

# 2016

Projets collaboratifs de Recherche et Développement  
financé par le Conseil Régional de Lorraine.  
Univ. Lorraine (URAFPA) et société SO.GE.EAU

Rapport final

**AlgUS :**

***Incidence sur les organismes non cibles d'un dispositif  
ultrasonique à faible puissance destiné à maîtriser les  
proliférations algales dans des plans d'eau.***





# 2016

Projets collaboratifs de Recherche et Développement  
financé par le Conseil Régional de Lorraine.

Univ. Lorraine (URAFPA) et société SO.GE.EAU

Rapport final

***AlgUS :***

***Incidence sur les organismes non cibles d'un dispositif  
ultrasonique à faible puissance destiné à maîtriser les  
proliférations algales dans des plans d'eau.***



# Sommaire

<u>Préambule</u>	5
<b><u>Introduction générale</u></b>	<b>7</b>
<b>Partie I : Exposition de poissons (<i>Cyprinus carpio</i>) à des dispositifs d'émission d'ultrasons et évaluation des effets indésirables sur cette espèce.</b>	<b>10</b>
<u>I.1. Introduction (partie 1)</u>	11
<u>I.2. Matériel et Méthodes</u>	12
I.2.1. Règles éthiques	
I.2.2. Système d'exposition aux ultrasons	
I.2.3. Design expérimental et soins aux poissons	
I.2.4. Prélèvements de poissons, mesures <u>morphométriques</u> et prélèvements sanguins	
I.2.5. Mesure du niveau de cortisol circulant	
I.2.6. Traitement des tissus prélevés et détermination des biomarqueurs	
I.2.7. Traitement des données et analyses statistiques	
<u>I.3. Résultats et discussion</u>	18
I.3.1. Mesure du signal acoustique dans les plans d'eau traités	
I.3.2. Indice de condition et niveau de cortisol circulant	
I.3.3. Mesures de biomarqueurs enzymatiques	
<u>I.4. Conclusion et perspectives (partie 1)</u>	29
<u>I.5. Références</u>	30
<b>Partie II : Exposition de crustacés (gammarès) à des dispositifs d'émission d'ultrasons et évaluation des effets indésirables sur cette espèce.</b>	<b>33</b>
<u>II.1. Introduction (partie 2)</u>	34
<u>II.2. Matériel et méthodes</u>	35
II.2.1. Collecte et acclimatation des gammarès	
II.2.2. Démarche expérimentale	
II.2.3. Suivi des paramètres physico-chimiques de l'eau	
II.2.4. Détermination de la durée d'exposition létale pour 50 % des individus (DL <sub>50</sub> )	
II.2.5. Evaluation de biomarqueurs potentiels d'exposition aux ultrasons	
II.2.6. Traitement statistique	
<u>II.3. Résultats et interprétation</u>	40
II.3.1. Paramètres physico-chimiques de l'eau	
II.3.2. Durées létales d'exposition aux ultrasons	
<u>II.4. Conclusion (partie 2)</u>	46
<u>II.5. Références :</u>	47
<b><u>Conclusion générale</u></b>	<b>48</b>
<b><u>Perspectives</u></b>	<b>50</b>
<u>Annexes</u>	51

# Préambule

Le Conseil Régional de Lorraine a mis en place un fonds pour les projets collaboratifs de recherche et développement (R&D) destiné à rapprocher les entreprises des laboratoires de recherche publics. Dans le cadre de ce dispositif, avec le soutien du pôle de l'eau Alsace-Lorraine HYDREOS, la société SO.GE.EAU localisée à Gerardmer (88) et l'Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (URAFPA) de l'Université de Lorraine, se sont associées.

La société SO.GE.EAU, spécialisée dans le traitement de l'eau et l'URAFPA, laboratoire dont les recherches s'attachent à assurer la durabilité des systèmes d'élevages dont les exploitations piscicoles, ont mis en commun leurs compétences afin d'apprécier l'absence d'impact négatif d'un nouveau système de traitement des eaux de surface, basé sur l'utilisation d'ultrasons.

Ce travail de R&D se place dans un contexte de :

- développement important (plus forte progression depuis 10 ans) de l'activité piscicole à l'échelle mondiale et de la demande croissante du consommateur en produits aquacoles.

- nécessité de maintenir ou rétablir le bon état des masses d'eau (première échéance de la Directive Cadre sur l'Eau atteinte en 2015) en France et l'ensemble des pays membres de la communauté européenne.

- prolifération récurrente des cyanobactéries (algues bleues dont certains taxons produisent des toxines) dans un grand nombre de masses d'eau. Ces algues rendent l'eau impropre à de multiples usages (ex. potabilisation, baignade, pisciculture, etc.) ou conduisent à rendre prohibitif le traitement de l'eau.

- interdiction de l'usage de produits chimiques ou de l'introduction de poisson herbivores (ex. Carpe chinoise) pour lutter contre la prolifération de cyanobactéries ou végétaux indésirables.

Par conséquent, le développement de méthodes innovantes et durables de traitement des eaux, permettant de lutter de manière préventive et/ou curative contre la prolifération de cyanobactéries dans les eaux de surface, constitue un enjeu économique et environnemental actuel majeur. Cet objectif s'avère particulièrement

pertinent pour la gestion durable des plans d'eau de baignade, de pisciculture, de pêche de loisir et/ou destinés à la production d'eau potable.

Au regard des recherches menées au cours de la dernière décennie tant en Europe qu'en Amérique du Nord, l'utilisation des ultrasons apparaît constituer un processus efficace pour lutter contre la prolifération des cyanobactéries. Cependant, préalablement au présent projet de R&D, aucune étude menée sur le terrain et visant à apprécier l'impact (ou l'absence d'impact) des ultrasons sur les espèces non cibles (ex. poissons) n'avait été recensée. L'interdiction des produits de traitements chimiques survenus au cours des dernières années résultait à juste titre d'une évaluation négative des effets collatéraux sur les espèces non cibles (c.-à-d. toxicités des produits phytosanitaires sur les animaux et/ou végétaux non cibles).

Dans ce contexte, l'objectif de ce projet de R&D était d'évaluer les impacts (ou absence d'effets délétères) des ultrasons sur les espèces non cibles (ex. carpe commune), ceci afin d'assurer que le développement par la société SO.GE.EAU et la commercialisation de ce processus de traitement des eaux serait adapté à la préservation des plans d'eau et à leur gestion durable.

Remarque : le présent projet de R&D n'avait pas pour objectif et ne disposait pas des moyens financiers nécessaires pour vérifier l'efficacité du traitement ultrasons afin de lutter contre la prolifération des cyanobactéries ou autres végétaux indésirables.

# Introduction générale

Une nécessité de développer et promouvoir des méthodes de lutte contre les fleurs d'eau à cyanobactéries et de s'assurer de l'absence d'effet délétère pour les écosystèmes aquatiques.

Ces dernières décennies, l'occurrence de fleurs d'eau à cyanobactéries (blooms algaux pour les anglo-saxons) a considérablement augmenté dans les plans d'eau et rivières. En rendant l'eau impropre à la consommation, à la baignade ou à la pêche, la prolifération cyanobactérienne a des répercussions économiques négatives pour l'ensemble des régions qui s'appuient sur les ressources en eau de surface pour leur alimentation en eau, mais aussi sur celles dont les activités touristiques dépendent de la qualité des écosystèmes aquatiques à vocation de loisirs ou naturalistes. Les plans d'eau piscicoles et l'activité économique associée sont quant à eux atteints à de multiples niveaux par ces proliférations de cyanobactéries. En effet, les cyanotoxines sont susceptibles d'induire diverses pathologies voire la mort chez les poissons et les autres organismes, mais elles sont également à l'origine du goût de vase (off-flavor) qui caractérise le poisson élevé en présence de cyanobactéries (Hagreaves, 2003). Les répercussions de ces blooms algaux sont également d'ordre sanitaire, car de nombreuses cyanobactéries produisent des toxines qui peuvent affecter le foie, le système nerveux, les yeux et les muqueuses, ou peuvent aussi provoquer des dermatites et des allergies (El-Shehawy et al., 2012).

En Lorraine, troisième région française productrice de poissons d'étangs, la prolifération de cyanobactéries en étangs a été pointée du doigt par Gigueux dès 1992 (Gigueux, 1992), et a pris de l'ampleur au cours des décennies suivantes (Banas, 2001; Didier, 2003). L'eutrophisation des eaux et en particulier les apports trop élevés de phosphore vers les milieux aquatiques semblent avoir été l'un des principaux facteurs ayant conduit à la prolifération de ces algues toxiques nuisibles à la santé humaine et animale au cours des décennies passées. L'évolution actuelle et à venir du climat pourrait encore accroître le phénomène. En effet, une température élevée de l'eau étant favorable au développement de ces organismes, un risque important de voir ce phénomène prendre de plus en plus d'ampleur au cours des

années à venir est suspecté (SINC, 2012). Ce risque apparaît particulièrement préoccupant pour les variétés de cyanobactérie cytotoxiques, qui sont susceptibles de produire plus de toxines et de devenir plus nocives (Newcombe et al., 2012).

Afin de lutter durablement contre l'eutrophisation des eaux et les proliférations cyanobactériennes, la réduction des rejets individuels et des intrants agricoles sur le bassin versant s'avère nécessaire mais n'est pas suffisante à elle seule à courts et moyens termes. En effet, au regard de l'inertie de réponse des écosystèmes aquatiques à l'amélioration de l'eau, mais également à la difficulté à faire évoluer efficacement les pratiques agricoles et les pressions anthropiques sur les bassins versants, il s'avère indispensable que les gestionnaires de plans d'eau puissent s'appuyer sur des méthodes complémentaires et efficaces de lutte contre les cyanobactéries.

La lutte contre les proliférations végétales en milieu aquatique s'est auparavant largement appuyée sur des méthodes chimiques tel que le sulfate de cuivre ou encore divers herbicides tels que Gramoxone® ou Roundup® maintenant interdits. Si ces interdictions sont absolument justifiées et peuvent même être considérées comme trop tardives au regard des effets indésirables sur les espèces non cibles, elles ont laissé les gestionnaires de plans d'eau sans réelle alternative de lutte contre les nuisances algales. Afin de combler ce manque, des méthodes de lutttes biologiques (ex. carpes herbivores ou biomanipulation), chimiques s'appuyant sur des molécules considérées comme naturelles (ex. allélopathie) ou physiques (ex. ultrasons) s'avèrent efficaces contre les cyanobactéries mais nécessitent l'acquisition de plus amples connaissances afin d'assurer la protection des écosystèmes aquatiques. Malgré les demandes pressantes et récurrentes des exploitants piscicoles pour un recours plus aisé à la carpe herbivore, les organismes en gestion des ressources en eau (ONEMA et MEDDE) ont confirmé que l'arrêté d'interdiction du 17 décembre 1985 devait être appliqué, limitant alors le recours à cette méthode de lutte. L'utilisation de substances chimiques considérées comme naturelles (ex. substances allélopathiques), impose quant à elle que l'innocuité de ces molécules pour les organismes non cible soit assurée (Svanys et al., 2014). En effet, bien que ces molécules soient produites naturellement par certains organismes, l'absence d'effets préjudiciables sur le biote n'est pas assurée et impose de prendre toutes les

précautions avant d'utiliser *in situ* de telles molécules dont la rémanence dans l'environnement est mal connue.

En réponse à ces inconvénients, les méthodes physiques (i.e. ultrasons) apparaissent particulièrement prometteuses. Ces techniques non chimiques présentent l'avantage de ne pas libérer dans l'environnement de substances qui pourraient s'avérer délétères pour l'environnement. Le traitement peut de plus être parfaitement modulé en intensité et en durée. Il présente aussi l'avantage de pouvoir être stoppé sans aucune inertie ou rémanence dans l'environnement.

## **Partie I**

**Exposition de poissons (*Cyprinus carpio*) à des dispositifs d'émission d'ultrasons et évaluation des effets indésirables sur cette espèce.**

## I.1. Introduction (partie 1)

L'objectif de ce travail de recherche mené en collaboration entre industriel et universitaire avec le soutien de la Région Lorraine, avait pour objectif de :

Tester en conditions réelles d'utilisation, en plan d'eau, si l'utilisation d'ultrasons appliqués pour lutter contre la prolifération végétale, avait des répercussions délétères sur les espèces non cibles.

Avec ce projet, c'est la première fois qu'un travail vise à évaluer les éventuels effets subléthaux à long terme d'une exposition aux ultrasons en utilisant une espèce piscicole commune, la carpe (*Cyprinus carpio*), comme modèle. Cette espèce de poisson est très largement répartie dans les lacs eutrophes, réservoirs, étangs et autres plans d'eau européens tout comme en Asie. Cette espèce constitue également l'espèce principale produite en étangs d'aquaculture [14].

## **I.2. Matériel et Méthodes**

Des juvéniles de carpe ont été exposés en continu à un système innovant d'émission d'ultrasons de faible puissance émettant à une double fréquence de 23 et 46 KHz. Après respectivement 7 et 28 jours d'exposition aux ultrasons, les poissons ont été sacrifiés, les indices de facteurs de conditions ont été déterminés et un panel de marqueurs biochimiques ont été évalués. Ces marqueurs comprenaient : i) des biomarqueurs du système enzymatique hépatique de défense anti-oxydante, c'est-à-dire la superoxydedismutase totale (SOD totale), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase totale (total GPx) et l'activité glutathion S-transferase (GST), ii) l'activité lactate deshydrogénase liée au métabolisme énergétique cellulaire et iii) et le niveau de cortisol sanguin subséquent au stress.

### **I.2.1. Règles éthiques**

Tous les traitements et les procédures appliquées sur les animaux impliqués dans cette expérimentation ont été assurés en accord total avec les recommandations générales du conseil de la communauté européenne (European Union, No 2010/63/CEE) et du conseil français de protection des animaux.

### **I.2.2. Système d'exposition aux ultrasons**

Le système d'ultrasons utilisé consistait en un système innovant à double fréquence d'émission d'ultrasons alimenté par une plateforme flottante elle-même équipée de panneaux solaires. Les deux transducteurs étaient immergés à une profondeur de 0,5 m, dont un émettait à une fréquence moyenne de 23 KHz et l'autre à 46 KHz.

L'alimentation électrique des transducteurs était fixée initialement à 15 W, à la fois en puissance d'entrée et de sortie. Ces appareils ont été spécifiquement développés par la société SO.GE.EAU afin d'être utilisés pour inhiber la prolifération des cyanobactéries.

Afin de s'assurer de l'émission d'ultrasons au cours de l'expérimentation et de vérifier l'exposition des organismes, à la demande de l'URAFPA, la société SO.GE.EAU a fait l'acquisition d'un hydrophone connecté à un multimètre digital

(FLUKE Instruments). De cette manière, une évaluation de l'amplitude d'émission pic-à-pic et du signal sinusoïdal de sortie du système d'émission ultrasonique pouvait être assurée, permettant ainsi une évaluation globale de la puissance acoustique et de la fréquence des ultrasons en fonction de la distance aux émetteurs.

### **I.2.3. Design expérimental et soins aux poissons**

Des carpes communes âgées de deux ans et originaires de l'étang expérimental piscicole de la ferme de La Bouzule (Laneuvellotte, Meurthe-et-Moselle, France), appartenant et géré par l'Université de Lorraine, ont été utilisées pour les diverses expérimentations. Des lots de 50 poissons ont été gardés en acclimatation durant quatre semaines dans des mésocosmes en polyester préalablement alimentés avec 2,8 m<sup>3</sup> d'eau aérée en continu. Etant donné qu'aucune mortalité ou comportement anormal n'a été observé durant cette période d'acclimatation, les poissons ont été transférés dans les étangs expérimentaux sélectionnés pour l'étude d'exposition aux ultrasons. Les étangs d'expositions consistaient en 5 gravières actuellement utilisées comme des étangs de pêche.

Remarque : Initialement, 6 gravières ont été équipés mais en raison d'un acte de vandalisme, et malgré une remise en place totale du système d'exposition, il s'est avéré impossible d'assurer la survie et la qualité du matériel biologique dans les 6 gravières. Cette dégradation a été déclarée à la gendarmerie de Neuves-Maisons et a fait l'objet d'une du dépôt de plainte contre X par le président de l'Université de Lorraine. Malgré l'enquête de gendarmerie, aucun suspect n'a été interpellé et aucun dédommagement n'a été rendu possible afin de compenser les surcoûts considérables (c'est-à-dire : coût du matériel biologique, coût du matériel d'exposition, coûts salariaux) imputables à cet acte.

Les poissons exposés dans deux plans d'eau ont été utilisés comme des contrôles (sans aucune exposition aux ultrasons) alors que dans les 3 autres gravières, les poissons étaient exposés aux ultrasons.

Les cinq plans d'eau étaient localisés à proximité de la rivière Moselle dans les communes de Méréville, Messein et Flavigny-sur-Moselle (Meurthe-et-Moselle, France). Ces plans d'eau présentaient des caractéristiques physico-chimiques similaires entre les sites et dans la gamme de : pH [8.2 – 9.6], conductivité [177 – 480  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ],  $\text{NO}_3^-$  [0 – 0.02 mg L<sup>-1</sup>],  $\text{PO}_4^{3-}$  [0 – 2.64 mg L<sup>-1</sup>],  $\text{SO}_4^{2-}$  [13.1 – 39.9 mg L<sup>-1</sup>],  $\text{Ca}^{2+}$  [17.1 – 61.7 mg L<sup>-1</sup>],  $\text{Mg}^{2+}$  [5.7 – 9.9 mg L<sup>-1</sup>],  $\text{Na}^+$  [7.6 – 28.9 mg L<sup>-1</sup>],  $\text{K}^+$  [1.3 –

6.2 mg L<sup>-1</sup>]. Dans chaque plan d'eau, trois cages flottantes fabriquées sur la base d'armature en bois (arrêtes de cubes) de 1 m<sup>3</sup> (1 m x 1 m x 1 m) et constituées de filets en nylon (mailles de 1 cm x 1 cm) étaient assemblées. Pour les plans d'eau concernés par l'exposition aux ultrasons, les trois cages étaient alignées à l'aide d'une armature bois d'une longueur de 10 m. Les cages étaient ainsi placées respectivement à 1 m, 10 m et 30 m des émetteurs à ultrasons (Fig. 1).

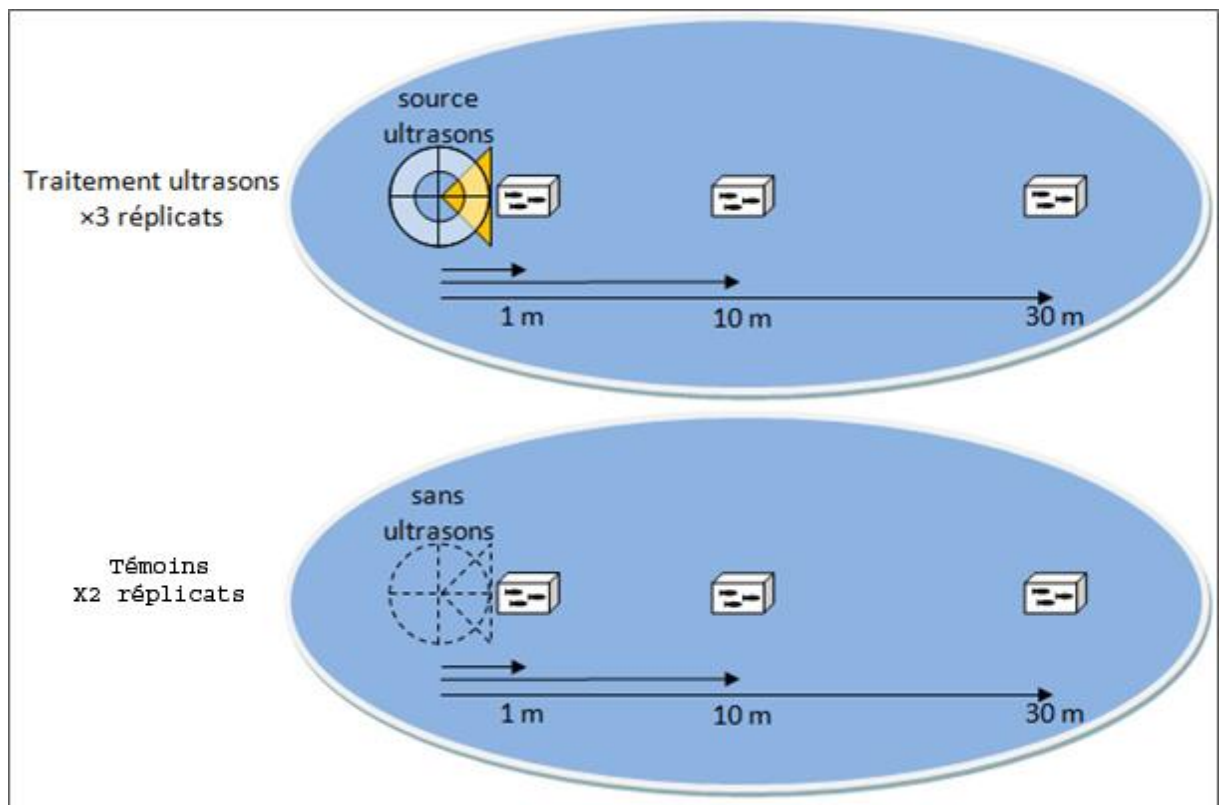


Figure 1 : Schéma du dispositif expérimental utilisé.

Trois cages étaient également introduites dans les plans d'eau de contrôle et étaient séparées les unes des autres conformément aux distances fixées dans les plans d'eau utilisés pour l'exposition aux ultrasons, c'est-à-dire 9 m entre la première et la seconde cage et 20 m entre la seconde et la troisième cage. Douze poissons étaient aléatoirement distribués dans chaque cage des différents plans d'eau. Ces carpes étaient alors soumises à une nouvelle période d'acclimatation de 13 jours dans l'ensemble des étangs avant que l'exposition aux ultrasons ne débute. Durant toute la période d'acclimatation et d'exposition, les poissons étaient nourris à un taux de 2% (P/P) de la biomasse. La nourriture était distribuée tous les matins à 8h00 en utilisant des distributeurs automatiques d'aliments. L'aliment utilisé consistait en des pellets commerciales de 5 mm de diamètre de type « Carpe extrudée-coul 3, Le

Gouessant ». Juste après la période d'acclimatation, quatre poissons étaient échantillonnés dans chaque cage et aux trois distances (1 m, 10 m, et 30 m). Ce prélèvement correspond à la date de prélèvement « T<sub>0</sub> ». La même procédure a été appliquée après 7 jours (T<sub>+7</sub>) et 30 jours (T<sub>+30</sub>) d'exposition aux ultrasons. A ces mêmes dates, des carpes étaient échantillonnées selon la même procédure dans les plans d'eau de contrôle (ou témoins).

#### **I.2.4. Prélèvements de poissons, mesures morphométriques et prélèvements sanguins**

A chaque date d'échantillonnage, quatre poissons étaient aléatoirement collectés dans chaque cages, c'est-à-dire n=4 poissons par distance et par plan d'eau. Les poissons étaient immédiatement anesthésiés (sur le bateau utilisé pour atteindre chaque cage correspondante sur le plan d'eau) par immersion dans une solution de tricaine methanesulfonate (MS-222, 0,3 g/L) tamponnée avec 0,6 g/L NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Les longueurs (cm) et les poids (g) des poissons étaient déterminés afin de calculer les facteurs de condition selon la formule de Fulton [15] :

$$K = [(poids (g) / longueur (cm))^3] \times 100$$

Le sang était collecté dans un délai maximal de cinq minutes suivant le prélèvement de poisson puis stocké dans la glace dans un microtube hépariné. Les microtubes étaient ensuite centrifugés (1700 g pendant 25 min) au laboratoire pour récupération du plasma. Des aliquotes de plasma étaient alors stockés à -80°C jusqu'au dosage du niveau de cortisol par ELISA. Après le prélèvement de sang, les poissons étaient mis à mort d'un coup sur la tête préalablement à une dissection ventrale en utilisant un scalpel. Des fragments de foie (~200 mg) étaient alors collectés, congelés directement sur le bateau dans de l'azote liquide et stockés ensuite au laboratoire à -80°C jusqu'à utilisation pour les dosages biochimiques (mesures de biomarqueurs).

#### **I.2.5. Mesure du niveau de cortisol circulant**

Les mesures des niveaux de cortisol circulant ont été effectuées directement sur les échantillons de plasma tamponnés, conformément aux instructions de DIASource. Toutes les mesures pour chaque poisson ont été assurées en utilisant un kit commercial ELISA (Cortisol ELISA KAPDB270, DIASource) et les résultats étaient

calculés à partir de moyennes de mesures effectuées en duplicats pour chaque échantillon.

### **I.2.6. Traitement des tissus prélevés et détermination des biomarqueurs**

Afin d'apprécier plus précisément les effets sanitaires potentiels qui pourraient résulter d'une exposition des poissons aux ultrasons, les mesures des activités LDH, GPx totale, CAT, total SOD et GST étaient réalisées en tant que biomarqueurs d'exposition (couramment employés en toxicologie) sur les foies de poissons collectés dans les plans d'eau traités aux ultrasons et dans les plans d'eau témoins.

Tous les produits chimiques nécessaires pour l'homogénéisation du foie et la détermination des activités enzymatiques provenaient de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) et étaient de grade analytique. Les homogénats de foie étaient obtenus après broyage à billes (billes d'oxyde de zirconium d'une masse équivalent à deux fois celui de l'échantillon) dans des tubes de microcentrifugation de 2 mL en utilisant un Blender à chocs [16] et cinq volumes de tampon Tris 100 mM (avec 1 mM d'EDTA, 150 mM de KCl, à pH 7,8 et 4°C).

Les homogénats ont été centrifugés à 10000 g, 15 min à 4°C et les surnageants (fractions S9) récupérés pour la détermination des teneurs en protéines et des activités enzymatiques dans des microplaques avec un lecteur Labsystem Multiskan EX microplate [17]. Les teneurs en protéines étaient déterminées sur la dilution appropriée de la fraction S9 selon la méthode préconisée par Thermo Scientific (Pierce bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay kit, No. 23225 [18]) avec de l'albumine de serum bovin comme standard. L'absorbance était lue à 595 nm après une période d'incubation préalable de 30 min à 37 °C. L'activité SOD totale (EC 1.15.1.1) était mesurée en utilisant : Dojindo's highly water-soluble tetrazolium salt, WST-1 (2-(4-Iodophenyl)- 3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)- 2H- tetrazolium, monosodium salt) couplé avec l'activité xanthine oxidase (kit de détermination Sigma-Aldrich 19160 SOD). Une unité de SOD était définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber en une minute, 50% de l'oxydation du WST-1. L'évaluation de la CAT (EC 1.11.1.6) était assurée en utilisant des microplaques avec du peroxyde d'hydrogène 10 mM comme substrat [17]. Une unité d'activité CAT correspond à la quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (en µmoles) décomposée par min (avec  $\epsilon_{240} = 0,0394 \text{ cm}^2 \mu\text{mole}^{-1}$ ). L'activité totale GPx (EC 1.11.1.9) était mesurée par méthode indirecte de [19] en utilisant l'hydroperoxyde de cumène comme substrat. Une unité d'activité

GPx correspondant comme la quantité d'enzyme catalisant l'oxydation de 1 nmol de NADPH par minute. L'activité LDH (EC 1.1.1.27) était déterminée selon le protocole de [20] adaptée comme décrit dans [17]. Une unité correspondait à la quantité d'enzyme nécessaire pour hydrolyser une nanomole de substrat NADH par minute. L'activité GST (EC 2.5.1.18) était mesurée selon la méthode de [21] en utilisant le 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) comme substrat. Une unité d'activité GST était fixée comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour conjuguer 1 nmol de CDBN par min. Toutes les activités enzymatiques étaient déterminées à 25°C, et les longueurs d'onde utilisées pour les mesures d'activités totales GPx, GST et LDH étaient de 340 nm, alors que pour les activités SOD et CAT elle était fixée respectivement à 450 et 240 nm. Pour un échantillon déterminé, chaque activité enzymatique était mesurée en duplicats à partir de deux aliquotes du même échantillon homogénéisé de foie, et finalement exprimée en U/mg protéine. La moyenne alors obtenue était ensuite utilisée pour les calculs ultérieurs.

### **I.2.7. Traitement des données et analyses statistiques**

Toutes les résultats sont exprimées en moyenne  $\pm$  SE. Une transformation de puissance par méthode Box-Cox était appliquée avant de tester la normalité (test de Shapiro-Wilk) et l'homogénéité de la variance (test de Browne-Forsythe). Ensuite, les données relatives aux échantillons de poisson issus des plans d'eau de contrôle et de plans d'eau traités aux ultrasons étaient analysées en fonction des effets de différents facteurs : le nombre de jour d'expérimentation (0, 7 et 30 jours d'exposition des poissons en plan d'eau), la distance (1, 10 et 30 m de la source d'ultrasons), le scénario de traitement d'exposition aux ultrasons (présence/absence d'ultrasons) et la variabilité propre aux plans d'eau (étangs considérés comme un facteur « niché » dans le facteur "exposition aux ultrasons "). Les analyses statistiques étaient réalisées selon une ANOVA hiérarchique (ou nichée, « nested ANOVA »), suivie d'une procédure de comparaison multiple de Tukey. Les données étaient finalement groupées selon la significativité des facteurs déterminée à partir de l'ANOVA hiérarchique pour une meilleure lisibilité des histogrammes représentés. Toutes les analyses statistiques étaient assurées à un niveau de significativité de  $p < 0.05$ , en utilisant Statistica v.10 software.

## I.3. Résultats et discussion

En raison de leurs propriétés présumées respectueuses de l'environnement, sans effets délétères à long terme (contrairement aux techniques traditionnelles utilisant des produits chimiques tels que le cuivre, le fer ou des sels d'aluminium [5]), les technologies basées sur les ultrasons ont été largement promues ces dernières années comme méthode efficace pour prévenir les blooms de cyanobactéries dans les plans d'eau [3, 6]. Selon la littérature, l'utilisation des ultrasons pour le traitement de l'eau présente l'avantage des effets mécaniques (liés à la résonance vibrationnelle), conduisant notamment à des phénomènes de cavitation et à la dislocation des membranes cellulaires s'accompagnant d'une altération biochimique tels que des dommages oxydatifs (inhibant également la croissance cyanobactérienne) [6, 22]. Malgré cette gamme d'effets biocides non spécifiques, il existe peu d'information concernant les potentiels effets sanitaires adverses des systèmes à ultrasons anti-cyanobactéries sur les organismes aquatiques non cible, particulièrement lorsqu'ils sont déployés à grande échelle dans un écosystème naturel et complexe tel que les plans d'eau.

A notre connaissance, cette étude est la première qui tente de combler ce manque d'information en mesurant après une longue période d'exposition aux ultrasons (30 jours), des indicateurs physiologiques non spécifiques de stress (incluant des facteurs de condition et le niveau de cortisol plasmatique), mais également des biomarqueurs cellulaires spécifiques d'effet (modulation des activités enzymatiques) chez une espèce piscicole communément présente dans nos écosystèmes aquatiques et élevée en aquaculture : la carpe commune (*Cyprinus carpio*).

### **I.3.1. Mesure du signal acoustique dans les plans d'eau traités**

Les données collectées à partir des systèmes à ultrasons à la fin de l'expérimentation montrent que les ultrasons alimentés à l'aide de panneaux solaires ont fonctionnés en moyenne 22,5 heures par jour dans les plans d'eau exposés.

Avec une puissance initiale d'entrée fixée à 15 W et atteignant une efficacité de 11 à 12 W in situ (selon l'ensoleillement), une puissance de sortie moyenne de 7 à 9 W peut être enregistrée sur les cartes embarquées connectées aux deux types de

transducteurs. Cette puissance était suffisante pour une exposition efficace aux ultrasons aux deux fréquences de 23 et 46 KHz en moyenne dans tous les plans d'eau exposés.

	<b>Distance aux émetteurs à ultrasons (m)</b>			
	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>30</b>
<b>Tension pic-à-pic (mV)</b>	1200 ± 283	145 ± 18	62 ± 30	18 ± 9
<b>Niveau de pression acoustique (dB SPL)</b>	201,1 – 207,2	187,4 – 187,7	158,6 - 185,3	152,6 – 175,1

**Tableau 1.** Détection des signaux acoustiques dans les étangs traités aux ultrasons en fonction de la distance aux émetteurs. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SE pour les tensions pic-à-pic (en mV; déterminées à partir d'un multimètre digital couplé à un hydrophone) alors que l'étendue des niveaux de pression acoustique (SPL) est exprimée en décibel (dB SPL).

Comme cela peut être observé avec les résultats présentés sur le Tableau 1, la détection du signal acoustique montre que la puissance acoustique la plus haute était atteinte à proximité des transducteurs. En effet les intensités mesurées de pic-à-pic tombent drastiquement de 1200 ± 283 mV à une distance de 0,5 m face aux transducteurs à seulement 145 ± 18 mV à un mètre de la source d'émission, représentant une diminution moyenne d'un ordre de magnitude (Tableau 1). Les intensités mesurées continuent de baisser en fonction de l'éloignement aux transducteurs, atteignant une valeur de base de 18 ± 9 mV à 30 m de distance (Tableau 1). La transformation des données en pression acoustique reflète également une diminution acoustique non négligeable de la puissance acoustique de 0,5 m à 1 m de distance des transducteurs, avec des valeurs enregistrées variant de 207,2 à 187,4 dB SPL (Tableau 1). Dans l'ensemble, la même gamme de niveau de pression acoustique était ainsi mesurée de 1 m à 30 m de distance (Tableau 1).

D'après la littérature, une puissance acoustique de l'ordre de 180 dB re 1 µPa (mesurée à 1 mètre ou moins de la source) ne constituerait pas a priori de « pollution sonore » notable en milieu aquatique [26]. De plus, la diminution observée dans le voltage pic-à-pic tel que mesuré grâce au montage incorporant un hydrophone pourrait s'expliquer à la fois du fait de la configuration des plans d'eau. En effet, comme récemment reporté par [27], l'immersion directe d'émetteurs à ultrasons sans

aucune couche de matériau permettant l'adaptation de l'impédance entre la surface plane du transducteur métallique et l'eau environnante résulterait très probablement en un champ acoustique non-uniforme avec des « points chauds » à proximité immédiate du transducteur (et probablement ailleurs) (1). Par ailleurs, tel que mentionné par [7], dans un environnement ouvert tels que les étangs de pisciculture, la surface de l'eau peut être modélisée comme une « couche enveloppante » imposant des conditions de pression conduisant à la réflexion des ondes, par opposition au fond de l'étang (habituellement constitué de sédiment, végétation et autres débris...) qui apparaîtrait davantage comme un environnement semi-anéchoïque résultant en une dissipation rapide de l'énergie (2). Considérant ces divers aspects, (1) et (2) expliqueraient la diminution de signaux acoustiques observés le long du gradient de distance des sources d'émission. En dépit d'un tel phénomène, les poissons peuvent être particulièrement sensibles aux ultrasons de par leur nature [12, 13, 28], et une exposition prolongée à de tels signaux acoustiques d'intensité variable associés à une double fréquence d'émission sont susceptibles d'altérer le comportement et la physiologie des vertébrés aquatiques. Ces derniers points nécessitent d'être clarifiés dans le cadre d'une évaluation des risques écologiques potentiels avant toute utilisation à grande échelle d'une telle technologie basée sur l'émission d'ultrasons.

### **I.3.2. Indice de condition et niveau de cortisol circulant**

Il est maintenant avéré que l'exposition de manière répétée ou chronique d'organismes aquatiques, en particulier les poissons, à des stress environnementaux de nature et d'intensité variable peut entraîner un panel de réponses biologiques reflétant directement les capacités d'adaptation des organismes aux perturbations environnementales. Ces effets biologiques qualifiés parfois de « subléthaux » se traduisent généralement par des variations de paramètres internes pouvant être appréhendées aux niveaux biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental [29, 30]. Lors de précédentes expérimentations en laboratoire [31], Zimba et Grimm (2008) ont par exemple reporté qu'une exposition de juvéniles de poisson-chat à une émission permanente d'ultrasons pouvait grandement altérer leur comportement alimentaire (sans préciser toutefois les détails inhérents au système d'émission à ultrasons). Par ailleurs, un retour à un comportement alimentaire « habituel » (i.e. alimentation normale) était observé dès lors que les émissions d'ultrasons cessaient,

suggérant ainsi des modifications biologiques réversibles concernant le stress potentiellement induit par les ultrasons en conditions d'expérimentation naturelles. Aussi, dans le cadre de l'évaluation à l'échelle des organismes du stress potentiel résultant de l'exposition aux ultrasons, l'indice de condition des carpes a d'abord été déterminé à chacune des dates d'échantillonnage, à la fois chez les poissons exposés et chez les individus témoins (Fig. 2).

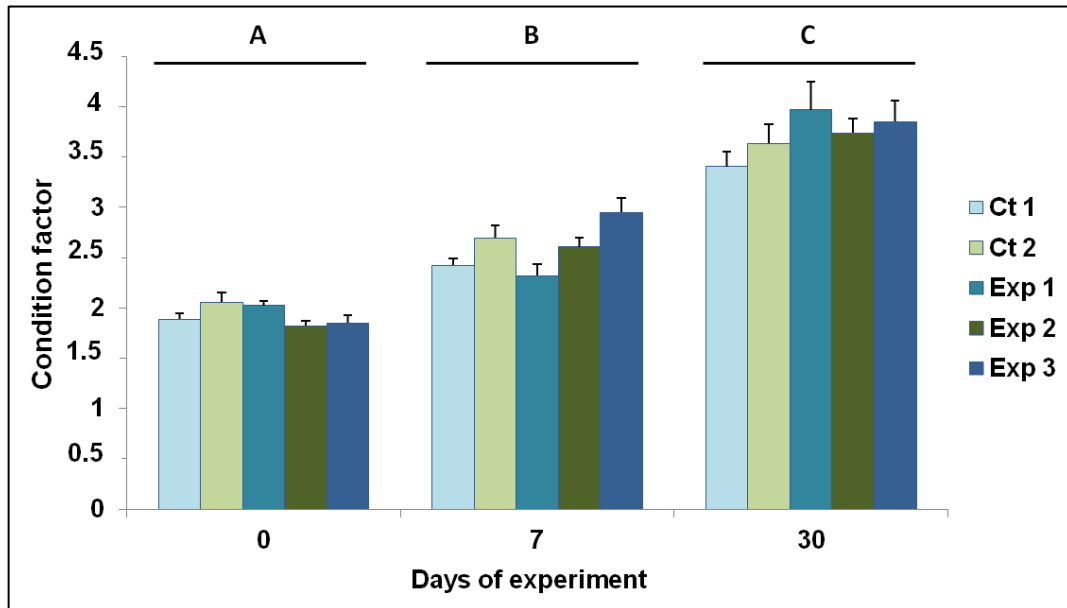


Fig. 2. Indices de condition des poissons à  $T_0$ ,  $T_{+7}$  et  $T_{+30}$  jours d'expérimentation dans les étangs contrôles (Ct) et exposés aux ultrasons (Exp). Ct 1: étang contrôle 1; Ct 2: étang contrôle 2; Exp 1: étang exposé 1; Exp 2: étang exposé 2; Exp 3: étang exposé 3. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  SE. Les différences entre groupes sont indiquées par différentes lettres majuscules ( $p < 0.05$ ).

Les résultats ont indiqué que seule la durée de séjour des poissons dans les étangs (indépendamment du fait que ces derniers soient concernés ou non par le traitement aux ultrasons) affectait leur croissance et leur condition globale (Tableau 2). Comme illustré à la Fig. 2, l'allongement de "l'élevage" des poissons en étang était associé à de meilleurs indices de condition des individus échantillonnés quelle que soit la modalité d'exposition considérée, i.e. traitement aux ultrasons vs absence de traitement. Ces observations suggèrent clairement une absence d'effet du système à ultrasons employé (dans nos conditions d'expérimentation in situ) quant à toute altération potentielle du comportement alimentaire qui aurait pu conduire à une sous-alimentation des carpes. De plus, concernant les concentrations plasmatiques en cortisol, hormone majeure du stress, les variations mesurées (Tableau 2, Fig. 3)

étaient principalement affectées par : i) la durée de séjour en étang (Tableau 2) avec dans l'ensemble une augmentation des niveaux circulant de l'hormone parallèlement à l'augmentation de la maintenance des poissons dans les cages flottantes (Fig. 3 A), et ii) la distance (Tableau 2, indifféremment de l'application d'un traitement aux ultrasons) avec davantage de concentration plasmatique en cortisol dans les poissons échantillonnés dans la première série de cages (à 1 m en distance théorique des transducteurs) suivis de ceux collectés à 10 m et finalement à 30 m, toujours indépendamment du traitement aux ultrasons (Tableau 2; Fig. 3 A, A').

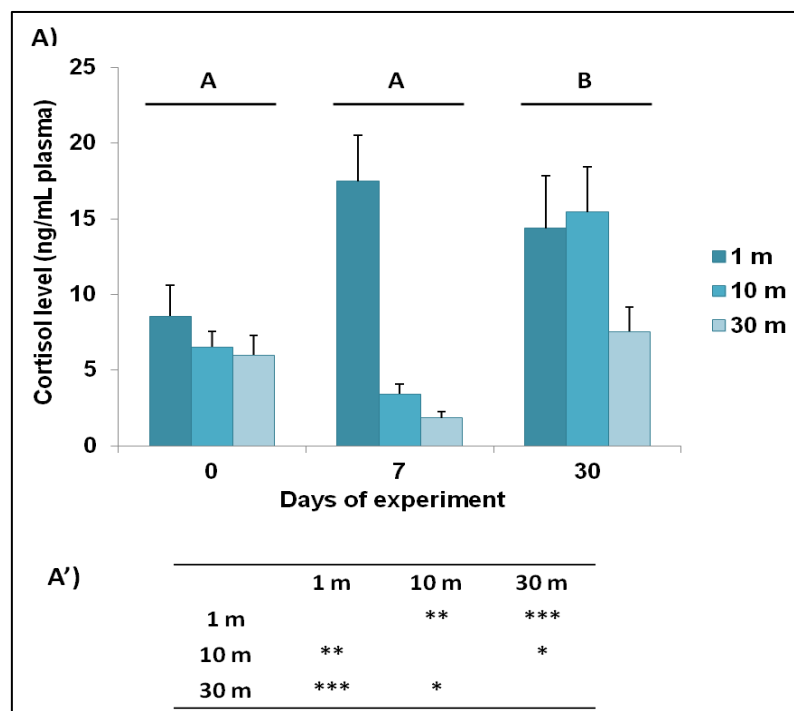


Fig. 3. A) Niveaux de cortisol plasmatique chez les poissons à T<sub>0</sub>, T<sub>+7</sub> et T<sub>+30</sub> jours d'expérimentation en fonction de la distance (1 m, 10 m, 30 m). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  SE. Les différences entre groupes sont indiquées par différentes lettres majuscules ( $p < 0.05$ ). A'') Résultats des tests de Tukey indiquant des différences significatives entre lots de poissons en fonction de la distance (indépendamment de la présence/absence de traitement aux ultrasons);  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), and  $p < 0.001$  (\*\*\*)).

Les analyses plasmatiques ont également révélé de légères variations des taux hormonaux en fonction de l'étang d'origine des poissons (Tableau 2) mais la procédure statistique de comparaison multiple des moyennes n'a pas permis de faire ressortir de différence marquante entre étangs traités aux ultrasons et étangs témoins. Dans la mesure où la biomasse des carpes continuait à croître au fil de leur maintenance en étangs (comme indiqués par les indices de conditions relevés chez

l'ensemble des poissons), et étant donné que la biomasse introduite par cage était bien en-deçà des valeurs habituellement préconisées pour cette espèce de poisson (densité maximale de  $150 \text{ kg m}^{-3}$ ; [32]), ces résultats indiqueraient davantage que les variations observées dans les niveaux de cortisol circulant étaient liées aux conditions d'élevage *stricto sensu*, notamment au confinement des individus dans les cages, plutôt qu'à des perturbations environnementales (e.g. ultrasons) inhérentes aux étangs considérés. La carpe commune ayant un comportement « fouisseur » lors de sa recherche de nourriture, on pourrait notamment émettre l'hypothèse qu'un prolongement de la durée d'exposition en cage flottante (jusqu'à 30 jours) aurait été suffisante pour stimuler la production de cortisol dans nos conditions expérimentales. En effet, le cortisol est l'hormone de stress majeure produite chez les vertébrés supérieurs, et sa libération plasmatique est généralement « proportionnelle » à l'intensité et à la durée du stress environnemental auquel est directement soumis l'organisme [29, 30]. Néanmoins, il est à souligner qu'une augmentation en concentration plasmatique de cortisol est une réponse physiologique adaptative qui ne se produit pas systématiquement au détriment de l'état biologique global de l'organisme ni au maintien de son homéostasie sur le long terme [29] ; cela a notamment été illustré dans le cas présent par une augmentation de l'indice de condition des carpes (Fig. 2). En outre, les niveaux relativement plus bas reportés pour les poissons situés à 30 m pourraient être liés au fait que ces individus étaient généralement les derniers à être pêchés lors des campagnes d'échantillonnage.

Source de variation	Indice de condition		Cortisol		SOD		CAT		GPx		GST		LDH	
	d.f.	F	d.f.	F	d.f.	F	d.f.	F	d.f.	F	d.f.	F	d.f.	F
Durée de l'expérimentation	2	228.43***	2	11.42***	2	13.82***	2	19.92***	2	42.71***	2	37.49***	2	83.88***
Distance	2	0.28	2	16.40***	2	1.29	2	2.06	2	1.08	2	1.13	2	1.36
Traitement aux ultrasons	1	0.23	1	0.17	1	0.03	1	1.28	1	1.38	1	0.003	1	0.19
Etangs (traitement aux ultrasons)	3	2.12	3	2.85*	3	5.18**	3	3.53*	3	3.03*	3	5.48**	3	6.74***
Erreur	161		161		161		161		161		161		161	

Tableau 2. Résultats de l'ANOVA hiérarchique concernant l'indice de condition des poissons, les niveaux de cortisol circulant, la SOD (activité superoxyde dismutase), CAT (activité catalase), GPx (activité glutathion peroxidase), GST (activité glutathion S-transferase activity) et LDH (activité lactate deshydrogenase) en tant que variables dépendantes, et la durée d'expérimentation (ou temps de séjour des poissons en étang), la distance (des émetteurs à ultrasons/entre les cages flottantes), le traitement aux ultrasons (présence/absence) et les étangs (niché dans le facteur « traitement aux ultrasons ») en tant que facteurs. Les astérisques indiquent des différences significatives au seuil de significativité de :  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) et  $p < 0.001$  (\*\*\*)

De fait et en raison des variations rapides des niveaux plasmatiques de cortisol, i.e. dans un délai de 3 min suivant l'exposition à un stress [33], on pourrait aisément supposé que les carpes situées à des distances plus importantes (de l'ordre de 30 m) auraient déjà été « adaptées » à la situation stressante concomitante à la navigation sur l'eau et à la pêche menées pour les échantillonnages dans les cages précédentes, conduisant à un « réajustement » des niveaux de cortisol à des valeurs pouvant être qualifiées de basales pour des poissons maintenus à des distances importantes (30 m).

### **I.3.3. Mesures de biomarqueurs enzymatiques**

Afin de mieux appréhender les effets subléthaux potentiels consécutifs à une exposition chronique aux ultrasons, plusieurs activités enzymatiques ont été évaluées sur les homogénats de foie des poissons non-exposés et exposés aux ultrasons (Fig. 4). Il s'agissait plus précisément d'enzymes couramment étudiées en toxicologie aquatique en tant que biomarqueurs liés à la régulation du stress oxydant (SOD, GPx, CAT) ainsi qu'aux activités de biotransformation (GST) et de métabolisme énergétique (LDH) au niveau cellulaire. Le recours à un panel de biomarqueurs cellulaires est particulièrement adapté à la détection précoce d'altération biologique avant que des dommages ne soient observables à des niveaux d'organisation supérieur, avec des conséquences écologiques potentiellement néfastes et irréversibles [34, 35]. Par ailleurs, le suivi de l'évolution de biomarqueurs au fil du temps d'exposition des poissons permet une meilleure compréhension des mécanismes d'adaptation des organismes aux stress environnementaux auxquels ils sont soumis [34, 35].

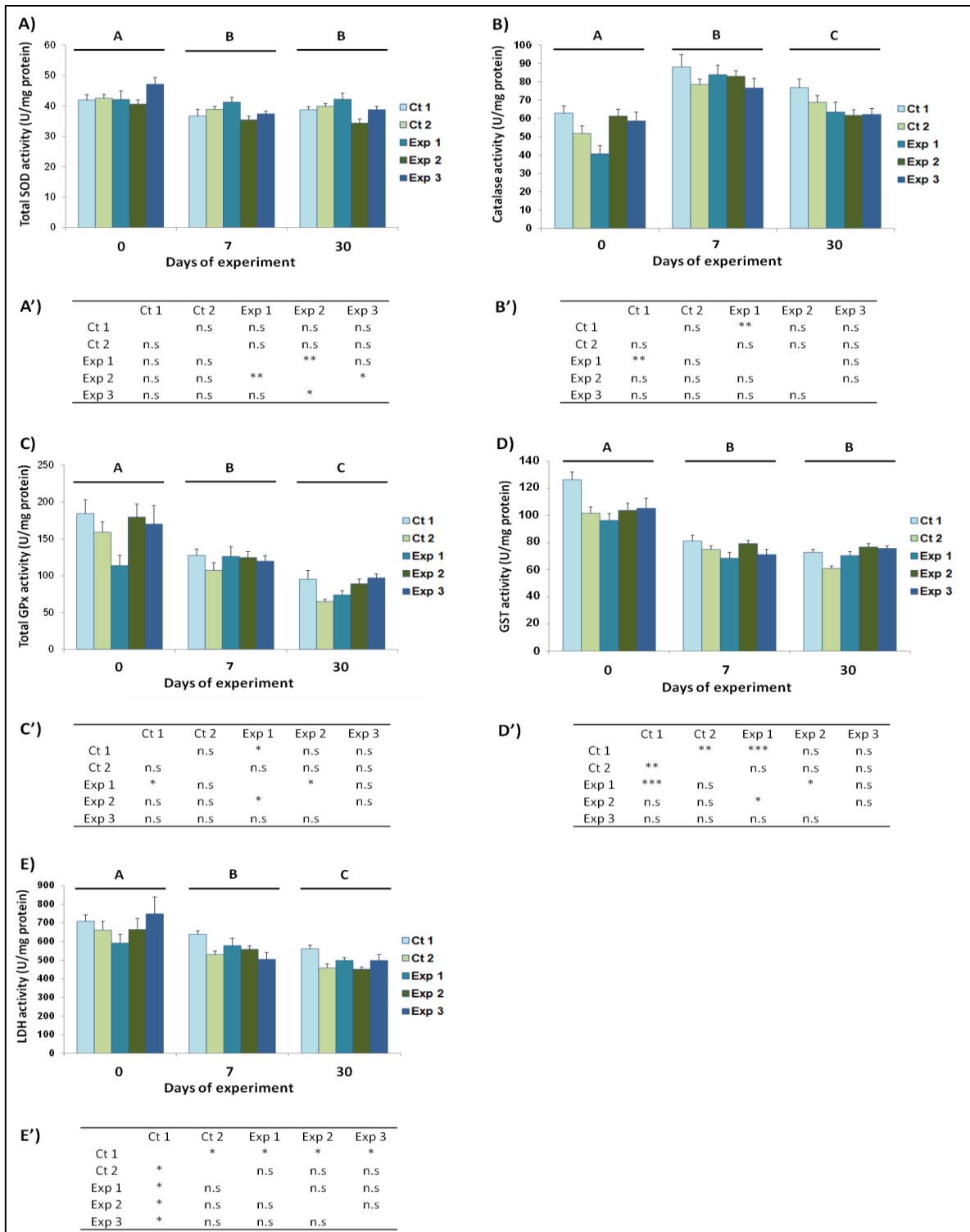


Fig. 4. A, B, C, D, E: Activités enzymatiques mesurées dans les homogénats de foie de poissons à T<sub>0</sub>, T<sub>+7</sub> et T<sub>+30</sub> jours d'expérimentation dans les étangs contrôles (Ct) et exposés aux ultrasons (Exp). A: activité SOD; B: activité CAT; C: activité GPx; D: activité GST; E: activité LDH. Ct 1: étang contrôle 1; Ct 2: étang contrôle 2; Exp 1: étang exposé 1; Exp 2: étang exposé 2; Exp 3: étang exposé 3. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SE. Les différences entre groupes sont indiquées par différentes lettres majuscules ( $p < 0.05$ ). A', B', C', D', E': Résultats des tests de Tukey indiquant des différences significatives entre lots de poissons groupés selon l'étang expérimental; Ct 1: étang contrôle 1; Ct 2: étang contrôle 2; Exp 1: étang exposé 1; Exp 2: étang exposé 2; Exp 3: étang exposé 3; seuil de significativité:  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) and  $p < 0.001$  (\*\*\*)

Comme indiqué à la Fig. 4 A, B, C, D, E, le principal facteur influençant les niveaux d'induction des différents biomarqueurs enzymatiques est la durée de maintenance des poissons dans les étangs (Tableau 2 : ANOVA hiérarchique,  $p < 0.001$  pour les activités SOD, GPx, CAT, GST et LDH). Globalement, les activités enzymatiques tendent à diminuer au fil du temps pour se stabiliser, à la fin des expérimentations, autour de valeurs moyennes variables en fonction de l'activité mesurée, indépendamment de l'application d'un traitement aux ultrasons (Fig. 4 A, B, C, D, E et Tableau 2 : ANOVA hiérarchique). L'absence d'effet des ultrasons est conforté par le fait que le facteur « distance » (particulièrement pour les étangs traités aux ultrasons) n'influence en aucun cas l'activité enzymatique mesurée quel que soit le biomarqueur ciblé (Tableau 2 : ANOVA hiérarchique). Les variations observées au niveau des biomarqueurs sont dans une moindre mesure affectées par l'étang lui-même dont sont originaires les poissons échantillonnés (Tableau 2 : ANOVA hiérarchique). En d'autres termes, la variabilité environnementale inhérente à chaque étang constituait le second facteur influençant l'évolution des biomarqueurs en fonction de la durée (croissante) du temps de résidence des poissons dans les cages flottantes. De plus, comme reporté dans les Fig. 4 A', B', C', D' et E' suite aux tests post-hoc de comparaisons multiples, aucune tendance spécifique ne pouvait ressortir à l'issue des comparaisons des groupes exposés aux ultrasons et témoins. Ces résultats portant sur l'induction d'activités enzymatiques pouvaient ainsi révéler des évolutions très différentes selon l'enzyme considérée indépendamment de la modalité expérimentale (Fig. 4 A', B', C', D', E'). Les SOD, GPx, CAT et GST représentent quatre familles majeures d'enzymes du système de défense antioxydant chez les poissons, enzymes dont les variations peuvent renseigner de manière précoce sur des effets subléthaux impliquant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [34, 36]. L'étude de l'activité LDH a également été reportée comme critère d'effet d'atteinte biologique en toxicologie aquatique [37]. C'est pourquoi ces cinq catégories d'enzymes ont été choisies comme biomarqueurs d'effets potentiels d'exposition aux ultrasons au niveau cellulaire dans le cadre du présent travail sur la carpe commune. En effet, les ultrasons sont susceptibles d'induire des effets thermiques et mécaniques, particulièrement dans la zone focale du faisceau d'émission des ultrasons où cela peut résulter en des phénomènes de cavitation [24]. La cavitation peut être brièvement définie comme la résultante des interactions des ultrasons avec les bulles de gaz conduisant des changements

brutaux et importants de la taille de ces bulles, un phénomène s'accompagnant localement d'augmentation de température (jusqu'à 1000°C) ainsi que de la formation de ROS [6, 24]. La cavitation est favorisée à de grandes longueurs d'ondes, i.e. à de faibles fréquences d'ultrasons [6, 24]. Dans ce contexte, nos résultats indiqueraient que les carpes ont été préservées de tout stress oxydatif, et plus globalement de tout effet délétère sur leur santé qui aurait pu être issu de phénomènes mécaniques résultant du procédé d'émission à ultrasons à double fréquence (et à faible puissance) de l'équipement utilisé dans ce travail.

## I.4. Conclusion et perspectives (partie 1)

Au cours de cette étude, les mesures de signaux acoustiques liés aux ultrasons ont suggéré une diminution rapide de la puissance acoustique dans des environnements ouverts comme les étangs. De plus, les résultats n'ont permis de révéler aucun effet délétère du système d'émission employé concernant l'état de santé des carpes exposées simultanément aux fréquences de 23 et 46 KHZ in situ sur une durée de 30 jours. En effet, la détermination de leur indice de condition au fil du temps de séjour en étang a témoigné d'une croissance constante des individus quelle que soit la modalité expérimentale considérée. Par ailleurs, les niveaux de cortisol circulant étaient influencés par la durée de séjour des poissons en étang et par la distance entre les cages flottantes, ce qui pourrait être attribué aux conditions « d'élevage » et d'échantillonnage *stricto sensu*. L'évaluation d'un panel de biomarqueurs enzymatiques (enzymes du système antioxydant et activité lactate déshydrogénase) a témoigné d'une diminution globale des activités enzymatiques, avec des variations sensibles selon les enzymes dépendant également de l'étang considéré, suggérant une adaptation des poissons aux différents étangs au fil du temps, indépendamment de la mise en place d'un système à ultrasons.

En perspectives, l'étude des effets subléthaux potentiels de l'ultrasonication à des degrés divers de blooms de cyanobactéries (avec pour conséquence éventuelle le relargage de cyanotoxines dans l'eau environnante) pourrait s'avérer complémentaire afin de garantir entièrement l'innocuité environnementale de cette éco-technologie basée sur les ultrasons.

## I.5. Références

- [1] J. Sevrin-Reyssac, M. Pletikusic, Cyanobacteria in fish ponds, *Aquaculture*, 88 (1990) 1-20.
- [2] H.W. Paerl, C.S. Tucker, Ecology of Blue-Green Algae in Aquaculture Ponds, *Journal of the World Aquaculture Society*, 26 (1995) 109-131.
- [3] C.-Y. Ahn, M.-H. Park, S.-H. Joung, H.-S. Kim, K.-Y. Jang, H.-M. Oh, Growth Inhibition of Cyanobacteria by Ultrasonic Radiation: Laboratory and Enclosure Studies, *Environmental Science & Technology*, 37 (2003) 3031-3037.
- [4] D.J. Barrington, E.S. Reichwaldt, A. Ghadouani, The use of hydrogen peroxide to remove cyanobacteria and microcystins from waste stabilization ponds and hypereutrophic systems, *Ecological Engineering*, 50 (2013) 86-94.
- [5] D. Jančula, B. Maršálek, Critical review of actually available chemical compounds for prevention and management of cyanobacterial blooms, *Chemosphere*, 85 (2011) 1415-1422.
- [6] P. Rajasekhar, L. Fan, T. Nguyen, F.A. Roddick, A review of the use of sonication to control cyanobacterial blooms, *Water Research*, 46 (2012) 4319-4329.
- [7] D.J.J. Leclercq, C.Q. Howard, P. Hobson, S. Dickson, A.C. Zander, M. Burch, Controlling Cyanobacteria with Ultrasound, *Proceedings of Internoise 2014*, Melbourne, Victoria, Australia, 16-19 November, paper 623, (2014).
- [8] M. Lürling, Y. Tolman, Beating the blues: Is there any music in fighting cyanobacteria with ultrasound?, *Water Research*, 66 (2014) 361-373.
- [9] L.A. Colucci, Ultrasonic Algae Control Literature Review. City of Austin Watershed Protection Department. Online at <http://assets.austintexas.gov/watershed/publications/files/SR-10-11%20Ultrasonic%20Algae%20Review%20Final.pdf>. Accessed 26 January 2016., (2010).
- [10] M.R. Doosti, R. Kargar, M.H. Sayadi, Water treatment using ultrasonic assistance: A review, *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 2 (2012) 96-110.
- [11] Drabkova M., M. B., A review of in-lake methods of cyanobacterial blooms control and management., *CyanoData – The Global Database of Methods for Cyanobacterial Blooms Management*, Centre for Cyanobacteria and their Toxins. [www.cyanodata.net](http://www.cyanodata.net), accessed 26 January 2016, (2007).
- [12] J. Astrup, Ultrasound detection in fish - a parallel to the sonar-mediated detection of bats by ultrasound-sensitive insects?, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 124 (1999) 19-27.
- [13] A.N. Popper, D.T.T. Plachta, D.A. Mann, D. Higgs, Response of clupeid fish to ultrasound: a review, *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 61 (2004) 1057-1061.
- [14] K. Milowska, T. Gabryelak, G. Lypacewicz, R. Tymkiewicz, A. Nowicki, Effect of ultrasound on nucleated erythrocytes, *Ultrasound in Medicine & Biology*, 31 (2005) 129-134.
- [15] Z. Jeney, Z. Jian, Use and exchange of aquatic resources relevant for food and aquaculture: common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Reviews in Aquaculture*, 1 (2009) 163-173.
- [16] R.D.M. Nash, A.H. Valencia, A.J. Geffen, The origin of fulton's condition factor : Setting the record straight, *American Fisheries Society*, Bethesda, MD, ETATS-UNIS, 2006.
- [17] C. Hoyt, Rapid, high-throughput homogenization of embryonic or larval zebrafish (*Danio rerio*), *Nature Protocol Exchange*, (2009).

- [18] D. Techer, S. Milla, P. Fontaine, S. Viot, M. Thomas, Acute toxicity and sublethal effects of gallic and pelargonic acids on the zebrafish *Danio rerio*, *Environmental Science and Pollution Research*, 22 (2015) 5020-5029.
- [19] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical Biochemistry*, 150 (1985) 76-85.
- [20] A.V. Peskin, C.C. Winterbourn, A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1), *Clinica Chimica Acta*, 293 (2000) 157-166.
- [21] Drotar, A, Phelps, P, Fall, R, Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells, Elsevier, Shannon, IRLANDE, 1985.
- [22] F. Jesus, R. Oliveira, A. Silva, A. Catarino, A.V.M. Soares, A.A. Nogueira, I. Domingues, Lethal and sub lethal effects of the biocide chlorhexidine on aquatic organisms, *Ecotoxicology*, 22 (2013) 1348-1358.
- [23] W.H. Habig, W.B. Jakoby, Assays for differentiation of glutathione S-transferases, *Methods in enzymology*, 77 (1981) 398-405.
- [24] H.M.B.B.S. Shankar, P.S.M.D. Pagel, Potential Adverse Ultrasound-related Biological Effects A Critical Review, *Anesthesiology*, 115 (2016) 1109-1124.
- [25] G.W. Hutchinson, Applying ultrasound technology to control algae and biofilm, <http://www.algaecontrol.us/>, (2009).
- [26] X. Lurton, L. Antoine, Analyse des risques pour les mammifères marins liés à l'emploi des méthodes acoustiques en océanographie. Rapport Final, IFREMER, Avril 2007 – DOP/CB/NSE/AS/07-07 (2007).
- [27] I. Tudela, V. Sáez, M.D. Esclapez, M.I. Díez-García, P. Bonete, J. González-García, Simulation of the spatial distribution of the acoustic pressure in sonochemical reactors with numerical methods: A review, *Ultrasonics Sonochemistry*, 21 (2014) 909-919.
- [28] Q.E. Ross, D.J. Dunning, J.K. Menezes, M.J. Kenna, G. Tiller, Reducing Impingement of Alewives with High-Frequency Sound at a Power Plant Intake on Lake Ontario, *North American Journal of Fisheries Management*, 16 (1996) 548-559.
- [29] B.A. Barton, Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids, *Integrative and Comparative Biology*, 42 (2002) 517-525.
- [30] R.E. Reinert, Biological Indicators of Stress in Fish, *Transactions of the American Fisheries Society*, 121 (1992) 274-276.
- [31] P.V. Zimba, C.G. Grimm, Ultrasound tested in channel catfish production systems., *Global Aquaculture Advocate* (July/August) (2008) 58-59.
- [32] H. Schmittou, Guidelines for Raising Principally Omnivorous Carps, Catfishes and Tilapias in Cages Suspended in Freshwater Ponds, Lakes and Reservoirs., *Proceedings of the People's Republic of China Aquaculture and Feed Workshop*, D. Akiyama, (Ed.). Singapore: American Soybean Association., (1991).
- [33] M.A. Nematollahi, H. van Pelt-Heerschap, J. Komen, Transcript levels of five enzymes involved in cortisol synthesis and regulation during the stress response in common carp: Relationship with cortisol, *General and Comparative Endocrinology*, 164 (2009) 85-90.
- [34] C. Cossu-Leguille, P. Vasseur, Aquatic Biomarkers, in: J.-F. Féraud, C. Blaise (Eds.) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2013, pp. 49-66.
- [35] R. van der Oost, J. Beyer, N.P.E. Vermeulen, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13 (2003) 57-149.
- [36] M. Hermes-Lima, Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals, in: *Functional Metabolism*, John Wiley & Sons, Inc., 2005, pp. 319-368.

- [37] T.C. Diamantino, E. Almeida, A.M.V.M. Soares, L.c. Guilhermino, Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus, *Chemosphere*, 45 (2001) 553-560.

## **Partie II**

**Exposition de crustacés (gammares) à des dispositifs d'émission d'ultrasons et évaluation des effets indésirables sur cette espèce.**

## II.1. Introduction (partie 2)

Les travaux reportés dans le présent rapport, réalisés par l'Unité de Recherche Animal Fonctionnalités des Produits Animaux (URAFPA – Université de Lorraine), ont pour objet « l'évaluation des effets biologiques sur les espèces non cibles, d'un procédé de lutte non chimique (ultrasons) contre la prolifération algale (cyanobactéries) ». Plus précisément, l'objectif de cette étude est de caractériser l'incidence d'un système à ultrasons innovant (basé sur l'émission d'ultrasons à deux fréquences de respectivement 23 et 46 KHz) sur le gammare. Il s'agit d'un modèle biologique couramment employé en toxicologie environnementale du fait, notamment, de sa répartition ubiquiste dans de nombreux plans d'eau à l'échelle nationale et de son importance écologique au sein des écosystèmes dulcicoles.

La démarche adoptée dans le cadre de cette étude repose sur trois séries d'expérimentation en conditions de laboratoire permettant de discriminer les effets potentiels des ultrasons, en particulier l'augmentation de température inhérente à l'émission d'ultrasons en enceintes closes.

## II.2. Matériel et méthodes

### II.2.1. Collecte et acclimatation des gammares

Les gammares sont collectés la veille des expérimentations au niveau d'un site situé le long de la Moselle dite 'sauvage' (secteur de Tonnoy, 54210). Il s'agit d'un site pouvant être qualifié de non contaminé (bruit de fond en terme de présence de xénobiotiques, Montarges-Pelletier, comm. pers.) en considération de l'historique des activités agro-industrielles de la région et de la contamination des matériaux sédimentaires en micropolluants (métaux, polluants organiques de type HAP). Les amphipodes sont acheminés dans l'heure qui suit au laboratoire, où ils sont maintenus à l'obscurité dans l'eau de prélèvement (oxygénée en permanence par l'intermédiaire d'un bulleur) jusqu'au début des expérimentations le lendemain.

### II.2.2. Démarche expérimentale

Trois séries d'expérimentation sont successivement réalisées, comprenant :

#### expérimentation 1 :

l'exposition des gammares aux ultrasons dans des unités expérimentales consistant en des cuves en verre d'un volume utile de 8 L (figure 1), préalablement installées isolément dans des caissons en polystyrène afin de prévenir la propagation des ultrasons aux cuves témoins, *i.e.* cuves non exposées aux ondes ultrasonores;

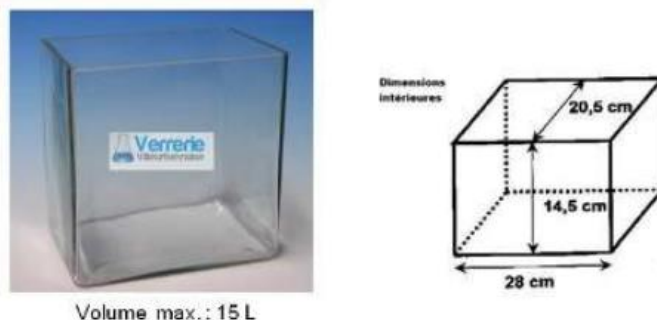


Figure 1 : Cuve en verre utilisée pour l'exposition des gammares aux ultrasons.

### expérimentation 2 :

L'exposition des gammars aux ultrasons dans les conditions précédentes, auxquelles s'ajoute la mise en place d'un système de recirculation de l'eau à travers l'ensemble des unités expérimentales (exposées et témoins), cela afin de maintenir des paramètres physico-chimiques de l'eau identiques entre les cuves, en particulier concernant la température (paramètre prépondérant dans la survie à court terme des gammars);

### expérimentation 3 :

L'exposition des gammars aux ultrasons, en ayant réparti au préalable les individus dans des sacs à litière en nylon (vide de maille de 0,5 mm) avant leur introduction dans les cuves en verre, ces dernières étant également caractérisées par la mise en place d'un système de recirculation de l'eau. Les sacs nylon testés correspondent aux systèmes de confinement les plus fréquemment utilisés afin d'exposer et contenir les gammars in situ.

Il est à préciser que la répartition des gammars entre les cuves et à l'intérieur des sacs à nylon s'effectue à chaque fois de manière aléatoire.

## **II.2.3. Suivi des paramètres physico-chimiques de l'eau**

Des mesures physico-chimiques de la qualité de l'eau sont réalisées à intervalles variables en fonction de la durée de chacune des séries d'expérimentations. Ces mesures sont obtenues par immersion directe de la sonde correspondant au paramètre mesuré au sein de chacune des cuves en verre -unités expérimentales- (PONSEL ODEON® Digital Handheld Multiparameter) et portent sur la température, la conductivité, la concentration en oxygène dissous et le pH.

## **II.2.4. Détermination de la durée d'exposition létale pour 50 % des individus (DL<sub>50</sub>)**

La durée d'exposition aux ultrasons entraînant la mort de 50 % (DL<sub>50</sub>) des gammars initialement introduits dans chacune des cuves soumises au traitement est déterminée pour les différentes expérimentations grâce à la macro Regtox

(v.7.0.6 ; Vindimian, 2012). Brièvement, il s'agit d'une macro développée sous Microsoft Excel couramment utilisée en toxicologie qui permet de déterminer statistiquement, après estimation des paramètres (concentration d'une substance toxique ou durée d'exposition) sur la base d'une modélisation -en l'occurrence le modèle de Hill-, la relation dose - effet (ou létalité) sur l'organisme exposé.

## **II.2.5. Evaluation de biomarqueurs potentiels d'exposition aux ultrasons**

Du fait de modifications comportementales (diminution de l'activité natatoire) observées au bout de plusieurs heures d'exposition aux ultrasons dans les séries d'expérimentations 1 et 2, la mesure de biomarqueurs enzymatiques, synonymes d'effets subléthaux non détectable par observation visuelle, n'a par conséquent été effectuée que sur les gammars de l'expérimentation 3. Il s'agissait de mesurer respectivement les activités « glutathion peroxydase » (GPx) et « glutathion S-transférase » (GST) sur des homogénats entiers de gammars. Ces activités enzymatiques sont impliquées dans la lutte contre le stress oxydant au niveau cellulaire. Le stress oxydant résulte du déséquilibre entre les systèmes anti et pro-oxydant, conduisant à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont source d'effets toxiques multiples à l'échelle de la cellule. Parmi les systèmes enzymatiques mis en place pour lutter contre la surproduction de ces espèces radicalaires, on retrouve donc la glutathion peroxydase (GPx) (Paglia and Valentine 1967) et la glutathion S-transférase (GST) (Habig and Jakoby 1981). L'intérêt de l'évaluation de l'induction (ou de l'inhibition) de la GPx réside d'une part dans le caractère aspécifique du phénomène de stress oxydant (reflet de l'état d'homéostasie cellulaire globale) et d'autre part dans le fait que cette enzyme catalyse de nombreux peroxydes, allant du peroxyde d'hydrogène aux peroxydes organiques, *i.e.* issus de l'altération globale des biomolécules à la suite d'un « stress » physique ou chimique. La GST quant à elle est une enzyme dite de « phase II », catalysant la réaction de conjugaison de xénobiotiques ou de métabolites endogènes (issus notamment de l'altération des biomolécules) à un autre composé endogène polaire, le glutathion (GSH), afin de faciliter leur excrétion (Habig et al. 1974). Aussi, le dosage de la GST comme biomarqueur potentiel d'exposition aux ultrasons apparaît complémentaire à celui de la GPx.

### **Obtention des homogénats totaux de gammare et dosage des protéines :**

Au bout de 6 h d'exposition aux ultrasons lors de la 3<sup>ème</sup> série d'expérimentation (gammare préalablement introduits dans des sacs à litière en nylon), 6 gammare sont prélevés aléatoirement dans chacun des sacs disposés dans les cuves en verre (exposées aux ultrasons et témoins). Ils sont immédiatement stockés à -80°C. Par la suite, on procède au broyage individuel des échantillons (Técher et al., 2015) suivi du dosage des protéines totales par l'intermédiaire du kit BCA<sup>TM</sup> Protein Assay (PIERCE) selon les instructions du fournisseur (lecture des absorbances à 562 nm).

### **Principe du dosage de la GPx totale :**

La technique de dosage de la GPx totale retenue dans le cadre de ce travail est basée sur celle décrite par (Paglia and Valentine 1967), adaptée au format microplaque (*cf.* Técher et al., 2015). Brièvement, la méthode repose sur le suivi de l'oxydation du NADPH couplée à l'activité peroxydasique. Le NADPH, H<sup>+</sup> réactif présente un pic d'absorbance à 340 nm mesurable par spectrophotométrie. Le substrat utilisé comme peroxyde organique est l'hydroperoxyde de cumène. L'activité GPx (exprimée en unités enzymatiques U) se traduit par la quantité de NADPH consommée par minute par mg de protéines ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$ ). Les mesures sont réalisées en duplicats pour chaque échantillon d'homogénat de gammare.

### **Principe du dosage de la GST :**

La GST est dosée d'après la méthode de (Habig and Jakoby 1981) adaptée au format microplaque par Frasco and Guilhermino (2002). Brièvement, 100  $\mu\text{L}$  d'une solution de phosphate de potassium (0,1 mM), 10  $\mu\text{L}$  d'une solution de CNDB (1 mM) et 10  $\mu\text{L}$  de glutathion (1 mM) sont ajoutés à 880  $\mu\text{L}$  d'eau distillée. 160  $\mu\text{L}$  de la solution ainsi préparée sont mélangés à 40  $\mu\text{L}$  d'homogénat de gammare (fraction S9) et incubés à 30°C durant 30 s (le surnageant cytosolique est remplacé par de l'eau dans les puits témoins). L'augmentation d'absorbance à 340 nm est mesurée durant 2 min toutes les 12 s d'intervalle. La valeur Vmax est calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 9600 mol/L/cm afin de déterminer l'activité de la GST. Les résultats sont finalement exprimés en unité enzymatique. Une unité (U) correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à la conjugaison d'1 nmol de

CDNB/mg protéines totales/min. Les mesures sont également réalisées en duplicats pour chaque échantillon d'homogénat de gammare.

## **II.2.6. Traitement statistique**

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SE (erreur standard). Les estimations des durées d'exposition aux ultrasons entraînant la mort de 50 % (DL<sub>50</sub>) des gammares sont réalisées par itérations successives grâce à la macro sous Excel de Regtox (v.7.0.6 ; Vindimian, 2012). Les comparaisons entre groupes témoins et groupes exposés aux ultrasons visant à mettre en évidence d'éventuelles différences statistiquement significatives sont réalisées par l'intermédiaire du test *t* de Student après avoir vérifié les conditions de normalité et d'homogénéité des variances grâce au logiciel Statistica v.10. Les tests statistiques ont tous été réalisés au seuil de signification  $p < 0,05$ .

## II.3. Résultats et interprétation

### II.3.1. Paramètres physico-chimiques de l'eau

L'ensemble des paramètres physico-chimiques de l'eau au début ( $T_0$ ) et à la fin ( $T_f$ ) de chacune des séries d'expérimentations est résumé dans le tableau 1.

		Expérimentations #1 : Pas de recirculation d'eau		Expérimentations #2 : Recirculation d'eau		Expérimentations #3 : Recirculation d'eau – sacs à litière en nylon	
		(-) US	(+) US	(-) US	(+) US	(-) US	(+) US
Température (°C)	$T_0$	18,85 ± 0,05	18,50 ± 0,10	14,40 ± 0,00	14,40 ± 0,08	17,90 ± 0,00	17,90 ± 0,00
	$T_f$	18,95 ± 0,25	<b>25,05 ± 0,35</b>	18,03 ± 0,05	18,10 ± 0,00	16,75 ± 0,05	16,80 ± 0,00
O <sub>2</sub> (mg/L)	$T_0$	9,63 ± 0,02	9,43 ± 0,14	10,46 ± 0,01	10,46 ± 0,01	10,12 ± 0,00	10,52 ± 0,38
	$T_f$	9,20 ± 0,02	<b>8,71 ± 0,09</b>	9,84 ± 0,05	9,82 ± 0,04	10,15 ± 0,00	10,20 ± 0,03
pH	$T_0$	8,10 ± 0,00	8,10 ± 0,00	7,40 ± 0,00	7,43 ± 0,12	7,55 ± 0,05	7,55 ± 0,05
	$T_f$	8,10 ± 0,00	8,10 ± 0,00	7,87 ± 0,05	7,80 ± 0,00	7,65 ± 0,05	7,70 ± 0,10
Conductivité (µS/cm)	$T_0$	333 ± 5	334 ± 1	192 ± 0	192 ± 0	205 ± 1	204 ± 0
	$T_f$	335 ± 3	344 ± 3	205 ± 0	205 ± 0	217 ± 1	217 ± 0

Tableau 1 : Paramètres physico-chimiques mesurés dans les cuves d'exposition des gammares ; 1<sup>ère</sup> série d'expérimentation :  $T_f$  = 4h30 min ; 2<sup>nde</sup> série d'expérimentation :  $T_f$  = 50h20 min ; 3<sup>ème</sup> série d'expérimentation :  $T_f$  = 72 h.

Au cours de la première série d'exposition aux ultrasons, le dispositif consistait en quatre cuves en verre (deux témoins et deux exposées) contenant chacune 30 gammares, sans système de recirculation d'eau. Les mesures réalisées témoignent d'une augmentation de température d'environ 6,5 °C dans les cuves exposées aux ultrasons à la fin de l'expérience, *i.e.* lorsque la totalité des gammares sont morts, alors qu'elle est demeurée constante dans les cuves témoins (tableau 1). On note également une diminution sensible de la teneur en dioxygène dissous dans les cuves exposées, pouvant être imputées à la fois à l'augmentation de température (entraînant une diminution de la solubilité du dioxygène dans l'eau) et au traitement par sonication. Les autres paramètres physico-chimiques mesurés (pH, conductivité) sont demeurés constants (tableau 1). Cette augmentation brutale de la température, observée uniquement dans les cuves soumises au traitement par ultrasons, peut

expliquer à elle seule la mortalité des gammares (Vincent, 1985). Par conséquent, afin d'écartier ce biais de confusion, un système de recirculation d'eau entre toutes les cuves (témoins et exposées aux ultrasons) a été mis en place lors des expérimentations ultérieures. De plus, des pains de glace ont été introduits dans la cuve de mélange de toutes les eaux afin de tamponner d'éventuelles augmentations de température inhérentes au traitement par ultrasons.

Les mesures effectuées au cours des expérimentations ultérieures (séries 2 et 3, tableau 1) n'ont pas permis de révéler de différence notable dans les paramètres physico-chimiques mesurés, en particulier concernant la température de l'eau entre cuves témoins (- US) et cuves exposées aux ultrasons (+ US) (tableau 1). Ces résultats ont confirmé l'efficacité du système de recirculation d'eau installé lors de ces expérimentations pour l'homogénéisation du fluide et l'obtention de paramètres identiques entre cuves témoins et traitées à la fin des expériences. Par ailleurs, il est à noter que les températures sont demeurées dans le préférendum thermique tout au long des expositions (observations personnelles) pour cette espèce d'amphipode, avec des températures proches de 17 °C au bout de 3 jours de traitement aux ultrasons (expérimentation 3).

### **II.3.2. Durées létales d'exposition aux ultrasons**

#### **Première série d'expérimentation**

En l'absence de recirculation d'eau entre les cuves en verre et de contrôle de la température, la durée létale d'exposition aux ultrasons entraînant la mort de 50 % des gammares ( $DL_{50}$ ) s'établit à 161 min, soit environ 2 h 40 min d'exposition (figure 2).

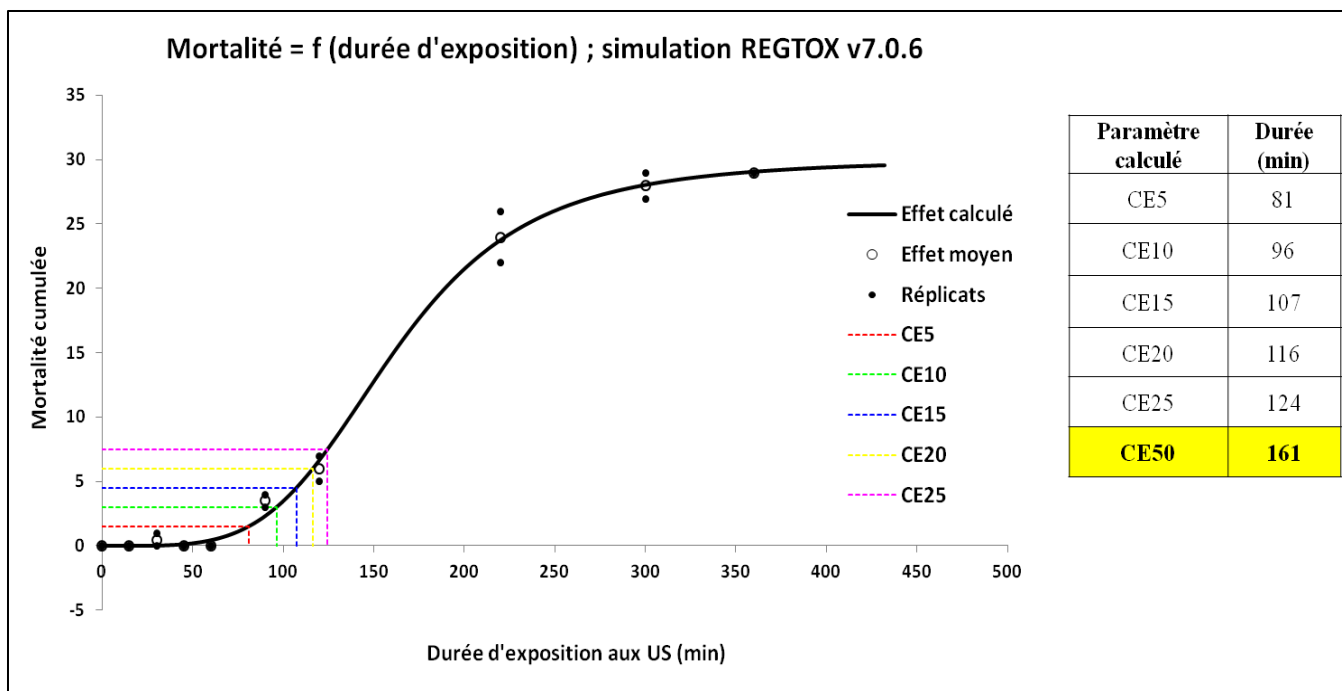


Figure 2 : Détermination de la DL<sub>50</sub> pour des gammarus (n = 60) directement exposés aux ultrasons, sans recirculation d'eau.

A ce stade des expérimentations, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées concernant les causes de mortalité des gammarus. En effet, on peut supposer que cette dernière résulte :

- de l'élévation rapide de la température,
- du traitement aux ultrasons,
- de l'interaction entre l'élévation de la température et l'exposition aux ultrasons.

### Seconde série d'expérimentation

Afin de discriminer l'effet des ultrasons de celui de l'élévation de température, une seconde série d'expérimentation a été conduite, incluant une limitation de l'élévation de la température par l'emploi de pains de glace et l'installation d'un système de recirculation de l'eau (par l'intermédiaire de pompes) entre les différentes cuves d'exposition (et témoins). L'estimation de la DL<sub>50</sub> correspondante est illustrée à la figure 3.

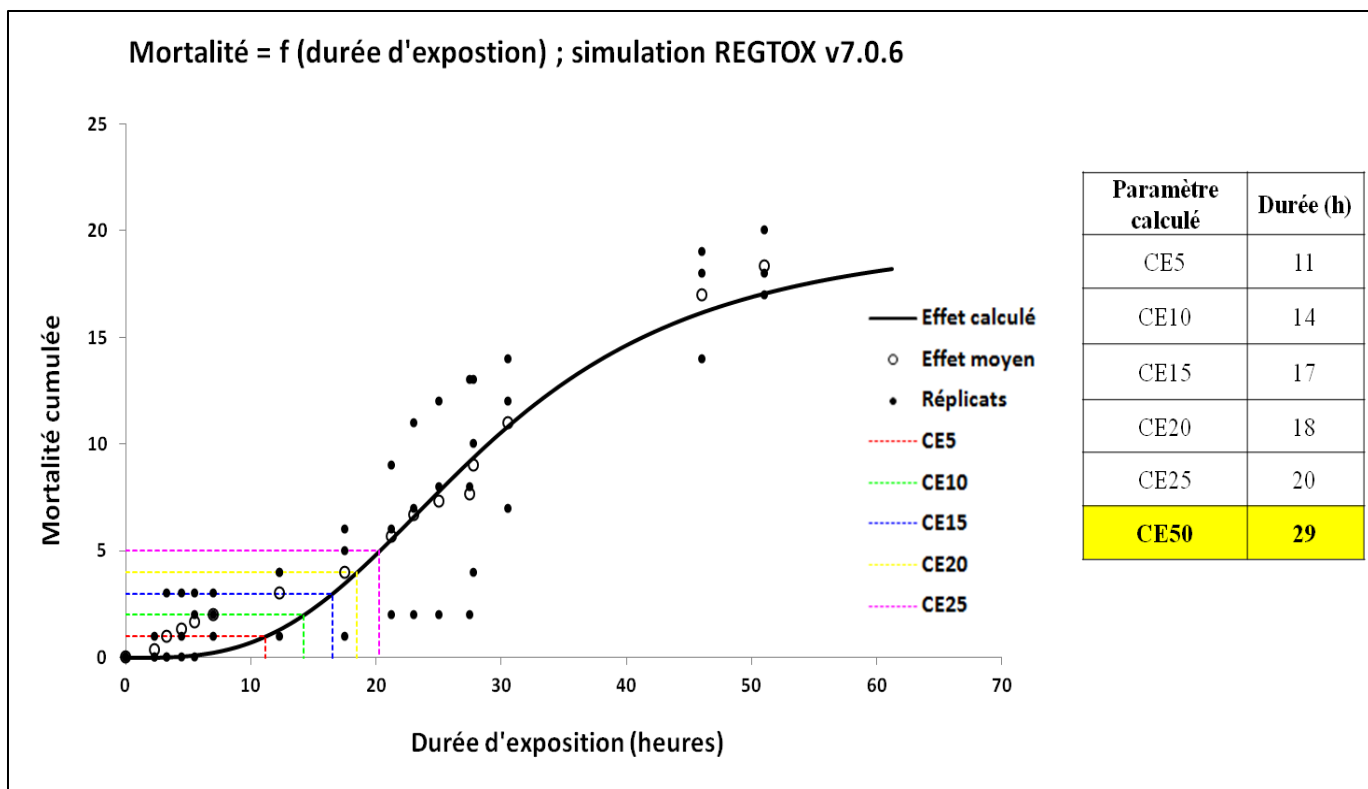


Figure 3 : Détermination de la DL<sub>50</sub> pour des gammars (n = 60) directement exposés aux ultrasons, avec recirculation d'eau entre les unités expérimentales.

Par l'intermédiaire d'une recirculation de l'eau et en l'absence d'une augmentation de température conduisant à des valeurs supérieures à 20°C, on remarque que la DL<sub>50</sub> suite à l'exposition permanente et conjointe aux émetteurs à ultrasons de 23 et 46 KHz s'élève à 29 h, soit environ 1 jour et 5 h d'exposition. Cette valeur, largement supérieure à celle reportée lors de la première expérimentation, suggère une faible toxicité à court terme de l'exposition à ce système d'émetteurs à ultrasons dans ces conditions de fonctionnement (puissances maximales d'entrée et de sortie fixées à 15 W).

### Troisième série d'expérimentation

Au cours de cette dernière phase d'essais en laboratoire, les gammars ont été préalablement introduits dans des sacs à litières en nylon (figure 4) qui correspondent aux systèmes de confinement des gammars les plus fréquemment utilisés lors d'expérimentations *in situ*. Comme illustré à la figure 4, l'effet des ultrasons a été clairement remarqué concernant l'inhibition de la formation de biofilm sur les sacs à litière exposés (figure 4). Cette inhibition de croissance du biofilm était toujours notable au bout de trois semaines d'exposition (observations personnelles).



Figure 4 : Inhibition de la formation de biofilm sur les sacs à litière exposés aux ultrasons (deux premiers sacs en partant de la gauche) en comparaison aux sacs témoins non exposés (deux derniers sacs).

En revanche, aucune mortalité n'a été observée chez les gammares exposés. De plus, l'observation de la mortalité des gammares pouvant être imputée à une exposition éventuelle aux ultrasons n'a pu se poursuivre après sept jours d'expérimentation du fait de phénomène (naturel) de cannibalisme pouvant se produire au-delà d'une telle durée de privation de nourriture chez ces amphipodes. Il apparaît par conséquent que les sacs en nylon ont eu un effet « protecteur » vis-à-vis des ultrasons, en comparaison aux expérimentations précédentes où la  $DL_{50}$  s'élevait à 29 h. Une hypothèse vraisemblable résiderait en la diminution des phénomènes de résonance des ultrasons (du fait des parois en verre des cuves) par-delà le maillage en nylon des sacs à litière (Tudela et al, 2014). Des mesures d'intensité et de fréquence des ultrasons émis ont été réalisées par la suite (figurant en annexe) qui indiqueraient en effet l'émission d'ultrasons à travers les sacs mais d'intensité en moyenne dix à vingt fois moins importante selon l'angle de disposition du microphone récepteur.

Afin de caractériser des effets subléthaux potentiels en dépit de l'effet vraisemblablement « protecteur » des sacs en nylon employés, les activités enzymatiques GPx et GST totales ont été évaluées et comparées entre gammares témoins et exposés aux ultrasons après trois jours de traitement. Les résultats sont illustrés à la figure 5.

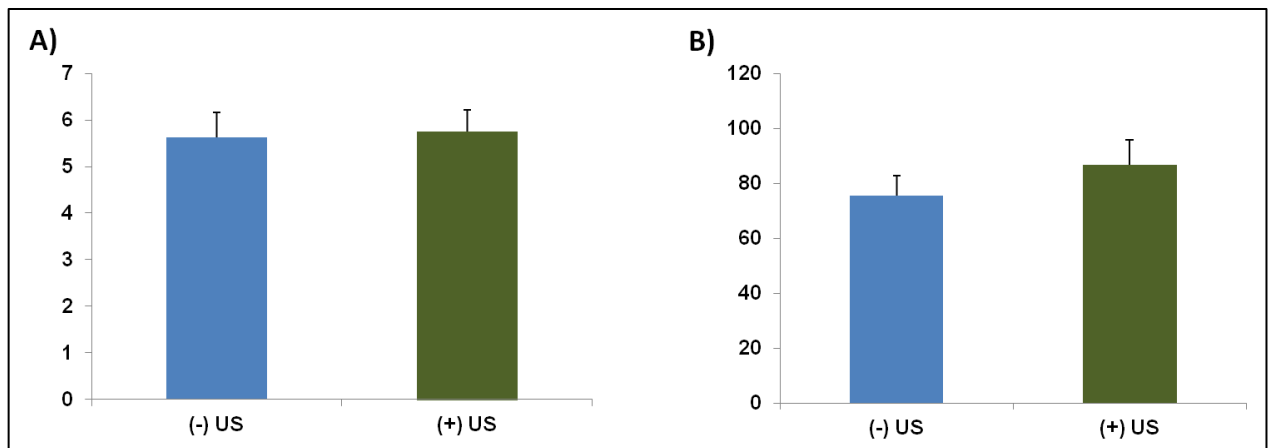


Figure 5 : Evaluation de l'activité GPx totale (A) et GST chez des gammarés préalablement introduits dans des sacs à litière, non-exposés (- US) et exposés aux ultrasons, avec recirculation d'eau (n = 12 pour chaque modalité).

Comme indiqué à la figure 5, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre individus témoins et exposés, confirmant une absence de toxicité des ultrasons dans ces conditions d'exposition.

## II.4. Conclusion (partie 2)

L'évaluation en laboratoire de l'incidence de l'exposition aux ultrasons (émetteurs de 23 et 46 KHz, puissances d'entrée et de sortie fixées à 15 W maximum) a témoigné d'une DL<sub>50</sub> de 2 h 40 min d'exposition en condition d'exposition directe des amphipodes, sans recirculation ni refroidissement de l'eau d'exposition. Cette durée est ramenée à 29 h lorsque l'augmentation de température de l'eau est maîtrisée, *i.e.* ne dépassant pas 20 °C de température finale de l'eau pour une température de début d'expérimentation à 14,4 °C, soulignant l'impact probable de l'augmentation de température dans les conditions expérimentales précédentes. Lorsque les phénomènes de résonance des ultrasons sont atténués par l'utilisation d'un sac à litière en nylon (mailles de 0,5 mm) emprisonnant les gammares, aucune mortalité n'est observée même au bout de 7 jours d'exposition. De même, l'évaluation de biomarqueurs enzymatiques couramment employés en toxicologie environnementale (activités GPx et GST) n'indique aucune différence entre groupes témoins et exposés, confirmant l'absence de toxicité aigüe des systèmes utilisés dans nos conditions d'exposition de laboratoire. Bien que ce projet de recherche ne visait pas à évaluer l'efficacité des ultrasons à limiter la prolifération végétale, il nous a visuellement été possible d'observer une relative efficacité du traitement par ultrasons concernant le ralentissement de la formation de biofilm sur les sacs à litière (ce constat n'a été que visuel et n'a pas fait l'objet de vérification et confirmation, ni d'aucune validation statistique). Ce dernier aspect, s'il se confirme dans des expérimentations ultérieures, pourrait offrir de nouvelles perspectives de développement quant aux applications potentielles du procédé.

## II.5. Références :

- Frasco MF, Guilhermino L. 2002. Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. *Fish Physiology and Biochemistry* 26(2):149-156.
- Habig WH, Jakoby WB. 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* 1981;77:398-405.
- Paglia DE, Valentine WN. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967 Jul;70(1):158-69.
- Techer D, Milla S, Fontaine P, Viot S, Thomas M. 2015. Acute toxicity and sublethal effects of gallic and pelargonic acids on the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Pollut Res* 22:5020–5029.
- Tudela I, Sáez V, Esclapez MD, Díez-García MI, Bonete P, González-García J (2014) Simulation of the spatial distribution of the acoustic pressure in sonochemical reactors with numerical methods: A review *Ultrasonics Sonochemistry* 21:909-919.
- Vincent M., 1985. Étude comparée des températures létales supérieures et du préférendum thermique chez deux espèces d'amphipodes épigés du Centre-Ouest. *Ann. Sci. Limousin*, 1, 43-47.
- Vindimian E (2012) MS Excel macro Regtox.7.0.6 freely available from Eric Vindimian. IRSTEA, France (2012). [http://www.normalesup.org/vindimian/fr/\\_index.html](http://www.normalesup.org/vindimian/fr/_index.html) (accessed in February 2016)

# Conclusion générale

Au cours de l'étude menée sur les carpes, les mesures de signaux acoustiques liés aux ultrasons ont suggéré une diminution rapide de la puissance acoustique dans des environnements ouverts comme les étangs. **Les résultats n'ont permis de révéler aucun effet délétère du système d'émission employé concernant l'état de santé des carpes exposées** simultanément aux fréquences de 23 et 46 KHZ in situ sur une durée de 30 jours. La détermination de l'indice de condition des poissons au fil du temps de séjour en étang a témoigné d'une croissance constante des individus quelle que soit la modalité expérimentale considérée. Les niveaux de cortisol circulant (indicateur de stress global des poissons) étaient influencés par la durée de séjour des poissons en étang et par la distance entre les cages flottantes, ce qui pourrait être attribué aux conditions « d'élevage » et d'échantillonnage *stricto sensu* mais pas aux traitements par les ultrasons. L'évaluation d'un panel de biomarqueurs enzymatiques (enzymes du système antioxydant et activité lactate déshydrogénase) a témoigné d'une diminution globale des activités enzymatiques, avec des variations sensibles selon les enzymes dépendant également de l'étang considéré, suggérant une adaptation des poissons aux différents étangs au fil du temps, indépendamment de la mise en place d'un système à ultrasons.

**L'évaluation en laboratoire (en bacs de 8 litres) de l'incidence de l'exposition des gammares aux ultrasons** (émetteurs de 23 et 46 KHZ, puissances d'entrée et de sortie fixées à 15 W maximum) **a témoigné d'une DL<sub>50</sub> de 2 h 40 min d'exposition en condition d'exposition directe des amphipodes, sans recirculation ni refroidissement de l'eau d'exposition. Cette durée est ramenée à 29 h lorsque l'augmentation de température de l'eau est maîtrisée**, *i.e.* ne dépassant pas 20 °C de température finale de l'eau pour une température de début d'expérimentation à 14,4 °C, soulignant l'impact probable de l'augmentation de température dans les conditions expérimentales précédentes. Lorsque les phénomènes de résonance des ultrasons sont atténués par l'utilisation d'un sac à litière en nylon (mailles de 0,5 mm) emprisonnant les gammares, aucune mortalité n'est observée même au bout de 7 jours d'exposition. De même, l'évaluation de biomarqueurs enzymatiques couramment employés en toxicologie environnementale

(activités GPx et GST) n'indique aucune différence entre groupes témoins et exposés, confirmant l'absence de toxicité aiguë des systèmes utilisés dans nos conditions d'exposition de laboratoire.

Par conséquent, nous pouvons considérer que l'expérimentation menée *in situ* sur les gammares (sur les mêmes sites et durant l'exposition des carpes), n'apportent pas d'information valide. En effet, bien que les gammares aient été exposés au sein de sacs classiques généralement utilisés pour confiner les crustacés sur le terrain, nos expérimentations complémentaires en laboratoire indiquent que ce système réduit considérablement (approximativement de 80%) la puissance des ultrasons. Par conséquent, il nous est impossible d'affirmer que l'absence d'effet des ultrasons sur les gammares exposés à 50 cm de la source ne résultait pas d'une protection induite par les sacs. Pour cette raison, les valeurs de survie, d'indice de condition et de valeurs de biomarqueurs, observées *in situ* sur les gammares, ne sont pas retranscrites dans le présent rapport.

**Le travail présent à fait l'objet de la soumission d'un article intitulé « Sublethal effect assessment of a low-power and dual-frequency anti-cyanobacterial ultrasound device on the common carp (*Cyprinus carpio*): a field study » dans la revue Environmental Science and Pollution Research en mai 2016 et est en cours d'évaluation à la date de rédaction de ce rapport.**

# Perspectives

## Effets sur les poissons

Cette expérimentation a montré que les appareils préconisés par la société SOGEEAU n'ont pas d'effets délétères sur la carpe en situation réelles d'exposition. Cependant, il est envisageable que si cet équipement s'avère efficace contre la prolifération de cyanobactéries, son usage en mode curatif (alors que les cyanobactéries sont déjà développées), conduise à la lyse des cellules et à la libération de cyanotoxines dans le plan d'eau. **Il serait alors nécessaire de vérifier si l'effet cumulé des ultrasons et de la libération de cyanotoxines dans l'eau ne se traduit pas par des effets délétères sur le poisson.**

## Effets sur les gammares

Ce projet de recherche prévoyait, en plus des expérimentations sur les carpes, de tester *in situ* l'effet du traitement ultrasons sur des gammares encagés dans des sacs de toiles nylon de vide de maille 0,5mm. Ce type de sac est le système d'exposition classiquement utilisé pour l'exposition des gammares sur le terrain.

Cette expérimentation a été menée à bien en exposant les gammares à diverses distances. Même au sein des sacs localisés à 50 cm des émetteurs, aucune mortalité ou perturbation n'a été constaté parmi les biomarqueurs testés. Cependant, les résultats détaillés de cette expérimentation ne sont pas présentés dans ce rapport car ils pourraient être utilisés à torts : en effet les expériences complémentaires menées en laboratoires ont mis en évidence que ce type de sac conduit à atténuer d'approximativement 80% la puissance des ultrasons.

Par conséquent, au sein de ce rapport nous ne relatons que les résultats menés sur gammares en laboratoire. Il a ainsi été montré que dans des aquariums de petites tailles (8 litres), le décès des animaux était observé en moyenne après 2h40 d'exposition mais que cette mortalité s'explique majoritairement par

l'augmentation de la température de l'eau. Lorsque l'effet joule est annulé, la DL<sub>50</sub> passe à 29h.

**En complément à ces travaux et afin de vérifier *in situ* l'innocuité des ultrasons sur les gammares, il apparaît nécessaire d'exposer en plan d'eau des animaux au sein de système d'encagement laissant passer les ultrasons.** Nos expérimentations ont été prolongées afin de trouver un tel système de contention et il apparaît que des sachets en polyéthylène répondent à cette attente.

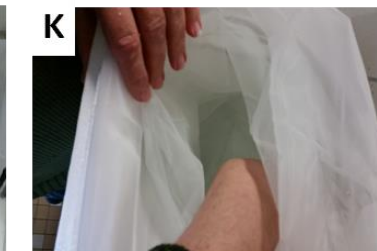
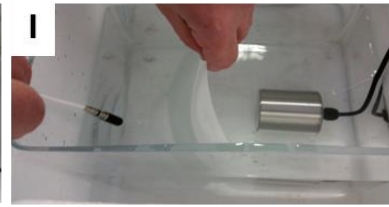
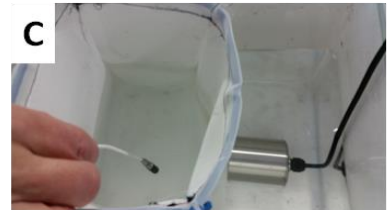
### **Effets sur les végétaux**

Bien que ce projet de recherche ne visait pas à évaluer l'efficacité des ultrasons à limiter la prolifération végétale, il nous a visuellement été possible d'observer une relative efficacité du traitement par ultrasons concernant le ralentissement de la formation de biofilm sur les sacs à litière (ce constat n'a été que visuel et n'a pas fait l'objet de vérification et confirmation, ni d'aucune validation statistique). Ce dernier aspect, s'il se confirme dans des expérimentations ultérieures, pourrait offrir de nouvelles perspectives de développement quant aux applications potentielles du procédé. **Afin de valider l'applicabilité des appareillages conçus par la société SOGEEAU et leur intérêt pour les gestionnaires de plans d'eau (ex. pisciculteurs, exploitants de bases nautiques, etc.), il apparaît nécessaire de vérifier l'efficacité de ces systèmes sur des populations de cyanobactéries et/ou sur des biofilms (c.-à-d. fooling).**

**ANNEXE : synthèse des mesures d'intensité des ultrasons effectuées le 13/01/2016**

**8 L d'eau distillée, température initiale de 14,3 °C, conductivité de 16,6  $\mu\text{S}/\text{cm}$**

Récipients utilisés : respectivement bocal 1 L blanc (polyéthylène), bécher 1 L en verre, bocal 100 mL bouchon vert (polyéthylène) et bocal 25 mL bouchon rouge (polyéthylène)



Transducteur US	Mesures effectuées	Situation au moment de la prise de mesure	Tensions mesurées (mV)
46 KHz	dans l'eau (transducteur uniquement)	- micro horizontal, en face à env. 8 cm	+ 475 / - 515
		- au fond de la cuve, à droite du transducteur	+ 314 / - 460
		- sur le côté droit du transducteur, micro horizontal (cf. photo A)	+ 370 / - 333
		- au-dessus du transducteur à env. 1 cm, micro vertical (cf. photo B)	+ 442 / - 206
		- micro vertical, en face à env. 8 cm	+ 380 / - 330
	derrière le filet blanc (cf. photo C)	- micro horizontal, en face à env. 8 cm	+ 23 / - 26
		- au fond de la cuve, à droite du transducteur	+ 11 / - 13
		- sur le côté droit du transducteur, micro horizontal, filet toujours présent	+ 29 / - 49
		- au-dessus du transducteur à env. 1 cm, micro vertical	+ 262 / - 375
		- micro vertical, en face à env. 8 cm, dans le filet (cf. photo C)	+ 39 / - 47
	dans le bocal 1 L blanc (polyéthylène?)	- micro horizontal, en face à env. 8 cm (cf. photo D) - au fond de la cuve, à droite du transducteur, bocal toujours présent (cf. photo E)	+ 441 / - 418 + 52 / - 50
	dans béccher 1 L en verre	- micro horizontal, en face à env. 8 cm (cf. photo F) - micro vertical, en face à env. 8 cm	+ 325 / - 382 + 355 / - 182
	dans bocal 25 mL bouchon rouge (polyéthylène?)	micro vertical, en face à env. 8 cm, (cf. photo G, G')	+ 408 / - 283
dans bocal 100 mL bouchon vert (polyéthylène?)	micro vertical, en face à env. 8 cm, (cf. photo H, H')	+ 495 / - 453	
derrière portion de filet blanc 1 mm	micro vertical, en face à env. 8 cm, (cf. photo I)	+ 80 / - 50	
filet sac tel qu'utilisé pour expé	micro horizontal, en face à env. 8 cm (cf. photo J)	+ 67 / - 105	
Filet 0,2 mm	micro horizontal, en face à env. 8 cm (cf. photo K)	+ 48 / - 50	
Filet 0,05 mm	micro horizontal, en face à env. 8 cm	+ 55 / - 183	
filet sac en augmentant la PE et PS max à 25 W au lieu de 15 W	micro vertical, en face à env. 8 cm	+ 170 / - 250	
sans filet et en augmentant la PE et PS max à 25 W au lieu de 15 W	micro vertical, en face à env. 8 cm	+ 411 / - 405	
23 KHz	transducteur dans l'eau	- micro horizontal, en face à env. 8 cm	+ 11 / - 15
		- micro vertical, en face à env. 8 cm	+ 22 / - 20
		- au fond de la cuve, à droite du transducteur	+ 7 / - 14
		- sur le côté droit du transducteur, micro horizontal	+ 27 / - 39
		- au-dessus du transducteur à env. 1 cm, micro vertical	+ 28 / - 45
derrière le filet blanc	- micro vertical, en face à env. 8 cm	+ 6 / - 11	
	- sur le côté droit du transducteur, à l'extérieur du filet blanc	+ 3,5 / - 8	
	dans le bocal 1 L blanc (polyéthylène?)	micro vertical, en face à env. 8 cm	+ 20 / - 32
	dans bocal 100 mL bouchon vert (polyéthylène?)	micro vertical, en face à env. 8 cm	+ 19 / - 26
grillage vert posé dans un sac plastique (cf. photo L)	micro vertical, en face à env. 8 cm	+ 51 / - 37	
46 KHz	grand bac blanc	- micro vertical, en face à env. 8 cm	+ 156 / - 197
		- micro vertical, en face à env. 40 cm	+ 210 / - 143
		- micro horizontal, en face à env. 8 cm (cf. photo M)	+ 460 / - 360
		- micro horizontal, en face à env. 40 cm	+ 425 / - 95
		- micro horizontal, en face à env. 40 cm, couche de feuilles flottantes et au fond (cf. photo N)	+ 12 / - 12
		- micro au fond du bac, plusieurs couches de feuilles dans l'eau	+ 2 / - 5
		- micro vertical, feuilles l'entourant dans petit bocal vert	+ 20 / - 35
		- puis feuilles enlevées	+ 284 / - 78
- avec uniquement une feuille placée devant le micro	+ 277 / - 51		

