

Impact d'eaux de ruissellement de chaussées sur le métabolisme d'algues unicellulaires

Impact of road runoff on the metabolism of unicellular algae

C. Durrieu (1), H. Guedri (1), I. Gaillard (1) M. Hammada(1) , C. Chouteau(2)

(1) ENTPE Université de Lyon, Rue Maurice Audin, 69518 Vaulx-en-velin cédex, France claude.durrieu@entpe.fr

(2) Laboratoire Régional des Ponts et Chaussées 151 rue de Paris, 02100 Saint Quentin, France celine.chouteau@developpement-durable.gouv.fr

RÉSUMÉ

Afin d'éviter leur rejet direct dans l'environnement, les eaux de ruissellement de chaussées sont stockées dans des bassins pour traitement avant rejet. Dans ce travail nous étudions l'impact de ces rejets de bassins sur le compartiment des producteurs primaires qui constituent des indicateurs pertinents pour étudier la qualité des écosystèmes. Les tests réalisés sont basés sur le suivi de l'activité métabolique d'algues unicellulaires. Outre les tests normalisés globaux comme le suivi de la croissance, des tests plus spécifiques ont été réalisés. Il s'agit de mesurer l'activité d'enzymes localisées sur la membrane externe des algues ou encore la réponse de la fluorescence chlorophyllienne. Les activités enzymatiques étudiées sont les phosphatases alcalines et les estérases. La souche algale choisie pour la réalisation de cette étude est *Chlorella vulgaris*. Cette étude concerne un bassin routier implanté dans la région de Douai. Les tests ont été effectués sur les rejets directs du bassin et sur des prélèvements d'eau en amont et en aval du rejet sur le cours d'eau récepteur. L'ensemble des tests réalisés mettent en évidence une perturbation du compartiment algal lié à la présence du bassin. On démontre dans ce travail l'intérêt des tests métaboliques qui donnent une réponse très rapide et constituent ainsi des systèmes d'alerte précoce informant de l'existence d'une perturbation.

ABSTRACT

To avoid direct discharge into the environment, road runoff waters are stored in retention basin for treatment. In this work we have studied the impact of these waste waters on algal compartment that are relevant indicators for studying ecosystem quality. Tests are based on metabolic activity monitoring on unicellular algae. In addition to standardized tests as global growth monitoring, more specific tests have been performed, as activity measurements of enzymes located on the external membrane of algae. Chlorophyll fluorescence has also been measured. The enzyme activities studied are alkaline phosphatase and esterases. The algal strain chosen for this study is *Chlorella vulgaris*. Samples come from a site located in the region of Douai. Tests have been performed on direct discharge samples and upstream and downstream samples. All tests have shown a disruption of algal compartment linked to the presence of the basin. In this work, metabolic tests have shown their advantages, notably very quick answers and thus can be considered as early warning systems informing about disturbances in ecosystems.

MOTS CLÉS

Bassins de rétention, pollution routière, algues, activités enzymatiques, fluorescence chlorophyllienne

1 INTRODUCTION

Les eaux de ruissellement de chaussées peuvent être responsables d'une dégradation des écosystèmes aquatiques par apport de matières minérales et de contaminants chimiques comme les métaux lourds et les hydrocarbures. L'impact des eaux pluviales sur les écosystèmes récepteurs a été étudié par de nombreux auteurs (Göbel *et al.*, 2007; Baun *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2005). C'est dans un contexte de préservation de la ressource en eau que des bassins de rétention sont construits pour récupérer les eaux drainées par les chaussées pour traitement avant restitution au milieu. Nous proposons ici d'étudier l'impact de rejets de bassins routiers au moyen de tests d'écotoxicité basés sur le suivi de l'activité métabolique d'algues unicellulaires entières et non modifiées. Les microalgues constituant la base des chaînes trophiques et possédant la capacité d'accumuler de grandes quantités de polluants, constituent des indicateurs de toxicité pertinents pour étudier la réponse des écosystèmes exposés à des émissions de polluants.

Des tests globaux comme le suivi de la croissance et de la fluorescence chlorophyllienne ont été réalisés, ils rendent compte d'une atteinte générale du compartiment des producteurs primaires. Il est d'autre part possible d'explorer des voies métaboliques particulières par le suivi d'activités enzymatiques. Nous nous intéressons plus particulièrement aux enzymes membranaires dont l'activité peut être mesurée directement sur la cellule sans extraction préalable. Les essais sont ainsi réalisés *in vivo* dans l'environnement naturel de l'enzyme et présentent de ce fait un grand réalisme écologique. Les activités étudiées ici sont la phosphatase alcaline qui renseigne sur le métabolisme du phosphore et l'estérase qui traduit le fonctionnement de l'activité photosynthétique. Ces activités enzymatiques sont le plus souvent perturbées avant l'apparition d'effets plus généraux comme l'inhibition de la croissance ; elles constituent ainsi des indicateurs précoces de toxicité permettant de renseigner sur l'atteinte de l'écosystème dès les plus faibles concentrations en contaminants. Des études antérieures ont montré la spécificité de réponse de ces activités pour certaines familles de polluants, nous avons notamment montré la grande sensibilité de la phosphatase à la présence de métaux lourds (Durrieu *et al.* 2003).

Dans ce travail nous étudions l'impact sur un cours d'eau récepteur de rejets d'un bassin routier implanté dans le Nord de la France dans la région de Douai. L'espèce phytoplanctonique choisie pour la réalisation des tests est *Chlorella vulgaris*. Les cellules sont préalablement exposées au rejet ainsi qu'à des échantillons d'eau prélevés en amont et en aval du rejet. Les résultats renseignent ainsi sur l'impact potentiel du rejet sur le compartiment des producteurs primaires.

Il s'agit là d'une étude prospective pour évaluer l'intérêt de ces tests d'activités métaboliques pour identifier rapidement la présence de composés xénobiotiques perturbant le fonctionnement des écosystèmes récepteurs. Cette approche multidisciplinaire allie des techniques de biochimie et de biologie végétale a des fins écologiques.

2 TECHNIQUES ET METHODES

2.1 Cultures algales

La souche de microalgues *Chlorella vulgaris* (CCAP 211/12) provient de la Culture Collection of Algae and Protozoa au Royaume Uni. Elle est entretenue par repiquage hebdomadaire dans le milieu LC oligo (Norme AFNOR T 90-304, 1983) préalablement stérilisé par autoclavage (20 minutes, 130°C, 1.3 bars). Les souches sont maintenues dans un cycle nyctéméral de 16 heures d'éclairement à 5000 lux et 8 heures d'obscurité.

2.2 Préconditionnement des cultures

L'espèce algale *Chlorella vulgaris* possède la propriété de stocker d'importantes quantités de phosphate (Fitzgerald *et al.* 1966) Or, l'activité phosphatase ne peut être induite qu'après épuisement des réserves internes phosphatées de la cellule. Un preconditionnement de 21 jours dans un milieu sans phosphate doit être respecté pour obtenir une activité phosphatase optimum. Le suivi de l'activité ne peut donc être réalisé qu'après cette étape appelée « starvation ». Les algues sont ensuite conservées à 4°C, leur activité phosphatase est stable pendant un mois au cours duquel les tests d'activité phosphatase peuvent être réalisés. L'activité estérase, par contre, atteint son maximum au

cours de la phase exponentielle de croissance, elle décroît ensuite très rapidement. Les tests d'activité estérase ont été réalisés 5 jours après le repiquage

2.3 Mesures d'activité

Les différentes activités sont mesurées avant et après exposition des algues aux rejets et aux échantillons d'eaux prélevés dans le cours d'eau récepteur en amont et en aval du rejet.

2.3.1 *Phosphatase alcaline*

Cette activité est mesurée au moyen de la MethylUmbelliferyl Phosphate (MUP, Sigma), utilisée comme substrat dans un milieu tamponné (TRIS-HCl, pH 8.4) dans des microplaques 96 puits. La dégradation du substrat par l'enzyme génère un produit fluorescent, la MethylUmbelliFerone (MUF) dosable en spectrofluorescence pour une excitation de 355 nm et une émission de 460 nm. Des cinétiques sont réalisées à 20 °C pendant 20 minutes pour différentes concentrations de substrat. Ce sont les vitesses maximales de la réaction qui seront ici considérées et comparées entre elles.

2.3.2 *Estérase*

Cette activité est mesurée au moyen de la Fluorescéine diacétate (FDA, sigma) comme substrat en microplaques 96 puits. La dégradation du substrat génère une fluorescence liée à la production de fluorescéine dosable en spectrofluorescence pour une excitation de 480 nm et une émission de 538 nm. Comme pour la phosphatase des cinétiques sont réalisées à 20°C et nous utilisons ensuite les vitesses maximales pour l'interprétation des résultats

2.3.3 *Fluorescence Chlorophyllienne*

La fluorescence chlorophyllienne est mesurée de manière directe sur les algues préalablement exposées aux prélèvements. Un spectre d'émission est réalisé pour des longueurs d'onde d'excitation variant entre 400 et 800 nm. Ce sont les variations d'intensité se traduisant par une modification de la hauteur du pic d'émission qui sont dans ce cas analysées.

2.3.4 *Croissance algale*

Les algues sont repiquées à 10^4 cellules par mL dans le rejet et les échantillons d'eau préalablement filtrés (GFC Whatman). Le volume total de l'essai est de 50 ml. Différentes concentrations d'échantillon sont introduites dans l'essai (90%, 50 % et 10 %). Après 72 d'heures d'éclairement (5000 lux) les cellules sont comptées au microscope. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la concentration cellulaire obtenue ramenée à celle du témoin réalisé dans les conditions de l'essai

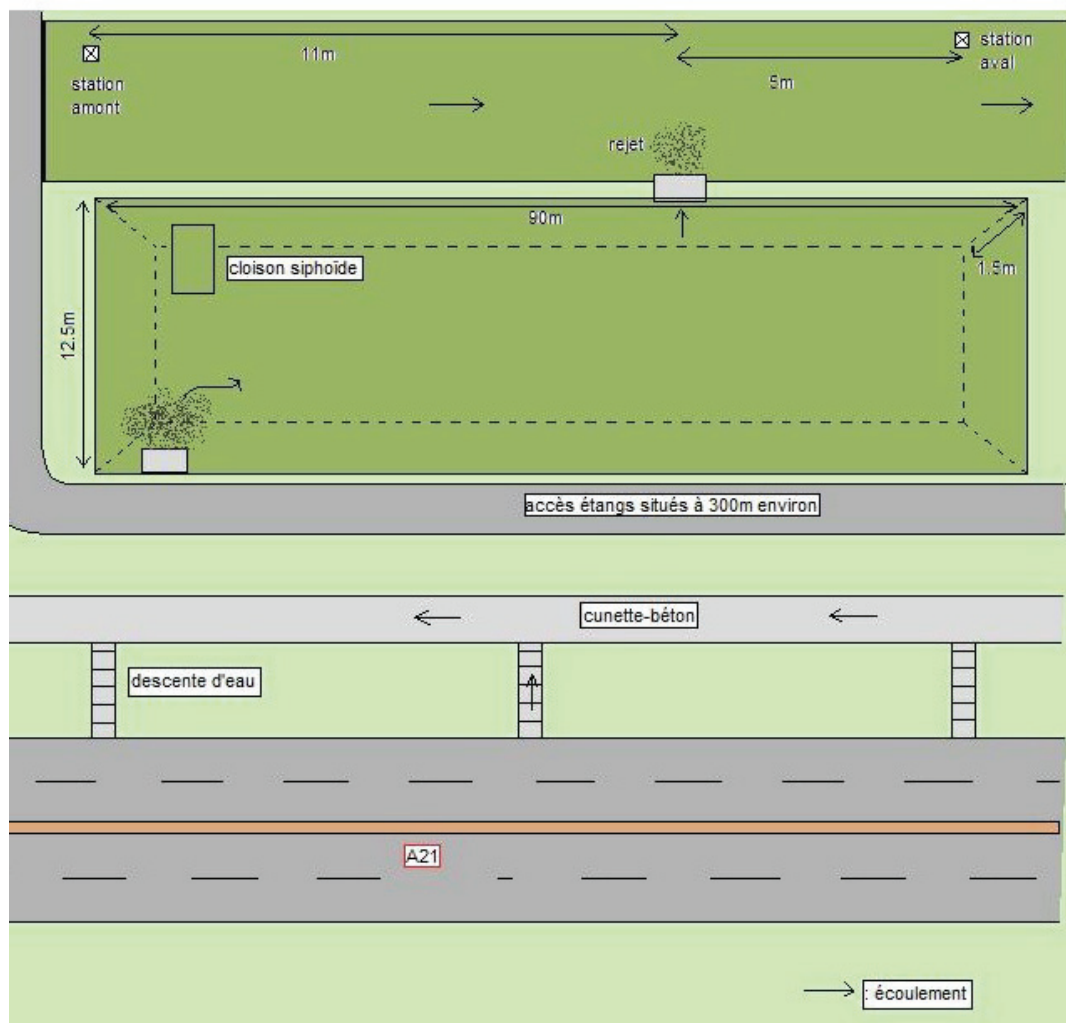
2.4 Exposition des algues aux échantillons

Les algues sont préalablement déposées dans des microplaques 48 puits de culture cellulaire traitées pour une adhésion des cellules aux parois. Les échantillons sont ensuite déposés sur les cellules pour un temps de contact de 2 heures au bout duquel ils sont retirés en laissant ainsi dans la plaque les cellules algales uniquement. Les algues témoins sont traitées dans les mêmes conditions, l'échantillon étant remplacé par du milieu de culture. Ce protocole permet d'éliminer les artefacts liés aux échantillons lors des mesures d'activité. Une partie des échantillons sont préalablement filtrés (GFC Whatman) de manière à tester la toxicité de la fraction particulaire.

Après retrait de l'échantillon le milieu est tamponné avant ajout du substrat pour la mesure d'activité.

2.5 Plan du bassin routier

Le bassin est localisé sur l'A 21 sur le contournement nord de Douai. Les prélèvements sont situés au niveau du rejet, 11 mètres à l'amont et 5 mètres à l'aval. Le milieu récepteur est un ru pouvant connaître des assècs.



3 RESULTATS ET DISCUSSION

Deux campagnes de prélèvement ont été réalisées à quelques semaines d'intervalle : la campagne 1 au printemps et la campagne 2 en début d'été 2009. Les échantillons prélevés au niveau du rejet à l'amont et à l'aval ont été conditionnés pour envoi au laboratoire.

Les activités phosphatases et estérases intrinsèques des échantillons ont été mesurées avant exposition aux cellules algales ; elles se sont révélées très fortes du fait de la présence probable d'une forte concentration de microorganismes. Les prélèvements ont donc été autoclavés, de manière à neutraliser cette activité parasite qui pouvait masquer celle des algues, puis filtrés.

Les algues ont ensuite été mises en contact avec les échantillons bruts et filtrés pendant deux heures selon le protocole décrit dans le chapitre méthodes. Les différents tests ont été réalisés juste après cette période d'exposition.

2.6 Activité Phosphatase Alcaline (APA)

La figure 1 présente le suivi de l'APA de cellules de *Chlorella vulgaris* préalablement exposées aux échantillons brut et filtrés. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle ramenée à l'activité d'algues témoins non exposées aux prélèvements et traitées dans les conditions de l'essai. On obtient pour les deux campagnes une activation de l'APA lorsque les algues sont préalablement exposées au rejet. L'activation induite par le rejet est plus importante pour la campagne 2. Cette

activation reste visible après dilution du rejet dans le cours d'eau, en effet l'échantillon d'eau prélevé en aval du rejet induit également une activation de l'APA, dans une moindre mesure cependant. L'échantillon amont ne produisant aucun effet, il est logique de penser que l'effet produit par le prélèvement aval est lié à la présence du rejet. On peut d'autre part noter que les échantillons bruts produisent toujours une activation plus importante que celles obtenus pour les essais réalisés avec les prélèvements filtrés. Il semble donc que l'effet observé sur l'APA soit lié à la fraction particulaire. Des études antérieures ont montré que les ions métalliques peuvent activer la phosphatase alcaline pour des concentrations inférieures ou égale au μg par litre. (Durrieu et al., 2004). De manière globale les ions de métaux lourds ayant tendance à s'adsorber sur les particules, il est logique ici de proposer l'hypothèse selon laquelle l'activation de l'APA serait induite par la présence d'ions de métaux lourds liés à la matière en suspension dans les eaux du bassin à des concentrations différentes entre les deux campagnes mais ne dépassant pas $0,1 \mu\text{g} / \text{L}$.

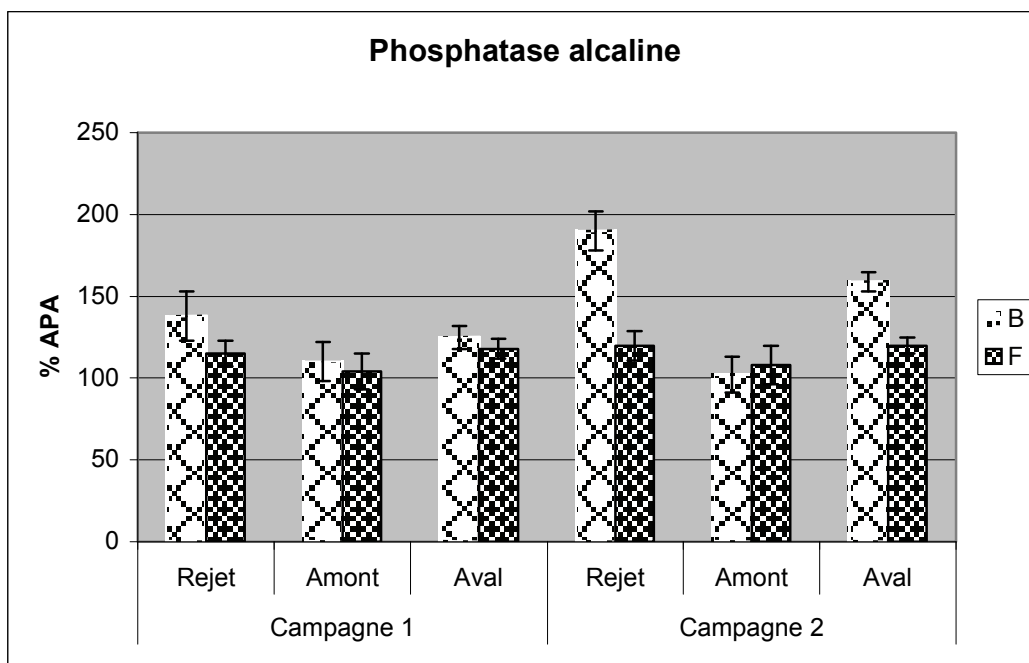


Figure 1 : Evolution de l'APA de cellules de *Chlorella vulgaris* après exposition aux rejets et à des eaux prélevées en amont et en aval du bassin

3.2 Activité estérase (AE)

La figure 2 présente le suivi de l'AE de cellules de *Chlorella vulgaris* préalablement exposées aux échantillons brut et filtrés. Comme pour la phosphatase, les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle. Contrairement à l'activité phosphatase, on observe ici des résultats différents entre les deux campagnes: les prélèvements de la campagne 1 produisent une induction de l'activité alors que ceux de la campagne 2 n'ont aucun effet significatif. On observe à nouveau une plus forte activation avec les prélèvements non filtrés montrant toujours l'importance de la fraction particulaire. Compte tenu du peu d'information dont nous disposons quant à la composition chimique des prélèvements, il est pour l'instant difficile d'expliquer le phénomène observé lors de la campagne 1 qui ne s'est pas reproduit quelques semaines après (campagne 2). Il est important de noter que les eaux amonts de la campagne 1 provoquent une activation de l'AE du même ordre que le rejet et les eaux aval. Il est possible qu'un élément exogène (pouvant être lié à un épisode orageux) ait été apporté simultanément dans le cours d'eau et le bassin.

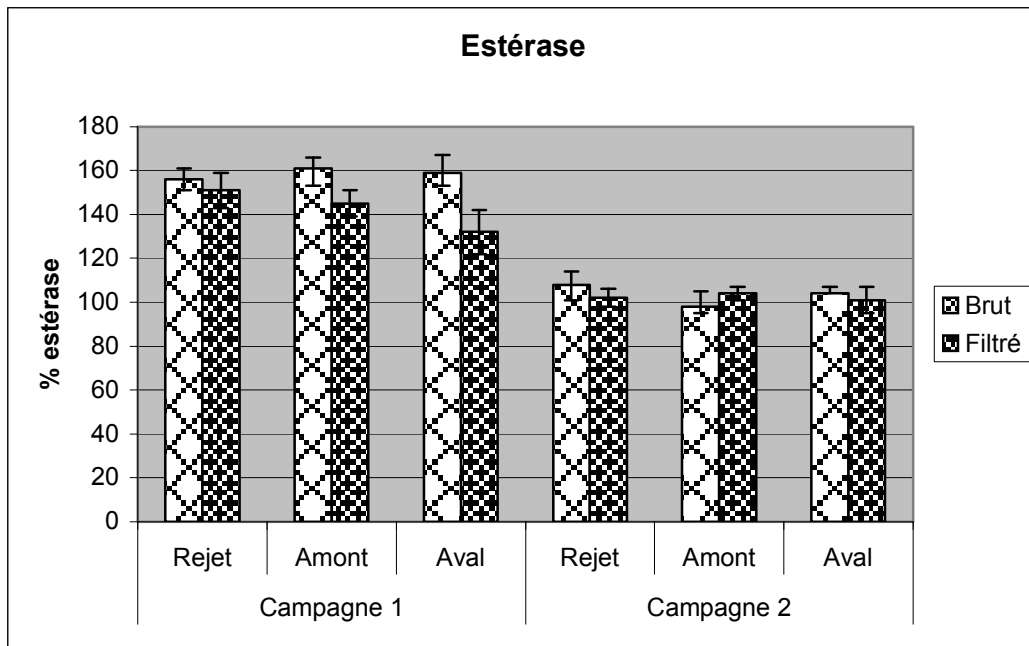


Figure 2 : Evolution de l' AE de cellules de *Chlorella vulgaris* préalablement exposées aux rejets et à des eaux prélevées en amont et en aval du bassin

2.7 Fluorescence chlorophyllienne

La chlorophylle a est un pigment photosynthétique qui fluoresce spontanément après excitation à des longueurs d'onde bien définies. Cependant, cette fluorescence est un indicateur de stress cellulaire ; en effet elle est directement dépendante de l'activité photosynthétique de la cellule : elle augmente lorsque la photosynthèse est perturbée par un stress chimique ou nutritionnel (Samuelson et al. 1977). Védrine et al.(2003) ont montré que la fluorescence est un marqueur de toxicité très pertinent pour la détection de composés phytosanitaires dans le milieu aquatique.

La figure 3 présente un spectre d'émission de fluorescence de cellules de *Chlorella vulgaris* préalablement exposées au rejet et à des eaux amont et aval. La longueur d'onde d'excitation est de 460 nm. Le spectre d'émission obtenu correspond à celui de la chlorophylle a. Le spectre présenté est obtenu dans le cadre de la campagne 1. On note que le rejet produit une augmentation de la hauteur du pic, le maximum d'émission restant à 680 nm. Ce résultat témoigne d'un stress cellulaire pouvant être lié à la présence d'un contaminant chimique dans le milieu, ce qui semble cohérent avec les réponses obtenues pour les activités enzymatiques. Les prélèvements réalisés pendant la campagne 2 n'induisent aucune modification significative de la fluorescence.

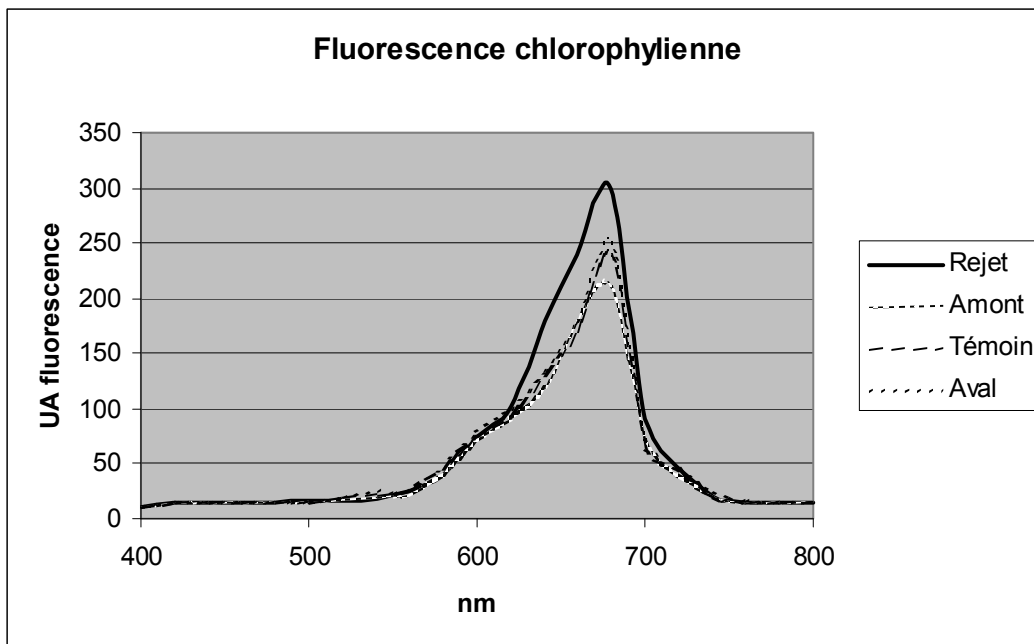


Figure 3 : fluorescence chlorophyllienne de cellules de *Chlorella vulgaris* préalablement exposées au rejet et à des eaux prélevées en amont et en aval du bassin

Une vue agrandie du sommet du pic d'émission est présentée dans la figure 4. Elle montre une inhibition de la fluorescence produite après contact avec les eaux aval. Une inhibition de fluorescence traduit en général une mortalité cellulaire. Il subsiste une légère augmentation de la fluorescence après dilution du rejet dans les eaux aval. Elle est toutefois peu significative.

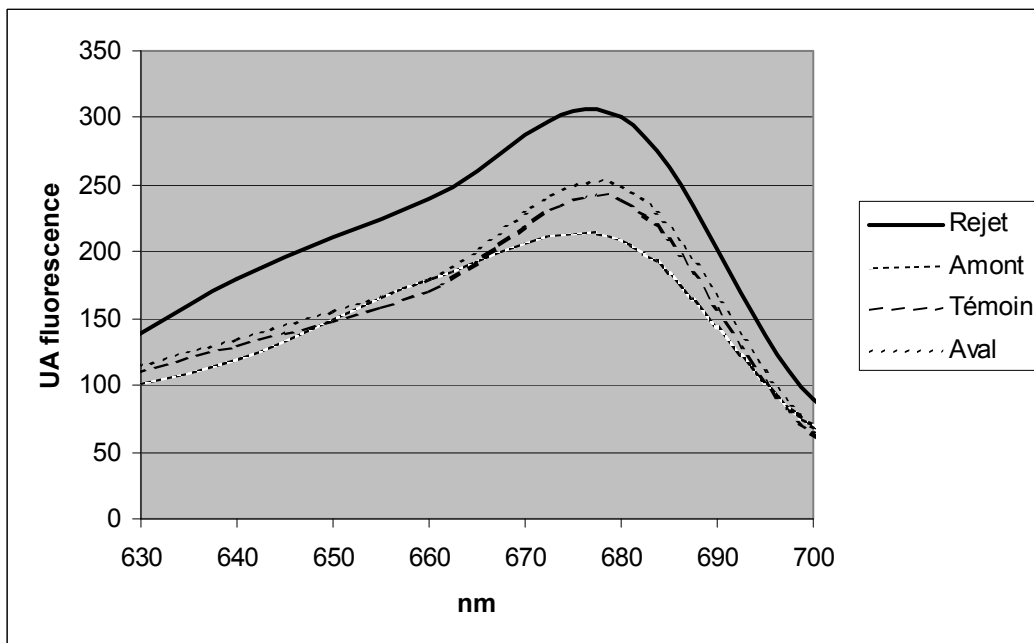


Figure 4 : Agrandissement du sommet du spectre de fluorescence de la figure 3

Les effets produits par le rejet d'une part et les eaux amonts d'autre part sont opposés. Il est donc probable que le rejet contienne un contaminant qui ne soit pas présent dans les eaux amonts contrairement à ce que pouvait nous laisser croire les résultats d'activité. Il est possible que l'augmentation importante de l'activité estérase enregistrée dans la campagne 1 soit liée à des substances différentes produisant globalement le même effet sur les enzymes de la classe des estérases.

2.8 Croissance

Des tests de croissance sont réalisés en repiquant des cellules de *Chlorella vulgaris* dans du milieu de culture contenant différentes concentrations du rejet ou des eaux amonts et aval. Le tableau 1 présente les résultats obtenus après 72 heures de croissance, ils sont exprimés en pourcentage du nombre d'algues obtenues rapporté au témoin traité dans les conditions de l'essai. Il en ressort que le rejet de la campagne 1 est plus toxique vis-à-vis de la croissance que celui de la campagne 2. La CE 50 du rejet est de l'ordre de 50 % pour la campagne 1 et de 70% pour la campagne 2. Les eaux amont prélevées dans la campagne 1 semble stimuler la croissance, ceci peut être du à la présence d'ions activateurs de la photosynthèse. Ce phénomène est masqué sur les eaux aval fortement impactées par le rejet

Concentration	Campagne 1			Campagne 2		
	Rejet	Amont	Aval	Rejet	Amont	Aval
90 %	0	130	60	30	102	85
50 %	60	98	102	80	110	96
10 %	90	106	98	95	104	104

Tableau 1 : suivi de la croissance algale de *Chlorella vulgaris* repiquée dans des milieux contenant différentes concentrations du rejet, des eaux amonts et aval

3 CONCLUSIONS

L'ensemble des tests réalisés dans ce travail montre un impact des rejets du bassin étudié sur *Chlorella vulgaris*, représentant le compartiment des microalgues. Les activités enzymatiques ainsi que la fluorescence chlorophyllienne sont modifiées en présence du rejet. Ces différentes perturbations observées sont confirmées par le test d'inhibition de croissance, critère plus global qui intègre tous les précédents, mais le plus souvent avec une sensibilité moindre. Les tests métaboliques présentés ici possèdent l'avantage de donner une réponse rapide, ils constituent ainsi des systèmes d'alarme précoce qui renseignent sur l'existence d'une perturbation sans pour autant en expliquer la cause. L'importance de la perturbation observée ici peut s'expliquer par le faible taux de dilution du rejet lié au débit peu élevé du ru récepteur. L'absence de caractérisation physico-chimique (composition ionique et métaux en particulier) du rejet ne nous permet pas de développer davantage l'interprétation des résultats. Cette étude permet toutefois de mettre en avant l'intérêt des tests d'activité métaboliques pour la surveillance de la santé des écosystèmes. Notre outil reste pour l'instant strictement qualitatif. Cette démarche sera poursuivie et complétée par l'évaluation de l'impact de ce type de rejets sur des représentants des compartiments des producteurs et des décomposeurs.

4 BIBLIOGRAPHIE

- Baun A., Eriksson E., Ledin A. and Mikkelsen P.S. (2006). *A methodology of ranking and hazard identification of xenobiotic organic compounds in urban stormwater*. Science of total environment, 370 (1), 29-38.
- Durrieu C., Badreddine I., Daix C. (2003) *A dialysis system with phytoplankton for monitoring chemical pollution in freshwater ecosystems by alkaline phosphatase assay*. Journal of applied Phycology, 15, 289-295.
- Durrieu C., Chouteau C., Barthet L., Chovelon J.M., Tran-Minh C. (2004) *A bi enzymatic whole cell algal biosensor for monitoring waste water pollutants*. Analytical letter, 37 (8), 1-11
- Fitzgerald G.P., Nelson T.C. (1966). *Extractive and enzymatic analyses for limiting or surplus*

- phosphorus in algae*. Journal of Phycology, 2, 32-37.
- Göbel, P., Dierkes C., Coldewey W.G. (2007). *Storm water runoff concentration matrix for urban areas*. Journal of contaminant hydrology, 91(1/2), 26-42.
- Li, F., Yuasa, A., Muraki Y., Matsmi Y. (2005). *Impact of heavy storm of rain upon dissolved and particulate organic C, N and Pin the main river of a vegetation rich basin area in japan*. Science of total Environment, 345(1/3), 99-113.
- Samuelson G., Öquist G. (1977) *A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on in vivo chlorophyll fluorescence*. Plant Physiology 40, 315-319
- Vedrine C., Leclerc J.C., Durrieu C., Tran-Minh C. (2003) *Optical whole cell biosensor using Chlorella vulgaris designed for monitoring herbicides*. Biosensors and Bioelectronics 18, 457-463