la plaque d'essai. La ligne pointillée indique l'endroit où ELISA et PPIA donneraient des résultats identiques.

Discussion

L'abondante quantité, remarquablement stable, et la haute disponibilité de la biomasse d'*Aph. flos-aquae* dans le lac Klamath a fourni la base pour une exploitation commerciale viable de cette cyanobactérie. La disponibilité d'une telle quantité de biomasse (quantité estivale disponible $> 10^6$ kg), qui est effectivement illimitée durant la saison de croissance et n'induit aucun coût de production, semble conférer à *Aphanizomenon* un avantage économique réel sur le marché. Ceci est d'autant plus vrai si l'on prend en compte le fait qu'*Aph. flos-aquae* peut être commercialisée comme une espèce « sauvage » recueillie dans la nature, ce qui est un avantage marketing sur le marché actuel de l'alimentation santé. Cependant, les questions logistiques et de contrôle qualité induites par la récolte et la transformation d'une biomasse algale sauvage en produit alimentaire naturel sûr se posent avec davantage d'acuité qu'au secteur de la spiruline. En effet, les lieux de production de ces microalgues pouvant être placés là où existent les conditions optimales pour maximiser le rendement et minimiser les problèmes de contrôle qualité, ces questions sont moins prégnantes pour ce secteur. Bien qu'il n'existe aucune analyse coûts/bénéfices qui compare les avantages de la « culture en bassin » et de la « récolte de biomasse sauvage », il semble que chaque méthode présente des avantages et des inconvénients.

Pour les récolteurs d'*Aph. flos-aquae*, le coût le plus important aura été le développement des procédés de récolte et de traitement afin de garantir un produit de haute qualité qui

respecte toutes les directives et règlements relatifs aux produits agricoles destinés à la consommation humaine. Alors qu'il n'existe aucune méthode normalisée pour déceler la présence possible de cyanotoxines dans la biomasse algale, l'industrie concernée prend à cœur de mettre en œuvre des méthodes précises et scientifiquement acceptables de détection de toutes les cyanotoxines pertinentes. Si l'on se base sur les espèces et variétés de cyanobactéries présentes durant la saison de récolte, certaines neurotoxines et hépatotoxines posent effectivement la question du contrôle de qualité concernant *Aph. flos-aquae*. Bien que la littérature rapporte qu'*Aphanizomenon* peut produire aussi des neurotoxines dont des saxitoxines et anatoxines-a (Carmichael, 1997), aucun test mené sur les algues du lac Klamath depuis 1992 n'a réussi à détecter la moindre neurotoxine issue des cyanobactéries (test de la souris, HPLC ou spectrométrie de masse) (Anderson & Carmichael, données non publiées). La seule cyanotoxine découverte dans le phytoplancton lacustre au cours des périodes de test est la microcystine. La comparaison des niveaux de microcystine découverts avec la composition du phytoplancton permet de déduire que *Microcystis* (Carmichael et al., non-publié) est le producteur des microcystines du lac Klamath. A ce jour, aucun rapport n'a confirmé qu'*Aph. flos-aquae* produit des microcystines.

Lorsque le Department of Agriculture de l'Etat d'Oregon a fixé la limite en microcystines pour les produits tirés des algues du lac Klamath, il n'a pas défini de méthode standard de contrôle du contenu en microcystines. Etant donné que les méthodes HPLC décrites dans la littérature ne sont pas conçues pour analyser rapidement et systématiquement des niveaux plus petits ou égaux à 1 µg/g, la méthode ELISA (An & Carmichael, 1994) est devenue le premier moyen de dépistage des microcystines dans les algues. Mais bien que la méthode ELISA ait été utilisée avec succès par d'autres pour l'analyse des microcystines (Ueno et al., 1996), aucun des anticorps ELISA n'a été testé en cherchant une réactivité croisée pour toutes les microcystines connues (environ 60). Pour cette raison, et afin de tester la corrélation entre ELISA comme test chimique et un test d'activité, les récolteurs ont aussi analysé le contenu en microcystines en utilisant le test PPIA (inhibition de la protéine phosphatase). Ce test d'activité évalue l'inhibition d'une enzyme, la protéine phosphatase (PP) ; si toute l'inhibition mesurée dans un échantillon est due aux microcystines, il devrait y avoir une bonne corrélation entre les deux tests. La figure 6 montre que c'est le cas pour les microcystines produites par les cyanobactéries du lac Klamath. Cette figure montre également que le test ELISA donne des valeurs en microcystines toujours plus élevées que le PPIA. Cela suggère que l'activité d'inhibition de la PP (c'est-à-dire la toxicité) des microcystines présentes dans le lac est moindre que leur nombre absolu obtenu par le test ELISA, la microcystine-LR étant utilisée comme référence de calibrage dans les deux cas. Donc l'utilisation d'ELISA

pour contrôler et réglementer des produits constitués d'algues peut surestimer le risque couru par les consommateurs ingérant des microcystines. Toutefois, le risque à long terme se révélant encore incertain, ELISA sert de sécurité supplémentaire, cette méthode étant utilisée pour déterminer si le produit est acceptable pour une consommation humaine et animale.

Aphanizomenon flos-aquae est une source alimentaire et de suppléments nutritionnels relativement nouvelle. Afin de s'assurer que la demande reste forte pour ces produits, il s'agira de travailler dans plusieurs directions :

1. La garantie de qualité doit perdurer et toute nouvelle question qui pourrait affecter la sécurité et diminuer la qualité du produit doit être réglée rapidement et de manière transparente.
2. Les responsables de la réglementation ainsi que la clientèle doivent être formés à tous les faits concernant les microalgues et leurs avantages potentiels comparés à d'autres sources alimentaires et de compléments nutritionnels. Ceci contribuera à réduire le besoin de réglementation officielle du secteur et assurera la plus grande confiance possible de la part des consommateurs.
3. De nouveaux produits et de nouvelles utilisations des microalgues doivent être développés si la demande pour ce nouvel aliment devait s'étendre au-delà de son usage actuel limité.

Remerciements

WWC et DA remercient les propriétaires de Cell Tech International de leur avoir livré accès au matériel présenté dans cet article. Nous sommes également reconnaissants à Ty Harrington, Brandt Gutermuth, Julie Stumpf, Cory Pigeon, Mike Jubie et Robert Moore de la Recherche & Développement de nous avoir livré les données précieuses présentées dans ces lignes. Jake Kann est quant à lui remercié pour nous avoir aimablement permis de faire usage de sa thèse sur le lac Klamath. Enfin nous remercions également Glenda Beckman, de Cell Tech R&D, pour son soutien lors de la collecte de nos informations, et Laurie Carmichael pour son aide à l'édition technique. Cet article est répertorié en tant que contribution n° 10 171 de la Woods Hole Oceanographic Institution.

Références

Abdulqader G, Barsanti L, Tredici MR (2000) Dihé : an ancient food in a forgotten world. J. appl. Phycol. 12.
An JS, Carmichael WW (1994) : Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. Toxicon 32 : 1495–1507.

- Association of Official Analytical Chemists (1990) Official Methods of Analysis, 15th edn, revised. AOAC, Washington, DC, pp. 881–882.
- Becker EW, Venkataraman LV (1984) Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in India. Biomass 4 : 105.
- Becker EW, Venkataraman LV (1980) Production and Processing of Algae in Pilot Plant Scale Experiences of the Indo-German Project. In Shelef G, Soeder CJ (éds), Algal Biomass, Production and Use, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 35–50.
- Belay A, Kato T, Ota Y (1996) *Spirulina (Arthrospira)* : potential application as an animal feed supplement. J. appl. Phycol. 8 : 303–311.
- Bortleson GC, Fretwell MO (1993) A Review of Possible Causes of Nutrient Enrichment and Decline of Endangered Sucker Populations in Upper Klamath Lake, Oregon. U.S. Geological Survey Water-Resources Investigations Report 93-4087, Portland, 24 pp.
- Cannell RJP (1990) Algal biotechnology. Appl. biochem. Biotech. 26 : 85–105.
- Carmichael WW (1997) The cyanotoxines. In Callow JA (éd.), Advances in Botanical Research, vol. 37. Academic Press, London, pp. 211–256.
- Chorus I, Bartram J (eds) (1999) Toxic Cyanobacteria in Water – A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. E & FN Spon, London, 416 pp.
- Chu FS, Huang X, Wei RO (1990) Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms. J. Ass. off. Analyt. Chem. 73 : 451–456.
- Chu FS, Huang X, Wei RO, Carmichael WW (1989) Production and characterization of antibodies against microcystins. Appl. environ. Microbiol. 55 : 1928–1933.
- Ciferri O (1983) *Spirulina*, the edible microorganism. Microbiol. Revs 47 (December) : 551–578. 595
- Ciferri O, Tiboni O (1985) The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. Ann. rev. Microbiol. 39 : 503–526.
- Delpuech F, Joseph A, Cavalier C (1975) Consumption as food and nutritional composition of blue-green algae among populations in the Kanem region of Chad. Ann. Nutr. Aliment. 29 : 497–516.
- Farrar WV (1966) Tecuitlatl : A glimpse of aztec food technology. Nature 5047 : 341–342.
- Gao K (1998) Chinese studies on the edible blue-green alga, *Nostoc flagelliforme* : a review. J. appl. Phycol. 10 : 37–49.
- Gutermuth FB, Beckstrand D, Watson C (1998) New Earth harvest site monitoring : 1996–1997. New Earth/Cell Tech Research and Development Dept., rapport technique final pour l'U.S. Fish and Wildlife Service, 120 pp.
- Hoppe HA (1979) Marine algae and their products and constituents in pharmacy. In Hoppe HA, Levring T, Tanaka Y (eds), Marine Algae in Pharmaceutical Science. Walter de Gruyter Publs, New York, pp. 25–119.
- James KJ, Furey A, Sherlock IR, Stack MA, Twohig M, Caudwell FB, Skulberg OM (1998) Sensitive determination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by liquid chromatography with fluorimetric detection. J. Chromatography A 798 : 147–157.
- Kann J (1997) Ecology and water quality dynamics of shallow hypereutrophic lake dominated by cyanobacteria (*Aphanizomenon flos-aquae*). PhD Dissertation, Univ. North Carolina, Chapel Hill, 110 pp.
- Laenen A, LeTourneau AP (1996) Upper Klamath basin nutrientloading study – Estimate of wind-induced resuspension of bed sediment during periods of low lake elevation. U.S. Geological Survey Open-File Report 95-414, Portland, Oregon, 11 pp.
- Lee YK (1997) Commercial production of microalgae in the Asia- Pacific rim. J. appl. Phycol. 9 : 403–411.
- Li D-M, Qi Y-Z (1997) *Spirulina* industry in China : Present status and future prospects. J. appl. Phycol. 9 : 25–28.
- Li R-H, Carmichael WW, Liu Y-D, Watanabe MM (2000) Taxonomic re-evaluation of *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5 based on morphology and 16S rRNA gene sequences. Hydrobiologia (sous presse).

- Mahmood NA, Carmichael WW (1987) Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* 25 : 1221–1227.
- Matsunaga S, Moore RE, Niemczura WP, Carmichael WW (1989) Anatoxin-a(s) a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *J. am. chem. Soc.* 111 : 8021–8023.
- Miller WE, Tash JC (1967) Interim Report Upper Klamath Lake Studies Oregon. Federal Water Pollution Control Administration, Corvallis, 37 pp.
- Phinney HK, Peek CA (1961) Klamath Lake, an instance of natural enrichment. *Transactions of the Seminar on Algae and Metropolitan Wastes*, April 27–29 1960, U.S. Public Health Service : 22–27.
- Rapala J, Sivonen K, Lyra C, Niemelä SI (1993) Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* at different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena* strains, a laboratory study. *Appl. environ. Microbiol.* 64 : 2206–2212.
- Richmond A (1990) *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 528 pp.
- Soong P (1980) Production and Development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan. In Shelef G, Soeder CJ (éds), *Algal Biomass, Production and Use*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 97–113.
- Taylor WA (1992) Acceptance Sampling, Taylor Enterprises Inc., Lake Villa, Illinois, Ch. 8, pp. 171–190.
- Toerien DF, Grobbelaar JU (1980) Algal mass cultivation experiments in South Africa, In Shelef G, Soeder CJ (eds), *Algal Biomass, Production and Use*, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 73–80.
- Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe MF, Park HD, Chen GC, Chen G, Yu SZ (1996) Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 17 : 1317–1321.
- Wood TM, Fuhrer GJ, Morace JL (1996) Relation between selected water-quality variables and lake level in upper Klamath and Agency Lakes, Oregon. U.S. Geological Survey Water- Resources Investigations Report 96-4079, Portland, 57 pp.