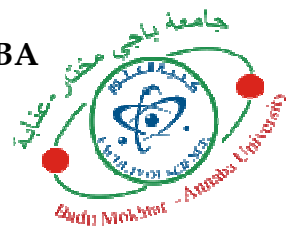


RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار - عنابة



UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE



Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de **Doctorat en Sciences**

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulée :

**Caractérisation Polyphasique des Cyanobactéries
Peuplant le Réservoir Cheffia, Nord-Est de l'Algérie**

Présentée par :

M^{elle} Lamia BENREDJEM

Directrice de thèse : Mme BERREDJEM Hajira Professeur, Université d'Annaba

Co-directrice de thèse : Mme ABDI Akila Professeur, Université d'Annaba

DEVANT LE JURY :

Président : Mr. BRANES Zidane Professeur, Université d'Annaba

Examineur : Mr. BENOUARETH Djamel Eddine Professeur, Université de Guelma

Examinatrice : Mme BOUALLEG Chahinez Professeur, Université de Souk Ahras

Examinatrice : Mme BOUZAHOUANE Hana MCA, Université de Souk Ahras

Année universitaire 2021/2022

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

REMERCIEMENTS

اللهم لك الحمد و الشكر كما ينبغي لجلال وجهك و عظيم سلطانك

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude.

*Je souhaite adresser mes vifs remerciements à mes deux directrices de thèse Madame **BERREDJEM Hajira** et Madame **ABDI Akila**, Professeurs au département de Biochimie, Université Badji Mokhtar-Annaba, auprès de qui j'ai toujours trouvé le soutien amical et les conseils avisés qui m'ont permis de mener à terme ce travail.*

Merci à vous deux pour m'avoir fait l'honneur de me confier et de diriger cette thèse, pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, pour votre disponibilité, vos conseils, votre relecture attentive et votre aide qui ont permis son aboutissement.

Vos compétences professionnelles incontestables ainsi que vos qualités humaines vous valent l'admiration et le respect de tous. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma haute considération, de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect. Sincères remerciements.

Je tiens à remercier particulièrement mon Jury de thèse, pour avoir accepté de juger mon travail :

*Je remercie Monsieur le Professeur **BRANES Zidane** qui me fait l'honneur de présider ce Jury. Veuillez trouver l'expression de ma haute considération.*

Je remercie Monsieur le Professeur BENOUARETH Djamel Eddine, Madame le Professeur BOUALLÉG Chahinez et Madame le Docteur BOUZAHOUANE Hana d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Veillez trouver l'expression de ma haute considération.

Je remercie le Professeur Antonio QUESADA du Département de Biologie de l'Université Autonome de Madrid, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir donné l'opportunité de découvrir le monde de la biologie moléculaire et pour les conseils qu'il m'a prodigués et les discussions constructives. Je remercie Maria Cristina CASERO de m'avoir accompagnée pendant toute la période de stage.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Professeur Graziano PESOLÉ Directeur de l'Institut de biomembranes, bioénergétique et Biotechnologies moléculaires (IBIOM) à Bari (Italie) de m'avoir accueilli au niveau du laboratoire de Bioinformatique au Département de Biosciences, Biotechnologies et Biopharmacie, Université Aldo Moro Bari. Je remercie Dr. Bruno FOSSO et Dr. Marinella MARZANO pour les analyses bioinformatiques de mes séquences. Je remercie les membres du laboratoire, pour la bonne ambiance qui règne dans l'unité, je les remercie pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble à Bari en dehors du travail. Merci pour le café et tous les plats dégustés.

Un immense remerciement au Professeur Vitor VASCONCELOS, Directeur du laboratoire Biotechnologie Bleue et Ecotoxicologie (BBE) et du Centre Interdisciplinaire de Recherche Marine et Environnementale (CIIMAR) de l'Université Porto (Portugal) pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Merci aux membres du laboratoire pour m'avoir aidé à isoler et à caractériser mes souches, Merci à Joana AZEVEDO pour m'avoir aidé dans les identifications des toxines de mes échantillons.

Ce travail a été mené à bien grâce à des stages et une bourse d'étude dans le cadre du Programme National Exceptionnel (PNE), je remercie le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

Mes remerciements s'adressent également au personnel du réservoir Cheffia pour la facilité de l'accès au site d'échantillonnage et leur accompagnement pendant les prélèvements.

Je remercie mes enseignants et mes collègues du Département de Biochimie à l'Université BADJI Mokhtar – Annaba et mes collègues à l'Université Abbes LAGHROUR– Khenchela.

Un grand merci revient à ma famille pour m'avoir supporté, soutenu, aidé et encouragé durant toutes ces années d'études. Recevez cette thèse en guise de remerciements et témoignage de mon amour.

Merci à toi qui me donne le sourire chaque jour, Mama.

DE LAMIA BENREDJEM

Dédicaces

À la mémoire de mon père.

TABLE DES MATIÈRES

	page
Résumés	
Abréviations et acronymes	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des photos	
Introduction	1
Chapitre 1. Synthèse bibliographique	4
1. Taxonomie et diversité des cyanobactéries	4
1.1. Position taxonomique	4
1.2. Caractéristiques générales	6
1.2.1. Diversité morphologique	6
1.2.2. Cytologie	7
1.2.3. Pigments photosynthétiques	8
1.2.4. Molécules de réserves	9
1.2.5. Multiplication	9
1.3. Ecologie des cyanobactéries	10
1.3.1. Milieux de vie	10
1.3.2. Rôle écologique	10
2. Prolifération massive des cyanobactéries	11
2.1. Définition	11
2.2. Cyanobactéries impliquées dans les proliférations	12
2.3. Conséquences des proliférations des cyanobactéries (AFSSA, 2006)	12
3. Déterminisme du développement des cyanobactéries	14
3.1. Lumière et flottabilité	14
3.2. Température	14
3.3. Le pH / teneur en CO ₂	15
3.4. Nutriments	15
3.5. Interaction avec le compartiment biotique	16
3.5.1. Le broutage	16

3.5.2. L'allélopathie	16
4. Les toxines des cyanobactéries ou cyanotoxines	17
4.1. Les hépatotoxines	18
4.1.1. Les microcystines et les nodularines	18
4.1.2. La cylindrospermopsine	21
4.2. Les neurotoxines	24
4.2.1. Les anatoxines	24
4.2.2. Les saxitoxines (STXs)	25
4.2.3. La bêta-N-méthylamino-L-alanine (BMAA)	27
4.3. Les dermatotoxines	28
4.3.1. Les alcaloïdes	28
4.3.2. Les lipopolysaccharides	29
4.4. Distribution des cyanotoxines et intoxications cyanobactériennes dans le monde	29
Chapitre 2. Matériel et méthodes	30
1. Présentation du site d'étude	30
2. Echantillonnage	31
3. Etude des échantillons d'eau et identification des cyanobactéries par des techniques culture-indépendantes	33
3.1. Mesure des paramètres physico-chimiques de l'eau	33
3.2. Identification morphologique des cyanobactéries	35
3.3. Etude moléculaire	35
3.3.1. Extraction d'ADN à partir des filtres	35
3.3.2. Amplification du gène de l'ARNr 16S	36
3.3.3. Séquençage du gène de l'ARNr 16S	37
3.3.4. Traitement bioinformatique et analyse statistique	38
3.3.5. Recherches des gènes reliés à la synthèse de métabolites secondaires toxiques	40
3.3.6. Extraction et identification des toxines	42
3.3.6.1. Extraction	42
3.3.6.2. Identification	43

4. Etudes des cyanobactéries isolées	45
4.1. Isolement des cyanobactéries	45
4.2. Caractérisation morphologique	46
4.3. Extraction d'ADN	46
4.4. Amplifications du gène de l'ARNr 16S et séquençage	46
4.5. Traitement des séquences du gène de l'ARNr16S	49
4.6. Recherches de gènes reliés à la synthèse des toxines	50
Chapitre 3. Résultats	52
1. Etude des échantillons naturels	52
1.1. Paramètres physico-chimiques et qualité de l'eau	52
1.2. Observation microscopique	52
1.2.1. Genres et espèces identifiés	52
1.2.2. Distribution des cyanobactéries	58
1.3. Concentrations et puretés des ADN extraits	59
1.4. Traitement des séquences de l'ARNr 16S	60
1.4.1. Analyse statistique de qualité	60
1.4.2. Classification taxonomique	64
1.4.3. Abondance relative	65
1.5. Localisation des gènes reliés à la synthèse des toxines	66
1.6. Identification des microcystines par HPLC-PDA et LC-ESI-MS/MS	67
2. Isolement, identification morphologique, étude moléculaire et phylogénie	71
2.1. Isolement des cyanobactéries et identification morphologique	71
2.2. Analyse Blast	81
2.3. Phylogénie	84
2.4. Génotypes toxiques	85
Chapitre 4. Discussion	89
Conclusion et perspectives	94
Références bibliographiques	96
Annexes	
Production scientifique	

Résumé

Le réchauffement climatique et l'eutrophisation sont les principaux paramètres associés au développement des blooms de cyanobactéries, à leur dynamique et à l'apparition de nouveaux taxons particulièrement toxiques. Ainsi, des populations de cyanobactéries d'un réservoir d'eau douce du Nord-Est de l'Algérie d'intérêt socio-économique, le réservoir Cheffia, ont été étudiées. Les échantillons ont été analysés en utilisant une approche polyphasique. L'identification des cyanobactéries a été réalisée sur la base de l'analyse morphologique, moléculaire culture-indépendante en utilisant le séquençage de nouvelle génération (NGS), de méthodes culture-dépendantes et de la localisation de gènes reliés à la synthèse des toxines. Les paramètres physico-chimiques des eaux ont été également étudiés ainsi que l'identification des toxines.

Les résultats obtenus ont montré que les eaux du réservoir Cheffia ont été classées dans la catégorie hypereutrophe. La communauté des cyanobactéries dans cet écosystème consistait en cinq ordres : Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales, Synechococcales et Chroococcidiopsidales subdivisés en 28 genres avec la dominance de *Microcystis* (34.2%), *Aphanizomenon* (20.1%) et *Planktothrix* (20.0%). D'autre part, l'analyse morphologique a révélé l'association dans ce plan d'eau de cinq espèces du genre *Microcystis*: *M. aeruginosa*, *M. novacekii*, *M. panniformis*, *M. ichthyoblabe* et *M. flos-aquae*. La présence des génotypes *mcyE* a été détectée dans la population identifiée et les analyses biochimiques des microcystines (MCs) par HPLC-PDA et LC-ESI-MS/MS ont permis l'identification de la microcystine-LR (MC-LR). Les études cultures-dépendantes ont permis l'identification d'un nouveau groupe dans cet écosystème, les picocyanobactéries, avec un génotype toxique.

Nous suggérons que l'eutrophisation est une cause possible de la diversité et la complexité de la population des cyanobactéries dans cet écosystème. D'autre part, l'effet de la température ne peut pas être exclu mais devrait être confirmé par un échantillonnage plus large au cours de différentes saisons et par des analyses de laboratoire. Ainsi, l'eutrophisation dans cet écosystème devrait être surveillée pour prévenir le développement de blooms toxiques.

Mots clés: Cyanobactéries - Eaux hypereutrophes - Phylogénie - Réservoir Cheffia - Séquençage de Nouvelle Génération - Toxines.

Title: Polyphasic characterization of cyanobacteria populating Cheffia reservoir, North-East of Algeria

Abstract

Global warming and eutrophication are the main factors associated with the development of cyanobacterial blooms, the cyanobacteria dynamics and the emergence of new taxa particularly toxic. Thus, populations of cyanobacteria from a freshwater reservoir in North-Eastern of Algeria with socio-economic interest, Cheffia reservoir, were studied. The samples were analyzed using a polyphasic approach. Thereby, cyanobacteria were identified on the basis of morphological analysis, culture-independent molecular methods using the next generation sequencing (NGS), culture-dependant methods and the localization of toxins-related genes; the physico-chemical parameters of waters were also studied as well as the identification of toxins.

The obtained results showed that Cheffia reservoir water's were classified in the hypereutrophic level. The cyanobacterial community in this ecosystem comprised five orders: Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales, Synechococcales and Chroococcidiopsidales subdivided into 28 genera with the dominance of *Microcystis* (34.2%), *Aphanizomenon* (20.1%) and *Planktothrix* (20.0%). On the other hand, morphological analysis revealed the association in this water body of five species of the genus *Microcystis*: *M. aeruginosa*, *M. novacekii*, *M. panniformis*, *M. ichthyoblabe* and *M. flos-aquae*. The presence of *mcyE* genotypes was detected in the identified population and biochemical analyzes of microcystins (MCs) by HPLC-PDA and LC-ESI-MS/MS allowed the identification of the microcystin-LR (MC-LR). Moreover, culture-dependant methods allowed the identification of a new cyanobacteria group in this ecosystem, picocyanobacteria, with a toxic genotype.

We suggest that eutrophication is a possible cause of the diversity and the complexity of the cyanobacterial population in this ecosystem. On the other hand, the effect of temperature can not be excluded but needs to be confirmed by large sampling during the different seasons and by laboratory analysis. Thus, eutrophication in this ecosystem must be monitored to prevent the development of toxic blooms.

Key Words: Cheffia reservoir - Cyanobacteria - Hypereutrophic water – Next Generation Sequencing – Phylogeny - Toxins.

العنوان : وصف متعدد الأطوار للبكتيريا الزرقاء التي تعيش في سد الشافية، شمال شرق الجزائر

ملخص

يعد التغير المناخي والتخثت العاملان الرئيسيان المرتبطتان بتطوير إزهار البكتيريا الزرقاء، ديناميكية البكتيريا الزرقاء وظهور أنواع جديدة خاصة سامة. ولهذه الأسباب، تمت دراسة مجتمعات البكتيريا الزرقاء على مستوى سد المياه العذبة شمال شرق الجزائر ذي الأهمية الاجتماعية والإقتصادية، سد الشافية. وبالتالي تم تحليل العينات باستخدام نهج متعدد المراحل ؛ بدءا بتحديد البكتيريا الزرقاء على أساس التحليل المورفولوجي، الأساليب الجزيئية المستقلة عن العزل و النمو في المخبر باستخدام تسلسل الجيل الجديد (NGS)، الأساليب الجزيئية بعد العزل و النمو و توطين الجينات المرتبطة بتركيب السموم. كما تمت دراسة الخصائص الفيزيائية والكيميائية للمياه وكذلك تحديد نوعية السموم.

خلال هذه الدراسة تم الحصول على نتائج بينت أن مياه السد تنتمي الى فئة فرط التخثت. مجتمع البكتيريا الزرقاء في هذا النظام البيئي تكون من خمسة رتب تنقسم إلى ثمانية و عشرون جنسا مع هيمنة *Microcystis* (34.2%)، *Aphanizomenon* (20.1%) و *Planktothrix* (20.0%). من ناحية أخرى كشف التحليل المورفولوجي عن الارتباط في هذا الجسم المائي لخمسة أنواع من جنس *Microcystis*: *M. aeruginosa*، *M. novacekii*، *M. panniformis*، *M. flos-aquae* و *ichthyoblabe*. تم الكشف عن وجود الأنماط الجينية *mcyE* في المجتمع المدروس و سمحت تحليلات الكيمياء الحيوية ل microcystin (MCs) بواسطة HPLC-PDA و LC-ESI-MS/MS بتحديد ال microcystin-LR (MC-LR). كشفت نتائج الدراسة بعد العزل و النمو عن وجود مجموعة جديدة من البكتيريا الزرقاء، picocyanobactéries، مع نمط جيني سام.

مبدئيا نقترح أن التخثت هو سبب تنوع و تعقد البكتيريا الزرقاء في هذا النظام البيئي ؛ كما لا يمكن استبعاد تأثير درجة الحرارة ولكن يجب تأكيده عن طريق أخذ عينات على نطاق أوسع يشمل جميع فصول السنة أو عن طريق الدراسات المخبرية. نتيجة لذلك يجب مراقبة التخثت في هذا النظام البيئي لمنع تطور الإزهار السام.

الكلمات المفتاحية : البكتيريا الزرقاء - مياه مفرطة التغذية - تسلسل الجيل الجديد - خزان الشافية -

سموم

Abréviations et acronymes

AChE	Acétylcholines Estérases
Adda	acide 3-amino-9 méthoxy-2-6,8-triméthyl-10-phényldeca-4,6-diénoïque
ANAs	anatoxines
ANTX	anatoxine-a
APHA	American Public Health Association
ARNase	ribonucléase
ASV(s)	Amplicon Sequences Variants
AU	unité d'absorption
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BioMaS	Bioinformatic analysis of Metagenomic AmpliconS
BLASTN	Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide
BMAA	L-bêta-N-méthylamino-L-alanine
BSA	Bovine Serum Albumin
Chl a	chlorophylle a
CIIMAR	Centre Interdisciplinaire de Recherche Marine et Environnementale
CyanoHABs	Cyanobacteria Harmful Algal Blooms
CYN	cylindrospermopsine
DDBJ	DNA DataBank of Japan
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMeAsp	acide 3 méthylaspartique
DMP	diméthyl-2,6-phénol
DNA Pol	ADN polymérase
ENA	European Nucleotide Archive
eV	électrons-volts
F	forward
FastQC	Fast Quality Control
FASTQ	Fast Adaptive Shrinkage Threshold Quality
FC	flow cell
g	gravité
GF	Glass Microfiber
GSH	Glutathionne
HANTX	homoanatoxine-a

Hm³	hectomètres cubes
HPLC/PDA	Chromatographie Liquide à Haute Performance couplé à un détecteur Photodiode Array
HTML	HyperText Mark-Up Language
ICBN	Code International de Nomenclature Botanique
ICNB	Code International de Nomenclature des Bactéries
INSDC	International Nucleotide Sequence Databases Collaboration
ISO	International Organization for Standardization
LC-ESI-MS/MS	Chromatographie Liquide -Ionisation Electrospray - Spectrométrie de Masse
LEGE-CC	Blue Biotechnology and Ecotoxicology Culture Collection
LPS	Lipopolysaccharide
m/z	rapport masse/charge d'un ion
MC-LR	microcystine – Leucine Arginine
MCs	microcystines
Mdha	N-méthyl-déhydroalanine
ME	microscope électronique
MeOH	méthanol
MgCl₂	chlorure de magnésium
NCBI	National center for biotechnology Information
NGS	Next Generation Sequencing
NH₄⁺	ion ammonium
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NO₂⁻	ion nitrite
NO₃⁻	ion nitrate
NODs	nodularines
NRPS	Non-Ribosomal Peptides Synthetase
OATP	Polypeptides Transporteurs d'Anions Organiques
ORF	Open Reading Frame
PCC	Pasteur Culture Collection
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEAR	Paired-End reAd mergeR
PKS	polyketides synthases
PP1	Protéines Phosphatases 1

PP2A	Protéines Phosphatases 2A
PT	Phosphore total
R	reverse
RDP	Ribosomal Database Project
ROS	espèces réactives d'oxygène
S	Svedberg
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
SRA	Sequence Read Archive
STXs	Saxitoxines
UAM	Université Autonome de Madrid
X-Gal	Bromo-5Chloro-4Indol-3 β -D-Galactopyranoside

Liste des tableaux

N° Tableau	Titre	Page
Tableau 1.	Classification des cyanobactéries selon l’approche polyphasique	5
Tableau 2.	Caractéristiques des amorces utilisées pour l’amplification des gènes reliés à la synthèse des toxines	41
Tableau 3.	Gradient d’élution utilisé en HPLC-PDA pour l’analyse des MCs ...	43
Tableau 4.	Caractéristiques des amorces utilisées dans les réactions PCR	51
Tableau 5.	Caractéristiques physico-chimiques des eaux du réservoir Cheffia pendant la période Octobre-Novembre 2014	52
Tableau 6.	Caractéristiques des colonies observées au niveau du réservoir Cheffia	53-54
Tableau 7.	Caractéristiques des formes filamenteuses observées au niveau du réservoir Cheffia	56-57
Tableau 8.	Distribution des cyanobactéries identifiées au niveau du réservoir Cheffia par investigation morphologique durant la période Octobre-Novembre 2014.....	59
Tableau 9.	Statistiques de base des séquences de l’ARNr16S des trois échantillons des cyanobactéries obtenues par FastQC	60
Tableau 10.	Résultats de l’analyse des séquences de l’ARNr 16S obtenues par illumina Miseq	64
Tableau 11.	Fragments produits par LC/ESI-MS/MS caractéristiques de la MC-LR	68
Tableau 12.	Identité (%) des séquences du gène de l’ARNr entre les souches de cyanobactéries isolées du réservoir Cheffia et leurs correspondances les plus proches disponibles sur Genbank (NCBI)	82-84

Liste des figures

N° Figure	Titre	Page
Figure 1.	Principaux plans d'organisation des cyanobactéries	7
Figure 2.	Structure de la MC-LR	18
Figure 3.	Structure chimique de la nodularine (Annala <i>et al.</i> , 1996)	19
Figure 4.	Groupe de gènes <i>mcy</i> et <i>nda</i> codant pour la biosynthèse de MCs et de NODs chez <i>M. aeruginosa</i> PCC7806 et <i>Nodularia spumigena</i> NSOR10, respectivement. Noir – enzymes tailoring, rouge – PKS, bleu – NRPS, blanc – non-MC synthétase, vert – transporteur ABC	20
Figure 5.	Structure chimique de la Cyindrospermopsine (1) et ses analogues : 7-déoxy-cyindrospermopsine (2) et 7-epicyindrospermopsine (3)	22
Figure 6.	Groupe de gènes <i>cyr</i> codant pour la biosynthèse de CYN chez <i>C. raciborskii</i> AWT205. Rouge– PKS/NRPS, vert– uracile, noir– enzymes tailoring, bleu– transporteur, blanc– transposase, orange– amidinotransférase, mauve– régulateur	23
Figure 7.	Structures chimiques des anatoxines	24
Figure 8.	Groupe des gènes <i>ana</i> chez <i>Oscillatoria</i> sp. PCC6506. Vert– transporter, orangé–cyclase, bleu clair– thioestérase, mauve– oxydase, bleu- protéine adénylation, jaune– acyl-carrier-protéine, rouge– PKS, noir– transposase	25
Figure 9.	Structures chimiques de la saxitoxine (A) et ses analogues (B) ...	26
Figure 10.	Groupe des gènes <i>sxt</i> chez <i>Aphanizomenon</i> sp. NH-5. Vert clair– transporter, blanc– transposase, noir–inconnu, bleu foncé– cyclase, vert– PKS, bleu clair– oxydoréductase, orangé– hydroxylase, rouge foncé– régulateur probable, orangé–	

	transférase, rouge– hydrolase	27
Figure 11.	Structures chimiques de la BMAA	28
Figure 12.	Structure de la lynbyatoxine-a (A), de l'aplysiatoxine (B) et de la debromoaplysiatoxine (C)	28
Figure 13.	Situation géographique du barrage de Cheffia	30
Figure 14.	Principe de l'approche Illumina	38
Figure 15.	Exemple d'une séquence générée par Illumina Miseq	39
Figure 16.	Marqueur de taille moléculaire 1 kb Plus Ladder	42
Figure 17.	Chambre de culture du CIIMAR (Porto, Portugal)	45
Figure 18.	Le plasmide pCR™ 2.1-TOPO®	47
Figure 19.	Morphotypes des formes coloniales des cyanobactéries du réservoir Cheffia. (A) <i>M. aeruginosa</i> , (B) <i>M. novacekii</i> , (C) <i>M. panniformis</i> , (D-E) <i>M. ichthyoblabe</i> , (F-G) <i>M. flos-aquae</i> , (H-Q) <i>Microcystis</i> sp.	55
Figure 20.	Morphotypes des formes filamenteuses des cyanobactéries du réservoir Cheffia. Barre d'échelle = 20 µm	58
Figure 21.	Distribution des longueurs des séquences sur toutes les séquences de l'ARNr16S de la lecture 1, échantillon 1	61
Figure 22.	Distribution des longueurs des séquences sur toutes les séquences de l'ARNr16S de la lecture 2, échantillon 1	61
Figure 23.	Distribution des longueurs des séquences sur toutes les séquences de l'ARNr16S de la lecture 1, échantillon 2	62
Figure 24.	Distribution des longueurs des séquences sur toutes les séquences de l'ARNr16S de la lecture 2, échantillon 2	62
Figure 25.	Distribution des longueurs des séquences sur toutes les séquences de l'ARNr16S de la lecture 1, échantillon 3	63

Figure 26.	Distribution des longueurs des séquences sur toutes les séquences de l'ARNr16S de la lecture 2, échantillon 3	63
Figure 27.	Abondance relative des cyanobactéries du réservoir Cheffia au niveau ordre	65
Figure 28.	Abondance relative des cyanobactéries du réservoir Cheffia au niveau genre	66
Figure 29.	Profil électrophorétique sur gel d'agarose 1.5% du gène <i>mcyE</i> des trois échantillons des cyanobactéries. M: Marqueur de taille (DNA ladder 1 kb plus); +C: contrôle positif; Ligne 1: échantillon 1 (13.10.2014); Ligne 2: échantillon 2 (09.11.2014); Ligne 3: échantillon 3 (22.11.2014); - C: contrôle négatif	66
Figure 30.	Chromatogramme HPLC-PDA extrait à 238 nm des extraits des cyanobactéries du réservoir Cheffia. (Abréviation: AU = unités d'absorption)	67
Figure 31.	Spectre d'absorption et temps de rétention des deux pics obtenus avec HPLC-PDA à 238 nm des extraits des cyanobactéries du réservoir Cheffia. (Abréviation: AU = unités d'absorption)	67
Figure 32.	Spectre electrospray de la MC-LR (m/z 995.42) détecté par LC/ESI-MS/MS dans les extraits des cyanobactéries du réservoir Cheffia. (Abréviations: m/z = masse/charge, MC-LR: Microcystine-LR)	69
Figure 33.	Spectre electrospray du pic 1 détecté par LC/ESI-MS/MS	70
Figure 34.	Culture des cyanobactéries obtenues après 2 mois d'isolement et de purification. a : <i>Aphanothece</i> sp. CR10, b : <i>Aphanothece</i> sp. CR11, c : <i>M. flos-aquae</i> CR13, d : <i>Microcystis</i> sp. CR12, e : <i>Microcoleus</i> sp. CR8, f : <i>Lyngbya</i> sp. CR6, g : <i>L. cincinnata</i> CR7, h: <i>P. rosea</i> CR9, i: <i>G. amphibium</i> CR2, j: <i>G. amphibium</i> CR3, k: <i>G. amphibium</i> CR4, l: <i>G. amphibium</i> CR1, m: <i>L. nigra</i> CR5.....	71

Figure 35.	Photographies de la souche <i>G. amphibium</i> CR1 isolée du réservoir Cheffia. A – partie du tapis ; B – détail du trichome	72
Figure 36.	Photographies de la souche <i>G. amphibium</i> CR2 isolée du réservoir Cheffia. A – tapis bleu-vert ; B – morphologie du trichome	72
Figure 37.	Photographies de la souche <i>G. amphibium</i> CR3 isolée du réservoir Cheffia. A – tapis bleu-vert ; B – morphologie du trichome	73
Figure 38.	Photographies de la souche <i>G. amphibium</i> CR4 isolée du réservoir Cheffia. A – tapis bleu-vert ; B – morphologie du trichome	74
Figure 39.	Photographies de la souche <i>L. nigra</i> CR5 isolée du réservoir Cheffia. A – partie du tapis ; B – détail du trichome	74
Figure 40.	Photographies de la souche <i>Lyngbya</i> sp. CR6 isolée du réservoir Cheffia. A – agrégation des trichomes en tapis bleu-vert ; B – morphologie du trichome	75
Figure 41.	Photographies de la souche <i>L. cincinnata</i> CR7 isolée du réservoir Cheffia. A – tapis bleu-vert ; B – morphologie du trichome	76
Figure 42.	Photographies de la souche <i>Microcoleus</i> sp. CR8 isolée du réservoir Cheffia. A – partie du tapis avec des filaments ondulés ou enroulés en spirale ; B – détails des filaments et des cellules apicales, C – gaine, cellule, D – hormocytes	77
Figure 43.	Photographies de la souche <i>P. rosea</i> CR9 isolée du réservoir Cheffia. A – tapis rouge-violacé ; B – morphologie du trichome..	78
Figure 44.	Photographies de la souche <i>Aphanothece</i> sp. CR10 isolée du réservoir Cheffia. A – apparence de la colonie ; B – organisation des cellules et morphologie	78

Figure 45.	Photographies de la souche <i>Aphanothece</i> sp. CR11 isolée du réservoir Cheffia. A – morphologie de la colonie ; B – organisation des cellules	79
Figure 46.	Photographies de la souche <i>Microcystis</i> sp. CR12 isolée du réservoir Cheffia. A morphologie de la colonie ; B – arrangement des cellules et morphologie, granules vert olive ou contenu brun, aérotopes	80
Figure 47.	Photographies de la souche <i>M. flos-aquae</i> CR13 isolée du réservoir Cheffia. A – morphologie de la colonie ; B – arrangement des cellules et morphologie, granules vert olive ou contenu brun, aérotopes, mucilage	81
Figure 48.	Arbre phylogénétique des souches des cyanobactéries isolées du réservoir Cheffia sur la base des séquences de l'ARNr 16S. <i>Escherichia coli</i> (J01859) a été utilisé comme groupe externe. Les souches isolées au cours de cette étude sont marquées en rose	85
Figure 49.	Gel l'électrophorèse des gènes responsables de la synthèse des MCs des souches isolées du réservoir Cheffia. A : <i>mcyE</i> , B : <i>mcyA</i> . M: Marqueur de taille (DNA ladder 1 kb plus), +C: contrôle positif; Ligne 1: <i>G. amphibium</i> CR1; Ligne 2: <i>G. amphibium</i> CR2; Ligne 3: <i>G. amphibium</i> CR3; Ligne 4: <i>G. amphibium</i> CR4; Ligne 5: <i>L. nigra</i> CR5; Ligne 6: <i>Lyngbya</i> sp. CR6; Ligne 7: <i>L. cincinnata</i> CR7; Ligne 8: <i>Microcoleus</i> sp. CR8; Ligne 9: <i>P. rosea</i> CR9; Ligne 10: <i>Aphanothece</i> sp. CR10; Ligne 11: <i>Aphanothece</i> sp. CR11; Ligne 12: <i>Microcystis</i> sp. CR12; Ligne 13: <i>M. flos-aquae</i> CR13; - C: contrôle négatif.....	86
Figure 50.	Gel l'électrophorèse des gènes responsables de la synthèse des STXs des souches isolées du réservoir Cheffia. A : <i>sxtA</i> , B : <i>sxtI</i> , C : <i>sxtG</i> . M: Marqueur de taille (DNA ladder 1 kb plus), +C: contrôle positif; Ligne 1: <i>G. amphibium</i> CR1; Ligne 2: <i>G. amphibium</i> CR2; Ligne 3: <i>G. amphibium</i> CR3; Ligne 4: <i>G.</i>	

amphibium CR4; Ligne 5: *L. nigra* CR5; Ligne 6: *Lyngbya* sp. CR6; Ligne 7: *L. cincinnata* CR7; Ligne 8: *Microcoleus* sp. CR8; Ligne 9: *P. rosea* CR9; Ligne 10: *Aphanothece* sp. CR10; Ligne 11: *Aphanothece* sp. CR11; Ligne 12: *Microcystis* sp. CR12; Ligne 13: *M. flos-aquae* CR13; - C: contrôle négatif..... 87

Figure 51. Gel d'électrophorèse des gènes responsables de la synthèse des ANAs et des CYNs des souches isolées du réservoir Cheffia. A : *anaC*, B : *cyrJ*. M: Marqueur de taille (DNA ladder 1 kb plus), +C: contrôle positif; Ligne 1: *G. amphibium* CR1; Ligne 2: *G. amphibium* CR2; Ligne 3: *G. amphibium* CR3; Ligne 4: *G. amphibium* CR4; Ligne 5: *L. nigra* CR5; Ligne 6: *Lyngbya* sp. CR6; Ligne 7: *L. cincinnata* CR7; Ligne 8: *Microcoleus* sp. CR8; Ligne 9: *P. rosea* CR9; Ligne 10: *Aphanothece* sp. CR10; Ligne 11: *Aphanothece* sp. CR11; Ligne 12: *Microcystis* sp. CR12; Ligne 13: *M. flos-aquae* CR13; - C: contrôle négatif..... 88

Liste des photos

N° Photo	Titre	Page
Photo 1.	Site d'échantillonnage au niveau du réservoir Cheffia (photo prise le 13.10.2014, BENREDJEM Lamia)	32
Photo 2.	Cyanobactéries au niveau de réservoir Cheffia (photo prise le 13.10.2014, BENREDJEM Lamia)	32

INTRODUCTION

Introduction

La dégradation de la qualité des eaux douces est l'un des problèmes les plus graves auxquels est confronté le monde d'aujourd'hui (Howard *et al.*, 2020). La contamination microbienne des eaux de surface par des microorganismes allochtones, tels que les bactéries et les virus entériques, ou par des micro-organismes autochtones peut limiter l'utilisation de l'eau à des fins récréatives, agricoles ou potables (Yéprémian *et al.*, 2007). Parmi ces micro-organismes, les cyanobactéries toxiques causant des effets indésirables et voir très graves sur la santé humaine et animale (Dittmann *et al.*, 2013).

Des preuves de recherches récentes suggèrent que les effets interactifs de l'eutrophisation et du changement climatique augmenteraient la probabilité de survenue ainsi que la gravité des proliférations des cyanobactéries (O'Neil *et al.*, 2012 ; Paerl et Paul, 2012 ; Codd *et al.*, 2017). Les scénarios des changements climatiques prédisent que les rivières, les lacs et les réservoirs connaîtront une augmentation des températures, des périodes plus intenses et plus longues de stratification thermique, ce qui pourrait favoriser les cyanobactéries sur les autres phytoplanctons (Carey *et al.*, 2012). Le processus d'eutrophisation favorisé par les activités humaines liées au développement urbain, agricole et industriel au cours des derniers siècles permet l'augmentation de l'afflux d'éléments nutritifs dans les écosystèmes d'eau douce (González et Roldán, 2019).

Les cyanobactéries sont connues par leur capacité de produire des métabolites secondaires ayant des effets neurotoxiques, hépatotoxiques et dermatotoxiques (Meriluoto, 2017). A l'échelle mondiale, on prévoit que des cyanobactéries toxiques se trouveront dans de nouveaux habitats et produiront de plus fortes concentrations de toxines, conséquence du changement climatique (Mantzouki *et al.*, 2018). Les changements dans la communauté cyanobactérienne résultant de l'eutrophisation ou du changement climatique sont d'une grande importance, ils peuvent être accompagné d'un changement des cyanotoxines prédominantes (Mehnert *et al.*, 2010). Ces changements sont critiques pour la gestion de l'eau potable (Hur *et al.*, 2013) ; les souches productrices de toxines doivent être identifiées et caractérisées ; sinon, les programmes de surveillance des effets toxiques de la prolifération cyanobactérienne sur les ressources en eau pourraient être inefficaces (Lee *et al.*, 2015).

Le climat méditerranéen, chaud, favorise la prolifération des cyanobactéries dans les eaux eutrophes, qui peut commencer au printemps et durer jusqu'au mois de Décembre,

ou dans les lacs hyper-eutrophes tout au long de l'année (Moustaka-Gouni *et al.*, 2007). Plus encore, les changements climatiques, en particulier dans le Sud de la Méditerranée devraient entraîner une augmentation des niveaux d'eutrophisation et de l'abondance des cyanobactéries (Mariani *et al.*, 2015).

En Algérie, plusieurs études ont décrit le développement des cyanobactéries toxiques dans les plans d'eau servant de réservoirs d'eau potable (Branes *et al.*, 2007 ; Nasri *et al.*, 2007 ; Guellati *et al.*, 2017 ; Saoudi *et al.*, 2017 ; Touati *et al.*, 2019). Cependant, la plupart de ces études étaient basées sur des méthodes traditionnelles dans lesquelles les cyanobactéries étaient identifiées par étude microscopique des caractères morphologiques. Ainsi, du fait de la grande variabilité morphologique et du faible nombre de caractères phénotypiques utilisés qui conduisent à de sérieux problèmes d'identification (Bittencourt-Oliveira et Piccin-Santos, 2012), l'inclusion d'autres caractéristiques comme l'information génétique, est un important complément pour une identification et une classification justes des cyanobactéries. La taxonomie polyphasique et l'analyse du gène codant l'ARNr 16S de la petite sous-unité ribosomale, est actuellement l'approche la plus utilisée pour une identification et une classification précises des cyanobactéries (Komárek, 2016).

Les méthodes moléculaires d'identification créent de nouvelles opportunités pour l'étude de la biodiversité (Cristescu, 2014 ; Ramos *et al.*, 2017). Néanmoins, parce que des cultures de cyanobactéries sont difficiles à obtenir, des méthodes spécifiques aux cyanobactéries qui ne demandent pas des cultures axéniques sont d'une grande importance (Choi *et al.*, 2008). Le métabarcodage de l'ADN, avec l'application de la technologie de séquençage à haut débit ou next generation sequencing (NGS), est l'une des méthodes les plus prometteuses pour explorer la diversité biologique en profondeur (Casero *et al.*, 2019). Ainsi, une technique de séquençage à haut débit, soit la technologie Illumina Miseq, a été choisie dans cette étude pour décrire la population des cyanobactéries. Cependant, des souches toxiques et non toxiques de la même espèce peuvent coexister. Il existe plus de 100 taxons (espèces ou genres) reconnus producteurs de toxines (Meriluoto *et al.*, 2017) ; appartenant à trois ordres : Chroococcales, Nostocales et Oscillatoriales ; et plus rarement les Stigonematales (Cires *et al.*, 2014). L'amplification par PCR de gènes spécifiques responsables de la synthèse des toxines est une technique fiable et robuste pour la détection de toxicité (Yuan et Yoon, 2021).

Introduction

Le projet de cette thèse tente, par une approche polyphasique, d'étudier les paramètres physico-chimiques des eaux du réservoir Cheffia, Nord-Est de l'Algérie, de définir les cyanobactéries présentes dans cet écosystème, par des techniques culture-indépendante et culture-dépendante, et la mise en évidence de génotypes toxiques et des métabolites secondaires toxiques produits. Des études antérieures ont identifié les genres *Oscillatoria* et *Anabaena* et ont décrit des blooms de *Microcystis novacekii* avec production de microcystines (MCs) (Nasri *et al.*, 2007 ; El Herry *et al.*, 2009). La pollution organique dans cet écosystème est considérable (Harrat et Achour, 2010), il a été observé que ce réservoir reçoit les déchets urbains, industriels et agricoles de l'Oued Bounamoussa.

Cette thèse est structurée en quatre chapitres :

- le premier fait état des connaissances acquises sur la taxonomie et les caractéristiques écologiques des cyanobactéries, la notion de bloom et les facteurs favorisant le développement des cyanobactéries ainsi que les métabolites secondaires produits par ces microorganismes et leurs caractéristiques ;
- le second situe le réservoir Cheffia et détaille la méthodologie utilisée dans le cadre de ce travail : **i.** les méthodes d'analyse des paramètres physico-chimiques, **ii.** l'identification morphologique, **iii.** l'amplification génique, **iv.** le séquençage du gène de l'ARNr 16S par Illumina Miseq et l'analyse des séquences obtenues, **v.** l'identification des métabolites secondaires toxiques et **vi.** l'isolement de quelques souches de cyanobactéries et leurs caractérisations morphologique, moléculaire et phylogénétique ;
- le troisième présente les différents résultats obtenus ;
- le quatrième est consacré à la discussion des résultats à la lumière des travaux antérieurs.

Enfin, une conclusion générale récapitule les principaux résultats et les avancées de ce travail et ouvre des perspectives sur les axes de recherche qui devraient être abordés.

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

1. Taxonomie et diversité des cyanobactéries

1.1. Position taxonomique

Le groupe des cyanobactéries, ou algues bleu-vertes, sont des organismes procaryotes photosynthétiques oxygéniques (Carmichael, 1994). La classification de ces organismes dépend à la fois du Code International de Nomenclature Botanique (ICBN, McNeill *et al.*, 2006) et du Code International de Nomenclature des Bactéries (ICNB, Lapage *et al.*, 1992). Elles sont normalement placées dans le groupe Eubacteria dans la taxonomie phylogénétique (Skulberg *et al.*, 1993).

La classification suivant le code de nomenclature botanique repose sur des critères morphologiques, qui permettent une identification relativement aisée des genres les plus fréquemment rencontrés. Selon la nomenclature bactériologique, la classification en espèce requiert, en complément, la prise en compte de caractéristiques physiologiques, biochimiques et génétiques déterminées sur des souches pures en culture (Rippka et Herdman, 1992). Rippka *et al.* (1979) ont recommandé cinq sections, qui sont devenues la base principale de la classification dans le Manuel de la systématique bactériologique de Bergey, qui reconnaissait cinq sous-sections au lieu d'ordres, I (= Chroococcales), II (= Pleurocapsales), III (= Oscillatoriales), IV (= Nostocales) et V (= Stigonematales) (Castenholz, 2001).

La classification des cyanobactéries a subi une restructuration et une révision importantes ces dernières années avec l'avènement des analyses phylogénétiques basées sur des données des séquences moléculaires ainsi qu'avec l'introduction de la microscopie électronique (ME). Le présent système a été construit suivant une approche polyphasique (utilisant des critères moléculaires, cytomorphologiques et écologiques) et a produit des arguments et des critères convaincants pour la définition objective de nombreux nouveaux genres taxonomiques basés sur des données de séquences moléculaires (Komárek *et al.*, 2014) (Tableau 1).

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

Tableau 1. Classification des cyanobactéries selon l'approche polyphasique (Komárek *et al.*, 2014).

Ordres	Principales caractéristiques
<u>Chroococcales</u>	Unicellulaires ou coloniales, multiplication par fission binaire et/ou formation d'exospores.
<u>Pleurocapsales</u>	Unicellulaires ou coloniales, multiplication par fissions multiples (baeocytes) ou en combinaison par fission binaire.
<u>Oscillatoriales</u>	Filamenteuses unisériées, sans hétérocystes, sans ramification, à division cellulaire perpendiculaire à l'axe du trichome.
<u>Nostocales</u>	Filamenteuses, pas de vraie ramification, différenciation cellulaire (hétérocystes et akinètes), à division cellulaire dans un seul plan.
<u>Gloeobacterales</u>	Unicellulaires cocoïdes ou coloniales, division cellulaire par simple fission binaire toujours perpendiculaire à l'axe cellulaire le plus long et par nanocytes.
<u>Synechococcales</u>	Colonies composées de cellules arrangées irrégulièrement dans un mucilage, légèrement allongées, ovales ou en forme de tige. La reproduction se produit par désintégration des colonies.
<u>Spirulinales</u>	Trichomes enroulés en spirales sans gaine mucilagineuse, avec des thylakoïdes pariétales et sans hétérocystes.
<u>Chroococcidiopsidales</u>	Unicellulaires ou organisées en groupes plus ou moins sphériques ou irréguliers, avec une gaine mince ferme et incolore et des thylakoïdes répartis irrégulièrement dans le cytoplasme. La reproduction se produit par baeocytes.

1.2. Caractéristiques générales

1.2.1. Diversité morphologique

Ces microorganismes présentent une large gamme d'organisation morphologique (Figure 1) : unicellulaires sphériques, ellipsoïdales, cylindriques, ovoïdes ou piriformes, isolées ou assemblées en colonies de formes irrégulière, sphérique, globuleuse, lobée, quadratique ou plane. Les formes pluricellulaires filamenteuses pourront être uni- ou plurisériées (une ou plusieurs séries de cellules jointives) avec ou sans gaine de polysaccharides (on parle alors respectivement de filaments et de trichomes), avec ou sans ramifications (vraies ou fausses) (Chorus et Bartram, 1999).

Deux types de cellules différenciées présentant des fonctions particulières sont aussi parfois observés :

- les akinètes, cellules de résistance à paroi épaisse et qui contiennent des réserves permettant aux espèces qui les possèdent (ordres des Nostocales et des Stigonematales) de survivre en conditions environnementales défavorables (Chorus et Bartram, 1999) ;
- les hétérocystes, qui sont spécialisées dans la fixation de l'azote atmosphérique, rencontrées uniquement chez les représentants des ordres des Nostocales et des Stigonematales (Chorus et Bartram, 1999).



Figure 1. Principaux plans d'organisation des cyanobactéries (Mur *et al.*, 1999).

1.2.2. Cytologie

La structure des cellules des cyanobactéries correspond à celle des autres membres des eubactéries. La distribution de l'ADN apparaît uniforme (observée sous ME), mais concentrée dans la région centrale formant des nucléoïdes qui ont des formes qui peuvent être différentes en fonction des genres (Cepák, 1993). La position et le model des thylakoïdes photosynthétiques observés sous ME diffèrent en fonction des genres et peuvent être utilisés comme un critère taxonomique (Komárek et Johansen, 2015).

Sous microscope photonique, la cellule apparaît de couleur bleue-verte pale ou brillante, vert olive, grise, rosée ou violette en fonction de la proportion des pigments photosynthétiques (Komárek et Johansen, 2015).

Différents types de granules existent dans la plupart des cellules. Les phycobilisomes associées aux thylakoïdes contiennent des phycobilines (Cohen-Bazire et

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

Bryant, 1982). Sous ME, les ribosomes sont également visibles (Komárek et Johansen, 2015).

Dans certains genres, la présence dans les cellules végétatives de vésicules à gaz permet à ces microorganismes de se positionner à différents niveaux dans la colonne d'eau, selon leurs besoins en lumière et en nutriments (Semyalo, 2009). Leur présence est caractéristique de certains genres et espèces (p.ex., *Microcystis*, *Radiocystis* et plusieurs espèces de *Woronichinia*) (Komárek et Johansen, 2015). Les vésicules à gaz sont arrangées en groupes (des centaines ou des milliers par cellules) et sont visibles dans les cellules végétatives comme des corps irréguliers de couleur marron foncé et de différentes tailles. Elles sont également nommées aérotopes et vacuoles à gaz (Walsby, 1978).

La paroi des cellules des cyanobactéries est composée majoritairement de protéines avec une couche de peptidoglycanes. Des lipoprotéines et des lipopolysaccharides externes peuvent également être présents (Drews et Weckesser, 1982). Un mucilage peut entourer les colonies, trichomes et filaments et présenter des contours nets ou diffus et une coloration plus ou moins marquée (Bourrelly, 1985) ; il aide les espèces benthiques à s'attacher à leur substrat minéral ou sert comme un milieu pour le transport des nutriments (Dade *et al.*, 1990).

1.2.3. Pigments photosynthétiques

En plus de synthétiser de la chlorophylle a (Chl a), les cyanobactéries produisent aussi des pigments accessoires appelés phycobiliprotéines photosynthétiques divisés en deux groupes : la phycocyanine (pigment bleu), la phycoérythrine (pigment rouge, chez certaines espèces seulement). La phycocyanine est divisée en trois groupes: C-phycocyanine, R-phycocyanine et allophycocyanine. Les fonctions principales de ces protéines est l'absorption de la lumière du spectre visible et le transfert d'énergie à la Chl a pour maintenir la photosynthèse et en même temps protéger les cyanobactéries de la photolyse due à l'exposition intense à la lumière (Mandal *et al.*, 2020).

Elles possèdent également des pigments caroténoïdes que l'on peut diviser en deux grandes classes en fonction de la présence ou de l'absence de la molécule d'oxygène dans leur structure chimique: xanthophylles (contient l'oxygène ; p. ex., la β -carotène) et

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

carotènes (ne contient par d'oxygène ; p. ex., la lutéine, la myxoxanthine, la myxoxanthophylle, l'oscillaxanthine, l'échinone, la nostoxanthine, la zéaxanthine, la flavocine) (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2018).

La scytonemine est un autre pigment jaune-marron de la paroi des cyanobactéries (Nägeli et Schwendener, 1877). Des dérivés de la scytonemine ont été également isolés des cyanobactéries tels que la dimethoxy-scytonemine, la tetramethoxy-scytonemine, la scytonine (Bultel-Poncé *et al.*, 2004) et la scytonemin-imine (Grant et Louda, 2013).

Grâce à leurs pigments, les cyanobactéries utilisent efficacement la lumière verte, jaune et orange, portion du spectre qui est généralement moins bien exploitée par les autres algues planctoniques (Douglas, 1994).

1.2.4. Molécules de réserves

Les cyanobactéries possèdent plusieurs types de molécules de réserves. Les réserves azotées sont constituées par la cyanophycine et la phycobilline tandis que les réserves carbonées sont formées par le glycogène et les réserves phosphorées se présentent sous forme de granules de polyphosphate (Kromkamp, 1987).

1.2.5. Multiplication

La reproduction des cyanobactéries est végétative et s'effectue par scission simple ou multiple, par bourgeonnement ou encore par fragmentation au hasard. Selon les espèces et les conditions environnementales, les temps de doublement des populations varient de quelques heures à plusieurs jours (Sguera, 2008). Chez les formes unicellulaires, la division successive de la cellule mère libère des nanocytes ou baeocytes. Les formes filamenteuses se dispersent par fragmentation au niveau des nécridies (cellules dégénérantes) libérant de courts trichomes ou filaments (les hormogonies) (Briand, 2008).

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

1.3. Ecologie des cyanobactéries

1.3.1. Milieux de vie

Grâce à leur grande capacité d'adaptation, les cyanobactéries colonisent la plupart des écosystèmes terrestres et aquatiques (Rasmussen et Johansson, 2002).

La plupart des cyanobactéries sont capables de se déplacer, soit à l'aide de vésicules gazeuses soit, dans le cas des cyanobactéries filamenteuses, par glissement (jusqu'à 25 microns par seconde) grâce à des microfibrilles (Girardin-Andréani, 2005). Certaines espèces sont adaptées à des conditions extrêmes, proliférant par exemple dans la glace, les eaux ferrugineuses, les pH extrêmes (Lavoie *et al.*, 2007), les déserts, les sources thermales et les lacs arctiques et antarctiques (Sompong *et al.*, 2005 ; Taton *et al.*, 2006).

En milieu aquatique, les cyanobactéries sont dites planctoniques ou pélagiques si elles prolifèrent en suspension dans la colonne d'eau, ou benthiques si elles sont attachées à un substrat (Lavoie *et al.*, 2007). Certains genres (*Anabaena*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Fischerella*, *Scytonema*) peuvent former des associations symbiotiques avec divers organismes tels que des algues (diatomées) (Brehm *et al.*, 2003), des champignons (Miura et Yokota, 2006), des bryophytes (Adams et Duggan, 2008), des ptéridophytes (Peters et Meeks 1989), des plantes (gymnospermes et angiospermes) (Bergman *et al.*, 2008) et des animaux (Lee *et al.*, 2001).

1.3.2. Rôle écologique

Apparues sur Terre il y a 2.5 à 3.5 milliards d'années (Awramik, 1992), les cyanobactéries sont reconnues comme étant les producteurs primaires de la chaîne alimentaire microbienne (Chisholm *et al.*, 1988). Elles constituent jusqu'à 70% de la biomasse totale du phytoplancton, elles produisent plus de 30% de l'O₂ total libre et représentent plus de 30% de la production primaire totale (fixation du CO₂) (Paerl *et al.*, 2001). Elles auraient également donné naissance au chloroplaste des eucaryotes, suite à l'endosymbiose d'une cyanobactérie ancestrale avec un proto-eucaryote (Gray, 1993).

D'autre part, la fixation d'azote atmosphérique par certains genres de cyanobactéries joue un rôle important du point de vue écologique et économique, leur

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

potentiel de fixation d'azote est de l'ordre de 20-40 kg N. ha⁻¹ par culture. Ainsi, elles jouent un rôle important dans le maintien et le développement de la fertilité des sols et par conséquent elles augmentent le rendement comme un biofertilisateur naturel (Ladha et Reddy, 2000). Les cyanobactéries augmentent également la fertilité du sol en augmentant la taille des pores du sol et sa capacité de rétention de l'eau à cause de la production excessive de mucilage et peuvent tolérer des doses élevées de pesticides au-dessus des niveaux recommandés appliqués sur le terrain (Singh *et al.*, 2016).

En plus de la fixation de l'azote atmosphérique, les cyanobactéries secrètent un nombre de substances d'intérêt commercial, pharmaceutique ou toxicologique (Nogueira *et al.*, 2006). Elles comprennent des métabolites primaires comme certaines protéines et vitamines et des métabolites secondaires avec des propriétés antifongiques, antibactériennes et antivirales ou des toxines. Les cyanobactéries sont également considérées comme une ressource importante et prometteuse pour la production de biocarburants, car elles sont les seules procaryotes qui effectuent la photosynthèse oxygénique (Kumar *et al.*, 2019).

Mais les cyanobactéries sont plus connues du grand public pour les perturbations environnementales et sanitaires qu'elles occasionnent par leurs proliférations en milieu aquatique (Hunter *et al.*, 2012). En effet, en raison de leur capacité de photosynthèse oxygénique, elles peuvent rapidement devenir dominantes dans les habitats aquatiques et terrestres par la formation de blooms intensifs (Paldavičienė *et al.*, 2009). Ces derniers, lorsqu'ils sont dominés par des espèces toxiques, sont un grand problème de santé publique et de vie des animaux, certaines espèces sont capables de synthétiser des hépatotoxines, des cytotoxines et des neurotoxines (Hunter *et al.*, 2012).

2. Prolifération massive des cyanobactéries

2.1. Définition

Les termes « fleur d'eau », « floraison », « efflorescence » et en anglais «bloom » ou «Cyanobacteria Harmful Algal Blooms (CyanoHABs)» désignent le résultat d'une phase de prolifération massive de cyanobactéries, se traduisant par une apparition

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

importante de biomasse, généralement sur une courte période de temps et pouvant persister plus ou moins longtemps selon les cas (Lavoie *et al.*, 2007).

Elles peuvent provoquer une coloration de l'eau qui dépendra des pigments majoritairement présents dans l'espèce dominante (El Herry, 2008). Une perte de diversité spécifique est alors observée dans le phytoplancton alors que seulement une espèce devient largement dominante. Dans les blooms de cyanobactéries, souvent une seule espèce représente plus de 95% de la population. Bien que ceci ait été interprété comme un résultat de compétition entre espèces, la dominance d'une espèce peut être un signe de formation de métabolites avec une activité cyanobactéricide (Mundt *et al.*, 2001). Ces blooms sont souvent corrélés à un processus d'eutrophisation, c'est-à-dire à l'enrichissement du milieu en nutriments, notamment des composés d'azote et de phosphore (Oudra *et al.*, 2002).

Une fleur d'eau de cyanobactéries n'est pas nécessairement toxique. Selon Santé Canada (2002), 30 à 50 % des fleurs d'eau ne sont pas toxiques. Toutefois, la proportion des souches toxiques dans un lac eutrophe peut varier de 6 à 86 % en fonction des facteurs environnementaux affectant la toxicité (Shirai *et al.*, 1991).

2.2. Cyanobactéries impliquées dans les proliférations

Les organismes responsables comprennent plus de 100 taxons (espèces ou genres) (Meriluoto *et al.*, 2017) mais les principaux sont : *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Cylindrospermopsis*, *Nodularia* (Chorus et Bartram, 1999), *Dolichospermum* et *Trichodesmium* (Huisman *et al.*, 2018).

2.3. Conséquences des proliférations des cyanobactéries (AFSSA, 2006)

Les effets de ces proliférations sont multiples :

➤ Sur l'environnement et le cadre de vie

- modification de l'aspect de la ressource par une coloration inhabituelle (bleue, rouge ou verte) ;
- nuisance olfactive lors de la décomposition de la prolifération.

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

➤ Sur les organismes du milieu

- perturbation de la biodiversité de l'écosystème aquatique ;
- perturbation des réseaux trophiques aquatiques car les cyanobactéries sont peu ou pas consommées par le zooplancton et leur prolifération s'effectue le plus souvent au détriment du développement des autres microorganismes photosynthétiques (compétition pour les nutriments et la lumière) ;
- mortalités de poissons, par intoxication ou diminution de la teneur en oxygène de l'eau ;
- mortalités d'oiseaux, par intoxication directe ou via leur alimentation (mollusques, poissons, ...) ;
- intoxication d'animaux domestiques ou sauvages par abreuvement à proximité d'écumes toxiques.

➤ Sur les usages anthropiques de l'eau

- coloration, odeur et texture de l'eau pouvant décourager la baignade ;
- troubles cutanés ou des muqueuses suite à des baignades dans des eaux affectées par des efflorescences ;
- perturbation du fonctionnement des procédés de traitement des eaux d'alimentation, notamment mécaniquement par colmatage des filtres ou des membranes, ou par consommation accrue en réactifs de traitement et génération de sous-produits de désinfection et par dérèglement des réactions de floculation par suite des changements rapides de pH des eaux entrant dans la filière ;
- dégradation, par la présence de métabolites odorants, de la qualité organoleptique des eaux d'alimentation mal traitées ;
- induction de risques sanitaires par ingestion, inhalation ou exposition par dialyse si les toxines sont mal éliminées ;
- perturbation des appareillages de dialyse par colmatage accéléré, si le traitement en amont est insuffisant.

3. Déterminisme du développement des cyanobactéries

Des recherches récentes, des modèles des études au laboratoire et des observations sur terrain montrent que les proliférations des cyanobactéries sont favorisées par une interaction complexe entre plusieurs facteurs (Zhou *et al.*, 2020).

3.1. Lumière et flottabilité

Une faible disponibilité en lumière dans la colonne d'eau favorise la croissance des cyanobactéries au détriment des algues. En effet, bien que de forts éclaircissements soient propices au développement des cyanobactéries, elles sont également bien adaptées à un manque de lumière causé par une prolifération algale excessive ou autres composantes de l'eau qui atténuent la lumière (matières humiques et sédiments en suspension). En ce sens, les cyanobactéries ont un réel avantage compétitif sur les autres algues et dominent souvent lorsque la lumière est limitante (Lavoie *et al.*, 2007).

3.2. Température

Les cyanobactéries dominent les assemblages de phytoplancton sous des températures plus élevées (souvent supérieure à 25 °C) (Reynolds, 2006) en raison à la fois des facteurs physiologiques (croissance plus rapide) et physiques (O'Neil *et al.*, 2012).

Le réchauffement climatique a été suggéré d'offrir un avantage compétitif aux cyanobactéries, qui se développent généralement mieux à des températures plus chaudes (Markensten *et al.*, 2010 ; Msagati *et al.*, 2006 ; Carey *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'augmentation des températures de l'eau va intensifier encore la stratification de l'eau et allonger la durée des périodes de stratification augmentant ainsi non seulement l'ampleur des fleurs, mais aussi leur durée (O'Neil *et al.*, 2012).

L'augmentation des températures des lacs est responsable de l'augmentation de la biomasse total du phytoplancton avec une dominance des cyanobactéries fixatrices d'azote conséquente à la diminution de l'export des nutriments à partir du bassin versant (Markensten *et al.*, 2010).

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

L'augmentation de la température de l'eau diminue également la viscosité de l'eau ; par conséquence, la résistance de l'eau à la migration verticale diminue également ; facilitant ainsi la migration vers le haut (optimisation de la production photosynthétique) et vers le bas (optimisation de l'acquisition des nutriments) par les cyanobactéries très mobiles (Reynolds, 1987). De plus, en améliorant l'activité bactérienne hétérotrophique et en diminuant la ventilation des eaux de fond, des eaux plus chaudes et plus stratifiées peuvent augmenter le problème de l'hypoxie des eaux de fond (Turner *et al.*, 1987). La charge interne en nutriments provenant des sédiments, en particulier des pools de phosphore sensibles à l'oxydoréduction, est souvent stimulée par l'hypoxie, alimentant davantage les cyanobactéries (Paerl, 1988).

3.3. Le pH / teneur en CO₂

Les algues bleu-vertes préfèrent généralement des conditions légèrement alcalines (pH 7.7 à 9.4), ce qui est proche du pH de l'eau naturelle (Wicks et Thief, 1990).

Plusieurs études ont rapporté que les cyanobactéries peuvent dominer les algues eucaryotes sous un pH élevé et des conditions de faible CO₂. La photosynthèse par les phytoplanctons élimine le CO₂ de l'environnement aquatique ce qui résulte dans l'augmentation du pH (Qui et Gao, 2002). En outre, des études au laboratoire et sur le terrain ont démontré que les cyanobactéries répondent à l'augmentation du CO₂ avec l'augmentation des taux de divisions cellulaires et l'augmentation de la biomasse (Ma et Wang, 2021).

3.4. Nutriments

Les nutriments tels que l'azote (N) et le phosphore (P) sont essentiels pour la croissance des cyanobactéries. Plusieurs études ont montré que les cyanobactéries ont une affinité à l'N ou au P plus élevée que les autres organismes photosynthétiques (Schindler *et al.*, 2008 ; Hernández *et al.*, 2018). En plus de leur affinité élevée aux éléments nutritifs, les cyanobactéries peuvent stocker des quantités importantes de phosphore pour effectuer deux à quatre divisions cellulaires (Metting et Pyne, 1986), qui correspondent à une augmentation de 4 à 32 fois de la biomasse (Msagati *et al.*, 2006). Un faible rapport N/P a été aussi observé comme un facteur favorisant les blooms de cyanobactéries (Villareal et Carpenter, 2003).

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

Dans les écosystèmes d'eau douce, la disponibilité du P a traditionnellement été considérée comme un facteur limitant la prolifération de cyanobactéries (Schindler *et al.*, 2008).

3.5. Interaction avec le compartiment biotique

3.5.1. Le broutage

Le "grazing" ou broutage par le zooplancton est un autre paramètre qui joue un rôle dans la formation et le maintien des blooms (Urrutia-Cordero *et al.*, 2013). Les interactions des brouteurs avec les cyanobactéries sont espèce-spécifique (Tillmanns *et al.*, 2008). Les cyanobactéries sont considérées comme un aliment inadéquat pour le zooplancton (p. ex., *Daphnia* sp.) à cause de leur morphologie, la production de toxines et la faible valeur nutritionnelle (Bednarska *et al.*, 2014). Cependant, il y a une grande variabilité dans la capacité des différents brouteurs de consommer et de se développer sur les cyanobactéries (Tillmanns *et al.*, 2008). Il est prouvé que les produits naturels des cyanobactéries, qui sont principalement les lipopeptides, les peptides, les depsipeptides et des alcaloïdes, peuvent servir de défenses chimiques ou peuvent être toxiques pour les herbivores et les compétiteurs (Berry *et al.*, 2008). Les défenses chimiques des cyanobactéries peuvent jouer un rôle essentiel dans la formation de fleurs et de leur persistance en limitant l'activité de broutage de certains consommateurs potentiels (Paerl et Paul, 2012). Cependant, les cyanobactéries peuvent utiliser les messagers chimiques dissous pour détecter le brouteur et ainsi changer leur morphologie, comme la formation de colonies pour éviter d'être ingérer (Lüring, 2001).

3.5.2. L'allélopathie

L'allélopathie est considérée comme l'un des facteurs favorisant le maintien et la prolifération d'algues et de cyanobactéries dans les systèmes marins et d'eau douce (Leão *et al.*, 2009).

L'allélopathie se reporte aux effets inhibiteurs et stimulateurs de plantes et microorganismes aux autres espèces de plantes ou microorganismes à travers la libération de composés organiques (Tollrian et Harvell, 1999). Les composés bioactifs peuvent

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

provoquer des modifications morphologiques et ultrastructurales (Valdor et Aboal, 2007), générer des espèces réactives d'oxygène (ROS) et le stress oxydatif (Hirata *et al.*, 2003) ou provoquer la lyse cellulaire et la mort (Fistarol *et al.*, 2004).

Anabaena est connu pour avoir des propriétés allélopathiques contre les phytoplanctons (Engstrom-Ost *et al.*, 2011). En outre, Jang *et al.* (2003) ont démontré que plusieurs souches de *Microcystis aeruginosa* peuvent augmenter la production de toxines, en réponse à l'exposition directe et indirecte de zooplancton herbivore.

De nombreuses espèces de macrophytes immergées, telles que *Cabomba caroliniana* et *Myriophyllum spicatum* (Nakai *et al.*, 1999), *Stratiotes aloides* (Mulderij *et al.*, 2007), *Chara vulgaris* (Zhang *et al.*, 2009) ont des effets inhibiteurs sur la croissance de *M. aeruginosa* par des composés allélopathiques.

4. Les toxines des cyanobactéries ou cyanotoxines

Certaines espèces de cyanobactéries sont capables de synthétiser des substances toxiques comme métabolites secondaires, appelées cyanotoxines. Suivant leur mode d'action, et plus précisément l'organe cible principal sur lequel elles agissent, on distingue les hépatotoxines, les neurotoxines et les dermatotoxines (Dittmann *et al.*, 2013).

L'exposition humaine aux proliférations des cyanobactéries et de leurs toxines peut se faire par plusieurs voies. La voie orale est la plus importante par la consommation d'eau potable mal traitée, par consommation d'aliments (crustacés, poissons et suppléments) ou par ingestion de l'eau lors des activités récréatives, sportives et professionnelles. L'exposition par voie parentérale a été décrite lorsque de l'eau contaminée a été utilisée pour l'hémodialyse (Funari et Testai, 2008).

A ce jour, plus de 100 taxons (espèces ou genres) de cyanobactéries appartenant aux Chroococcales, Nostocales, Oscillatoriales (Meriluoto *et al.*, 2017) et Stigonematales (Cires *et al.*, 2014) sont producteurs de toxines. Les espèces les plus souvent citées dans les cas d'intoxication animale et humaine appartiennent aux genres : *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon*, *Dolichospermum*, *Nostoc*, *Phormidium* et *Limnothrix* (Meriluoto *et al.*, 2017).

4.1. Les hépatotoxines

Les hépatotoxines regroupent les microcystines, les nodularines et la cylindrospermopsine.

4.1.1. Les microcystines et les nodularines

- **Structure chimique**

Les microcystines (MCs) sont des heptapeptides cycliques présentant une structure commune : cyclo (-D-Ala-L-X-D-MeAsp-L-Z-Adda-D-Glu-Mdha), où X et Z sont deux L acides aminés variables, DMeAsp est l'acide 3 méthylaspartique, Adda est l'acide 3-amino-9 méthoxy-2-6,8-triméthyl-10-phényldeca-4,6-diénoïque et Mdha est la N-méthyl-déhydroalanine (Figure 2) (Sivonen et Jones, 1999). L'Adda est un élément clé de l'activité biologique et toxique des MCs (Bouaïcha *et al.*, 2019).

A ce jour, il existe au moins 279 variantes structurales de MCs identifiées (Bouaïcha *et al.*, 2019) dont la plus étudiée car la plus toxique est la microcystine-leucine-arginine notée MC-LR (WHO, 2020). Les isoformes des MCs résultent des variations de méthylation, hydroxylation, épimerisation et peptides substitution (Ginn *et al.*, 2009).

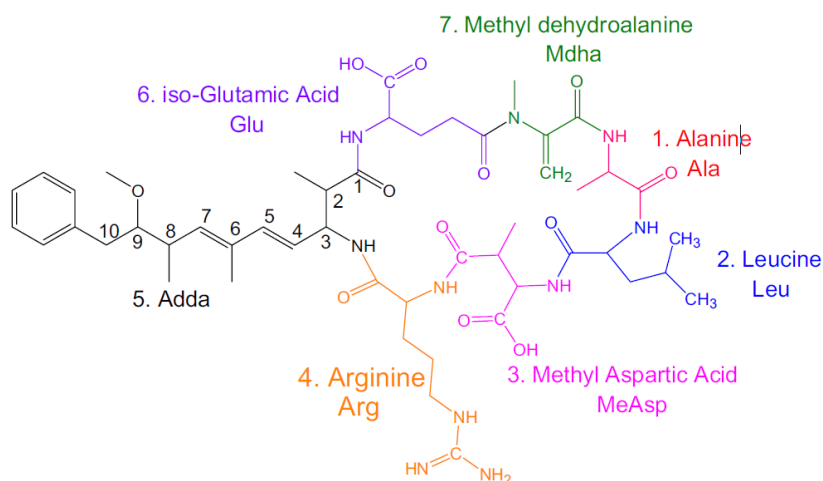


Figure 2. Structure de la MC-LR (Antoniou *et al.*, 2008).

Les nodularines (NODs) sont des pentapeptides cycliques (Figure 3) (Beattie *et al.*, 2000). Elles ont la structure cyclo (-D-érythro-b-méthylAsp (iso)- LArg -Adda-D-Glu (iso)

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

-2 - (méthylamino) -2 - (Z)- acide dehydrobutyrique) (Rinehart *et al.*, 1988). Dix variantes de NODs ont été décrites à ce jour (Meriluoto *et al.*, 2017).

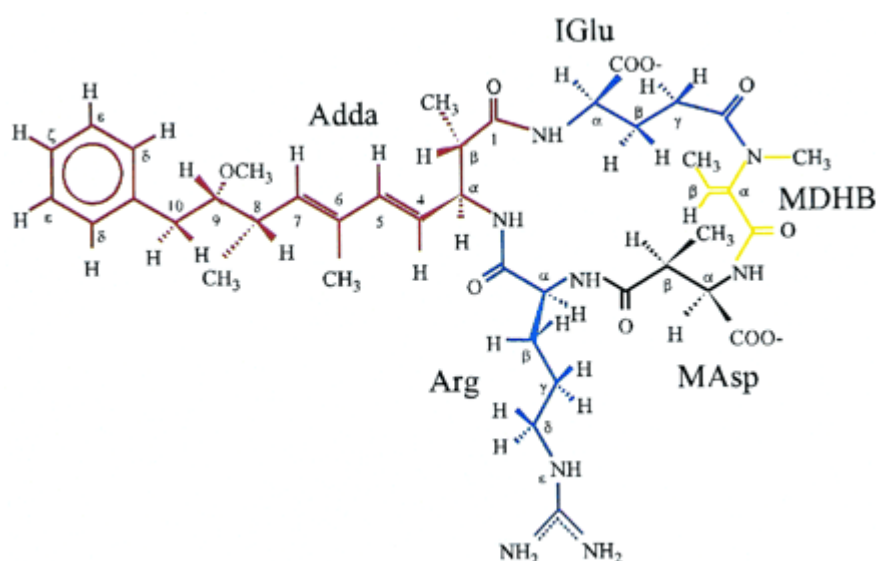


Figure 3. Structure chimique de la nodularine (Annila *et al.*, 1996).

- **Organismes producteurs**

Les MCs sont produites par des cyanobactéries des genres *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Phormidium*, *Limnothrix*, *Nostoc* et *Cylindrospermopsis* (Meriluoto *et al.*, 2017). Parmi ces derniers, *Microcystis* est le genre le plus connu et le plus cosmopolite à partir duquel 35 variantes de MCs ont été isolées (Sivonen et Jones, 1999).

Les NODs sont produites seulement par *Nodularia spumigena* et *N. sphaerocarpa* PCC7804 (Beattie *et al.*, 2000).

- **Bases moléculaires de la production des MCs et des NODs**

C'est une biosynthèse complexe, non ribosomale où des gènes peptides synthétases non ribosomiques (Non-Ribosomal peptides synthetase, NRPS) et des gènes polycétides synthétases (polyketides synthétases, PKS) sont impliqués (Dittmann *et al.*, 2013) ainsi que des enzymes de finalisation des queues peptidiques (tailoring) (Boaru *et al.*, 2006). Un seul groupe de gènes microcystine synthétase (*mcy*) composé de 10 gènes (*mcyA* à *mcyJ*) regroupés en deux opérons d'une taille totale de 55 kb est responsable de la production de

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

toutes les variantes des MCs (Tanabe *et al.*, 2009). Ce dernier a une structure modulaire, chaque module est responsable de l'activation et de l'incorporation des constituants spécifiques de l'heptapeptide (Dittmann et Börner, 2005).

Ces gènes sont organisés en deux opérons polycistroniques, *mcyABC* et *mcyDEFGHIJ*, transcrits à partir d'un promoteur central bidirectionnel situé entre *mcyA* et *mcyD* (Figure 4). La biosynthèse commence par la formation d'Adda et sa liaison au D-glutamate. Ce ci est accompli par les enzymes codés par les gènes *mcyD-J* (Boaru *et al.*, 2006). L'étape suivante, accomplie avec les enzymes codés par les gènes *mcyA*, *mcyB* et *mcyC*, comprend l'activation et l'incorporation de Mdha, DAla, L-X, D-MCAsp et L-Z (Dittmann et Börner, 2005).

Les gènes *mcyF*, *mcyH*, *mcyI* et *mcyJ* codent une racémase, un transporteur ABC, D-3-phosphoglycérate (D-3-PGDH) et O-méthyltransférase (OM), respectivement. La fonction de ces gènes comprend la coupure post transcriptionnelle (*mcyJ*, *mcyF* et *mcyI*) et le transport de la toxine (*mcyH*) (Ginn *et al.*, 2009).

Comme les MCs, les NODs sont également produites par un groupe de gènes *nda* au moyen de systèmes enzymatiques NRPS-PKS (Figure 4). Dans le cas de *N. spumigena* NSOR10, le locus du groupe de gènes *nda* (48kb) se compose de neuf cadres de lecture ouverts (ORF : Open Reading Frame, *ndaA-I*) transcrit à partir d'une région promotrice régulatrice bidirectionnelle (Moffitt et Neilan, 2004).

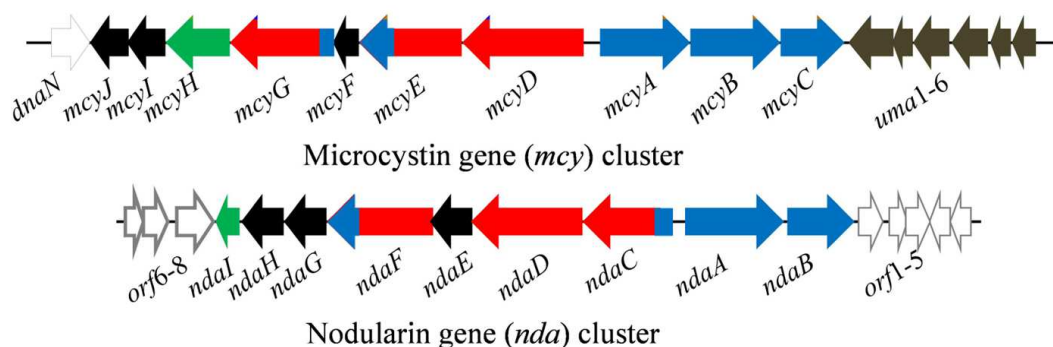


Figure 4. Groupe de gènes *mcy* et *nda* codant pour la biosynthèse de MCs et de NODs chez *M. aeruginosa* PCC7806 et *N. spumigena* NSOR10, respectivement. Noir – enzymes tailoring, rouge – PKS, bleu – NRPS, blanc – non-MC synthétase, vert – transporteur ABC (Rastogi *et al.*, 2015).

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

- **Mécanisme d'action**

Les MCs et les NODs causent des perturbations graves de la structure du foie (Chorus et Bartram, 1999). Après administration orale, elles sont transportées à travers l'iléon dans la circulation sanguine par des polypeptides transporteurs d'anions organiques (OATP) utilisés par les acides biliaires et s'accumulent préférentiellement dans le foie (Falconer *et al.*, 1992). Les OATP ne sont pas seulement exprimés dans le foie, mais aussi dans le tractus gastro-intestinal, les reins, le cerveau, et il est prouvé que la MC-LR peut être transportée à travers la barrière hémato-encéphalique humaine (Fischer *et al.*, 2005). À l'intérieur des cellules, les MCs et les NODs inhibent les protéines phosphatases 1 (PP1) et 2A (PP2A) serine/thréonine eucaryotiques. L'inhibition de PP1 et PP2A conduit à l'hyperphosphorylation des protéines du cytosquelette (Gehring, 2004) résultant, lors d'intoxication aiguë, de la déformation des hépatocytes (apoptose et nécrose) menant à une hémorragie massive et la mort en quelques heures (Dawson, 1998). Les doses létales 50 (DL50) de la MC-LR et de la NOD-R mesurées par injection intra-péritonéale (i.p) chez la souris sont comprises entre 25 et 150 mg/kg et entre 50 et 150 mg/kg, respectivement (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999).

Il a été reporté que d'autres mécanismes peuvent être impliqués dans l'apoptose induite par les MCs comme l'activation des caspases (Fladmark *et al.*, 1999), la modification de l'expression des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (Billam *et al.*, 2008) et des espèces réactives de l'oxygène (Weng *et al.*, 2007). Ainsi, il est bien connu que les MCs sont des promoteurs de tumeur (MacKintosh *et al.*, 1990). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a établi une limite maximale admissible de 1 µg/L pour les MCs dans l'eau potable (WHO, 2004).

4.1.2. La cylindrospermopsine

- **Structure chimique**

La cylindrospermopsine (CYN), une molécule de poids moléculaire égal à 415 Da, se présente sous la forme d'un alcaloïde tricyclique de Guanine associé à un hydroxyméthyl-uracile (Figure 5) (Ohtani *et al.*, 1992). Seulement deux variantes

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

structurales sont connues : 7-epicylindropermopsine et deoxycylindropermopsine (Banker *et al.*, 2000 ; Seifert *et al.*, 2007).

La CYN est principalement produite comme une toxine extracellulaire, et il est fréquent de trouver environ 70-98% de la toxine totale dissoute dans la colonne d'eau (Chiswell *et al.*, 1999).

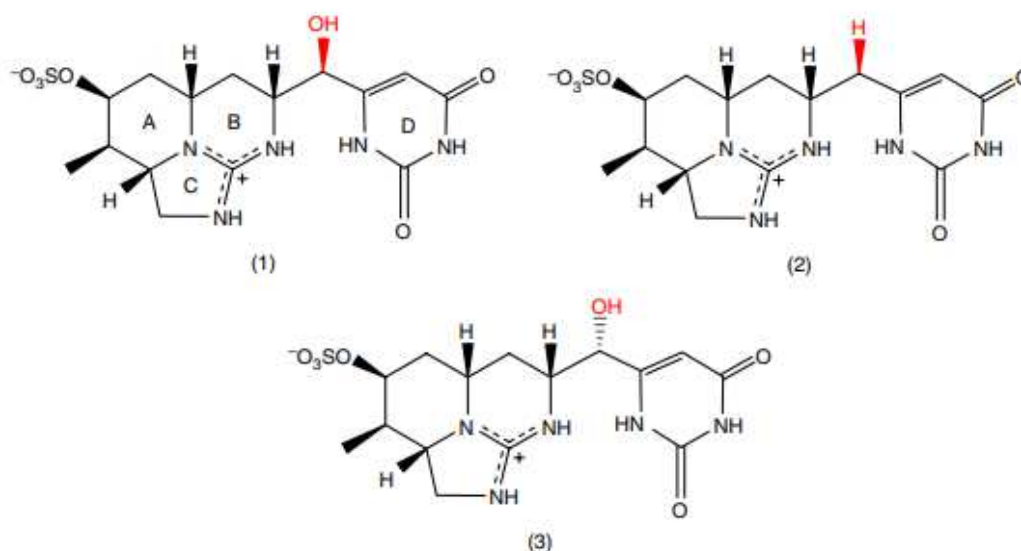


Figure 5. Structure chimique de la Cylindropermopsine (1) et ses analogues : 7-déoxycylindropermopsine (2) et 7-epicylindropermopsine (3) (Moreira *et al.*, 2012).

- **Organismes producteurs**

Elle est produite par certaines cyanobactéries comme : *Cylindropermopsis raciborskii* (Ohtani *et al.*, 1992), *Umezakia natans* (Harada *et al.*, 1994), *Aphanizomenon flos-aquae* (Preusel *et al.*, 2006), *Anabaena bergii*, (Schembri *et al.*, 2001), *Anabaena lapponica* (Spoof *et al.*, 2006), *Raphidiopsis curvata* et *Raphidiopsis mediterranea* (Li *et al.*, 2001 ; McGregor *et al.*, 2011), *Oscillatoria* sp. (Mazmouz *et al.*, 2010) et *Lyngbya wollei* (Seifert *et al.*, 2007).

- **Bases moléculaires de la production de CYN**

Le groupe de gènes *cyr* (42kb) codant pour les enzymes de la biosynthèse de CYN (Figure 6) code pour 15 ORFs (*cyrA-O*). La biosynthèse de CYN est initiée par une

amidino-transférase et complétée par des enzymes de type NRPS-PKS en combinaison avec des enzymes tailoring (Muenchhoff *et al.*, 2010).



Figure 6. Groupe de gènes *cyr* codant pour la biosynthèse de CYN chez *C. raciborskii* AWT205. Rouge– PKS/NRPS, vert– uracile, noir– enzymes tailoring, bleu– transporteur, blanc– transposase, orange– amidino-transférase, mauve– régulateur (Rastogi *et al.*, 2015).

- **Mécanisme d'action**

La CYN a le potentiel d'interférer avec plusieurs voies métaboliques. La toxicité rapide semble être médiée par le cytochrome P450 (Norris *et al.*, 2002). La toxicité à long terme est due à l'inhibition irréversible de la synthèse de protéines eucaryotiques (Terao *et al.*, 1994) et à l'inhibition de la synthèse de glutathionne (GSH) qui conduit potentiellement à l'augmentation du stress oxydatif (Runnegar *et al.*, 1995). Des études ont montré que cette cyanotoxine est génotoxique et potentiellement cancérigène (Humpage *et al.*, 2005). L'effet mutagène de la CYN a été prouvé *in vitro*. En effet, cette toxine cause la rupture du brin de l'ADN et la perte de chromosome pendant la division cellulaire (Shen *et al.*, 2002).

La cible principale de cette toxine est le foie, mais elle affecte également les reins, le thymus, le tube digestif et les poumons (Terao *et al.*, 1994 ; Hawkins *et al.*, 1997). La toxicité de la CYN est inférieure à celle des autres hépatotoxines, la DL50 de la CYN pure est de 2 mg/kg par voie orale chez la souris en 24 heures (Ohtani *et al.*, 1992). Bien qu'aucune valeur indicative officielle n'existe pour la CYN, l'OMS considère un niveau proposé de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (WHO, 2004).

4.2. Les neurotoxines

Les neurotoxines comportent trois grands groupes : les anatoxines, la saxitoxine et ses dérivés et l'acide aminé neurotoxique appelé L-bêta-N-méthylamino-L-alanine (BMAA) (Rodgers *et al.*, 2018).

4.2.1. Les anatoxines

- **Structure chimique**

Comprennent l'anatoxine-a (ANTX), l'homoanatoxine-a (HANTX) et l'anatoxine-a(S). L'ANTX et l'HANTX sont des alcaloïdes (Figure 7) principalement associés aux genres *Dolichospermum* (*Anabaena*), *Cuspidothrix*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Phormidium* et *Arthrospira*. L'anatoxine-a (S) est une N-hydroxyguanidine cyclique phosphorylée (Figure 7) produite par des souches du genre *Anabaena*. C'est un composé organophosphoré, de structure (5S) -2-amino-1 - ((hydroxyméthoxyphosphinyl) oxy) -N, N-diméthyle-4,5-di hydro-1H-imidazole-5-méthanamine. Elle inhibe de manière irréversible les acétylcholines estérases (AChE) et ainsi l'influx nerveux est bloqué (Moura et Pinto, 2010). Cette toxine est structurellement non liée aux autres alcaloïdes neurotoxiques produits par les cyanobactéries. L'anatoxine-a (S) est incapable de traverser la barrière hémato-encéphalique, étant un inhibiteur périphérique de la cholinestérase (Cook *et al.*, 1989).

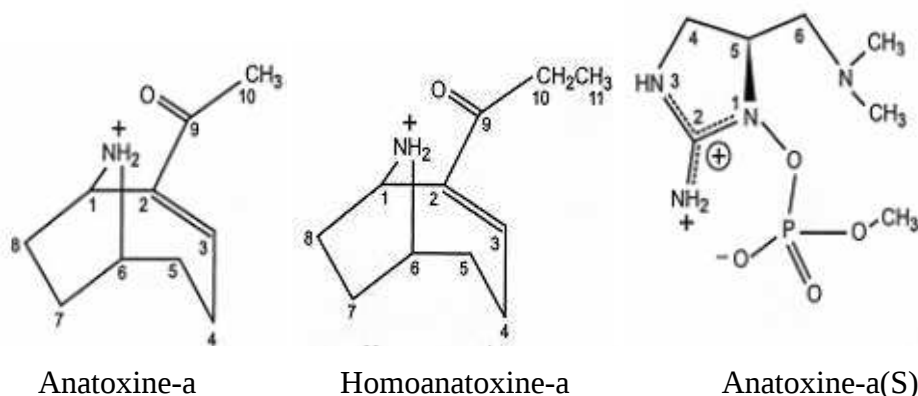


Figure 7. Structures chimiques des anatoxines (Fathalli, 2012).

- **Bases moléculaires de la production des anatoxines**

Elles sont synthétisées dans la cellule à partir de l'ornithine *via* la putrescine catalysée par l'enzyme ornithine décarboxylase. De plus, le séquençage partiel du génome a démontré la présence d'un groupe de gènes putatif codant pour la voie de biosynthèse de l'ANTX et de l' HANTX chez des cyanobactéries telles que *Oscillatoria* PCC6506 (Méjean *et al.*, 2014) et *Anabaena* strain 37 (Rantala-Ylinen *et al.*, 2011 ; Figure 8).

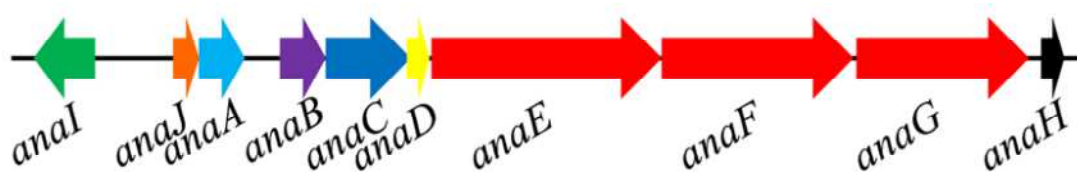


Figure 8. Groupe des gènes *ana* chez *Oscillatoria* sp. PCC6506. Vert– transporteur, orangé–cyclase, bleu clair– thioestérase, mauve– oxydase, bleu- protéine adénylation, jaune– acyl-carrier-protéine, rouge– PKS, noir– transposase (Rastogi *et al.*, 2015).

- **Mécanisme d'action**

Elles ciblent la jonction neuromusculaire et paralysent les muscles incluant ceux impliqués dans l'activité respiratoire conduisant à une mort par arrêt respiratoire (Bruno *et al.*, 2017). Des mécanismes de toxicité supplémentaires ont également été proposés pour l'ANTX ; la pression artérielle, la fréquence cardiaque et les échanges gazeux ont été affectés (Adeyemo et Siren, 1992). L'ANTX est une toxine extrêmement puissante avec une DL50 de 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Devlin *et al.*, 1977).

4.2.2. Les saxitoxines (STXs)

- **Structure chimique**

La saxitoxine (STX) et ses analogues (STXs) sont composés d'un système 3,4-perhydropurine tricyclique et possèdent deux groupes de guanidine. La molécule du STX

peut être substituée à différentes positions (Figure 9). Actuellement, 57 STXs sont décrites (Wiese *et al.*, 2010).

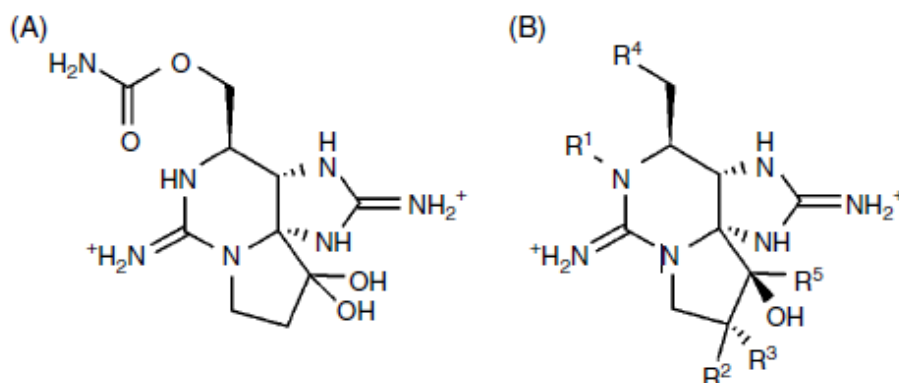


Figure 9. Structures chimiques de la saxitoxine (A) et ses analogues (B) (Ballot *et al.*, 2017).

- **Organismes producteurs**

La toxine est produite essentiellement par des espèces planctoniques de dinoflagellés marins (Neilan *et al.*, 2008) et certaines cyanobactéries d'eau douce, comme *A. flos-aquae*, *Anabaena circinalis*, (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999), *Lyngbya wollei* et *C. raciborskii* (Nicholson *et al.*, 2003).

- **Bases moléculaires de la production de STX**

Le groupe de gènes biosynthétiques de la STX (25,7 à 36 ko) comprend 33 gènes (Figure 10). Les positions des gènes codant pour les enzymes biosynthétiques, les transporteurs et les protéines régulatrices au sein du cluster diffèrent entre les différentes souches de cyanobactéries productrices de STXs. De plus, le profil toxique exprimé dans différentes souches est déterminé par la position et la présence, ou l'absence, de gènes spécifiques dans les groupes respectifs (Rastogi *et al.*, 2015). Il a été postulé que la biosynthèse de STXs dépend du gène *sxtA* (Kellmann *et al.*, 2008).

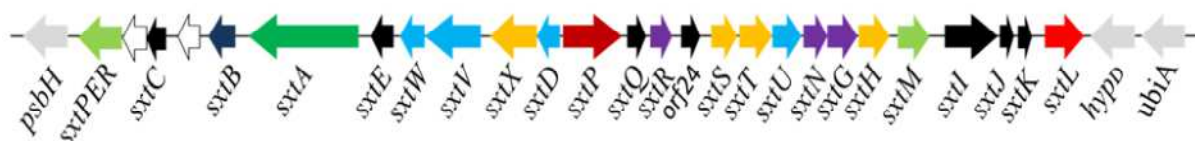


Figure 10. Groupe des gènes *sxt* chez *Aphanizomenon* sp. NH-5. Vert clair– transporteur, blanc– transposase, noir–inconnu, bleu foncé– cyclase, vert– PKS, bleu clair– oxydoréductase, orangé– hydroxylase, rouge foncé– régulateur probable, orangé– transférase, rouge– hydrolase (Rastogi *et al.*, 2015).

- **Mécanisme d'action**

C'est un groupe de toxines qui inhibent les canaux sodium voltage dépendant des jonctions neuromusculaires et provoquent chez les mammifères une paralysie musculaire entraînant la mort par arrêt respiratoire (Humpage, 2008).

4.2.3. La bêta-N-méthylamino-L-alanine (BMAA)

La figure 11 montre la structure chimique de l'acide (S)-2-amino-3-méthylaminopropanoïque (l-BMAA) de formule moléculaire ($C_4H_{10}N_2O_2$). Elle est produite par tous les groupes des cyanobactéries connues des eaux douces, salines et saumâtres (Cox *et al.*, 2005). La BMAA a été détectée dans une grande variété d'organismes ; zooplanctons, mollusques et poissons (Jonasson *et al.*, 2010 ; Lage *et al.*, 2015), les cerveaux de patients décédés de Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), la maladie d'Alzheimer et de Parkinson (Funari et Testai, 2008). Plusieurs études épidémiologiques ont montré que l'incidence excessive des cas de SLA était liée à une consommation de graines de l'arbre tropical *Cycas circinalis*, très riches en BMAA (Cox *et al.*, 2003). Cox *et al.* (2003) ont attribué cette neurotoxine aux cyanobactéries symbiotiques (*Nostoc* sp.) se développant dans les tissus des cycas. D'autres études ont montré que cette toxine est produite par *Nostoc* sp. isolée d'eau douce, saumâtre et marine (Cox *et al.*, 2005).

Weiss *et al.* (1989) ont montré que la BMAA pouvait endommager le système moteur, et les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) étaient des cibles moléculaires pour la BMAA. La BMAA est capable de former des carbamates avec une ressemblance

structurale très étroite avec le glutamate, expliquant potentiellement sa capacité à se lier aux récepteurs du glutamate et à être toxique pour les motoneurones.

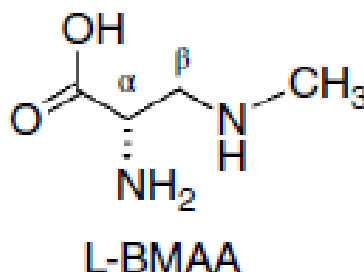


Figure 11. Structures chimiques de la BMAA (Ploux *et al.*, 2017).

4.3. Les dermatotoxines

4.3.1. Les alcaloïdes

La lyngbyatoxine A, les aplysiatoxines et la débromoaplysiatoxine sont des alcaloïdes (Figure 12) retrouvés chez des cyanobactéries benthiques telles que *Lyngbya*, *Oscillatoria* et *Schizothrix* (Chorus et Bartram, 1999). La lyngbyatoxine A est responsable des irritations cutanées et d'inflammations orales et gastro-intestinales (Cardellina *et al.*, 1979). Les aplysiatoxines et les débromoaplysiatoxines sont des agents promoteurs de tumeurs et des activateurs de protéines kinase C (Fujiki *et al.*, 1990).

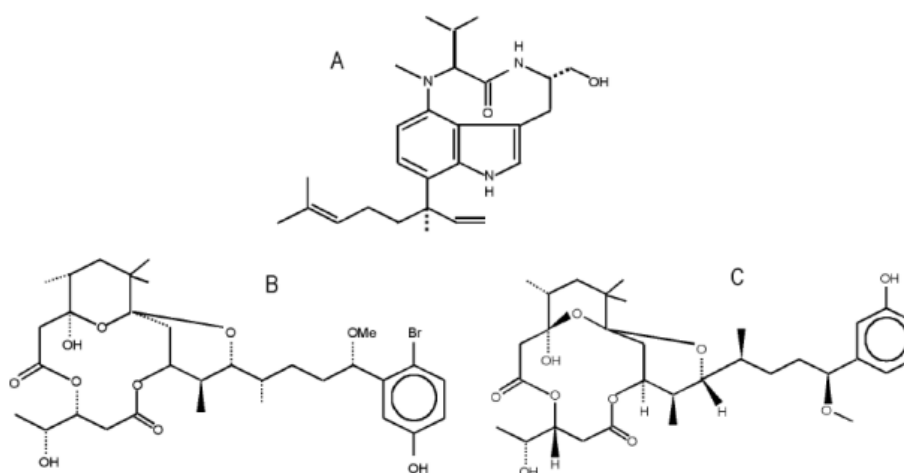


Figure 12. Structure de la lyngbyatoxine-a (A), de l'aplysiatoxine (B) et de la débromoaplysiatoxine (C) (Merel, 2009).

4.3.2. Les lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des endotoxines entrant dans la composition de la paroi cellulaire externe des bactéries à Gram négatif y compris les cyanobactéries. Ils sont responsables de réactions allergiques et toxiques chez les animaux et les humains et certainement associés à des irritations cutanées (Kerr *et al.*, 1995). Ils pourraient également être responsables d'effets gastro-intestinaux, d'irritation et d'inflammation (Stewart *et al.*, 2006). Mais leurs effets sont moins toxiques que les autres bactéries à Gram négatif (Chorus et Bartram, 1999).

Les LPS toxiques ont été isolés à partir de plusieurs genres de cyanobactéries : *Microcystis*, *Anabaena*, *Spirulina* et *Oscillatoria*. Les valeurs de DL50 des LPS des cyanobactéries chez la souris varient de 45 à 190 mg/kg (Stewart *et al.*, 2006).

4.4. Distribution des cyanotoxines et intoxications cyanobactériennes dans le monde

Un total de 468 articles sélectionnés sur les cyanobactéries toxiques a été examiné par Svirčev *et al.* (2019). L'étude a montré 1118 identifications enregistrées de cyanotoxines majeures dans 869 écosystèmes d'eau douce de 66 pays dans le monde entier. Les MCs étaient les cyanotoxines les plus souvent enregistrées dans le monde (63% ; 699 sur les 1118), suivi de la CYN (10% ; 107 sur 1118), des ANAs (9% ; 100 sur 1118) et des STXs (8% ; 93 sur 1118). Les NODs étaient les cyanotoxines les plus rarement enregistrées (2% ; 19 sur 1118). De plus, 183 cas d'intoxications aux cyanotoxines ont été enregistrés chez l'Homme et/ou les animaux. Sur toutes les proliférations cyanobactériennes toxiques examinées, le pourcentage le plus élevé d'empoisonnements associés était trouvé en Amérique du Nord et centrale (39% ; 69 cas sur 179), puis en Europe (20% ; 35 sur 179), l'Australie y compris la Nouvelle Zélande (15% ; 27 sur 179) et l'Afrique (11% ; 20 sur 179), tandis que le pourcentage le plus faible était lié à l'Asie (8% ; 14 cas sur 179) et en Amérique du Sud (8% ; 14 cas sur 179).

Chapitre 2. Matériel et méthodes

L'ensemble des manipulations ont été réalisées dans trois laboratoires de recherche. L'étude des échantillons des cyanobactéries par des techniques cultures-indépendantes (identification morphologique et manipulations de l'ADN) ont été conduites dans le laboratoire du Département de Biologie de l'Université Autonome de Madrid. Le traitement des données NGS a été réalisé dans le laboratoire de Bioinformatique du Département de Biosciences, Biotechnologies et Biopharmacie, Université Aldo Moro Bari (Italie). L'identification des toxines par HPLC-PDA et LC-ESI-MS/MS, l'isolement et l'étude des cyanobactéries isolées ont été effectués dans le laboratoire de Biotechnologie Bleue et Ecotoxicologie (BBE) du Centre Interdisciplinaire de Recherche Marine et Environnementale (CIIMAR) de l'Université Porto (Portugal).

1. Présentation du site d'étude

Le réservoir Cheffia (36°07'N et 8°03'E) est situé au Nord-Est de l'Algérie, Wilaya d'El Tarf (Figure 13). Construit en 1956, il couvre une surface de 9.78 Km² avec une capacité totale de 168 Hm³ et un volume de stockage de 101 Hm³ destinés à l'irrigation des zones agricoles et à des besoins industriels et humains (Agence Nationale des Ressources en Eau, 2004). La pollution organique dans ce réservoir semble être considérable ; en effet, il est connecté à Oued Bounamoussa qui reçoit des rejets de différentes origines : urbaine, industrielle et agricole (Harrat et Achour, 2010).



Figure 13. Situation géographique du barrage de Cheffia (Derradji, 2016).

2. Echantillonnage

Des échantillons d'eau et de cyanobactéries pour des études physico-chimiques, moléculaires et biochimiques ont été récoltés à intervalles irréguliers, selon l'observation de l'apparition des cyanobactéries à l'œil nu au niveau de la berge (site à accès facile, Photos 1 et 2), pendant la période s'étalant d'Octobre à Novembre 2014. Le volume d'eau à échantillonner dépend des types d'analyses réalisées.

Pour l'identification morphologique et les études moléculaires, un maximum de biomasse cyanobactérienne est concentré à l'aide d'un filet à plancton de 20 μm de diamètre de maille, prélevé de la berge et à faible profondeur (de quelques cm à 1 m de profondeur de la surface de l'eau). Au laboratoire, 100 mL de la biomasse cyanobactérienne ont été conservés dans une solution de Lugol à 4 °C et le reste a été concentré sur des filtres GF/F (Glass Microfiber), ces derniers ont été conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation pour les études moléculaires.

Les prélèvements pour le dosage des paramètres physico-chimiques ont été réalisés directement avec une bouteille de polyéthylène (1.5 litre) à une profondeur d'environ 30 cm de la surface de l'eau ; les échantillons ont été transportés et conservés à 4 °C et analysés dans les 24 heures.

Les études biochimiques des MCs ont été réalisées à partir d'un échantillon prélevé avec une bouteille de polyéthylène (1.5 L). Deux cents millilitres (200 mL) d'eau ont été filtrés sur deux filtres GF/C (100 mL par filtre) et conservés à -20 °C.

Pour l'isolement, un échantillon de cyanobactéries a été collecté le 21/10/2018, à l'aide d'un filet à plancton de 20 μm de diamètre de maille, de la berge et conservés à 4°C jusqu'à utilisation.



Photo 1. Site d'échantillonnage au niveau du réservoir Cheffia (photo prise le 13.10.2014, BENREDJEM Lamia).



Photo 2. Efflorescence de cyanobactéries au niveau de réservoir Cheffia (photo prise le 13.10.2014, BENREDJEM Lamia).

3. Etude des échantillons d'eau et identification des cyanobactéries par des techniques culture-indépendantes

3.1. Mesure des paramètres physico-chimiques de l'eau

Les paramètres physico-chimiques suivants ont été déterminés : température de l'eau, et concentrations des minéraux suivants : ammonium (NH_4^+ , mg L^{-1}), nitrates (NO_3^- , mg L^{-1}), nitrites (NO_2^- , mg L^{-1}), et phosphore total (PT, mg L^{-1}).

- **Température**

La température de l'eau a été déterminée directement dans le site de prélèvement en utilisant un testeur à main (Hanna Instruments Hi 98129, PHK-260 010Y) après calibration.

- **Ammonium**

Spectroquant[®] (Merck, Darmstadt, Allemagne) Test en tube Ammonium a été utilisé pour le dosage de l' NH_4^+ .

Principe : dans une solution fortement alcaline, l' NH_4^+ réagit avec les ions hypochlorites pour donner de la monochloramine. Celle-ci forme avec un phénol substitué un dérivé bleu d'indophénol qui est dosé par photométrie. La méthode est analogue à APHA 4500-NH₃ F (APHA : American Public Health Association) (APHA, 1985), ISO 7150-1 (ISO : International Organization for Standardization) et DIN 38406-5 (DIN : Deutsches Institut für Normung).

Méthode : dans un tube à essai, 5 mL de l'échantillon et une dose du réactif NH_4 -1 ont été mélangés, ensuite le tube fermé hermétiquement a été agité vigoureusement jusqu'à dissolution totale du réactif. Après un temps de réaction de 15 minutes (min), la concentration de l' NH_4^+ a été mesurée avec un spectrophotomètre à 655 nm.

- **Nitrates**

Spectroquant[®] (Merck, Darmstadt, Allemagne) Test en tube Nitrates a été utilisé pour l'analyse des NO_3^- .

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Principe : dans une solution sulfurique et phosphorique, les ions nitrates forment avec le diméthyl-2,6-phénol (DMP) le nitro-4-diméthyl-2,6-phénol qui est dosé par spectrophotomètre.

Méthode : dans un tube à essai, 0.50 mL de l'échantillon on été ajouté à 1 mL du réactif $\text{NO}_3\text{-1K}$. Après un temps repos de 10 min du tube brûlant, la concentration des ions NO_3^- à été mesurée par spectrophotomètre à 320 nm.

- **Nitrites**

Spectroquant[®] (Merck, Darmstadt, Allemagne) Test en tube Nitrites a été utilisé pour la mesure de la concentration des NO_2^- .

Principe : dans une solution acide les ions NO_2^- forment avec le fer (II) éthylène-di-ammonium sulfate un composé fer (II) jaune à brun vert qui est dosé par spectrophotomètre.

Méthode : deux micro-cuillers du réactif $\text{NO}_2\text{-1K}$ ont été introduites dans un tube à essai et 8.0 mL de l'échantillon y sont ajoutés ; le tube a été fermé hermétiquement et agité vigoureusement jusqu'à dissolution totale du réactif. Après un temps de repos de 20 min, la concentration des ions NO_2^- a été mesurée par spectrophotométrie à 320 nm.

- **Phosphore total**

La concentration du PT a été déterminée en suivant la méthode spectrométrique ammonium molybdate (ISO 6878: 2004) et en utilisant des tubes de test commerciaux (Spectroquant, Merck, Darmstadt, Allemagne).

Principe : la détermination du PT consiste à digérer et à oxyder toutes les formes de phosphore avec du persulfate de potassium en milieu acide sous pression à 121 °C.

Méthode : dans une cuve, 4.0 mL de l'échantillon à analyser et 1 mL du réactif NANOFIX R2 (peroxodisulfate de sodium) ont été mélangés et placés dans le bloc chauffant. Après 30 min à 120 °C, la cuve a été retirée du bloc chauffant et laissée refroidir à température ambiante. Ensuite, 1 mL du réactif NANOFIX R3 et 200 μL

Chapitre 2. Matériel et méthodes

du réactif R4 (acide sulfurique) ont été ajoutés et mélangés ; enfin la concentration du PT a été mesurée après 10 min par spectrophotométrie à 690 nm.

3.2. Identification morphologique des cyanobactéries

L'observation microscopique des cyanobactéries a été établie à l'aide d'un photomicroscope Olympus BH-2 équipé d'une caméra Leica DFC300 FX (Leica Microsystems, Germany), à 125 x et 500 x magnifications. L'identification morphologique est basée sur les critères taxonomiques établis par Komárek et Anagnostidis (1999, 2005) et Komárek (2013). Les paramètres suivants ont été analysés pour les formes coloniales : forme et développement de la colonie, model d'agréation cellulaire, diamètre des cellules et caractéristiques du mucilage. Pour les filaments, la forme et la taille des cellules végétatives (intercalaires et terminales), la présence ou l'absence d'hétérocystes, akinètes et vésicules de gaz, la forme du filament et son potentiel d'agréation en colonies et la présence ou l'absence de gaine mucilagineuse ont été enregistrées.

3.3. Etude moléculaire

La première étape consiste à extraire l'ADN génomique. Dans une deuxième étape, une amplification et le séquençage du gène de l'ARNr 16S ont été réalisés en utilisant des amorces universelles spécifiques aux cyanobactéries, ensuite une amplification des gènes reliés à la synthèse des toxines communes a été réalisée pour déterminer une éventuelle production des toxines.

Toutes les réactions de PCR ont été réalisées avec un thermocycleur Thermal Cycler TC 5000 (TECHNE, Roissy, France).

3.3.1. Extraction d'ADN à partir des filtres

L'extraction de l'ADN génomique à partir des filtres GF/F a été réalisée à l'aide du kit miniature DNeasy Plant (QIAGEN, Hilden, Allemagne) suivant le protocole décrit par le fabricant et modifié par Lezcana *et al.* (2016). Au début, chaque filtre est coupé en deux et chaque partie est introduite dans un tube eppendorf de 1.5 mL afin d'éviter l'excès de

Chapitre 2. Matériel et méthodes

résidus du filtre fibreux qui peut entraver l'extraction de l'ADN. Immédiatement, les tubes ont été introduits pendant 30 secondes (s) dans de l'azote liquide et ont été décongelés à température ambiante, cette opération est répétée deux fois. Après la décongélation, les cellules ont été éclatées en utilisant des billes de verre stériles (212-300 μm , lavées à l'acide, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Etats-Unis) et un homogénéisateur (Precellys, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) à 5000 rpm pendant 40 s. L'ARNase a été ajoutée aux tubes ensuite incubés à 65 °C pendant 10 min, puis centrifugés à 20 000 x g pendant 2 min. Les surnageants ont été transférés dans de nouveaux tubes à microcentrifugeuse en évitant les résidus de filtre. A ce stade, les instructions du fabricant ont été suivies et les deux tubes appartenant au même filtre à fibres de verre ont été combinés à la même colonne Spin DNeasy Mini.

La concentration et la pureté des extraits d'ADN ont été confirmées par spectrophotométrie à 260 et 280 nm (ThermoScientific Nanodrop ND-1000). Enfin, l'ADN a été conservé à -20 °C jusqu'à amplification par PCR puis séquençage.

3.3.2. Amplification du gène de l'ARNr 16S

L'ARNr 16S est une région de l'opéron ribosomique constituée de neuf régions variables (1500 nt), flanquée par des régions conservées. Dans notre étude, l'amplification de la région hypervariable V3- V4 de l'ADNr 16S (344 pb) a été réalisée en utilisant les amorces CYA359F (forward / GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG) et CYA781Ra/b (reverse/ GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T/ GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T) (Nübel *et al.*, 1997).

La solution de réaction d'amplification contenait 1 μL de tampon de la polymérase, 1.5 μL de MgCl_2 , 3.13 μL de désoxynucléotide triphosphate (dNTPs, 2 mM), 5 μL de sérum albumine bovine (Bovine Serum Albumin, BSA), 1.25 μL de chaque amorce (10 mM), 1 μL d'échantillon d'ADN, 0.1 μL de Taq DNA polymerase (QIAGEN) et 6.37 μL d'eau milli Q ; le volume final étant de 20 μL pour chaque tube PCR.

Les réactions de PCR ont été réalisées en suivant les conditions suivantes : dénaturation initiale de 5 min à 94 °C puis 35 cycles de 1 min à 94 °C, 1 min à 60 °C et 1 min à 72 °C. Le cycle se terminant avec une extension finale de 10 min à 72 °C (Nübel *et al.*, 1997). Au terme du programme, les amplicons obtenus ont été conservés à -20 °C jusqu'à utilisation.

3.3.3. Séquençage du gène de l'ARNr 16S

Les produits de PCR du gène de l'ARNr 16S de chaque échantillon ont été quantifiés par fluorimétrie avec PicoGreen (Invitrogen, CA, USA) et regroupés à des concentrations équimolaires. Ensuite, un séquençage massif a été réalisé par paires de 2 × 250 pb dans une plateforme Illumina MiSeq (Parque Científico de Madrid, Madrid, Espagne) en utilisant les amorces CYA359F et CYA781R (a/b).

Principe de la technique Illumina Miseq

Cette technologie a été créée à l'origine par Solexa (Bentley, 2006), une compagnie qui fut rachetée par Illumina en 2007.

La technologie de séquençage Illumina "Paired-End " (Figure 14) consiste au séquençage des deux extrémités d'un même fragment d'ADN (Strausberg *et al.*, 2008). Pour cela, des séquences adaptatrices sont associées aux extrémités des fragments d'ADN simples brins (Figure 14, encadré a). Ces fragments d'ADN sont ensuite immobilisés (de façon aléatoire) sur une surface en verre (ou « flow cell », FC) sur laquelle se trouvent des amorces (dont les séquences adaptatrices sont complémentaires) (Figure 14, encadré b). L'amplification par pontage va permettre l'amplification localisée d'un fragment unique en plusieurs centaines de millions de fragments identiques (amplification clonale) formant un regroupement d'ADN clonal appelé « cluster » (Figure 14, encadré c). Les brins anti-sens sont ensuite clivés à la fin des amplifications pour permettre la linéarisation des brins sens et leur séquençage. Le brin anti-sens de chaque fragment amplifié est clivé puis éliminé. Le brin restant se voit alors hybridé à une amorce de séquençage pour être ensuite mis en présence d'ADN polymérase et des quatre nucléotides comportant chacun un terminateur de chaîne réversible marqué par un fluorophore spécifique au nucléotide en question (Figure 14, encadré d). Après excitation au laser, la fluorescence émise par un nucléotide incorporé est captée et analysée pour toutes les colonies de fragments amplifiés sur la plaque, puis, après clivage des terminateurs de chaîne, un nouveau cycle d'ajout des nucléotides peut commencer (Figure 14, encadré d). Ces cycles de séquençage se répètent permettant ainsi de déduire la séquence de chacun de ces fragments une base à la fois (Figure 14, encadré e).

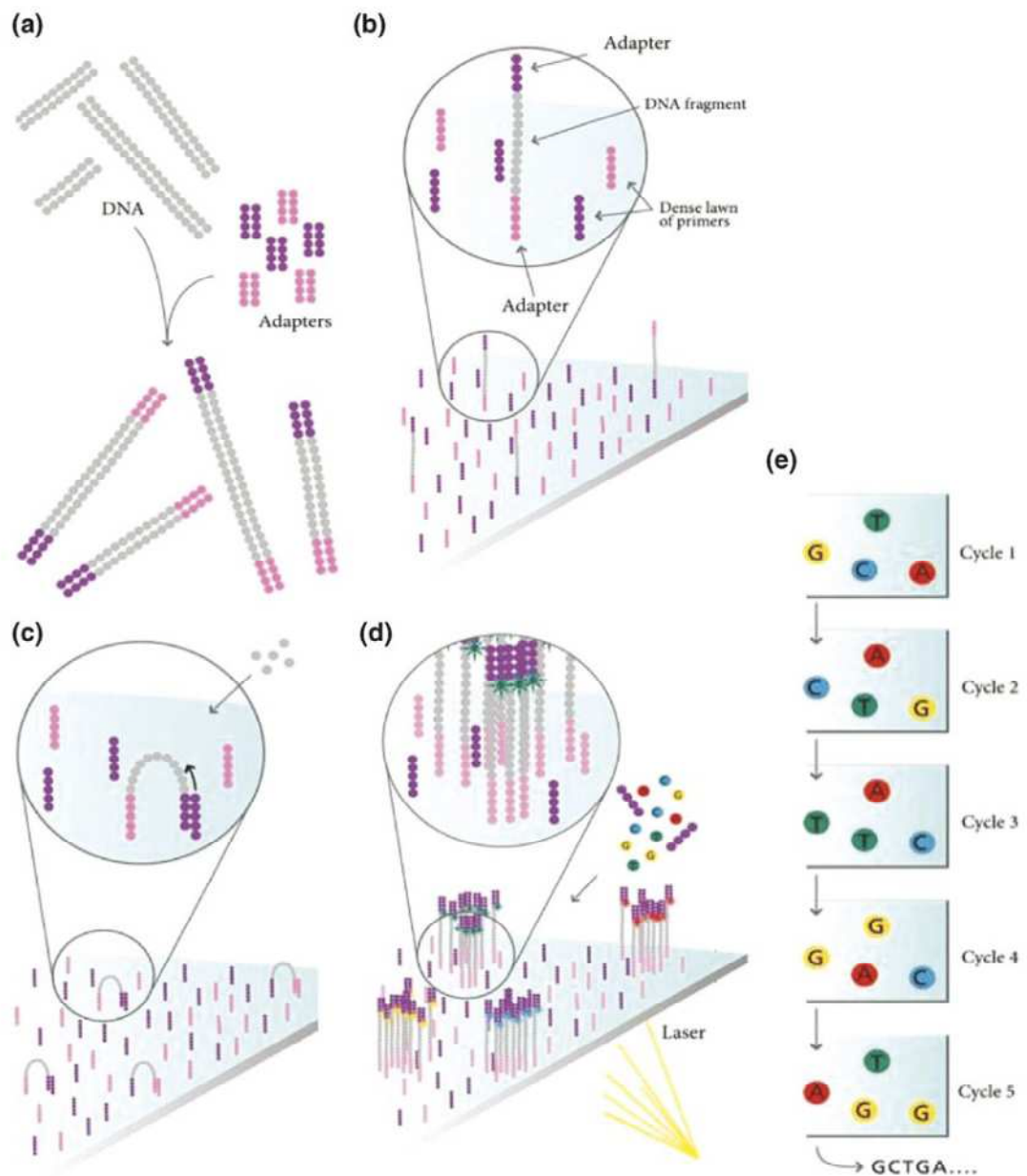


Figure 14. Principe de l'approche Illumina (Strausberg *et al.*, 2008).

3.3.4. Traitement bioinformatique et analyse statistique

Les fichiers générés par illumina Miseq sont sous format fastQ, un format qui contient les séquences des lectures et leurs qualités avec des probabilités d'erreur par nucléotide. Cette probabilité est codée sur l'échelle Phred :

- probabilité d'erreur de lecture de la base de 10%, Score PHRED = 10 ;
- probabilité d'erreur de lecture de la base de 1%, Score PHRED = 20 ;

Chapitre 2. Matériel et méthodes

- probabilité d'erreur de lecture de la base de 0.1%, Score PHRED = 30.

Chaque lecture est représentée par 4 lignes (Figure 15) :

- la première ligne commence par le symbole '@' suivi d'un identifiant de séquence ;
- la seconde ligne correspond à la séquence ;
- la troisième ligne commence par '+' suivi éventuellement du nom de la séquence, encore une fois ;
- la quatrième ligne correspond à la séquence qualité de la 2^e ligne.

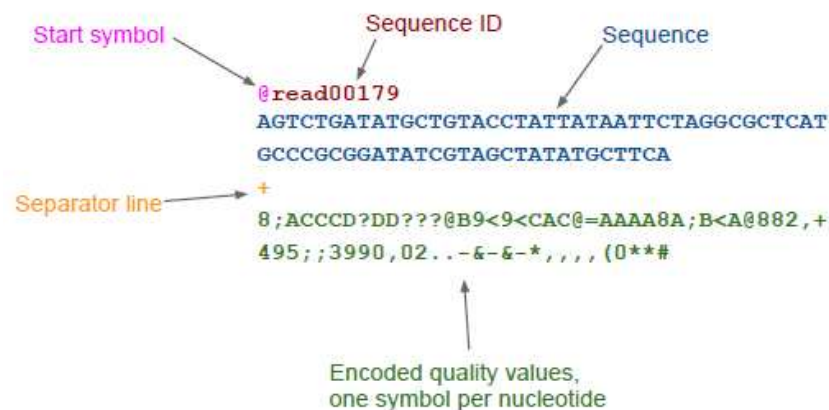


Figure 15. Exemple d'une séquence générée par Illumina Miseq.

Avant toute analyse de données NGS, un contrôle qualité des fichiers fastq reçus est nécessaire. Pour cela on a utilisé le logiciel FastQC (disponible gratuitement, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Ce logiciel permet de générer un rapport de la qualité moyenne sous forme HTML (HyperText Mark-Up Language). Après, différentes analyses sur les données ont été réalisées et pour chaque analyse un programme a été utilisé. Les amorces ont été éliminées des séquences en utilisant cutadapt (Martin, 2011) ; FLASH (Magoc et Salzberg, 2011) est un outil appliqué pour assembler les paired end reads. Ces derniers ont subi ensuite un débruitage (denoising) en ASV(s) (Amplicon Sequences Variants) (Callahan *et al.*, 2017) en utilisant DADA2 (version 1.10.1) (Callahan *et al.*, 2016). Les ASV(s) résultants ont été alignés avec le pipeline BioMaS (Bioinformatic analysis of Metagenomic AmpliconS, Fosso *et al.*, 2015) contre la

Chapitre 2. Matériel et méthodes

base de données SILVA, version 138 NR 99 (Pruesse *et al.*, 2007) et les ASVs affiliés aux chloroplastes ont été éliminés.

Les séquences de l'ARNr 16S ont été stockées dans la base des données brutes Sequence Read Archive (SRA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>) sous la référence PRJNA612648.

SRA est un format d'archive de l'INSDC (International Nucleotide Sequence Databases Collaboration, entre DDBJ, DNA DataBank of Japan, ENA, European Nucleotide Archive, and GenBank). Le centre Américain pour les informations biotechnologiques (National Center for Biotechnology Information, NCBI) maintient la base de données SRA comme dépôt des données issues des technologies de séquençage à haut-débit (454 de Roche, Illumina, SOLiD d'Applied Biosystems...).

L'abondance relative des séquences a été calculée sur la base du nombre total des séquences et les ASVs observés par échantillon.

3.3.5. Recherches des gènes reliés à la synthèse de métabolites secondaires toxiques

Quatre gènes ; *mcyE*, *cynJ*, *anaF* et *sxtI* ; responsables de la synthèse des microcystines (MCs), cylindrospermopsines (CYNs), anatoxines (ANAs) et saxitoxines (STXs), respectivement, ont été recherchés. Les caractéristiques des amorces et des programmes de PCR suivis pour chaque amplification sont représentées dans le tableau 2.

L'amplification de chacun de ces gènes a été réalisée dans un volume total de 18 µL contenant 2 µL de tampon PCR (Qiagen), 1.2 µL de MgCl₂, 0.5 µL de dNTPs (2 mM), 1 µL de chaque amorce (10 mM), 1 µL d'ADN génomique et 0.1 µL de Taq DNA Pol (Qbiogene) dans un volume d'eau milli Q de 12.8 µL.

Les contrôles positifs contenaient 1 µL d'ADN des souches *M. aeruginosa* UAM 247, *A. issatchenkii* SP 33, *A. gracile* UAM 529 et *A. ovalisporum* UAM 290, de la collection de l'Université Autonome de Madrid (UAM), productrices de MCs, ANAs, STXs et CYNs, respectivement.

L'amplification du gène *mcyE* a été réalisée selon les conditions suivantes : une dénaturation initiale à 92 °C pendant 2 min et 30 cycles à 92 °C pendant 20 s, 52 °C pendant 30 s et 72°C pendant 1 min.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Le gène *cynJ* a été amplifié sous les conditions suivantes: une dénaturation initiale à 94 °C pendant 3 min et 30 cycles à 55 °C pendant 10 s, 55 °C pendant 20 s, 72 °C pendant 3 min et une étape d'extension finale à 72°C pendant 7 min.

Pour les deux gènes *anaF* et *sxtI*, les conditions de PCR sont les suivantes : une dénaturation initiale à 94 °C pendant 4 min et 30 cycles à 94 °C pendant 10 s, 55 °C pendant 20 s, et 72 °C pendant 1 min.

Tableau 2. Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification des gènes reliés à la synthèse des toxines.

Gene ciblé / taille (pb)	Paire d'amorce utilisée	Séquence	Référence
<i>mcyE</i> / 472	HEPF HEPR	TTTGGGGTTAACTTTTTTGGCC AATTCTTGAGGCTGTAAATCGG	Jungblut et Neilan, 2006
<i>cynJ</i> / 578	cynsulfF cylnamR	ACTTCTCTCCTTTCCCTATC GAGTGAAAATGCGTAGAACTTG	Mihali <i>et al.</i> (2008)
<i>anaF</i> / 461	atxoaf atxar	TCGGAAGCGCGATCGCAAATCG GCTTCCTGAGAAGGTCCGCTAG	Ballot <i>et al.</i> (2010)
<i>sxtI</i> / 960	sxtaf sxtar	AGCGCTGCCGCTATGGTTGTCG ACGCAATGAGGGCGACACCAC	Casero <i>et al.</i> (2014)

Les produits de PCR ont été analysés via une électrophorèse en gel d'agarose. Ce gel contenant 1.5% (p/v) d'agarose dans du tampon TAE 1X (Tris-Acétate-EDTA, pH 8). Le colorant GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Bromure d'éthidium) (Biotium, Hayward, CA) a été incorporé au gel (0.01 µL/mL); lors de la migration, il s'intercale entre les bases d'ADN et émet une fluorescence lorsqu'il est exposé à la lumière Ultraviolet (UV). Après la polymérisation du gel, dans chaque puits 5 µL de chacun des produits de PCR et 3 µL du tampon bleu de bromophénol ont été mélangés et déposés. Trois microlitres (3 µL) d'un marqueur de taille moléculaire Gel pilot 1 kb Plus Ladder (DNA molecular Weight Markers de QIAGEN, Figure 16) ont été également déposés dans l'un des puits pour estimer la taille des fragments obtenus. La migration du gel a été faite à 100 V pendant 90 min et la révélation des bandes a été effectuée sous transillumination aux UV avec un

système de documentation sur gel (Gel Doc 1000, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).

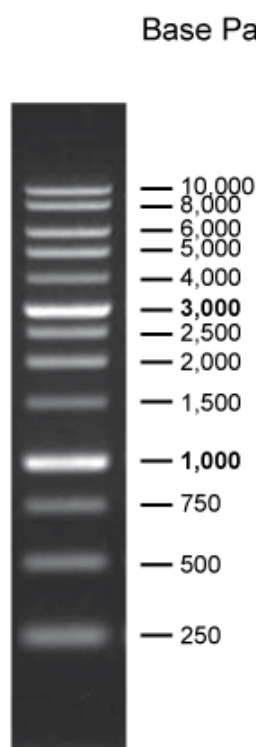


Figure 16. Marqueur de taille moléculaire 1 kb Plus Ladder.

3.3.6. Extraction et identification des toxines

3.3.6.1. Extraction

Chaque filtre a été placé dans un volume suffisant (15 mL) de méthanol (MeOH) (50%, v/v) et soumis à une macération mécanique par ultrasonication (Vibra cell, Sonics & Materials Inc. Danbury, Connecticut, USA) dans un bain de glace pendant 5 min à 60 Hz. Le surnageant a été ensuite récupéré par centrifugation à 4995 g pendant 5 min à 4 °C (GYROZEN 2236R, High Speed Centrifuge, KOREA) et conservé à 4 °C. Le culot a été dissout dans du MeOH (50%, v/v) et conservé à 4 °C pendant une nuit pour une deuxième extraction. Les surnageants collectés des deux extractions ont été séchés dans un évaporateur rotatif (Rotavapor R-300, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) (<35 °C ; <150 mbar) et l'extrait sec a été dissout dans un volume de 1.5 ml de MeOH (50%, v/v) et conservé à -20 °C.

3.3.6.2. Identification

L'identification des toxines a été réalisée premièrement par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) couplée à un Détecteur Photodiode Array (HPLC/PDA) (Churro *et al.*, 2017) en utilisant un système *HPLC* Waters® Alliance e2695 (Milford, MA) couplé à un détecteur PDA 2998, en suite par Chromatographie Liquide - Ionisation Electrospray - Spectrométrie de Masse (LC-ESI-MS/MS) (Mayumi *et al.*, 2006) pour confirmer l'identité des pics.

- **HPLC/PDA** : l'élution a été réalisée sur une colonne Merck® Lichrospher RP-18 (5 µm, 250 mm × 4.6 mm i.d.) maintenue à 45 °C. La phase mobile est constituée de MeOH à 0,1% d'acide trifluoroacétique TFA (Solvant A) et du TFA à 0,1% d'eau Milli-Q (Solvant B). Le volume injecté est de 20 µL et le flux étant de 0.9 mL par min pendant 30 min ; le détecteur PDA balaye le domaine 200-400 nm. Le programme du gradient utilisé est représenté dans le tableau 3.

Tableau 3. Gradient d'élution utilisé en HPLC-PDA pour l'analyse des MCs.

Temps (min)	0	5	10	15	15.1	20
Solvant A (%)	55	65	80	100	55	55
Solvant B (%)	45	35	20	0	45	45

Les MCs ont été identifiées sur la base de leur spectre UV caractéristique, et leur temps de rétention avec le logiciel Empower 2™ Chromatography Data Software. La MC-LR (Cyano Biotech GmbH, Berlin) a été utilisée comme variante standard.

- **LC-ESI-MS/MS** : l'analyse a été réalisée en *Full scan* (270-2000 m/z) en utilisant une plateforme Liquid Phase Chromatograph Finnigan Surveyor (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), couplée d'un détecteur de spectrométrie (MS Mass LCQ Fleet™ ion trap) avec une source d'ionisation de type electrospray (ESI), comprenant une pompe Surveyor LC, un passeur d'échantillons Surveyor et un détecteur Surveyor Photoelectric Diodearray (PDA).

Chapitre 2. Matériel et méthodes

La séparation a été réalisée sur une colonne C₁₈ Hypersil Gold column (100 × 4.6 mm I.D., 5 µm, ThermoScientific, Waltham, MA, USA) maintenue à 25 °C, avec un gradient d'élution d'acétonitrile (phase mobile A) et d'eau (phase B) contenant 0.1% d'acide formique. Les proportions utilisées sont les suivantes : 55% A et 45% B à 0 min, 90% A et 10% B à 12 min, 100% A à 12.5 min, 100% A à 15 min, 45% A et 55% B à 15.01 et 25 min. Ces derniers circulent avec un débit de 0.7 mL/min et le volume d'injection est de 20 µL d'échantillon.

Les paramètres optimaux d'ionisation sont les suivants : une tension capillaire maintenue à 22 kV ; une tension de pulvérisation de 5.5 kV et une température capillaire maintenue à 350 °C. Les spectres de fragmentation sont collectés avec une énergie de collision de 35 électrons-volts (eV) et l'ensemble des modules sont pilotées par le logiciel XcaliburTM version 2 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). L'identification a été réalisée en comparant les masses moléculaires (m/z) des masses éluées avec celles décrites dans la littérature.

4. Etudes des cyanobactéries isolées

4.1. Isolement des cyanobactéries

Après un enrichissement sur milieu liquide d'une durée de 20-30 jours, l'isolement des cyanobactéries a été réalisé par ensemencement sur gélose à 1.5% agar. Les boîtes ont été observées régulièrement sous microscope inversé Leica® DMi8; après plusieurs repiquages sur de nouvelles boîtes, les souches isolées ont été maintenues sur milieu liquides dans des bouteilles de culture de 75 cm³ (Greiner Bio-One, Germany). L'isolement et le maintien des cyanobactéries ont été réalisés sur le milieu BG11 (Annexe 1) (Rippka *et al.*, 1979), dans une chambre de culture (Figure 17) avec un cycle 14:10 h lumière /obscurité à 19 ± 1 °C. La croissance des microorganismes eucaryotes a été inhibée par l'addition du Cyclohexemide (Sigma) à 100 µg mL⁻¹ au milieu de culture dans les premières étapes de l'isolement (Rippka, 1988).



Figure 17. Chambre de culture du CIIMAR (Porto, Portugal).

4.2. Caractérisation morphologique

L'observation microscopique des souches isolées a été réalisée sous microscope optique Olympus BX5 à 100 x, 400 x et 1000 x magnifications. Des photographies ont été prises avec une caméra Leica® DFC550 et les dimensions des cellules ont été déterminées à partir de 100 cellules pour chaque souche à 1000 x magnification à l'aide du logiciel Leica® Las. La classification taxonomique est déterminée selon les critères de Komárek et Anagnostidis (1999, 2005).

4.3. Extraction d'ADN

L'ADN génomique a été extrait avec le Kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen, San Diego, CA) selon les instructions du fabricant. La qualité de l'ADN a été vérifiée avec électrophorèse sur gel d'agarose à 1.0 % puis l'ADN extrait a été conservé à -20 °C jusqu'à utilisation.

4.4. Amplifications du gène de l'ARNr 16S et séquençage

Le gène de l'ARNr 16S a été amplifié en utilisant les amorces CYA359F/ CYA781R (GGGGAATYTTCCGCAATGGG/ GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT) (Nübel *et al.*, 1997) et 27F1/1494Rc (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG/ TACGGCTACCTTGTTACGAC (Neilan *et al.*, 1997). Les réactions PCRs ont été réalisées avec le thermocycleur Biometra TProfessional gradient thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany), dans un volume final de 20 µL.

Le mélange de la réaction contenait 1 µL du tampon 5× Green GoTaq® Flexi (Promega), 1.5 µL de MgCl₂ (25 mM), 1.25 µL de chaque amorce (0.1 µM), 3.13 µL de dNTPs mix (187.5 µM, Promega), 5 µL de BSA, 0.1 µL de GoTaq® DNA polymerase (0.5U, Promega), 1 µL d'ADN et 6.37 µL d'eau milli Q.

Les conditions de la réaction PCR sont: dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min, suivie par 35 cycles avec une dénaturation à 95°C pendant 1 min, hybridation à 55°C pendant 45s et extension à 72°C pendant 1 min.

Les produits de PCR ont été examinés sur gel d'agarose à 1.0% révélé avec SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) puis purifiés avec le kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Germany) selon les instructions du fabricant.

Les produits purifiés ont été séquencés selon la méthode de Sanger *et al.* (1977) par l'entreprise GATC Biotech (Allemagne).

Pour les ADN dont les séquences sont de faibles qualités (à cause de la présence de bactéries contaminantes), un clonage a été réalisé.

Clonage

- **Vecteur utilisé**

Le kit TOPO[®] TA Cloning (Invitrogen) a été utilisé dans cette étape. Le vecteur utilisé est le plasmide pCR[™] 2.1-TOPO[®] (Annexe 2) d'une taille de 3,9 kb, il possède un gène de résistance à l'ampicilline et permet le clonage direct des produits de PCR présentant des bouts francs (Figure 18). Aucune digestion du vecteur n'est nécessaire parce qu'il est déjà sous forme linéaire.

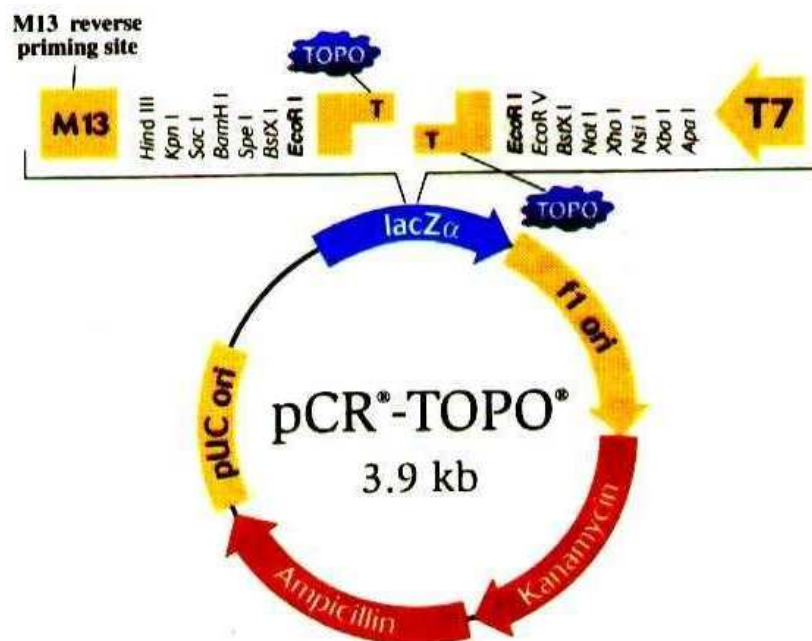


Figure 18. Le plasmide pCR[™] 2.1-TOPO[®]

- **Milieux de culture**

Le milieu solide Luria Bertani (LB, Biorad, Annexe 1) contenant $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ d'ampicilline a été utilisé pour la croissance et la sélection des cellules transformées. Les boîtes LB ont été additionnées de $40 \mu\text{L}$ d'X-gal (Bromo-5Chloro-4Indol-3 β -D-Galactopyranoside, 40 mg/ml dans la formamide) par étalement en surface.

Le milieu SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression, Sigma, Annexe 1) a été utilisé dans la dernière étape pour optimiser la transformation.

Les étapes sont les suivantes :

- **Ligation**

Un mélange de la réaction de ligation contenant $1 \mu\text{L}$ des produits PCR, $1 \mu\text{L}$ de la solution saline (1.5 M MgCl ; 0.06 M MgCl_2), $0.5 \mu\text{L}$ d'eau et $0.5 \mu\text{L}$ du vecteur pCR™ 2.1-TOPO® a été incubé pendant 20 min à température ambiante ensuite placé dans la glace.

- **Transformation**

Chaque tube eppendorf de la réaction de ligation a été additionné de $50 \mu\text{L}$ des cellules compétentes *Escherichia coli* OneShot® TOP10 (Invitrogen) et incubé dans la glace pendant 30 min, ensuite un choc thermique des cellules a été réalisé pendant 30 s à 42°C sans agitation. Puis, les tubes ont été transférés immédiatement dans la glace pendant 2 min. Dans l'étape suivante, $250 \mu\text{L}$ du milieu SOC ont été ajoutés à chaque tube eppendorf et incubés pendant 1h à 37°C avec agitation (180 rpm). $100 \mu\text{L}$ de chaque culture diluée ont été étalés sur les boîtes LB (boîtes diluées). Le reste des cultures a été centrifugé à 5000 g pendant 3 min. Environ $100 \mu\text{L}$ du surnageant ont été éliminés et le culot a été dissout dans le surnageant restant. Les cultures concentrées ont été étalées sur d'autres boîtes LB (boîtes concentrées) et le reste des cultures a été conservé à 4°C . Les boîtes ensemencées ont été incubées pendant une nuit à 37°C .

- **Analyse des cellules transformées**

Après une nuit d'incubation, les boîtes ont été placées pendant 20 min à 4°C. Les clones recombinants ont été ensuite transférés dans des tubes contenant 5 ml du milieu SOC additionné de 100 µg ml⁻¹ d'ampicilline, et mis en culture pendant une nuit à 37 °C avec agitation à 2000 rpm.

- **Isolement du plasmide et séquençage**

L'ADN du plasmide a été isolé en utilisant le kit GenElute™ Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) selon les instructions du fabricant. Les plasmides ont été séquencés bidirectionnellement, en utilisant les amorces : 27F1, CYA359F, CYA781R et 1494Rc, par la méthode de Sanger *et al.* (1977) par l'entreprise GATC Biotech (Allemagne).

4.5. Traitement des séquences du gène de l'ARNr 16S

Les séquences brutes sens et antisens (fichiers ab1) ont été assemblées avec le logiciel Geneious (version 8.1.8) puis déposées dans la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sous les références suivantes : OM401262, OM401263, OM401264, OM401265, OM401266, OM401267, OM401268, OM401269, OM401270, OM401271, OM401272, OM401273 et OM401274.

Les séquences obtenues ont été comparées avec les séquences publiées sur NCBI (accessible via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en utilisant l'algorithme BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide). Un arbre phylogénétique a été construit sur la base des résultats obtenus en utilisant le mode "One Click" de la plateforme online Phylogeny.fr (http://www.phylogeny.fr/simple_phylogeny.cgi, Dereeper *et al.*, 2008). La procédure comprend quatre étapes i: (1) alignement multiple par MUSCLE, (2) curation avec le programme Gblocks qui élimine les positions faiblement alignées et les régions divergentes, (3) phylogénie par PhyML (Phylogenetic estimation using Maximum Likelihood), et (4) visualisation de l'arbre par le programme TreeDyn. Dans cette méthode, un nouveau indice : test du rapport de vraisemblance approximatif (approximate likelihood-ratio test—aLRT) remplace la procédure de bootstrap.

4.6. Recherches de gènes reliés à la synthèse des toxines

L'amplification des gènes reliés à la synthèse des MCs (*mcyA*), l'amino- transférase (AMT) des complexes synthétases des MCs et des NODs (*mcyE*), des STXs (*sxtA*, *sxtG* et *sxtI*), des ANAs (*anaC*), et des CYNs (*cyrJ*) a été réalisée par PCR avec des amorces spécifiques (Tableau 4). Le volume des réactions de PCR, 18 µL, est composé de 2 µL du tampon 1 X PCR (Promega, Madison, WI, USA), 1.2 µL de MgCl₂ (2.5 mM), 0.5 µL de dNTPs (250 µM), 1 µL de chaque amorce (10 pmol), 0.1 µL de Taq DNA polymérase (0.5 U), 1 µL de l'ADN génomique et 12.8 µL d'eau milliQ.

L'amplification du gène *mcyA* a été réalisée selon les conditions suivantes: une dénaturation initiale à 95 °C pendant 2 min et 35 cycles à 95 °C pendant 90 s, 56 °C pendant 30 s, et 72 °C pendant 50 s et une extension finale à 72°C pendant 7 min (Saker et al., 2007). Le gène *mcyE* a été amplifié selon le programme suivant : une dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 min et 35 cycles à 95 °C pendant 60 s, 52 °C pendant 30 s, et 72 °C pendant 60 s avec une étape d'extension finale à 72°C pendant 5 min (Jungblut et Neilan, 2006). Les conditions de PCR pour les gènes *sxtA* et *sxtG* sont comme suit: une dénaturation initiale à 98 °C pendant 30 s, ensuite 35 cycles à 98 °C pendant 5 s, 62 °C pendant 5 s et 72 °C pendant 10 s, finalement 72 °C pendant 1 min (Savela et al., 2015). Pour le gène *sxtI*, les conditions PCR sont : 94 °C pendant 3 min et 35 cycles à 94 °C pendant 10 s, 52 °C pendant 20 s, et 72 °C pendant 60 s et une extension finale à 72°C pendant 7 min (Lopes et al., 2012). Les conditions de PCR pour le gène *cyrJ* sont : une dénaturation initiale à 94 °C pendant 3 min et 30 cycles à 94 °C pendant 10 s, 50 °C pendant 20 s, et 72 °C pendant 60 et une étape d'extension finale à 72°C pendant 7 min (Mihali et al., 2008). Pour le gène *anaC*, les conditions PCR sont comme suit : une dénaturation initiale à 94 °C pendant 2 min et 35 cycles à 94 °C pendant 30 s, 58 °C pendant 30 s, et 72 °C pendant 30 s et une élongation à 72°C pendant 5 min (Rantala-Ylinen et al., 2011).

La souche *M. aeruginosa* LEGE 91339 a été utilisée comme contrôle positif pour les gènes *mcyA* et *mcyE*, *A. gracile* LMECYA 040 pour les gènes *sxtA*, *sxtG* et *sxtI*, *C. raciborskii* LEGE 97047 et *Anabaena* sp. LEGE X-002 pour les gènes *cyrJ* et *anaF*, respectivement. Ces souches appartiennent à la collection de culture du laboratoire de Biotechnologie

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Bleue et d'Ecotoxicologie (Blue Biotechnology and Ecotoxicology Culture Collection, LEGE-CC) du CIIMAR (Porto, Portugal).

Les réactions de PCR ont été réalisées avec les thermocycleurs Veriti thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ou Biometra TProfessional gradient thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany). Les produits de PCR obtenus ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.0% coloré avec SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) et photographiés sous transillumination UV avec un système de documentation de gel (Gel Doc 1000, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Tableau 4. Caractéristiques des amorces utilisées dans les réactions PCR.

Genes	Amorces	Sequence (5'-3')	Taille (bp)	Reference
<i>mcyA</i>	mcyA-Cd1F	AAAATTAAAAGCCGTATCAAA	297	Hisbergues <i>et al.</i> 2003
	mcyA-Cd1R	AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT		
<i>mcyE</i>	HEPF	TTTGGGGTTAACTTTTTTGGGCATAGTC	472	Jungblut et Neilan, 2006
	HEPR	AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGTTT		
<i>sxtA</i>	sxtA855F	GACTCGGCTTGTTGCTTCCCC	648	Savela <i>et</i> <i>al.</i> 2015
	sxtA1480R	GCCAAACTCGCAACAGGAGAAGG		
<i>sxtG</i>	sxtG432F	AATGGCAGATCGCAACCGCTAT	519	Savela <i>et</i> <i>al.</i> 2015
	sxtG928R	ACATTCAACCCTGCCCATTCAT		
<i>sxtI</i>	sxtI 682F	GGATCTCAAAGAAGATGGCA	200	Lopes <i>et al.</i> 2012
	sxtI 877R	GCCAAACGCAGTACCACTT		
<i>cyrJ</i>	cynsulF	ACTTCTCTCCTTTCCCTATC	584	Mihali <i>et</i> <i>al.</i> 2008
	cylnamR	GAGTGAAAATGCGTAGAACTTG		
<i>anaC</i>	anaC-genF	TCTGGTATTCAGTCCCCTCTAT	366	Rantala- Ylinen <i>et</i> <i>al.</i> 2011
	anaC-genR	CCCAATAGCCTGTCATCAA		

Chapitre 3. Résultats

1. Etude des échantillons naturels

1.1. Paramètres physico-chimiques et qualité de l'eau

Les résultats de quelques paramètres environnementaux et l'état trophique des eaux du réservoir Cheffia déterminés au cours de la période Octobre-Novembre 2014 sont représentés dans le tableau 5. La température de l'eau varie entre 29.0 °C au début du mois d'Octobre et 21.0 °C à la fin du mois de Novembre avec une valeur moyenne d'environ 24 °C. Des concentrations élevées de nutriments ont été observées ; des teneurs d'azote inorganique total entre 13.34-19.07 mg L⁻¹ et des teneurs de phosphore total entre 2.02-6.30 mg L⁻¹.

Tableau 5. Caractéristiques physico-chimiques des eaux du réservoir Cheffia pendant la période Octobre-Novembre 2014.

Echantillons Paramètres	Echantillon 1 (13.10.2014)	Echantillon 2 (09.11.2014)	Echantillon 3 (22.11.2014)
Température (°C)	29.0	22.5	21.0
NO₃⁻ (mg L⁻¹)	0.42	3.15	1.07
NO₂⁻ (mg L⁻¹)	12.92	14.31	11.65
NH₄⁺ (mg L⁻¹)	2.39	1.61	0.62
PT (mg L⁻¹)	2.02	6.30	3.49

1.2. Observation microscopique des cyanobactéries

1.2.1. Genres et espèces identifiés

Sur la base des critères morphologiques définis par Komárek et Anagnostidis (1999, 2005), des formes coloniales caractéristiques du genre *Microcystis* ont été observées (Tableau 6, Figure 19) avec une grande diversité morphologique. Quelques morphotypes ont été identifiés au niveau spécifique, il s'agit de *M. aeruginosa*, *M. novacekii*, *M. panniformis*, *M. ichthyoblabe* et *M. flos-aquae*. Pour les formes filamenteuses, deux groupes ont été identifiés : l'ordre des Oscillatoriales représenté par les genres

Planktothrix, *Planktothricoides*, *Oscillatoria*, et *Phormidium* et l'ordre des Nostocales caractérisé par la présence du genre *Aphanizomenon* (Tableau 7, Figure 20).

Tableau 6. Caractéristiques des colonies observées au niveau du réservoir Cheffia.

Espèce	Caractéristiques	Figure
<i>M. aeruginosa</i>	Colonie mucilagineuse, microscopique, irrégulière, souvent macroscopique, allongée, 600-900 µm de diamètre, composée de sub-colonies, avec un contour irrégulier et un grand nombre de cellules condensées. Mucilage incolore, diffluent, avec un contour visible. Cellules sphériques avec vésicules à gaz et un diamètre de 4-6 µm.	19 (A)
<i>M. novacekii</i>	Colonie microscopique, parfois macroscopique, subdivisée en sub-colonies, souvent sphériques et compactes. Mucilage incolore, irrégulier, délimité, non diffluent, mais avec un contour rétractif. Cellules sphériques, condensées, de 3-5.5 µm de diamètre et avec vésicules à gaz.	19 (B)
<i>M. panniformis</i>	Colonie irrégulière, macroscopiques. Mucilage incolore. Cellules sphériques, de 2.5-4 µm de diamètre et arrangées irrégulièrement dans la colonie.	19 (C)
<i>M. ichthyoblabe</i>	Colonie sphérique, irrégulière et composée de groupes de cellules. Mucilage homogène et incolore. Cellules sphériques de 2-3 µm de diamètre.	19 (D, E)

Tableau 6. (Suite)

<i>M. flos-aquae</i>	Colonie microscopique, plus ou moins sphérique avec contour irrégulier, compacte et composée d'une grande densité de cellules. Enveloppe mucilagineuse fine, hyaline et incolore. Cellules sphériques, de 3.6-4.2 µm de diamètre et avec vésicules à gaz.	19 (F, G)
<i>Microcystis</i> sp.	Colonies microscopiques ou macroscopiques, avec différentes formes (sphériques, ovales, allongées ou irrégulières), avec une grande densité des cellules arrangées dans un mucilage commun. Mucilage fin, incolore, souvent homogène, diffluent ou délimité et parfois avec un contour rétractif. Cellules sphériques avec vésicules à gaz et un diamètre supérieur à 3 µm.	19 (H-Q)

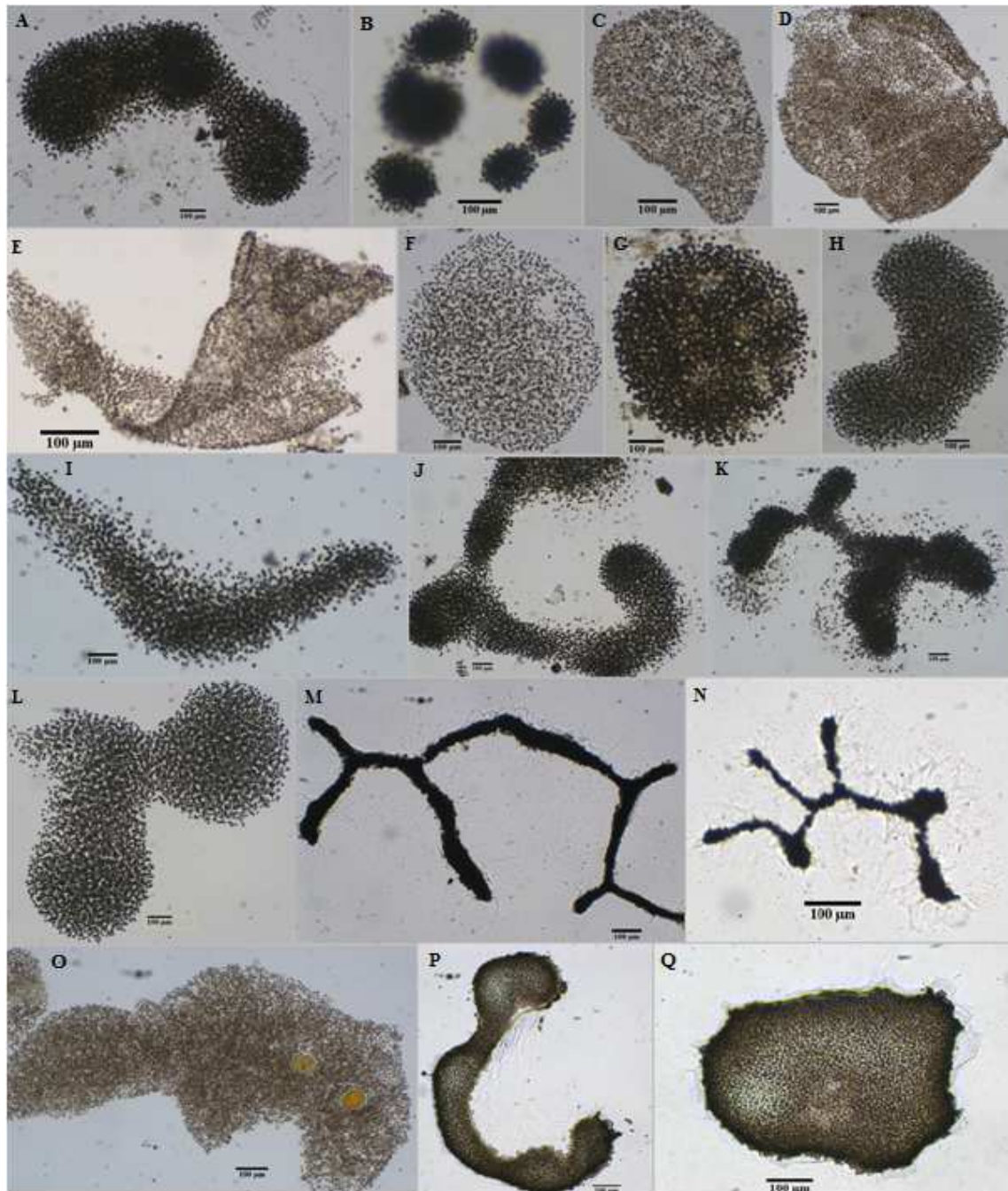


Figure 19. Morphotypes des formes coloniales des cyanobactéries du réservoir Cheffia. (A) *M. aeruginosa*, (B) *M. novacekii*, (C) *M. panniformis*, (D-E) *M. ichthyoblabe*, (F-G) *M. flos-aquae*, (H-Q) *Microcystis* sp.

Tableau 7. Caractéristiques des formes filamenteuses observées au niveau du réservoir Cheffia.

Espèce	Caractéristiques	Figure
<i>Planktothrix pseudagardhii</i>	Trichome droit avec une gaine mucilagineuse, sans étranglements aux parois transversales et de 4-6.4 μm de largeur. Cellules avec vésicules à gaz, de 1.2-3.2 μm de longueur ; les cellules apicales sont arrondies.	20 (a)
<i>P. agardhii</i>	Trichome droit, de 3-5 μm de largeur, sans d'étranglements aux parois transversales. Cellules courtes qui contiennent des vésicules à gaz, les cellules apicales sont arrondies.	20 (b)
<i>Planktothricoides raciborskii</i>	Trichome solitaire, plus ou moins droit, isopolaire, sans étranglements aux parois transversales, de 4-6 μm de largeur, avec enveloppe fine incolore et de petites vésicules à gaz. Les cellules terminales sont atténuées.	20 (c)
<i>Oscillatoria</i> sp.	Trichome droit avec des étranglements aux parois transversales. Les cellules sont courtes, discoïdes, de 2-4 μm de longueur, finement granulées, sans vésicules ; les cellules apicales sont arrondies sans paroi épaisse.	20 (d)
<i>Oscillatoria</i> sp.	Trichome légèrement incurvé, de 20-25 μm de largeur avec des étranglements aux parois transversales. Les cellules sont discoïdes, de 3-4 μm de longueur ; les cellules terminales sont atténuées.	20 (e)
<i>Oscillatoria</i> sp.	Trichome droit ou faiblement incurvé, avec étranglements aux parois transversales, de 9-11.5 μm de largeur. Les cellules sont courtes, de 2-4 μm de longueur, finement granulées, sans vésicules à gaz. Les cellules apicales sont arrondies et non atténuées.	20 (f)

Tableau 7. (Suite)

Espèce	Caractéristiques	Figure
<i>Phormidium</i> sp.	Trichome isopolaire, plus ou moins droit, de 4-7 µm de largeur, avec une enveloppe ferme, incolore. Les cellules contiennent des granules mais pas de vésicules à gaz; les cellules terminales sont atténuées et pointues.	20 (g)
<i>Aphanizomenon</i> sp.	Cellules végétatives hyalines, cylindriques, de 7.1-9.2 x 3.4-4.2 µm. Cellules terminales allongées, cylindriques, pointues, sans vésicules à gaz. Hétérocystes intercalaires, solitaires, cylindriques, de 6.2-7.0 x 3.1-3.6 µm. Akinètes intercalaires, longues, cylindriques, distantes des hétérocystes, 40-52 x 5.7-6.5 µm.	20 (h)

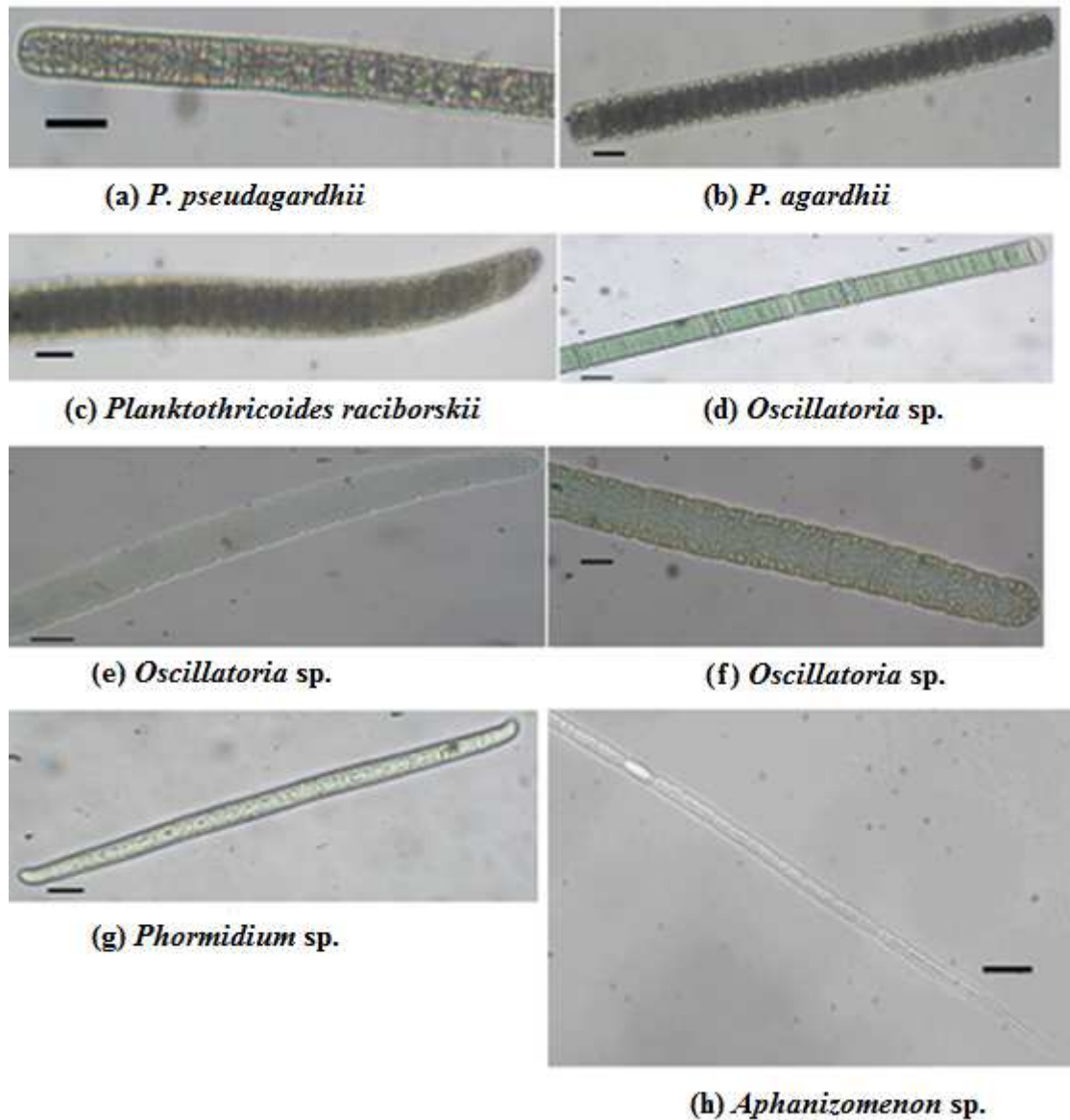


Figure 20. Morphotypes des formes filamenteuses des cyanobactéries du réservoir Cheffia.
Barre d'échelle = 20 μm.

1.2.2. Distribution des cyanobactéries

Parmi les six genres identifiés au cours de la période d'étude, uniquement trois genres: *Microcystis*, *Planktothrix* et *Planktothricoides* ont été identifiés dans tous les échantillons (Tableau 8).

Tableau 8. Distribution des cyanobactéries identifiées au niveau du réservoir Cheffia par investigation morphologique durant la période Octobre-Novembre 2014.

Taxons	13.10. 2014	09.11. 2014	22.11.2014
<i>M. aeruginosa</i>		x	x
<i>M. novacekii</i>		x	
<i>M. panniformis</i>	x		x
<i>M. ichthyoblabe</i>	x		x
<i>M. flos-aquae</i>			x
<i>Microcystis</i> sp.	x	x	x
<i>P. pseudagardhii</i>	x	x	x
<i>P. agardhii</i>	x	x	x
<i>Planktothricoides</i>	x	x	x
<i>Oscillatoria</i>	x		
<i>Phormidium</i>	x		
<i>Aphanizomenon</i>			x

1.3. Concentrations et puretés des ADN extraits

L'ADN total des échantillons a été extrait avec le kit miniature DNeasy Plant (QIAGEN, Hilden, Allemagne) et la concentration et la pureté ont été mesurées avec spectrophotométrie à 260 et 280 nm (Thermo Scientific Nanodrop ND-1000). Des concentrations d'ADN de 14.5, 13.3 et 18.7 ng/μL ont été obtenues pour les trois échantillons, respectivement. La pureté des ADN extraits évaluée par le rapport de l'absorbance à 260 nm et 280 nm, a donné des valeurs de 1.92, 1.90 et 2.12 des trois échantillons, respectivement. Un rapport d'environ 1.8 est généralement acceptable.

1.4. Traitement des séquences de l'ARNr 16S

1.4.1. Analyse statistique de qualité

Avec la technologie Illumina Miseq, deux librairies par échantillon ont été construites, il s'agit d'un séquençage des deux cotés d'un segment d'ADN avec un chevauchement des séquences au centre ce qui permet de reconstruire un brin d'une longueur supérieure à chacun des deux brins initiaux, c'est ce qu'on appelle paired-end. Les analyses statistiques de qualité avec FastQC ont montré que les longueurs des lectures des trois échantillons obtenues par illumina Miseq varient entre 35 et 301 pb (Tableau 9) avec une majorité des séquences de longueur supérieure à 290 pb (Figures 21, 22, 23, 24, 25 et 26). Le nombre des séquences de faible qualité est nul et le GC% varie entre 52 et 55% (Tableau 9).

Tableau 9. Statistiques de base des séquences de l'ARNr16S des trois échantillons des cyanobactéries obtenues par FastQC.

Echantillon/lecture	Nombre total de séquences	Séquences de faible qualité	Longueur des séquences (pb)	GC%
13.10.2014 / lecture 1	369 687	0	35-301	52
13.10.2014 / lecture 2	369 687	0	35-301	53
09.11.2014 / lecture 1	355 398	0	35-301	54
09.11.2014 / lecture 2	355 398	0	35-301	55
22.11.2014 / lecture 1	407 004	0	35-301	52
22.11.2014 / lecture 2	407 004	0	35-301	53

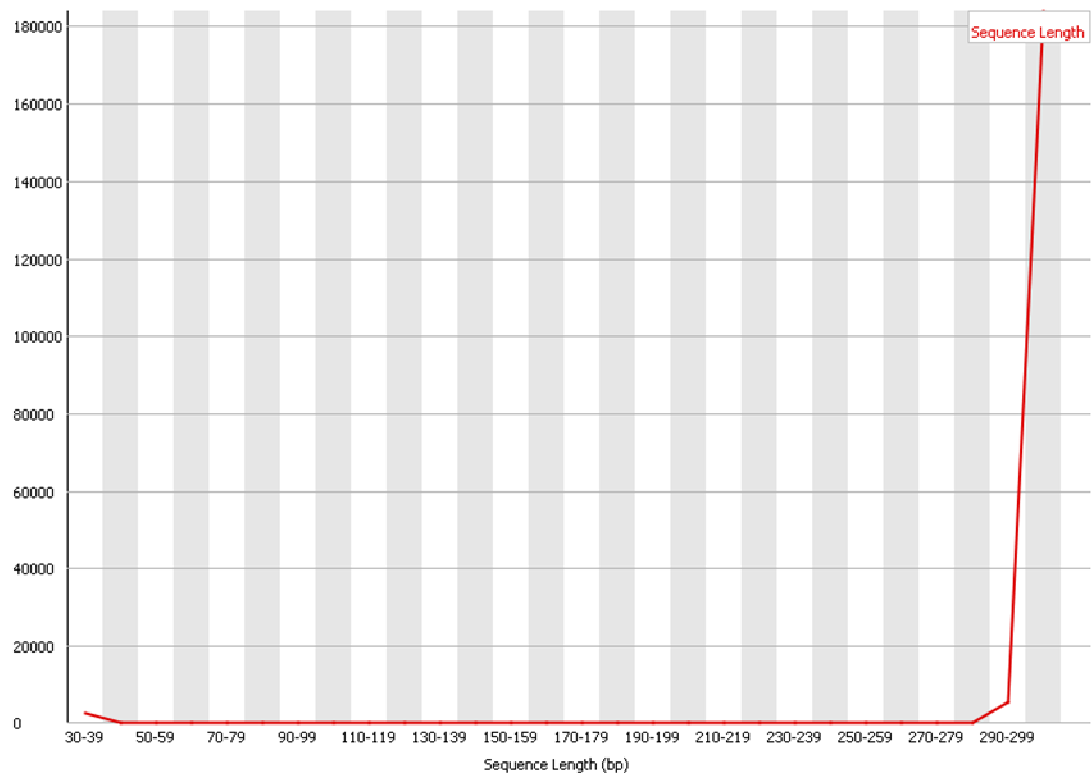


Figure 21. Distribution des longueurs des séquences sur toutes les séquences de l'ARNr16S de la lecture 1, échantillon 1.

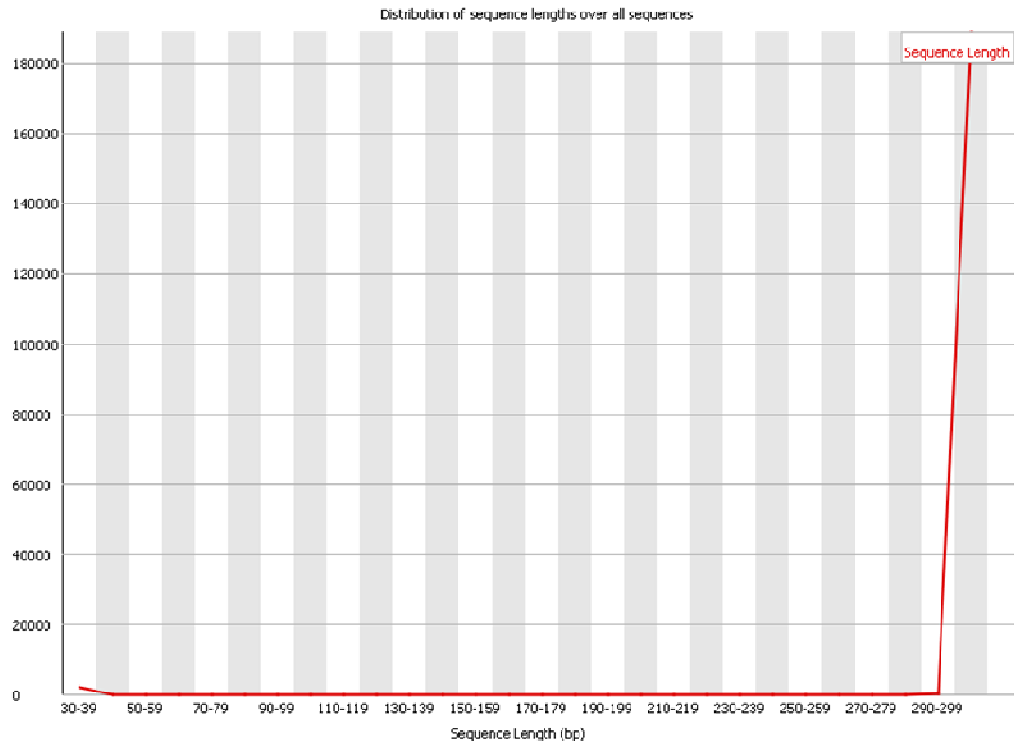


Figure 22. Distribution des longueurs des séquences sur toutes les séquences de l'ARNr16S de la lecture 2, échantillon 1.

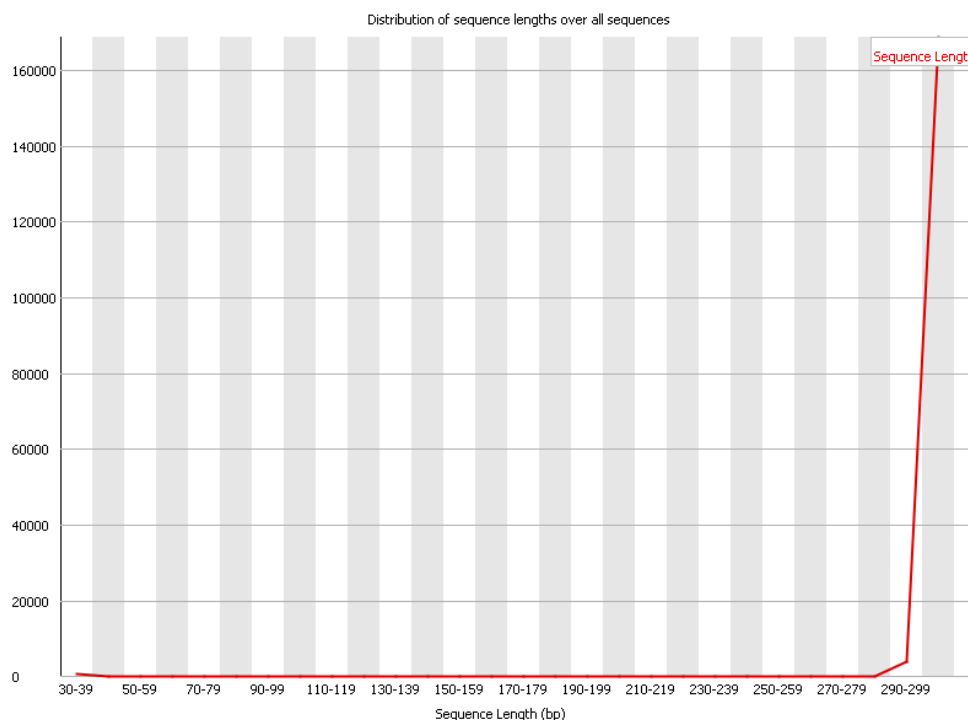


Figure 23. Distribution des longueurs des séquences sur toutes les séquences de l'ARNr16S de la lecture 1, échantillon 2.

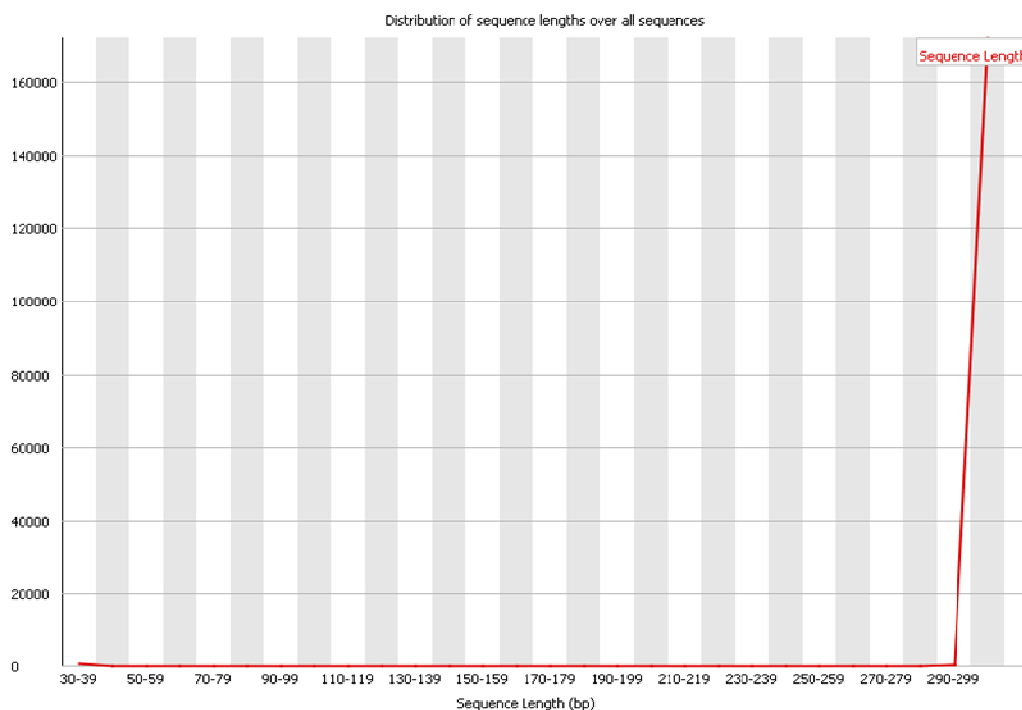


Figure 24. Distribution des longueurs des séquences sur toutes les séquences de l'ARNr16S de la lecture 2, échantillon 2.

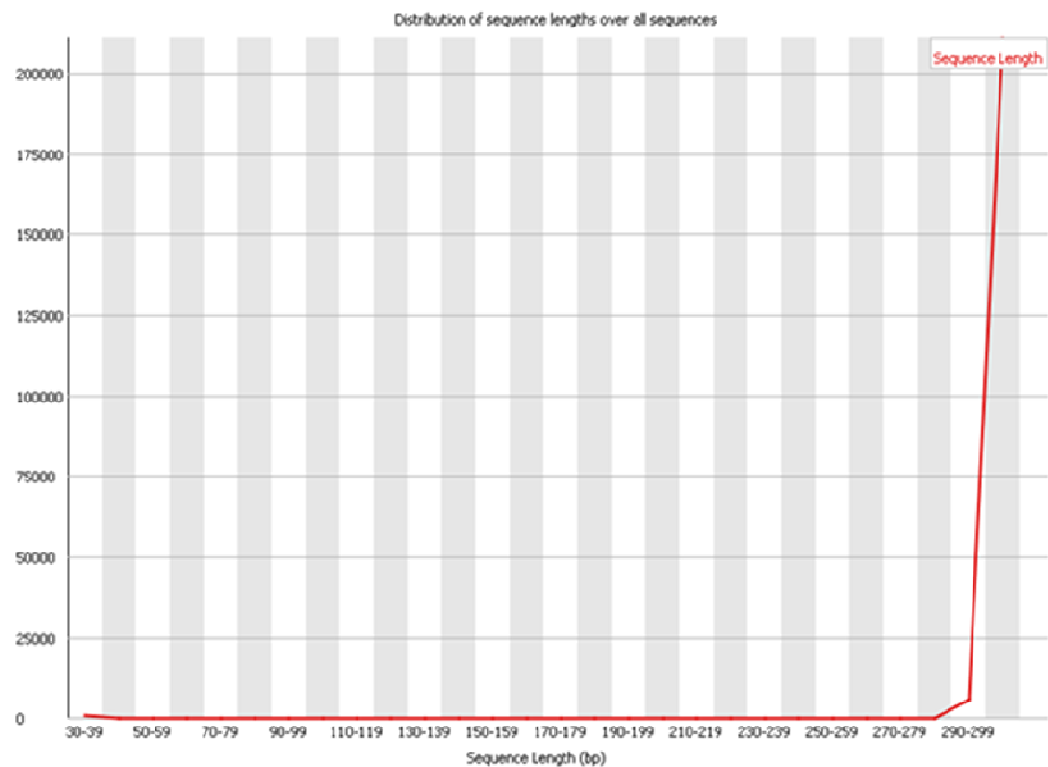


Figure 25. Distribution des longueurs des séquences sur toutes les séquences de l'ARNr16S de la lecture 1, échantillon 3.

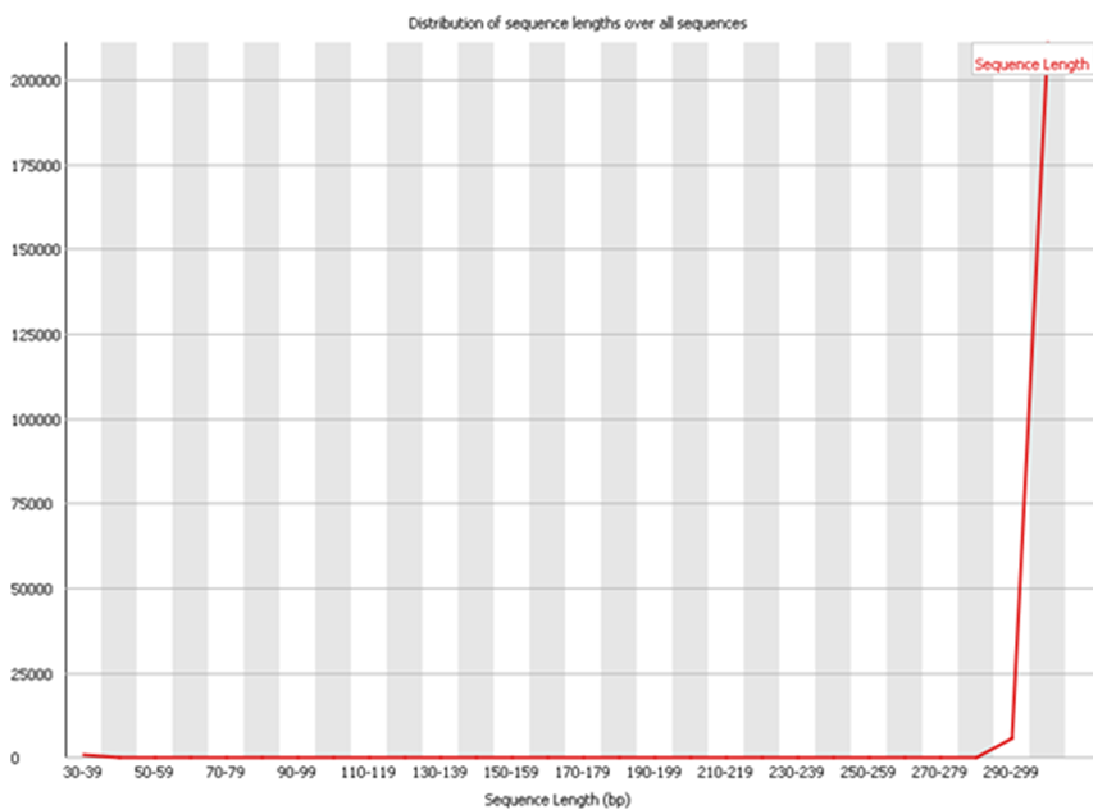


Figure 26. Distribution des longueurs des séquences sur toutes les séquences de l'ARNr16S de la lecture 2, échantillon 3.

1.4.2. Classification taxonomique

Les séquences du gène de l'ARNr 16S obtenues ont été traitées par plusieurs logiciels pour la détermination de l'identité des cyanobactéries présentes dans le réservoir Cheffia. A partir d'un nombre total de 1,132,089 séquences brutes, après traitement, plus de 53% des séquences initiales ont été retenues (Tableau 10). Néanmoins, plus de 130,000 séquences par échantillon ont été conservées. Sur la base de la classification taxonomique, environ 99.19 % des séquences retenues (271 ASVs) correspondait aux cyanobactéries (Tableau 10) avec élimination de 57 séquences attribuées aux chloroplastes.

Tableau 10. Résultats de l'analyse des séquences de l'ARNr 16S obtenues par illumina Miseq.

Echantillons	13.10.14	09.11.14	22.11.14
Lectures brutes (nombre)	369 687	355 398	407 004
Lectures assemblées (%)	91,09	90,25	90,74
Lectures retenues après débruitage (%)	54,68	52,48	52,82
Lectures affiliées aux cyanobactéries (%)	99,44	99,58	98,55

Les analyses des données statistiques ont montré que les séquences affiliées aux cyanobactéries dans les trois échantillons sont distribuées entre trois ordres dominants : Chroococcales (34,6%), Nostocales (33,3%) et Oscillatoriales (31,9%). Des pourcentages de 0.013% et 0.008% correspondaient aux ordres des Synechococcales et Chroococcidiopsidales, respectivement.

Au total, 28 genres de cyanobactéries ont été identifiés ; *Microcystis* représentait la première position des séquences (34.2%) suivi par les genres *Aphanizomenon* (20.1%) et *Planktothrix* (20.0%). Les genres *Planktothricoides*, *Cylindrospermopsis*, *Sphaerospermopsis* et *Pseudanabaena* étaient présents mais constituaient une minorité de la population des cyanobactéries ; les pourcentages sont les suivants : 8.6%, 7.1%, 6.0% et 2.4%, respectivement. La fraction des cyanobactéries identifiées avec un pourcentage inférieur à 1% correspondait aux genres *Roseofilum* (0.4 %), *Cyanobium* (0.4 %) et

Phormidium (0.4 %). Les cyanobactéries identifiées avec un pourcentage inférieur à 0.1% appartenait aux genres : *Oscillatoria*, *Leptolyngbya*, *Pantalinema*, *Synechocystis*, *Merismopedia*, *Gloeocapsa*, *Prochlorothrix*, *Nodosilinea*, *Tychonema*, *Chroococcidiopsis*, *Aliterella*, *Scytonema*, *Tolypothrix*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Rivularia*, *Arthrospira* et *Dolichospermum*.

1.4.3. Abondance relative

Le plus grand nombre des ASVs a été observé dans la communauté des cyanobactéries du premier prélèvement (135 ASVs), suivi du troisième échantillon (116 ASVs) par contre la communauté du deuxième prélèvement a montré le plus faible nombre (57 ASVs). La composition taxonomique des trois échantillons a montré des différences des valeurs d'abondance relative (Figures 27-28). L'ordre des Nostocales a été complètement absent au deuxième point d'échantillonnage (c.-à-d. 09.11.14) tandis que le premier et le troisième sont plus similaires.

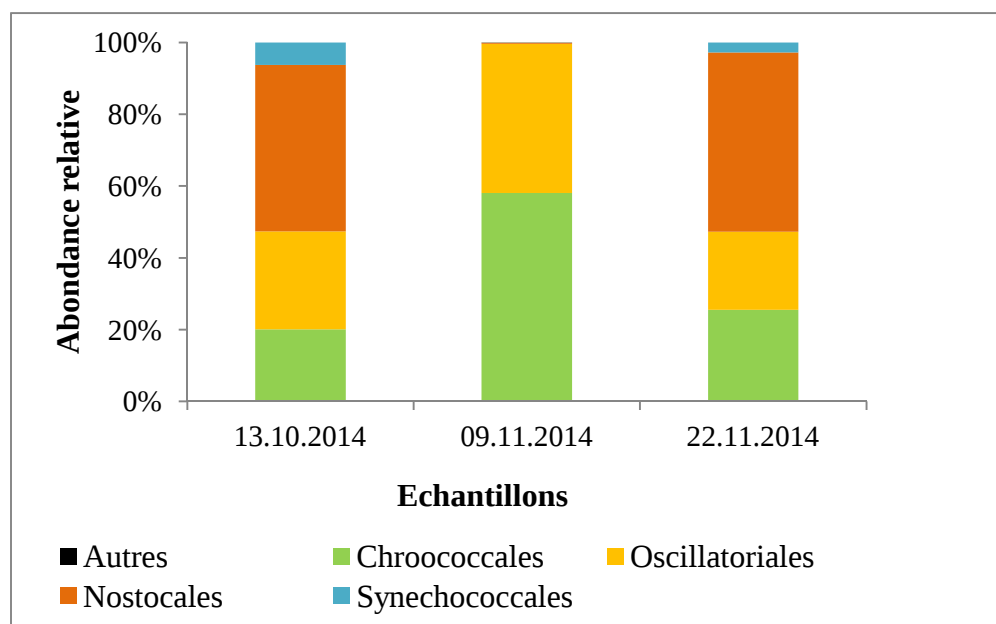


Figure 27. Abondance relative des cyanobactéries du réservoir Cheffia au niveau ordre.

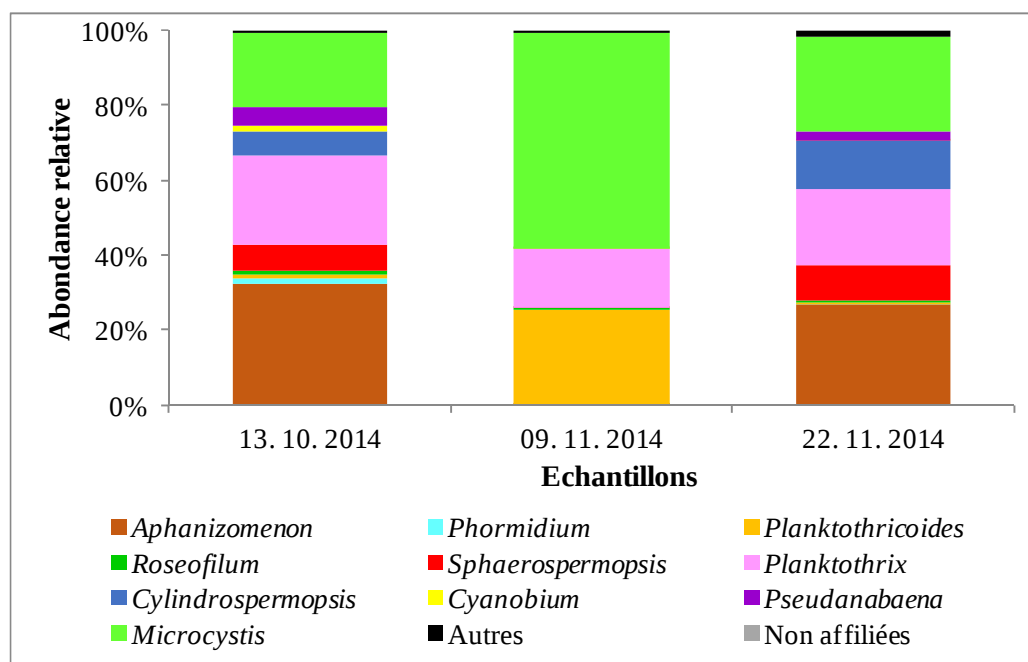


Figure 28. Abondance relative des cyanobactéries du réservoir Cheffia au niveau genre.

1.5. Localisation des gènes reliés à la synthèse des toxines

Les toxines communes ; MCs, NODs, ANAs, CYNs et STXs, ont été recherchées par amplifications des gènes correspondants avec des amorces spécifiques. Les résultats de l'amplification ont donné un résultat positif avec la paire d'amorce HEPE/HEPR ciblant le gène *mcyE* (Figure 29) révélant ainsi l'éventuelle présence de souches productrices des MCs.

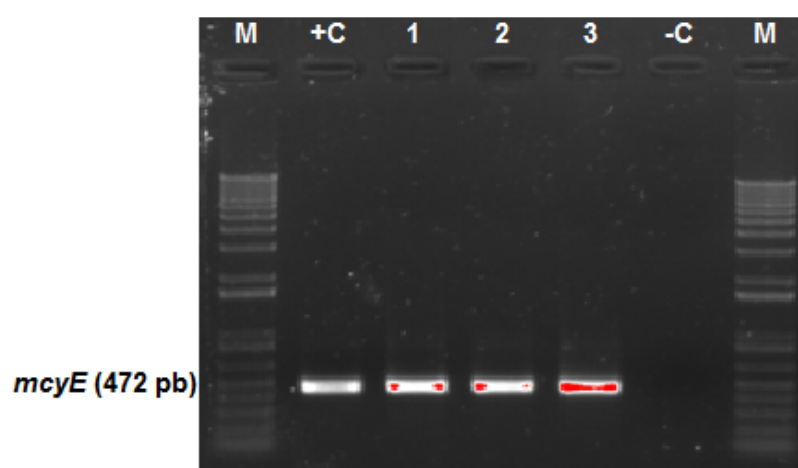


Figure 29. Profil électrophorétique sur gel d'agarose 1.5% du gène *mcyE* des trois échantillons des cyanobactéries. M: Marqueur de taille (DNA ladder 1 kb plus) ; +C: contrôle positif ; Ligne 1: échantillon 1 (13.10.2014) ; Ligne 2: échantillon 2 (09.11.2014); Ligne 3: échantillon 3 (22.11.2014) ; - C: contrôle négatif.

1.6. Identification des microcystines par HPLC-PDA et LC-ESI-MS/MS

Les chromatogrammes obtenus par HPLC-PDA ont montré deux pics bien définis avec des spectres d'absorption UV à 232.2 nm (Pic1) et 238.1 nm (Pic 2), caractéristiques des MCs, et des temps de rétention de : 7.783 min et 8.817 min, respectivement (Figures 30-31). Sur la base du standard de la MC-LR utilisé, le Pic 2 correspondait à la MC-LR.

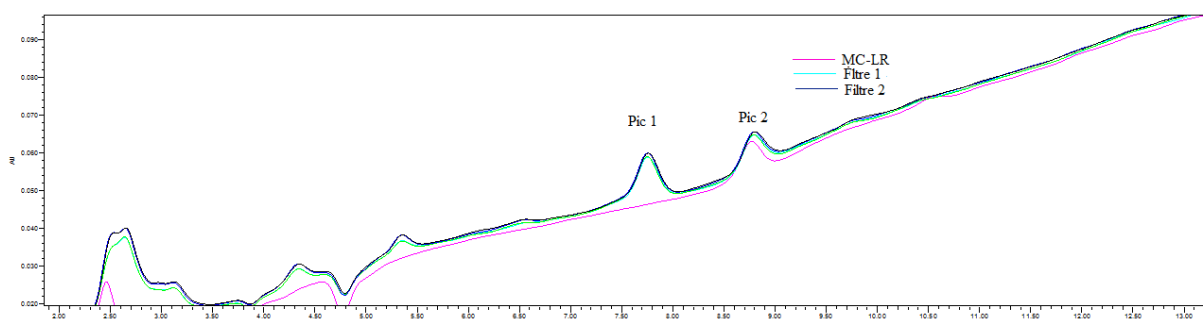


Figure 30. Chromatogramme HPLC-PDA extrait à 238 nm des extraits des cyanobactéries du réservoir Cheffia. (Abréviation: AU = unités d'absorption).

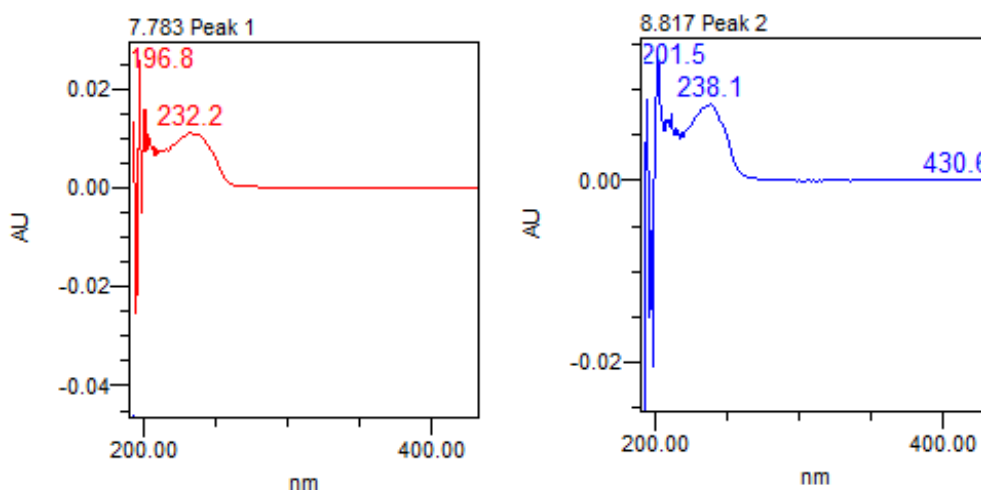


Figure 31. Spectre d'absorption et temps de rétention des deux pics obtenus avec HPLC-PDA à 238 nm des extraits des cyanobactéries du réservoir Cheffia. (Abréviation: AU = unités d'absorption).

L'analyse par LC/ESI-MS/MS a confirmé l'identité de la MC-LR pour le Pic 2, le spectre a montré le pic d'ion parent de la MC-LR ($m/z = 995$) et les masses des ions produits après dissociation induite par collision (Tableau 11, Figure 32). Par contre, le

spectre de la fragmentation du pic 1 n'a pas montré les fragments caractéristiques des MCs (Figure 33).

Tableau 11. Fragments produits par LC/ESI-MS/MS caractéristiques de la MC-LR.

m/z	Fragment
599.27	[Arg + Adda + Glu + H]
866	[M + H] ⁺ - Glu
553	Mdha + Leu + MeAsp + Arg + H
977	MH ⁺ - H ₂ O
967	MH ⁺ - CO
553	Mdha + Ala + X + MeAsp + Arg + H ⁺
470	Ala + X + MeAsp + Arg + H ⁺
397	Glu + Mdha + Ala + X þ H ⁺
303	[MeAsp + Arg + NH ₂ + 2H] ⁺

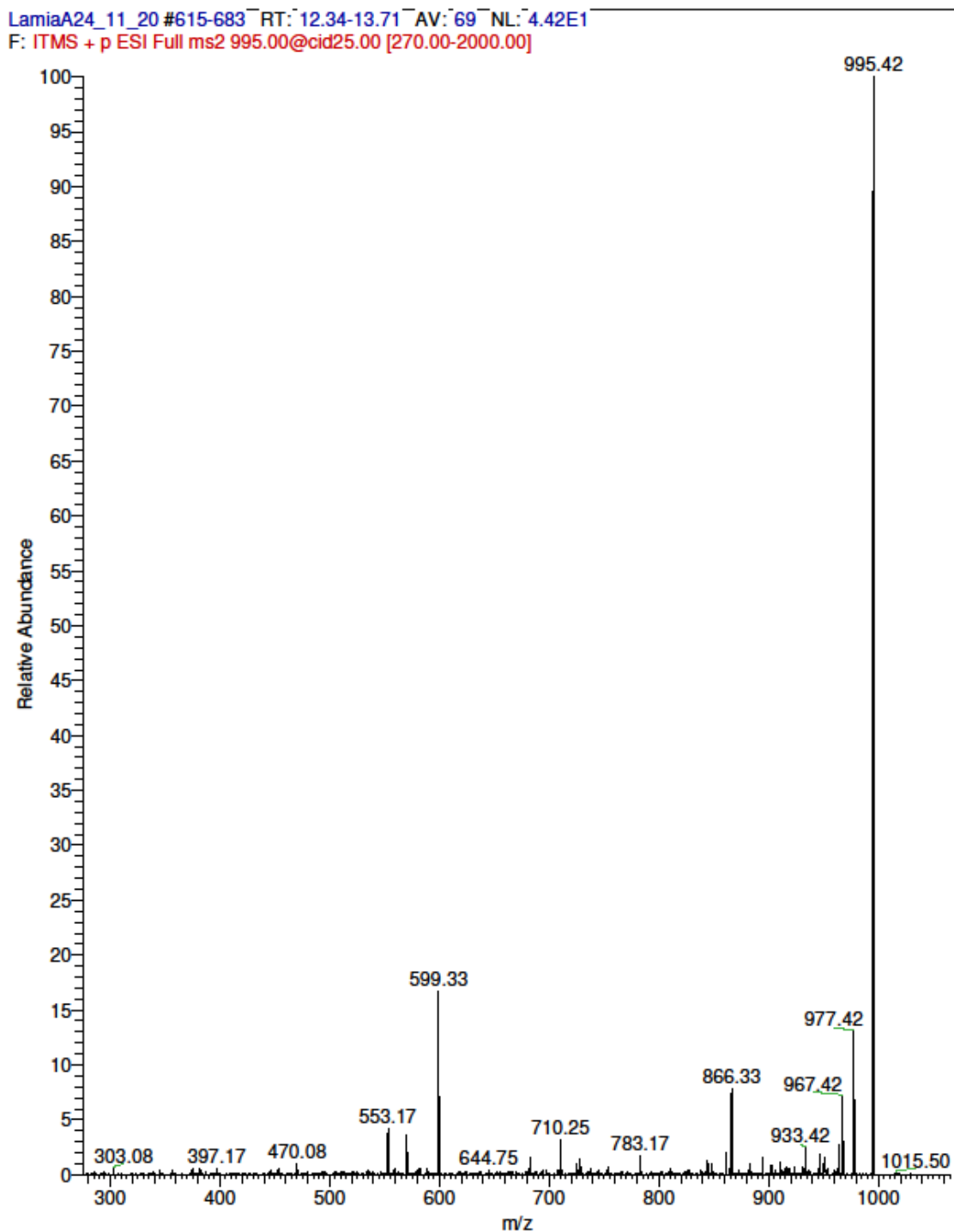


Figure 32. Spectre electrospray de la MC-LR (m/z 995.42) détecté par LC/ESI-MS/MS dans les extraits des cyanobactéries du réservoir Cheffia. (Abréviations: m/z = masse/charge, MC-LR: Microcystine-LR).

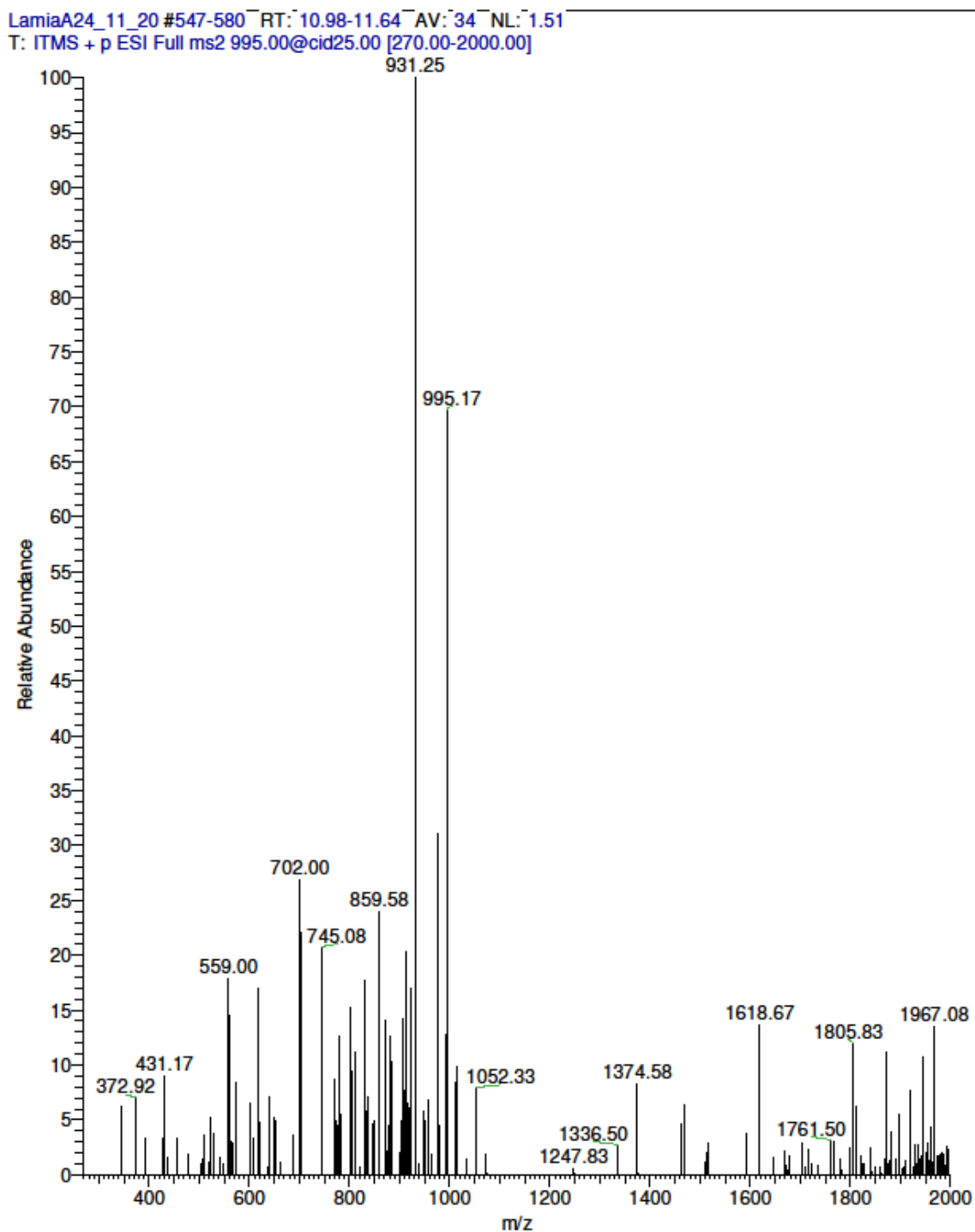


Figure 33. Spectre electrospray du pic 1 détecté par LC/ESI-MS/MS.

2. Isolement, identification morphologique, étude moléculaire et phylogénie

2.1. Isolement des cyanobactéries et identification morphologique

Au total treize (13) souches de cyanobactéries ont été isolées (Figure 34). Selon les critères morphologiques de Komárek et Anagnostidis (1999, 2005), les souches isolées appartenaient à deux ordres: Oscillatoriales et Chroococcales. Elles ont été identifiées comme : *Geitlerinema* (G.) *amphibium* (4 souches), *Lyngbya* (L.) *nigra* (1 souche), *Lyngbya* sp. (1 souche), *L. cincinnata* (1 souche), *Microcoleus* sp. (1 souche), *Pseudanabaena* (P.) *rosea* (1 souche), *Aphanothece* sp. (2 souches), *Microcystis* (M.) *flos-aquae* (1 souche) et *Microcystis* sp. (1 souche).



Figure 34. Culture des cyanobactéries obtenues après 2 mois d'isolement et de purification. a : *Aphanothece* sp. CR10, b : *Aphanothece* sp. CR11, c : *M. flos-aquae* CR13, d : *Microcystis* sp. CR12, e : *Microcoleus* sp. CR8, f : *Lyngbya* sp. CR6, g : *L. cincinnata* CR7, h : *P. rosea* CR9, i : *G. amphibium* CR2, j : *G. amphibium* CR3, k : *G. amphibium* CR4, l : *G. amphibium* CR1, m : *L. nigra* CR5.

Les caractéristiques morphologiques des isolats sont décrites ci-dessous.

Souche 1

Identification taxonomique : *G. amphibium* CR1

Caractéristiques morphologiques : les trichomes forment un tapis fin et mince (Figure 35. A). Ils sont droits ou ondulés, sans ramification, de 1.77 - 2.97 μm de largeur, sans étranglements aux parois transversales, unisériés, mobiles, sans paroi et composés uniquement de cellules cylindriques de 1.96 - 4.73 μm de longueur, sans aérotopes mais avec des granules (Figure 35.B).

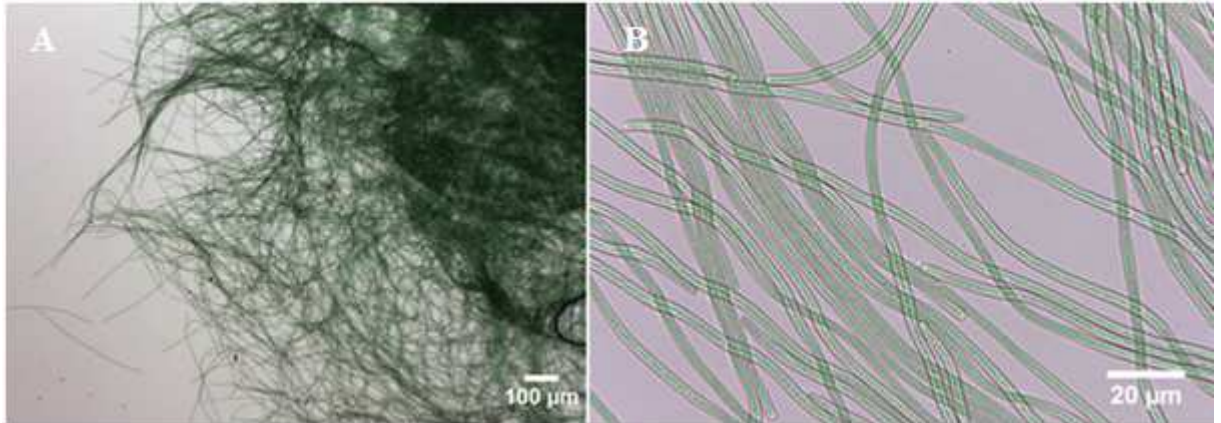


Figure 35. Photographies de la souche *G. amphibium* CR1 isolée du réservoir Cheffia. A – partie du tapis ; B – détail du trichome.

Souche 2

Identification taxonomique : *G. amphibium* CR2

Caractéristiques morphologiques : les trichomes ont une largeur de 1.7 - 2.5 µm, ils sont unisériés, mobiles, sans gaine, groupés en tapis fins et minces (Figure 36.A). Ils sont simples, droits ou ondulés, cylindriques sur toute la longueur avec des étranglements aux parois transversales. Ils sont composés uniquement de cellules cylindriques plus longues que larges (Figure 36.B), d'une longueur de 1.71 - 3.56 µm ; les cellules contiennent des granules bleu-verts.

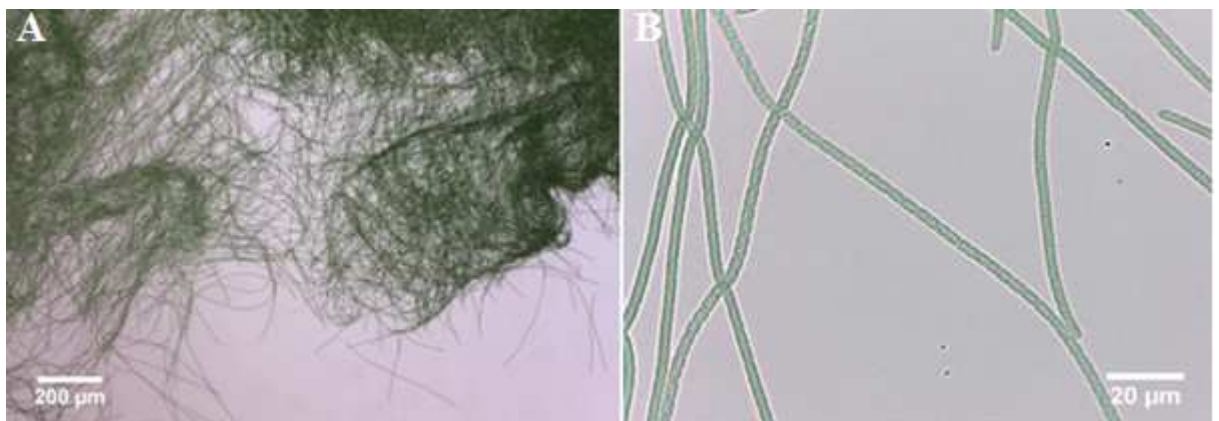


Figure 36. Photographies de la souche *G. amphibium* CR2 isolée du réservoir Cheffia. A – tapis bleu-vert ; B – morphologie du trichome.

Souche 3

Identification taxonomique : *G. amphibium* CR3

Caractéristiques morphologiques : les trichomes sont de couleur bleu-verte brillante et forment un tapis (Figure 37.A), ils ont une largeur de 1.52 - 2.92 μm , ils sont cylindriques, unisériés, mobiles, sans gaine, plus moins droits, sans étranglements; possèdent des corps polaires (Figure 37.B), et sont composés uniquement de cellules cylindriques qui sont plus longues que larges, leur longueur est de 1.44 - 3.91 μm .

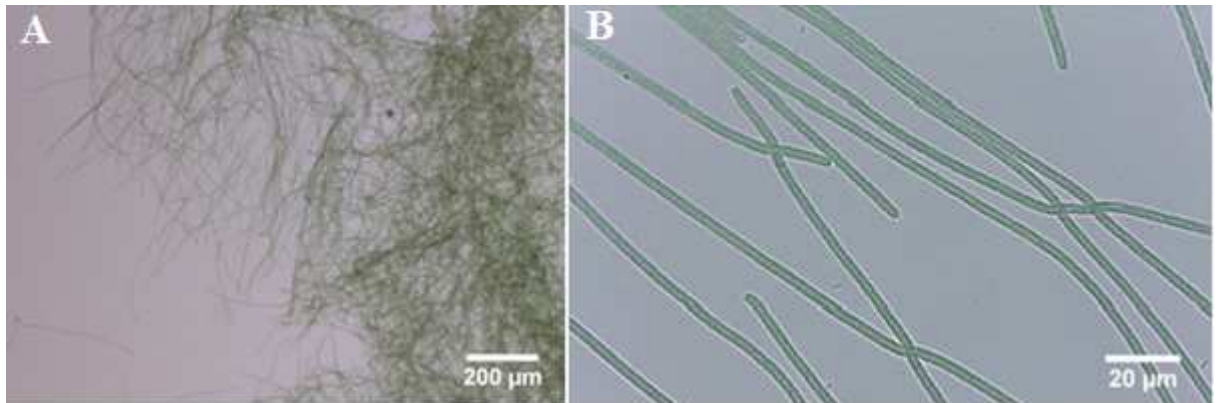


Figure 37. Photographies de la souche *G. amphibium* CR3 isolée du réservoir Cheffia. A – tapis bleu-vert ; B – morphologie du trichome.

Souche 4

Identification taxonomique : *G. amphibium* CR4

Caractéristiques morphologiques : le thalle est diffluent, fasciculé, formant un tapis (Figure 38.A). Les trichomes ont une largeur de 1.38 - 2.54 μm , avec une gaine, sans ramification, de couleur bleu-verte brillante, ils sont unisériés, droits avec ondulations, sans étranglements aux parois transversales, composés de cellules cylindriques avec des granules. Les cellules sont principalement plus longues que larges, de 1.82 - 3.59 μm de longueur, rarement isodiamétriques et sans aérotopes (Figure 38.B).

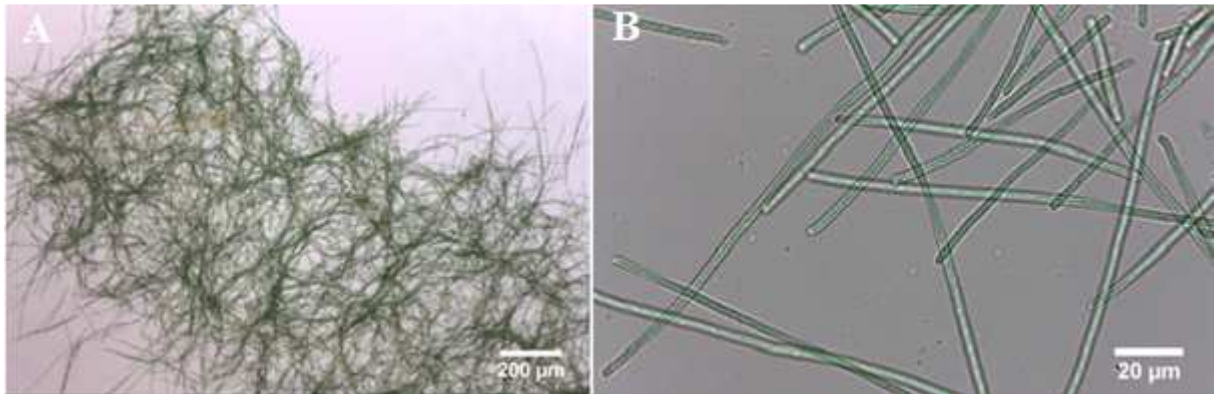


Figure 38. Photographies de la souche *G. amphibium* CR4 isolée du réservoir Cheffia. A – tapis bleu-vert ; B – morphologie du trichome.

Souche 5

Identification taxonomique : *L. nigra* CR5

Caractéristiques morphologiques : les trichomes forment un tapis (Figure 39.A), ils sont droits ou légèrement ondulés, sans étranglements aux parois transversales, de 12.82 - 17.84 µm de largeur, jusqu'à 19.22 µm dans les filaments les plus âgés, isopolaires avec des enveloppes qui contiennent un seul trichome. Les gaines sont fines et dures, ouvertes à la fin, incolores ou de couleur bleu et légèrement distantes du trichome dans les filaments âgés. Les filaments sont mobiles par glissement. Les cellules sont courtes, discoïdes, de 1.95 - 5.15 µm de long, avec un contenu granulaire et des aérotopes. La reproduction se produit par désintégration du trichome en courtes hormogonies mobiles avec l'aide de nécridies (Figure 39.B).

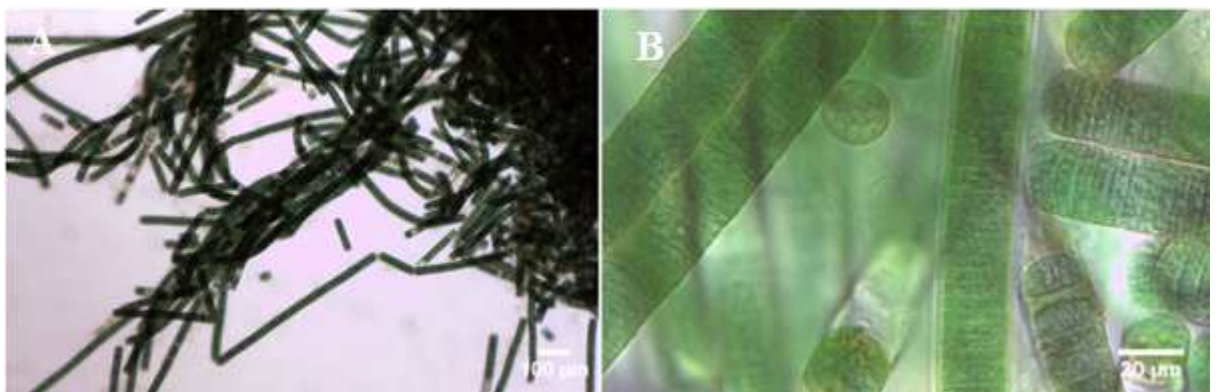


Figure 39. Photographies de la souche *L. nigra* CR5 isolée du réservoir Cheffia. A – partie du tapis ; B – détail du trichome.

Souche 6

Identification taxonomique : *Lyngbya* sp. CR6

Caractéristiques morphologiques : le thalle est fasciculé (Figure 40.A). Trichomes de 13.00-19.36 μm de largeur, isopolaires avec des terminaisons identiques et des gaines qui contiennent un seul trichome. Les gaines sont fines et rigides, incolores, cylindriques, ouvertes à la fin. Les cellules sont de couleur grise bleu-verte clairement courtes que larges, de 1.9 - 5.2 μm de longueur. La majorité des filaments ont une largeur de 15.03 - 22.92 μm , sans étranglements aux parois transversales et mobiles par glissement. Des hormogonies se développent à partir de la fin des trichomes sous forme de cellules courtes (Figure 40.B).

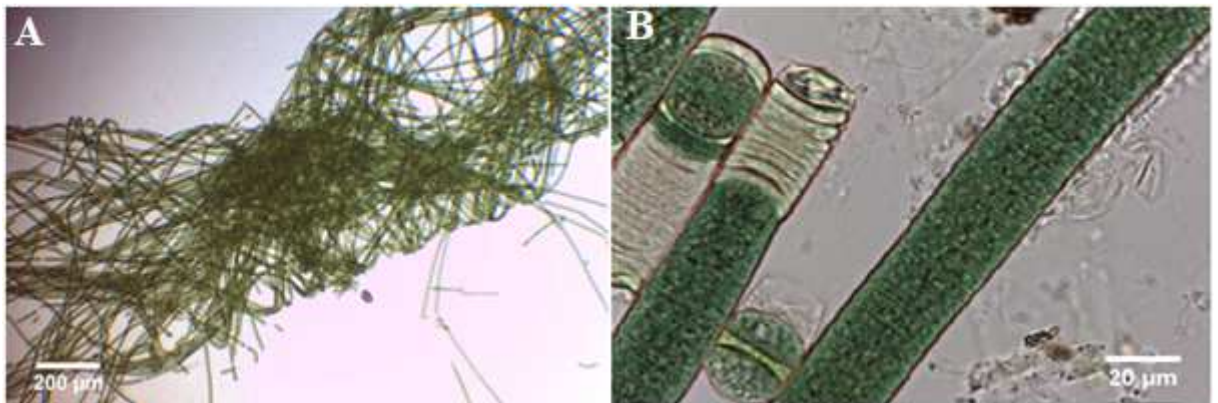


Figure 40. Photographies de la souche *Lyngbya* sp. CR6 isolée du réservoir Cheffia. A – agrégation des trichomes en tapis bleu-vert ; B – morphologie du trichome.

Souche 7

Identification taxonomique : *L. cincinnata* CR7

Caractéristiques morphologiques : le thalle est formé de filaments enchevêtrés (Figure 41.A). Les trichomes ont une largeur de 13.46 - 19.66 μm , ils sont cylindriques, légèrement ondulés, isopolaires et possèdent des étranglements aux parois transversales. Les filaments ont une largeur de 15.43 - 20.36 μm , compacts et superposés en groupes. Les gaines sont fermes, épaisses, de couleur jaune, ouvertes et contiennent un trichome. Les cellules sont discoïdes, 2.09 - 4.62 μm de long, toujours plus courtes que larges. Le contenu cellulaire est granulaire, les aérotopes sont rares (Figure 41.B). La reproduction se produit par désintégration des trichomes en homocytes à partir du filament entier.

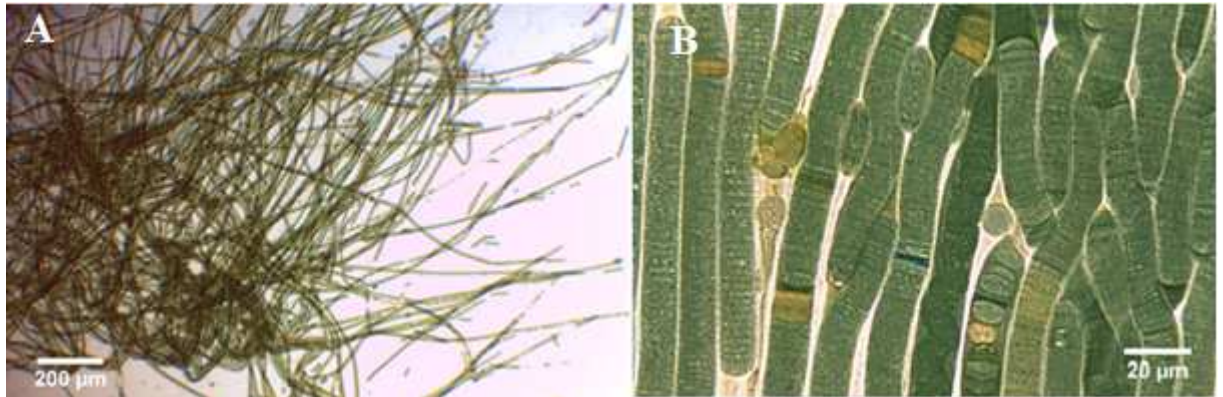


Figure 41. Photographies de la souche *L. cincinnata* CR7 isolée du réservoir Cheffia. A – tapis bleu-vert ; B – morphologie du trichome.

Souche 8

Identification taxonomique : *Microcoleus* sp. CR8

Caractéristiques morphologiques : à l'observation macroscopique, elle forme un tapis fasciculé vert olive (Figure 42.A). Les trichomes sont de 3.08 - 5.17 µm de largeur; ondulés ou enroulés comme un vis, avec des étranglements aux parois transversales (Figure 42.B). Les filaments sont mobiles et entourés d'une gaine ferme et épaisse, homogène, ouverte à la fin, hyaline et comprend un seul trichome (Figure 42.C). Les filaments sont de 3.75 - 7.67 µm de largeur, unisériés, cylindriques et isopolaires, composés de cellules majoritairement isodiamétriques ou faiblement longues que larges, de 3.09 - 6.02 µm de longueur et contiennent des aérotopes. Les cellules apicales sont coniques sans calyptras et la reproduction se produit par fragmentation du trichome en hormocytes immobiles (Figure 42.D).

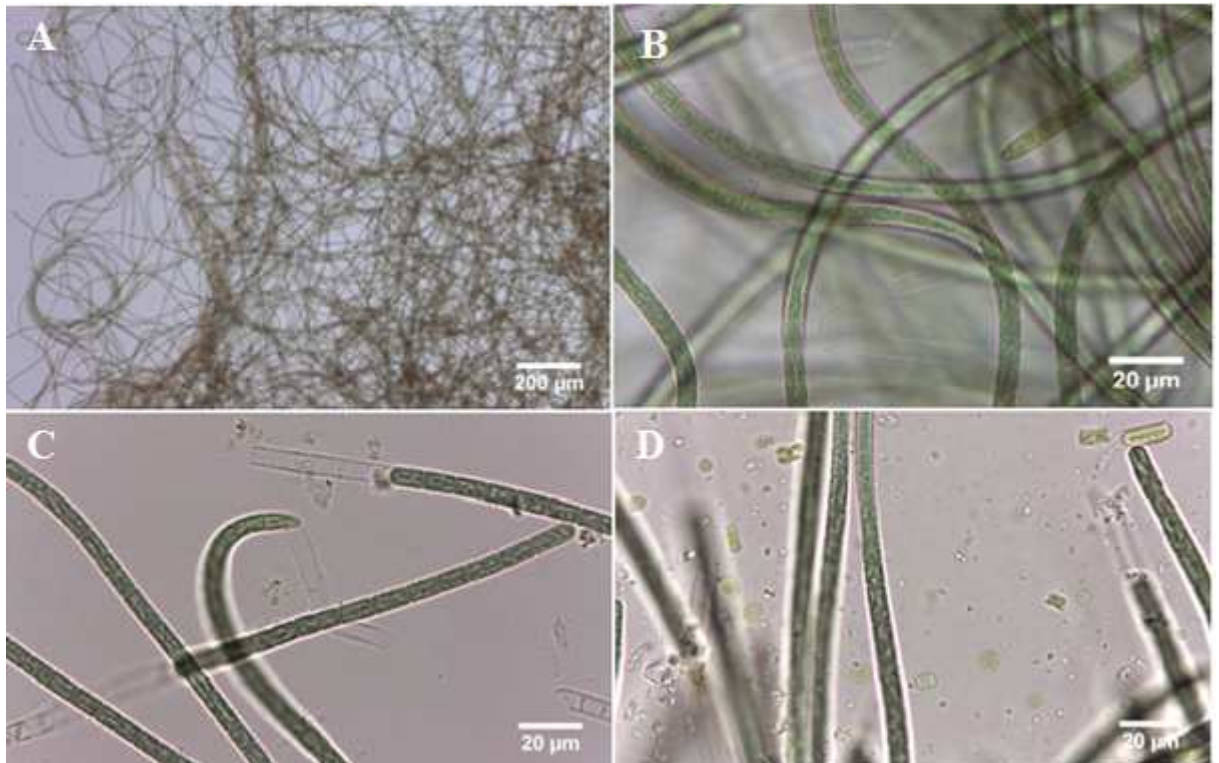


Figure 42. Photographies de la souche *Microcoleus* sp. CR8 isolée du réservoir Cheffia. A – partie du tapis avec des filaments ondulés ou enroulés en spirale ; B – détails des filaments et des cellules apicales, C – gaine, cellule, D – hormocytes.

Souche 9

Identification taxonomique : *P. rosea* CR9

Caractéristiques morphologiques : elle forme des tapis fins et des colonies groupées de couleur rouge-violacée (Figure 43.A), composés de trichomes droits ou légèrement incurvés, de 1.61 - 2.67 µm de largeur, sans gaine, avec des étranglements aux parois transversales. Les filaments sont simples, sans ramifications, composés uniquement de cellules cylindriques, de 1.67 - 3.89 µm de longueur, sans aérotopes (Figure 43.B). La reproduction se produit par désintégration en cellules solitaires. Les trichomes sont très mobiles par rotation.

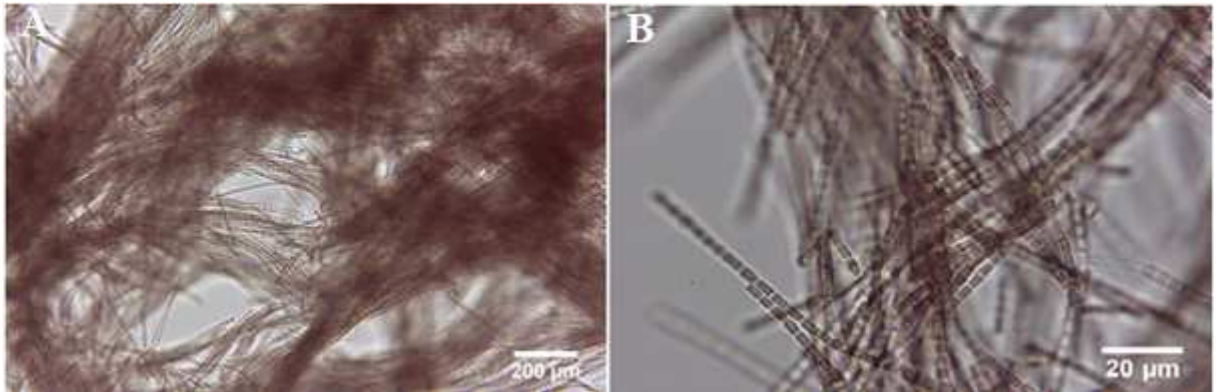


Figure 43. Photographies de la souche *P. rosea* CR9 isolée du réservoir Cheffia. A – tapis rouge-violacé ; B – morphologie du trichome.

Souche 10

Identification taxonomique : *Aphanothece* sp. CR10

Caractéristiques morphologiques : les colonies sont irrégulières, microscopiques à macroscopiques, bleu-vertes, entourées d'un mucilage fin, incolore et distinct à la marge (Figure 44. A), contiennent des cellules principalement sphériques ou ovales, de 1.07 - 1.98 μm de diamètre, avec des vésicules à gaz, le contenu est de couleur bleu-verte pâle et entourées d'enveloppes individuelles. Les enveloppes sont fermes, délimitées et colorées en bleu-vert foncé (Figure 44.B).

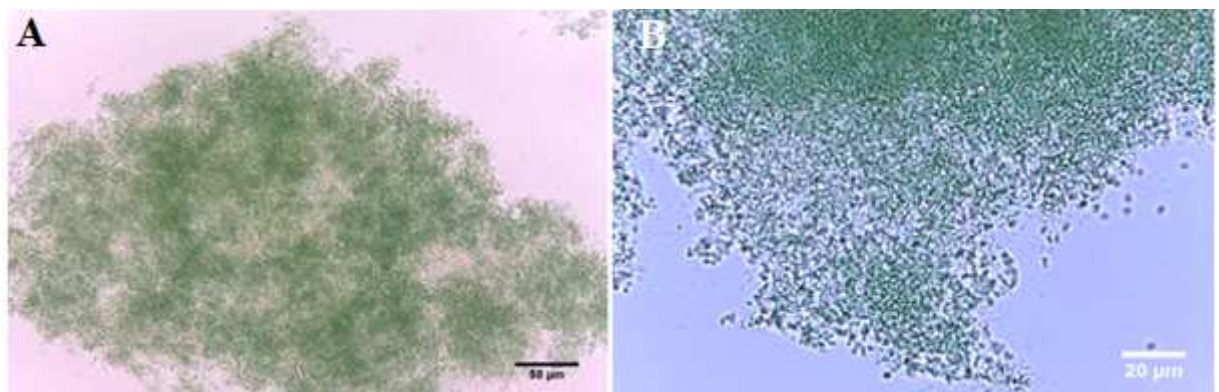


Figure 44. Photographies de la souche *Aphanothece* sp. CR10 isolée du réservoir Cheffia. A – apparence de la colonie ; B – organisation des cellules et morphologie.

Souche 11

Identification taxonomique : *Aphanothece* sp. CR11

Caractéristiques morphologiques : les colonies sont sphériques, de contour irrégulier, microscopiques, mucilagineuses et forment des agglomérations granulaires visibles à l'œil nu (Figure 45.A). Le mucilage est incolore et homogène, sans contour rétractif, délimité à la marge et suit le contour irrégulier de la colonie. Les cellules sont sphériques, de 0.90 - 1.36 μm de diamètre, de couleur bleu-verte brillante ou pâle, légèrement distantes les une des autres, sans vésicules à gaz, possèdent souvent des granulations fines avec un contenu plus ou moins homogène et sont entourées d'une couche individuelle mince (Figure 45.B).

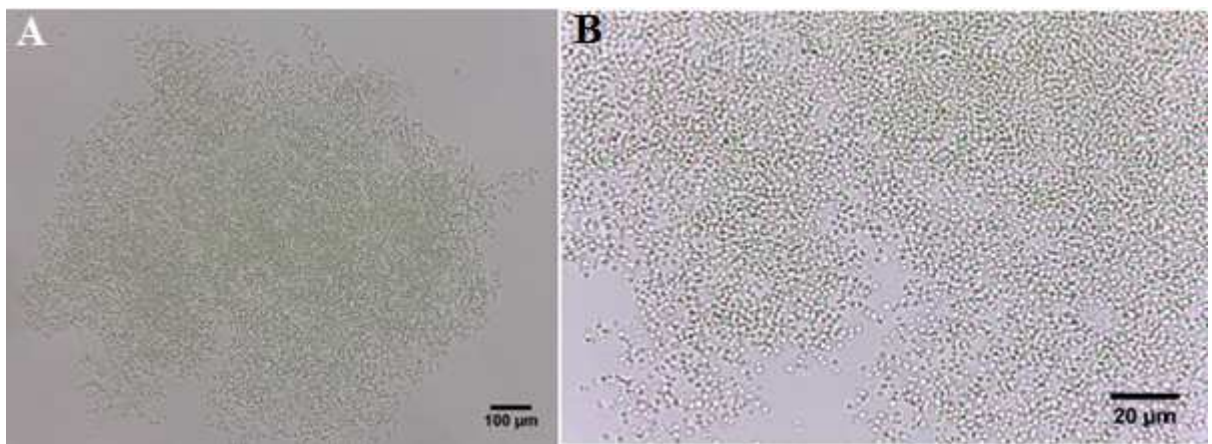


Figure 45. Photographies de la souche *Aphanothece* sp. CR11 isolée du réservoir Cheffia.

A – morphologie de la colonie ; B – organisation des cellules.

Souche 12

Identification taxonomique : *Microcystis* sp. CR12

Caractéristiques morphologiques : les colonies sont macroscopiques, lenticulaires, faiblement allongées, tridimensionnelles, regroupées dans des masses macroscopiques, flottantes, gélatineuses, de couleur bleu-verte, contiennent des cellules entourées d'un mucilage fin (Figure 46.A) et formant des agrégats de forte densité. Les cellules sont sphériques, de 4.02 - 5.97 μm de diamètre, solitaires ou en paires après division, avec des enveloppes individuelles, le contenu est souvent homogène, de couleur verte olive ou brune avec des aérotopes (Figure 46.B). La division cellulaire se produit par fission binaire dans trois plans perpendiculaires.

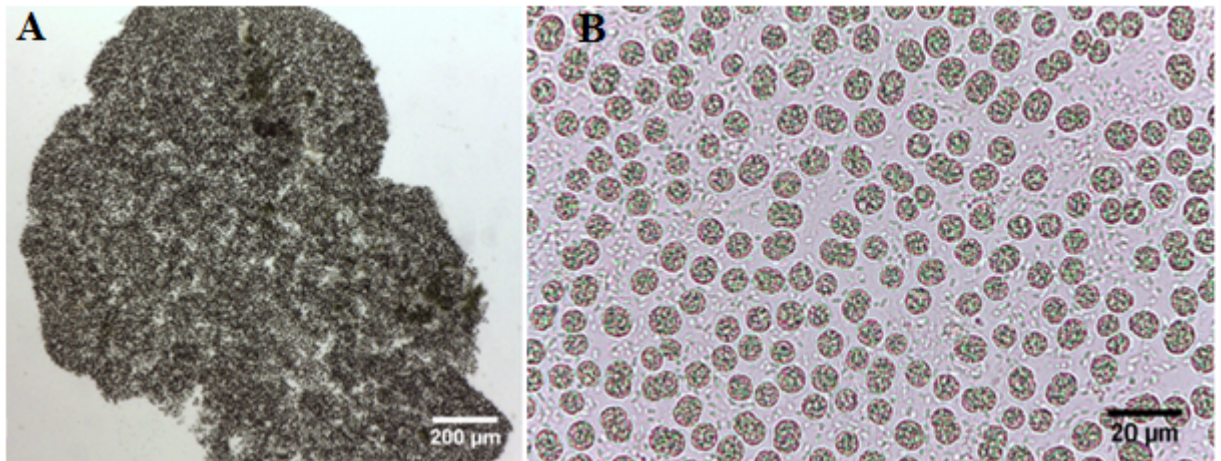


Figure 46. Photographies de la souche *Microcystis* sp. CR12 isolée du réservoir Cheffia. A morphologie de la colonie ; B – arrangement des cellules et morphologie, granules vert olive ou contenu brun, aérotopes.

Souche 13

Identification taxonomique : *M. flos-aquae* CR13

Caractéristiques morphologiques : à l'observation macroscopique, des groupes de colonies forment une couche de biomasse gélatineuse bleu-verte flottante. Les colonies sont sphériques, avec un contour irrégulier, microscopiques à macroscopiques. Le mucilage est incolore, faiblement distant des groupes de cellules et délimité par une ligne faiblement réfractive (Figure 47.A). Les cellules sont sphériques ou hémisphériques après division, de 3.98 - 5.77 µm de diamètre et entourées d'enveloppes individuelles épaisses. Le contenu cellulaire apparaît granulaire de couleur verte olive ou brune avec aérotopes (Figure 47.B).

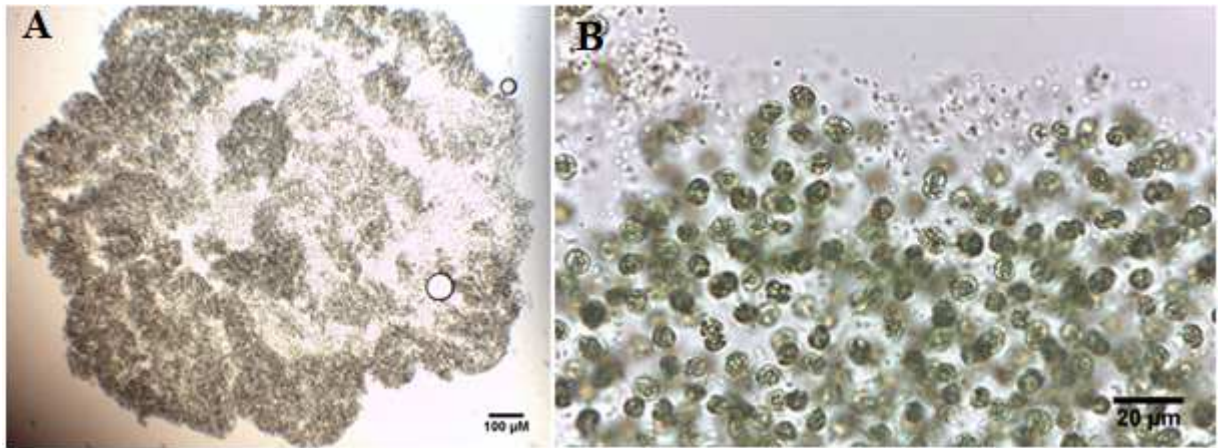


Figure 47. Photographies de la souche *M. flos-aquae* CR13 isolée du réservoir Cheffia. A – morphologie de la colonie ; B – arrangement des cellules et morphologie, granules vert olive ou contenu brun, aérotopes, mucilage.

2.2. Analyse Blast

L'analyse BLAST a montré des pourcentage d'identité élevés, entre 97.26 et 99.91%, entre les séquences du gène de l'ARNr 16S des souches isolées au cours de cette étude et 27 autres souches appartenant aux ordres Chroococcales, Oscillatoriales et Synechococcales disponibles sur GenBank (Tableau 12).

Tableau 12. Identité (%) des séquences du gène de l'ARNr 16S entre les souches des cyanobactéries isolées du réservoir Cheffia et leurs correspondances les plus proches disponibles sur Genbank (NCBI).

Souche (Numéro d'accèsion)	Correspondances les plus proches (Numéro d'accèsion)	Couverture des séquences requêtes (%)	Pourcentage identité (%)
<i>G. amphibium</i> CR1 (OM401262)	<i>Geitlerinema amphibium</i> I013-0021 (KY550458)	82	99.39
	<i>Anagnostidinema amphibium</i> NRERC-450 (MN179486)	98	99.13
	<i>Pseudanabaena westiana</i> NRERC-303 (MN145866)	98	99.13
	<i>Limnothrix</i> sp. B15 (GQ848190)	98	99.13
<i>G. amphibium</i> CR2 (OM401263)	<i>Geitlerinema amphibium</i> I013-0021 (KY550458)	83	99.74
	<i>Pseudanabaena westiana</i> NRERC-303 (MN145866)	99	99.56
	<i>Limnothrix</i> sp. B15 (GQ848190)	100	99.56
	<i>Anagnostidinema amphibium</i> NRERC-451 (MN179485)	100	99.49
	<i>Jaaginema</i> sp. TAU-MAC 0110 (MN062656)	96	97.59
<i>G. amphibium</i> CR3 (OM401264)	<i>Geitlerinema amphibium</i> I013-0021 (KY550458)	85	99.91
	<i>Anagnostidinema amphibium</i> NRERC-450 (MN179486)	100	99.70
	<i>Pseudanabaena westiana</i> NRERC-303 (MN145866)	100	99.70
	<i>Limnothrix</i> sp. B15 (GQ848190)	100	99.70
	<i>Jaaginema</i> sp. TAU-MAC 0110 (MN062656)	97	97.71
<i>G. amphibium</i> CR4 (OM401265)	<i>Geitlerinema amphibium</i> I013-0021 (KY550458)	85	99.91
	<i>Limnothrix</i> sp. B15 (GQ848190)	100	99.85
	<i>Anagnostidinema amphibium</i> NRERC-450 (MN179486)	100	99.70
	<i>Pseudanabaena westiana</i> NRERC-303 (MN145866)	100	99.70
	<i>Jaaginema</i> sp. TAU-MAC 0110 (MN062656)	98	97.73

Tableau 12. (suite)

Souche (Numéro d'accession)	Souches les plus proches (Numéro d'accession)	Couverture des séquences requêtes (%)	Pourcentage identité (%)
<i>L. nigra</i> CR5 (OM401266)	<i>Phormidium cf. irriguum</i> CCALA 759 (FN813343)	99	99.85
	<i>Oscillatoria</i> sp. UIC 10045 (KF444211)	93	99.35
	<i>Lyngbya martensiana</i> H3b/33 (JN854141)	95	97.78
<i>Lyngbya</i> sp. CR6 (OM401267)	<i>Phormidium cf. irriguum</i> CCALA 759 (FN813343)	97	99.85
	<i>Oscillatoria</i> sp. UIC 10045 (KF444211)	90	99.28
	<i>Lyngbya martensiana</i> H3b/33 (JN854141)	92	97.73
<i>L. cincinnata</i> CR7 (OM401268)	<i>Phormidium cf. irriguum</i> CCALA 759 (FN813343)	97	99.63
	<i>Oscillatoria</i> sp. UIC 10045 (KF444211)	91	99.04
	<i>Lyngbya martensiana</i> H3b/33 (JN854141)	93	97.50
<i>Microcoleus</i> sp. CR8 (OM401269)	<i>Microcoleus</i> sp. HTT-U-KK5 (EF654070)	99	99.40
<i>P. rosea</i> CR9 (OM401270)	<i>Pseudanabaena limnetica</i> Lim1 (LC434121)	100	99.27
	<i>Limnothrix redekei</i> CCAP 1459/29 (HE974998)	100	99.05
	<i>Arthronema gygaxiana</i> UTCC 393 (AF218370)	100	98.39
<i>Aphanothece</i> sp. CR10 (OM401271)	<i>Synechococcus</i> sp. CACIAM 66 (MG272380)	100	99.11
	<i>Cyanobium</i> sp. JJM10D4 (AM710359)	100	98.96
	<i>Aphanothece minutissima</i> 2LT34S03 (FM177488)	100	97.41
	<i>Microcystis elabens</i> (AB001724)	100	97.26
	<i>Aphanothece</i> sp. 4SS (MH341432)	86	97.79

Tableau 12. (suite)

Souche (Numéro d'accession)	Souches les plus proches (Numéro d'accession)	Couverture des séquences requêtes (%)	Pourcentage identité (%)
<i>Aphanothece</i> sp. CR11 (OM401272)	<i>Synechococcus</i> sp. CENA108 (EF088334)	100	98.96
	<i>Cyanobium</i> sp. JJ22K (AM710364)	100	98.30
	<i>Cyanobacterium</i> DC-1 (JF966674)	100	98.30
	<i>Cyanodictyon</i> sp. JJCD (AM710382)	100	98.22
	<i>Aphanocapsa salina</i> SAG 33.79 (KM020007)	100	98.07
	<i>Aphanothece</i> sp. 4SS (MH341432)	87	97.89
<i>Microcystis</i> sp. CR12 (OM401273)	<i>Synechococcus</i> sp. CENA108 (EF088334)	100	98.08
	<i>Cyanobium</i> sp. JJM10D5 (AM710380)	100	98.00
<i>M. flos-aquae</i> CR13 (OM401274)	<i>Microcystis flos-aquae</i> CHAB541 (KJ818189)	100	99.77
	<i>Sphaerocavum brasiliense</i> CCIBt3094 (KY460548)	100	99.32
	<i>Synechocystis</i> sp. SAG 45.90 (KM019995)	100	99.47

2.3. Phylogénie

L'arbre phylogénétique obtenu à partir de l'analyse BLAST comprend cinq groupes (Figure 48). Le groupe A comprend les séquences des souches *Microcoleus* sp. et *Lyngbya* spp. Ce groupe est composé de deux sous-groupes : sous-groupe I consiste à la souche *Microcoleus* sp. CR8 et une autre souche *Microcoleus* du GenBank, HTT-U-KK5 ; le sous-groupe II contient toutes les souches *Lyngbya* avec une séquence d'une souche du même genre : *L. martensiana* H3b/33, et deux autres séquences des genres *Oscillatoria* et *Phormidium* (*Oscillatoria* sp. UIC 10045 et *Ph. cf. irriguum* CCALA 759). Le groupe B consiste uniquement à la séquence de la souche *M. flos-aquae* CR13 et une séquences d'une souche de la même espèce, *M. flos-aquae* CHAB541, et celles des genres *Synechocystis* et *Sphaerovacum* du GenBank (*Synechocystis* sp. SAG 45.90 et *S. brasiliense* CCIBt3094). Le groupe C est représenté par les souches *G. amphibium* avec

des séquences des souches appartenant aux *G. amphibium*, *Limnothrix*, *Jaaginema*, *Pseudanabaena* et *Anagnostidinema*. Le groupe D contient les deux picocyanobactéries des genres *Aphanothece* et la souche identifiée sur la base des critères morphologiques comme *Microcystis* sp. avec des séquences des souches appartenant aux genres *Cyanobacterium*, *Cyanobium*, *Synechococcus*, *Aphanothece*, *Cyanodictyon*, *Aphanocapsa* et *Microcystis* de la base de données GenBank. Le groupe E consiste à la souche *Pseudanabaena* et des séquences du GenBank des espèces *P. limnetica* Lim1, *L. redekei* CCAP 1459/29 et *Arthronema gyaxiana* UTCC 393.

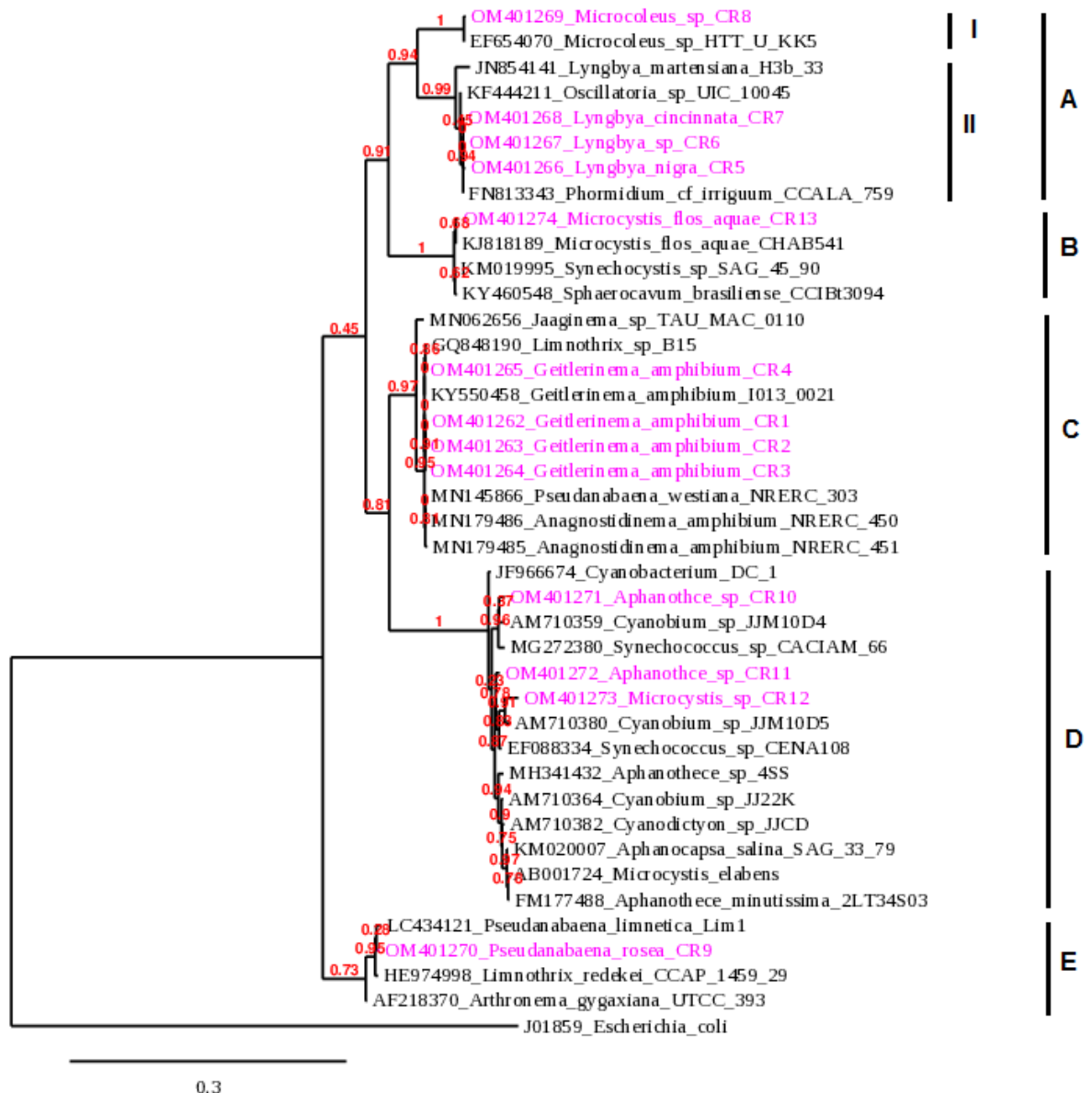


Figure 48. Arbre phylogénétique des souches des cyanobactéries isolées du réservoir Cheffia sur la base des séquences de l'ARNr 16S. *Escherichia coli* (J01859) a été utilisé comme groupe externe. Les souches isolées au cours de cette étude sont marquées en rose.

2.4. Génotypes toxiques

Le screening moléculaire des gènes responsables de la synthèse des toxines a donné un résultat positif avec le gène *mcyE* spécifique des MCs/NODs pour la souche *Aphanothece* sp. CR11 (Figure 49.A). Cependant, aucune souche n'a donné un résultat positif pour les gènes des STXs (*sxtA*, *sxtG* et *sxtI*, Figure 50), des ANAs et des CYNs (*anaC* et *cyrJ*, respectivement, Figure 51).

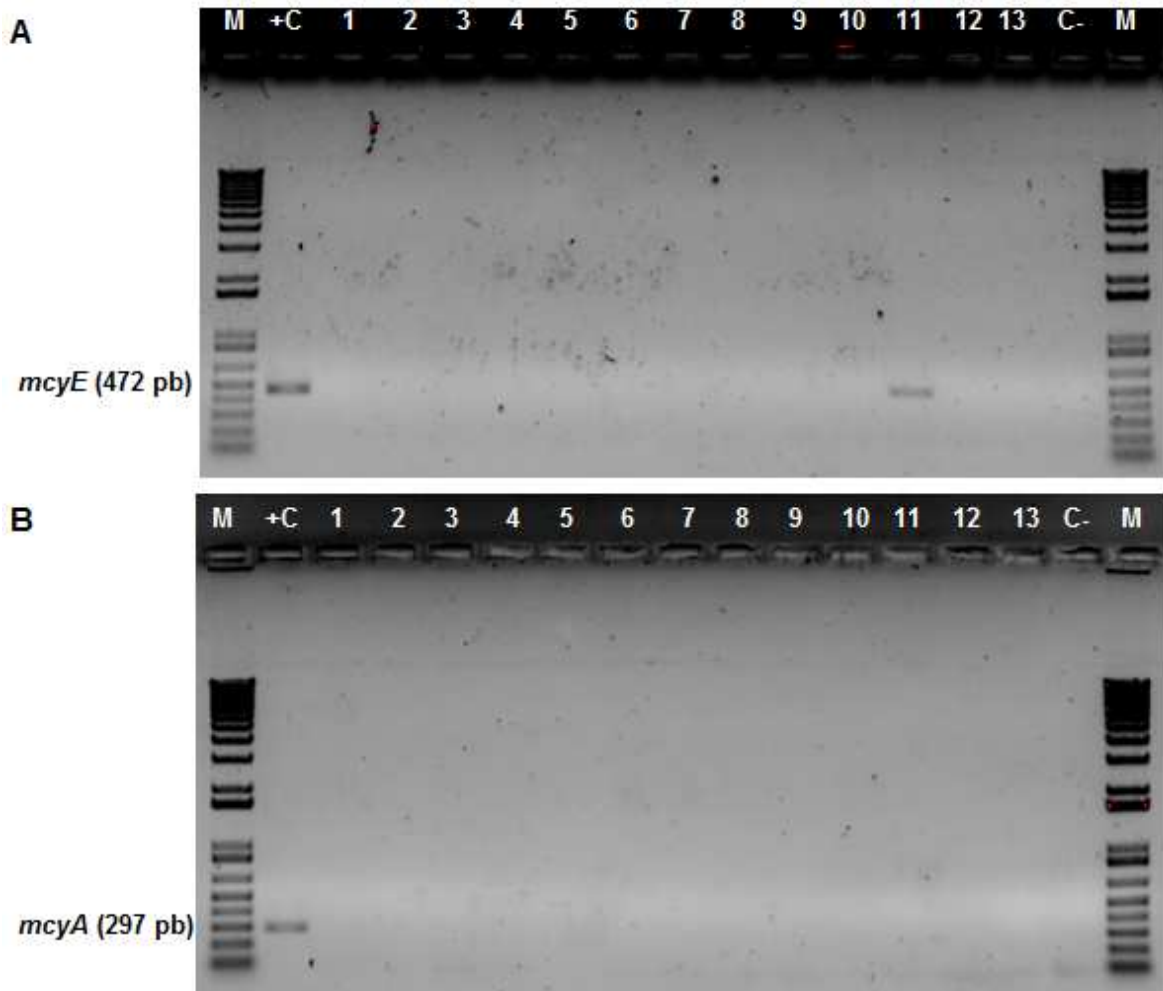


Figure 49. Gel l'électrophorèse des gènes responsables de la synthèse des MCs des souches isolées du réservoir Cheffia. A: *mcyE*, B: *mcyA*. M: Marqueur de taille (DNA ladder 1 kb plus), +C: contrôle positif; Ligne 1: *G. amphibium* CR1; Ligne 2: *G. amphibium* CR2; Ligne 3: *G. amphibium* CR3; Ligne 4: *G. amphibium* CR4; Ligne 5: *L. nigra* CR5; Ligne 6: *Lyngbya* sp. CR6; Ligne 7: *L. cincinnata* CR7; Ligne 8: *Microcoleus* sp. CR8; Ligne 9: *P. rosea* CR9; Ligne 10: *Aphanothece* sp. CR10; Ligne 11: *Aphanothece* sp. CR11; Ligne 12: *Microcystis* sp. CR12; Ligne 13: *M. flos-aquae* CR13; - C: contrôle négatif.

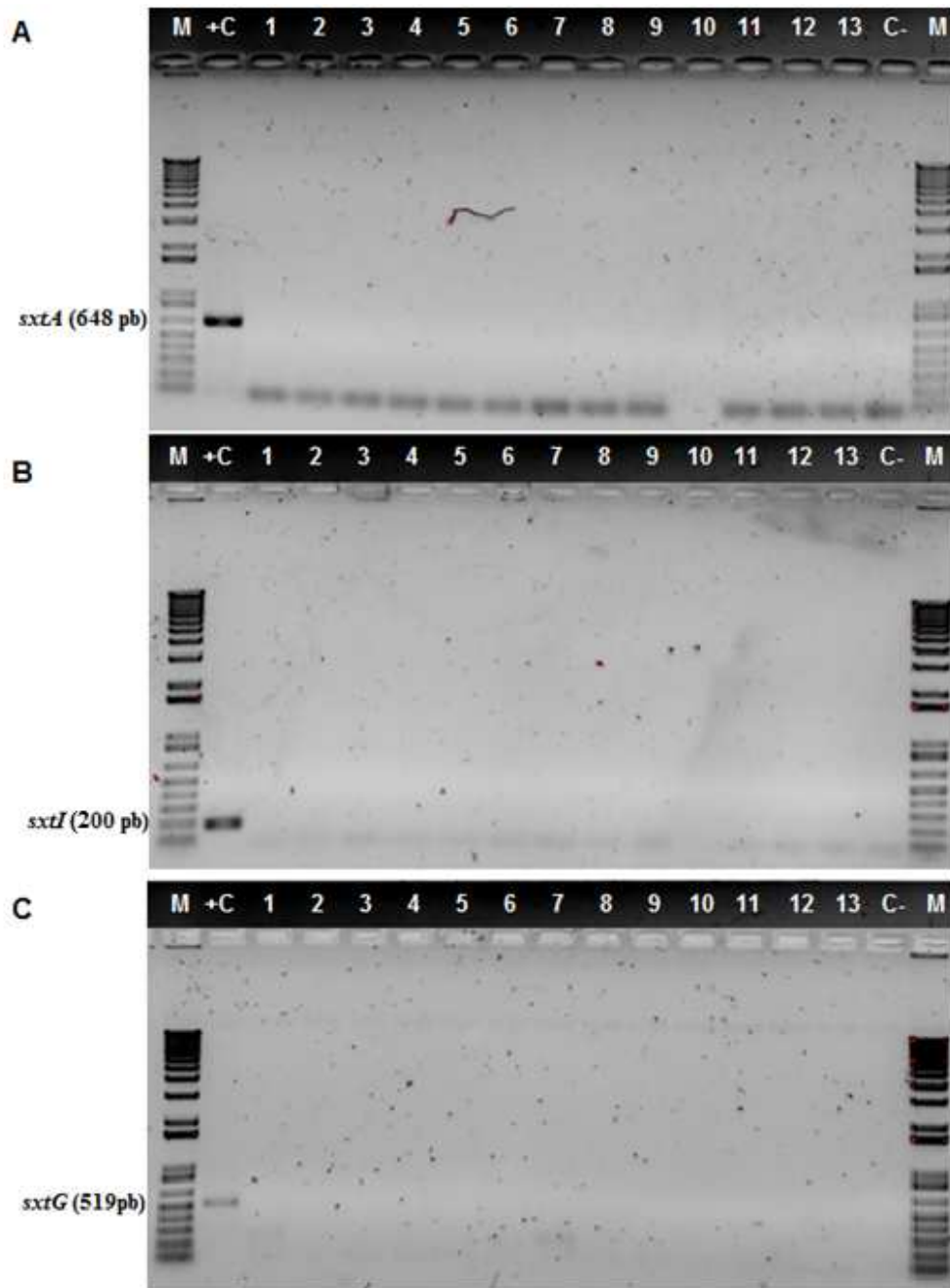


Figure 50. Gel l'électrophorèse des gènes responsables de la synthèse des STXs des souches isolées du réservoir Cheffia. A: *sxtA*, B: *sxtI*, C: *sxtG*. M: Marqueur de taille (DNA ladder 1 kb plus), +C: contrôle positif; Ligne 1: *G. amphibium* CR1; Ligne 2: *G. amphibium* CR2; Ligne 3: *G. amphibium* CR3; Ligne 4: *G. amphibium* CR4; Ligne 5: *L. nigra* CR5; Ligne 6: *Lyngbya* sp. CR6; Ligne 7: *L. cincinnata* CR7; Ligne 8: *Microcoleus* sp. CR8; Ligne 9: *P. rosea* CR9; Ligne 10: *Aphanothece* sp. CR10; Ligne 11: *Aphanothece* sp. CR11; Ligne 12: *Microcystis* sp. CR12; Ligne 13: *M. flos-aquae* CR13; - C: contrôle négatif.

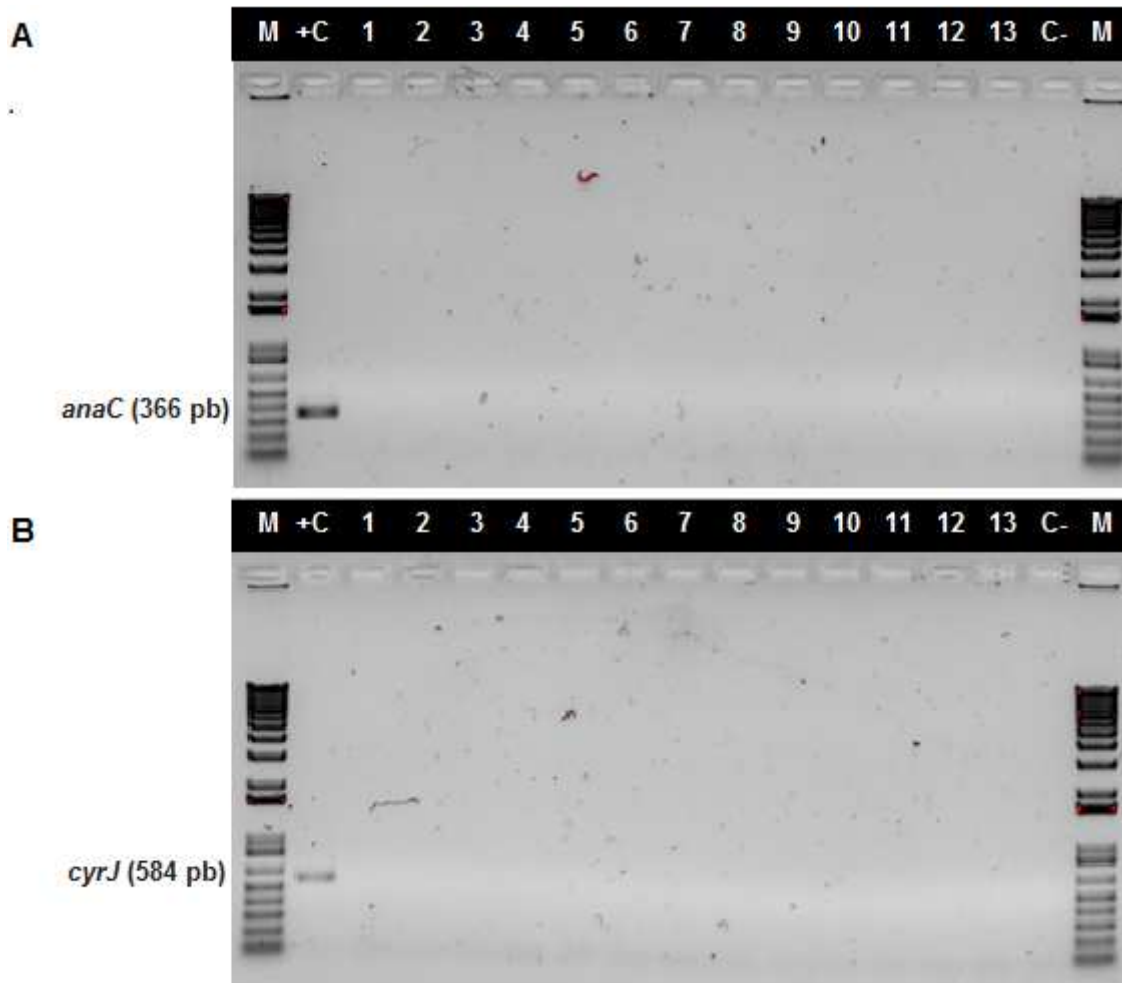


Figure 51. Gel d'électrophorèse des gènes responsables de la synthèse des ANAs et des CYNs des souches isolées du réservoir Cheffia. A: *anaC*, B: *cyrJ*. M: Marqueur de taille (DNA ladder 1 kb plus), +C: contrôle positif; Ligne 1: *G. amphibium* CR1; Ligne 2: *G. amphibium* CR2; Ligne 3: *G. amphibium* CR3; Ligne 4: *G. amphibium* CR4; Ligne 5: *L. nigra* CR5; Ligne 6: *Lyngbya* sp. CR6; Ligne 7: *L. cincinnata* CR7; Ligne 8: *Microcoleus* sp. CR8; Ligne 9: *P. rosea* CR9; Ligne 10: *Aphanothece* sp. CR10; Ligne 11: *Aphanothece* sp. CR11; Ligne 12: *Microcystis* sp. CR12; Ligne 13: *M. flos-aquae* CR13; - C: contrôle négatif.

Chapitre 4. Discussion

Notre étude visait à déterminer la composition de la communauté des cyanobactéries dans le réservoir Cheffia, un réservoir subtropical dans le Nord-Est de l'Algérie. Les travaux antérieurs dans ce plan d'eau se sont concentrés sur l'étude des paramètres physico-chimiques de l'eau et de la diversité des cyanobactéries en se basant soit sur les caractères morphologiques des populations naturelles (Nasri *et al.*, 2004) ou sur l'identification moléculaire de souches isolées sans culture (El Herry, 2009). Notre étude tente, par des techniques modernes, de contribuer à la caractérisation de la communauté des cyanobactéries dans cet écosystème et des paramètres environnementaux majeurs affectant leur développement, la température et les nutriments.

L'identification de la communauté des cyanobactéries sur la base de leur morphologie a montré que la plupart des morphotypes ne peuvent pas être distingués au niveau spécifique. D'un autre côté, la méthode de métabarcodage de l'ARNr 16S a permis l'identification du phylum des cyanobactéries avec succès et la détermination de 22 genres non détectés par des techniques traditionnelles. Un nombre important parmi ces derniers, *Tolypothrix*, *Nostoc*, *Rivularia*, *Arthrospira*, *Synechocystis*, *Pseudanabaena*, *Chroococcidiopsis*, *Cyanobium* et *Roseofilum* sont d'une importance majeure à cause de leur capacité de production de MCs (Bláha et Maršálek, 1999; Domingos *et al.*, 1999; Oudra *et al.*, 2002; Metcalf et Codd, 2012; Pereira *et al.*, 2012; Magana-Arachchi et Wanigatunge, 2013; Richardson *et al.*, 2014). Cependant l'identification des espèces par cette méthode n'est pas possible à cause des limites de la résolution taxonomique du gène de l'ARNr 16S à ce niveau pour les cyanobactéries (Shiels *et al.*, 2019). Ainsi, les approches moléculaires sont plus informatives pour évaluer la structure de la communauté naturelle (Steffen *et al.*, 2012) et par suite, on reporte l'importance et le besoin de l'utilisation de ces méthodes pour comprendre les dynamiques des populations des cyanobactéries dans la colonne d'eau.

Les paramètres physico-chimiques ont indiqué que les eaux du réservoir, au cours de la période de notre étude, offraient des conditions propices au développement des cyanobactéries du fait que le phosphore et l'azote ont été démontrés comme étant des facteurs liés au développement massif des cyanobactéries d'eau douce (Jankowiak *et al.*, 2019) et le taux de croissance plus élevé des cyanobactéries à des températures supérieures à 20 ° C (Paerl et Huisman, 2008). En se basant sur la classification trophique définie par

la concentration du PT de l'OECD (1982), le réservoir Cheffia est classé dans la catégorie des eaux hypereutrophes (concentration du PT > 100 µg/litre) ce qui reflète de la pollution anthropogénique dans cet écosystème.

La température de l'eau et l'eutrophisation sont les facteurs majeurs affectant le développement des cyanobactéries (O'Neil, 2012 ; Paerl et Paul, 2012) ; par conséquence nos résultats peuvent être, probablement, expliqués par l'état trophique de l'eau dans cet écosystème. Les formes filamenteuses (Reynolds, 1996), des espèces de Nostocales (Salmaso *et al.*, 2015), *Microcystis* (Belykh *et al.*, 2013 ; Deutsch *et al.*, 2020) et *Planktorhtix* (Bukowska *et al.*, 2017) ont été considérées caractéristiques des eaux hypereutrophes. Nos résultats sont en concordance avec ces données ; les espèces dominantes dans nos échantillons sont des membres des genres *Microcystis*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon* et *Planktothricoides*. Le genre *Microcystis* est également favorisé par des températures élevées (Šejnohová et Maršálek, 2012). Certaines études ont attribué la dominance des Nostocales à la disponibilité du phosphore (Kolzau *et al.*, 2014 ; Gkelis *et al.*, 2017) et la possibilité d'être renforcée par l'augmentation des températures de l'eau (Salmaso *et al.*, 2015). Ainsi, le réchauffement climatique est considéré comme un facteur majeur favorisant la nouvelle diffusion des Nostocales des régions tropicales aux régions subtropicales et tempérées (Antunes *et al.*, 2015). Cet ordre a été également identifié dans nos échantillons en pourcentage élevé. Par conséquence, l'effet de la température doit être pris en considération dans les futures investigations du développement des cyanobactéries dans cet écosystème. En effet, l'Algérie est le pays le plus grand de l'Afrique et du bassin Méditerranéen, qui sont parmi les régions les plus exposées aux changements climatiques (Niang *et al.*, 2014). La réponse des différents taxons aux changements climatiques est encore non claire (O'Neil *et al.*, 2012), cependant il a été suggéré que quelques taxons, comme *Microcystis*, sont plus sensibles aux changements de température par rapport aux autres (Rigosi *et al.*, 2014).

De plus une distribution et une diversité variables des cyanobactéries ont été observées entre les échantillons. Cependant notre travail a été réalisé sur un court intervalle de temps, ce qui indique que d'autres études avec un échantillonnage plus large couvrant toute l'année et l'ensemble de la colonne d'eau sont nécessaires pour explorer les facteurs déterminant la composition des communautés des cyanobactéries dans cet écosystème.

La communauté des cyanobactéries identifiées comprenait des génotypes MCs producteurs. Des études antérieures ont démontré que la présence des gènes *mcy* dans les cellules est, généralement, corrélée avec leur capacité à synthétiser les MCs (Panksep *et al.*, 2020). Köker *et al.* (2017) ont observé la cooccurrence de plus d'un genre MCs producteur, *Anabaena*, *Microcystis* et *Planktothrix* dans les lacs eutrophes et hypertrophes. Comme suggéré par les mêmes auteurs, cette complexité de plusieurs genres MCs producteurs a été favorisée par des eaux riches en nutriments. En effet, les MCs peuvent être retrouvées dans tous les ordres des cyanobactéries (Aboal et Puig, 2005 ; Izaguirre *et al.*, 2007) et la plupart des taxons MCs producteurs appartiennent aux genres *Microcystis*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Anabaena/Dolichospermum* et *Anabaenopsis* (Merel *et al.*, 2013 ; Bernard *et al.*, 2017).

Microcystis, un des genres dominants, a montré la cooccurrence de 5 morphotypes. Cette étude est le deuxième rapport décrivant un nombre important des espèces du même genre, *Microcystis*, après Krstić *et al.* (2017) où 9 morphotypes du même genre (*M. aeruginosa*, *M. botrys*, *M. flos-aquae*, *M. ichthyoblabe*, *M. novacekii*, *M. protocystis*, *M. smithii*, *M. viridis* et *M. wesenbergii*) ont été identifiés dans le lac Dojran (un lac eutrophe stable), FYR Macedonia. Cette donnée est très importante en terme de toxicité, comme la majorité des morphotypes identifiés sont reconnus comme MCs producteurs: *M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe* (Lee *et al.*, 2018) et *M. novacekii* (Song *et al.*, 1998) ; ainsi la concentration des toxines dans cet écosystème peut augmenter si des blooms se produisent dans le future puisque il a été confirmé que la croissance des espèces des eaux eutrophes est plus intense que celle des eaux mesotrophiques (Lüring *et al.*, 2018) ; ou si de nouveaux taxons sont producteurs de différentes espèces chimiques toxiques.

Bien que dans la plupart des cas, les souches de *Microcystis* avec les gènes *mcy* produisent des MCs (Qiu *et al.*, 2013 ; Falcone-Dias *et al.*, 2020), ceci n'est pas le cas pour les souches de *Planktothrix* (Christiansen *et al.*, 2006). Cependant, la toxicité de *P. agardhii* a été récemment confirmée dans un plan d'eau en Algérie, le barrage Ain Zada (Saoudi *et al.*, 2017). La toxicité des souches de *Microcystis* est aussi bien connue dans les écosystèmes Algériens, le lac Oubeira (Nasri *et al.*, 2008) et le lac des oiseaux (Bouhaddada *et al.*, 2016), ainsi que dans les pays voisins de mêmes conditions climatiques : au Maroc, le réservoir lac Lalla Takerkoust (Samoudi *et al.*, 2016), le réservoir Yaacoub Al Mansour (Ait Hammou *et al.*, 2018), le réservoir Mansour Eddahbi, le réservoir Almassira (Douma *et al.*, 2010), les lacs Aguelmam Azizgza et Dayet

Afourgah (Douma *et al.*, 2017); les réservoirs Tunisiens ; Hjar, Nebhana, Joumine, Séjnène (Fathalli *et al.*, 2011) et le barrage Lebna (El Herry *et al.*, 2008) aussi bien qu'en Egypte (Mohamed *et al.*, 2015). *Anabaena/Dolichospermum* (Merel *et al.*, 2013 ; Bernard *et al.*, 2017) et *Nostoc* (Oudra *et al.*, 2009) sont considérés aussi parmi les producteurs majeurs des MCs. Effectivement, l'identification de la MC-LR dans nos échantillons, a confirmé que les cyanobactéries dans ce réservoir produisent les MCs.

Les souches isolées ont été identifiées sur la base de critères morphologiques, moléculaires et phylogénétiques. Les résultats ont montré que les classifications morphologiques et phylogénétiques peuvent être incompatibles. C'est le cas de la souche *Microcystis* sp. CR12, affiliée au genre *Microcystis* sur la base de caractéristiques morphologiques selon la description de ce genre dans le *Manuel de Bergey de Bactériologie Déterminative* (Holt *et al.*, 1994). En effet, le genre *Microcystis* possèdent les caractéristiques suivantes: des cellules cocoïdes avec aérotopes et une structure coloniale entourée d'un mucilage (Otsuka *et al.*, 2001). Des différences entre les caractéristiques moléculaires et morphologiques ont été largement reportées (Komárek, 2010; Willame *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2014), en plus, il a été démontré que la base de données GenBank contient des erreurs de classification des espèces (Komárek, 2010). Des souches dans les collections de culture ont été également misidentifiées, et peuvent être trouvées dans d'autres collections de culture sous différents noms (Komárek, 2010). En outre, avec les nombreuses modifications de la taxonomie des cyanobactéries et de la nomenclature, il n'y a pas une possibilité pour apporter ces corrections ou ajuster les bases de données (Komárek, 2006). En plus, le nombre des séquences du gène de l'ARNr 16S disponibles actuellement dans l'ensemble des bases de données est néanmoins faible, et des études de systématique supplémentaires sont nécessaires pour clarifier les ambiguïtés taxonomiques actuelles (Lopes *et al.*, 2012).

Trois clades ont été obtenus à partir des souches des Oscillatoriales confirmant l'origine polyphylétique de cet ordre (Valério *et al.*, 2009). Les souches de *Microcystis* obtenues ont été mixées dans l'arbre phylogénétique et n'ont pas pu être identifiées comme un groupe monophylétique ce qui confirme également la polyphylie des Chroococcales (Litvaitis, 2002; Seo et Yokota, 2003).

Notre étude a révélé pour la première fois la présence de génotype toxique du genre *Aphanothece* dans le réservoir Cheffia. Des souches de picocyanobactéries productrices de MCs ont été isolées du réservoir Tabocas dans la cité Caruaru (Brésil) où le premier incident d'intoxication humaine a été observé (Domingos *et al.*, 1999). Quelques études ont également montré que des souches de picocyanobactéries peuvent produire des MCs en culture mais aucune étude n'a exploré la présence de gènes de toxicité (Śliwińska-Wilczewska *et al.*, 2018).

Le groupe des picocyanobactéries est capable aussi de produire des blooms qui sont responsables de la mort d'une grande partie de la faune et de la flore benthiques (Śliwińska-Wilczewska *et al.*, 2018). Les blooms de picocyanobactéries les plus étudiés ont été observés dans le Nord de la Méditerranée aux lagunes Comacchio (Nord-Ouest de la côte Adriatique) (Sorokin et Zakusina, 2010). Ces blooms ont causé la mortalité de la végétation de fond et de la faune benthique et la perte de ressources précieuses de poissons (anguille et mulot) et de mollusques (Munari *et al.*, 2005). Selon Śliwińska-Wilczewska *et al.* (2018), les blooms de picocyanobactéries est un nouveau phénomène qui nécessite des études approfondies et bien que les effets du changement climatique sur les blooms des picocyanobactéries soient complexes, la plupart des données actuelles suggèrent que ce processus semble augmenter l'amplitude et la fréquence de ces événements.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Dans le but de réaliser des investigations de la composition de la communauté des cyanobactéries dans le réservoir Cheffia du Nord-Est Algérien, une approche polyphasique a été utilisée. En conclusion, les eaux du réservoir Cheffia ont été caractérisées par un état hypereutrophe, accompagné d'une grande diversité dans la composition de la communauté des cyanobactéries. Cinq ordres ont été identifiés : Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales, Synechococcales et Chroococcidiopsidales ; au niveau générique, 28 genres ont été identifiés avec la dominance des taxons appartenant aux genres *Microcystis*, *Aphanizomenon* et *Planktothrix*. Ainsi, il a été reporté pour la première fois une portion élevée des Nostocales, ce qui signale un éventuel effet du changement climatique sur la composition des cyanobactéries étant donné que l'Algérie, peut être considérée comme un point chaud pour ce phénomène.

Une association multiple de souches productrices de toxines, caractéristique des eaux riches en nutriments, a été observée. Cette association peut être grave en terme de toxicité si plusieurs ou de nouveaux congénères sont, éventuellement, produits. Cependant, la production la MC-LR, la variante la plus toxique, a été confirmée.

Les méthodes cultures-dépendantes ont permis l'identification d'un génotype toxique appartenant aux picocyanobactéries, un groupe de cyanobactéries qui est souvent négligé bien que sa toxicité soit d'une grande importance.

Ainsi, une attention particulière doit être attribuée à la surveillance de l'eutrophisation dans cet écosystème et un plan de gestion des déchets urbains et industriels doit être mis en place. Les méthodes de traitement de l'eau dans cet écosystème doivent également tenir compte de la présence des souches de picocyanobactéries ;

En perspectives,

- cette étude a été conduite sur une courte période, des recherches supplémentaires sur de longues périodes ou des études *in vitro* et éventuellement sur d'autres habitats sont nécessaires pour déterminer les facteurs responsables des changements de la composition de la communauté des cyanobactéries pour une meilleure gestion des écosystèmes. De plus, ces données ouvrent la voie à une compréhension plus approfondie des mécanismes sous-jacents à la dynamique de la

Conclusion et perspectives

biodiversité et des conséquences du changement de la biodiversité sur le fonctionnement des écosystèmes ;

- il est important d'étudier avec attention le rôle des picocyanobactéries dans les écosystèmes aquatiques ;
- des études portant sur la phylogénie et la phylogéographie des cyanobactéries dans les écosystèmes Algériens par isolement et mise en culture est une étape très importante, au profit de la recherche scientifique ;
- enfin, les cyanobactéries ont également diverses applications d'intérêt biotechnologique, ainsi un nouvel axe de recherche peut être ouvert pour l'exploration et l'exploitation de ces ressources naturelles.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aboal M., Puig M.A. (2005). Intracellular and dissolved microcystin in reservoirs of the river Segura basin, Murcia, SE Spain. *Toxicon* 45 (4):509–518.
- Adams D.G., Duggan Pt.S. (2008). Cyanobacteria-bryophyte symbioses. *J Exp Bot* 59:1047–1058.
- Adeyemo O.M., Siren A.L. (1992). Cardio-respiratory changes and mortality in the conscious rat induced by (+)- and (+/-)-anatoxin-a. *Toxicon* 30:899–905.
- AFSSA (2006). Rapport sur l'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives.
- Agence National des Ressources en Eau (2004). Rapport annuel interne de l'agence nationale des ressources en eau, Wilaya de Skikda, Algérie, 32 p.
- Ait Hammou H., Latour D., Samoudi S., Mouhri K., Douma M., Robin J., Loudiki M. (2018). Occurrence of the first toxic *Microcystis* bloom in a recent Moroccan reservoir. *Water Resour* 45 (3):409–417.
- Annala A., Lehtimäki J., Mattila K., Eriksson J.E., Sivonen K., Rantala T.T., Drakenberg T. (1996). Solution structure of nodularin an inhibitor of serine/threonine-specific protein phosphatases. *J Biol Chem* 271:16695–16702.
- Antoniou M.G., Shoemaker J.A., de la Cruz A.A., Dionysiou D. (2008). LC/MS/MS structure elucidation of reaction intermediates formed during the TiO₂ photocatalysis of microcystin-LR. *Toxicon* 5:1103–1118.
- Antunes J., Leão P., Vasconcelos V. (2015). *Cylindrospermopsis raciborskii* : Distribution, phylogeography and ecophysiology of a global invasive species. *Front Microbiol* 6:473.
- APHA (1985). American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and waste water 15th edition. Pp 476.
- Awramik S.M. (1992). The oldest records of photosynthesis. *Photosynth Res* 33:75–89.
- Ballot A., Bernard C., Fastner J. (2017). Chapter 14: Saxitoxin and analogues. In: Meriluoto J., Spoof L., Codd G.A. (Eds.), *Handbook of cyanobacterial monitoring and*

- cyanotoxin analysis. John Wiley & Sons Kapittel 14. ISBN 9781119068686. s148–154.
- Ballot A., Fastner J., Lentz M., Wiedner C. (2010). First report of anatoxin-a-producing cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* in northeastern Germany. *Toxicon* 56:964–971.
- Banker R., Teltsch B., Sukenik A., Carmeli S. (2000). 7 Epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from Lake Kinneret, Israel. *J Nat Prod* 63:387–389.
- Beattie K.A., Kaya K., Codd G.A. (2000). The cyanobacterium *Nodularia* in PCC 7804, of freshwater origin, produces L-Har (2) nodularin. *Phytochemistry* 54:57–61.
- Bednarska A., Pietrzak B., Pijanowska J. (2014). Effect of poor manageability and low nutritional value of cyanobacteria on *Daphnia magna* life history performance. *J Plankton Res* 36 (3):838–847.
- Belykh O.I., Gladkikh A.S., Sorokovikova E.G., Tikhonova I.V., Potapov S.A., Fedorova G.A. (2013). Microcystin-producing cyanobacteria in water reservoirs of Russia, Belarus and Ukraine. *Chem Sustain Dev* 21:347–361.
- Bentley D. (2006). Whole-genome re-sequencing. *Curr Opin Genet Deve* 16:545–552.
- Bergman B., Zheng W.W., Klint J., Ran L. 2008. On the origin of plants and relations to contemporary cyanobacterial-plant symbioses. *Plant Biotechnol* 25 (3):213–220.
- Bernard C., Ballot A., Thomazeau S., Maloufi S., Furey A., Mankiewicz-Boczek J., Pawlik-Skowronska B., Capelli C., Salmaso N. (2017). Appendix 2. Cyanobacteria associated with the production of cyanotoxins. In: Meriluoto J., Spoof L., Codd G.A. (Eds.), *Handbook on cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 503–527.
- Berry J.P., Gantar M., Perez M.H., Berry G., Noriega F.G. (2008). Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algaecides, herbicides and insecticides. *Mar Drugs* 6:117–146.

Références bibliographiques

- Billam M., Mukhi S., Tang L., Weimin G., Wang J.S. (2008). Toxic response indicators of microcystin-LR in F344 rats following a single dose treatment. *Toxicon* 51:1068–1080.
- Bittencourt-Oliveira M.C., Piccin-Santos V. (2012). Genetic diversity of Brazilian Cyanobacteria revealed by phylogenetic analysis. In: Caliskan M. (Eds.), Genetic diversity in microorganisms. InTech Europe University Campus STeP Ri, Rijeka, Croatia, pp. 275–290.
- Bláha L., Maršálek B. (1999). Microcystin production and toxicity of picocyanobacteria as a risk factor for drinking water treatment plants. *Algol Stud* 92:95–108.
- Boaru D.A., Kristin S., Corneliu T., Nicolae D. (2006). Microcystins: powerful cyanobacterial toxins. *Contribuții Botanice*, XLI, 1 : 119–145.
- Bouaïcha N., Miles C.O., Beach D.G., Labidi Z., Djabri A., Benayache N.Y., Nguyen-Quang T. (2019). Structural diversity, characterization and toxicology of microcystins. *Toxins* 11:714.
- Bouhaddada R., Néliu S., Nasri H., Delarue G., Bouaïcha N. (2016). High diversity of microcystins in a *Microcystis* bloom from an Algerian lake. *Environ Pollut* 216:836–844.
- Bourrelly P. (1985). Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. III. Les algues bleues et rouges, les Eugléniens, Peridiniens et Cryptogmonadines. 2^{ème} éd. Soc Nouv Ed Boubée, Paris, France, pp. 606.
- Branes Z., Ounissi M., Sargos D., Amblard C. (2007). Density and biomass of phytoplankton in the Oubeira Lake (North-East Algeria). *J Fish Int* 2: 200–206.
- Brehm U., Krumbein W.E., Paliniska K.A. (2003). Microbial spheres : a novel cyanobacterial diatom symbiosis. *Naturwissenschaften* 90:136–140.
- Briand E. (2008). Contribution à la compréhension du déterminisme de la mise en place des proliférations de cyanobactéries et de leur production de toxines. Thèse de Doctorat, Discipline : Ecologie Microbienne. Muséum National d'Histoire Naturelle, 270 pages.

- Bruno M., Ploux O., Metcalf J.S., Mejean A., Pawlik-Skowronska B., Furey A. (2017). Anatoxin-a, Homoanatoxin-a, and natural analogues. In: Meriluoto J., Spoof L., Codd G.A. (Eds.), Handbook on cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 138–147.
- Bukowska A., Kaliński T., Koper M., Kostrzevska-Szlakowska I., Kwiatowski J., Mazur-Marzec H., Jasser I. (2017). Predicting blooms of toxic cyanobacteria in eutrophic lakes with diverse cyanobacterial communities. *Sci Rep* 7:8342.
- Bultel-Poncé V., Felix-Theodose F., Sarthou C., Ponge J.F., Bodo B. (2004). New pigment from the terrestrial cyanobacterium *Scytonema* sp. collected on the Mitraka Inselberg, French Guyana. *J Nat Prod* 67:678–681.
- Callahan B.J., McMurdie P.J., Holmes S.P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J* 11:2639–2643.
- Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J.A., Holmes S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13:581.
- Cardellina J.H., Marner F.J., Moore R.E. (1979). Seaweed dermatitis structure of lyngbyatoxin A. *Science* 204:193–195.
- Carey C.C., Ibelings B.W., Hoffmann E.P., Hamilton D., Brookes J.D. (2012). Ecophysiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Res* 46 (5):1394–1407.
- Carmichael W.W. (1994). The toxins of cyanobacteria. *Sci Am* 270 (1):78–86.
- Casero M.C., Ballot A., Agha R., Quesada A., Cirés S. (2014). Characterization of saxitoxin production and release and phylogeny of *sxt* genes in paralytic shellfish poisoning toxin-producing *Aphanizomenon gracile*. *Harmful Algae* 37:28–37.
- Casero M.C., Velázquez D., Medina-Cobo M., Quesada A., Cirés S. (2019). Unmasking the identity of toxigenic cyanobacteria driving a multi-toxin bloom by high-throughput sequencing of cyanotoxins genes and 16S rRNA metabarcoding. *Sci Total Environ* 15:367–378.

Références bibliographiques

- Castenholz R.W. (2001). Phylum BX. Cyanobacteria. In: Boone D.R., Castenholz R.W. (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, p. 473–599, Springer, New York.
- Cepák V. (1993). Morphology of DNA containing structures (nucleoids) as a prospective character in cyanophyte taxonomy. *J Phycol* 29:844–852.
- Chisholm S.W., Olsen R.J., Zettler E.R., Goericke R., Waterbury J.B., Welschmeyer N.A. (1988). A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature* 334:340–343.
- Chiswell R.K., Shaw G.R., Eaglesham G., Smith M.J., Norris R.L., Seawright A.A., Moore M.R. (1999). Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. *Environ Toxicol* 14:155–161.
- Choi G.G., Bae M.S., Ahn C.Y., Oh H.M. (2008). Induction of axenic culture of *Arthrospira (Spirulina) platensis* based on antibiotic sensitivity of contaminating bacteria. *Biotechnol Lett* 30:87–92.
- Chorus I., Bartram J. (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water, A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, WHO, E & FN Spon, London, pp. 400.
- Christiansen G., Kurmayer R., Liu Q., Börner T. (2006). Transposons inactivate biosynthesis of the nonribosomal peptide microcystin in naturally occurring *Planktothrix* spp. *Appl Environ Microbiol* 72 (1):117–123.
- Churro C., Azevedo J., Vasconcelos V., Alexandra S. (2017). Detection of a *Planktothrix agardhii* bloom in Portuguese marine coastal waters. *Toxins* 9 (12):391.
- Cires S., Alvarez-Roa C., Wood S.A., Puddick J., Loza V., Heimann K. (2014). First report of microcystin-producing *Fischerella* sp. (Stigonematales, Cyanobacteria) in tropical Australia. *Toxicon* 88:62–66.
- Codd G.A., Meriluoto J., Metcalf J.S. (2017). Introduction: cyanobacteria, cyanotoxins, their human impact, and risk management. In: Codd G.A., Meriluoto J., Metcalf J.S. (Eds.), *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, pp 1–8.

- Cohen-Bazire G., Bryant D.A. (1982). Phycobilisomes: composition and structure. In: Carr N.G., Whitton B.A. (Eds.), The biology of cyanobacteria. Blackwell, Oxford, pp. 141–190.
- Cook W.O., Dellinger J.A., Singh S.S., Dahlem A.M., Carmichael W.W., Beasley V.R. (1989). Regional brain cholinesterase activity in rats injected intraperitoneally with anatoxin-a(s) or paraoxon. *Toxicol Lett* 49 (1):29–34.
- Cox P.A., Banack S.A., Murch S.J. (2003). Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *PNAS USA* 100 (23):13380–13383.
- Cox P.A., Banack S.A., Murch S.J., Rasmussen U., Tien G., Bidigare R.R., Metcalf J.S., Morrison L.F., Codd G.A., Bergman B. (2005). Diverse taxa of cyanobacteria produce β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *PNAS USA* 102:5074–5078.
- Cristescu M.E. (2014). From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends Ecol Evol* 29:566–571.
- Dade W.B., Davis J.D., Nichols P.D., Nowell A.R.M., Thistle D., Trexler M.B., White D.C. (1990). Effects of bacterial exopolymer adhesion on the entrainment of sand. *Geomicrobiol J* 8:1–16.
- Dawson R.M. (1998). The toxicology of microcystins. *Toxicon* 36 (7):953–962.
- Dereeper A., Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Dufayard J.F., Guindon S., Lefort V., Lescot M., Claverie J.M., Gascuel O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 1:36(Web Server issue):W465–9.
- Derradji E.F. (2016). Qualité, gestion et protection des eaux du barrage de Cheffia (Nord-Est Algerien). Conférence: Le 5^{ème} Colloque international du réseau "Eaux & Climats", Fès, Maroc.
- Deutsch E.S., Alameddine I., Qian S.S. (2020). Using structural equation modeling to better understand *Microcystis* biovolume dynamics in a mediterranean hypereutrophic reservoir. *Ecol Model* 435:109282.

Références bibliographiques

- Devlin J.P., Edwards O.E., Gorham P.R., Hunter N.R., Pike R.K., Stavríc B. (1977). Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h. Can J Chem 55:1367–1371.
- Dittmann E., Borner T. (2005). Genetic contribution to the risk assessment of microcystin in the environment. Toxicol Appl Pharmacol 203:192–200.
- Dittmann E., Fewer D.P., Neilan B.A. (2013). Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. FEMS Microbiol Rev 37(1):23–43.
- Domingos P., Rubim T.K., Molica R.J.R., Azevedo S.M.F.O., Carmichael W.W. (1999). First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a northeast Brazilian drinking water supply. Environ Toxicol 14:31–35.
- Douglas S.E. (1994). Chloroplast origins and evolution. In: Bryant D.A. (Eds.), The molecular biology of cyanobacteria. Advances in Photosynthesis, vol 1. Springer, Dordrecht. 91–118.
- Douma M., Ouahid Y., del Campo F.F., Loudiki M., Mouhri K., Oudra B. (2010). Identification and quantification of cyanobacterial toxins (microcystins) in two Moroccan drinking-water reservoirs (Mansour Eddahbi, Almassira). Environ Monit Assess 160 (1):439–450.
- Douma M., Ouahid Y., Loudiki M., del Campo F.F., Oudra B. (2017). The first detection of potentially toxic *Microcystis* strains in two Middle Atlas Mountains natural lakes (Morocco). Environ Monit Assess 189 (1):39.
- Drews G., Weckesser J. (1982). Function, structure and composition of cell walls and external layers. In: Carr N.G., Whitton B.A. (Eds.), The biology of cyanobacteria. Blackwell, Oxford, pp. 333–357.
- El Herry S., Fathalli A., Jenhani-Ben Rejeb A., Bouaïcha N. (2008). Seasonal occurrence and toxicity of *Microcystis* spp. and *Oscillatoria tenuis* in the Lebna Dam, Tunisia. Water Res 42:1263–1273.
- El Herry S., Nasri H., Bouaïcha N. (2009). Morphological characteristics and phylogenetic analyses of unusual morphospecies of *Microcystis novacekii* forming bloom in the Cheffia Dam (Algeria). J Limnol 68 (2):242–250.

- Engstrom-Ost J., Repka S., Mikkonen M. (2011). Interactions between plankton and cyanobacterium *Anabaena* with focus on salinity, growth and toxin production. *Harmful Algae* 10:530–535.
- Falcone-Dias M.F., Vaz Rodrigues M., Nielsen J.L., de Jonge N., Jørgensen N.O.G., Alonso D.P., David G.S., da Silva R.J., Júnior J.P.A. (2020). Occurrence of cyanobacteria and microcystins in hydroelectric reservoirs used for fish farming. *J Water Health* 18:983–994.
- Falconer I.R., Choice A., Hosja W. (1992). Toxicity of edible mussels (*Mytilus-edulis*) growing naturally in an estuary during a water bloom of the blue-green-alga *Nodularia spumigena*. *Environ Toxicol Water Qual* 7:119–123.
- Fathalli A., Ben Rejeb Jenhani A., Moreira C., Welker M., Romdhane M., Antunes A., Vasconcelos V. (2011). Molecular and phylogenetic characterization of potentially toxic cyanobacteria in Tunisian freshwaters. *Syst Appl Microbiol* 34 (4):303–310.
- Fathalli F. (2012). Caractérisation moléculaire et étude du potentiel toxique des souches de cyanobactéries isolées à partir des retenues de barrages de la Tunisie : Cas de la retenue du barrage Bir M'cherga. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques, Spécialité : Sciences Halieutiques, Institut National Agronomique de Tunisie. Université de Carthage. Tunisie. 291 pages.
- Fischer W.J., Altheimer S., Cattori V., Meier P.J., Dietrich D.R., Hagenbuch B. (2005). Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol* 203:257–263.
- Fistarol G.O., Legrand C., Selander E., Hummert C., Stolte W., Graneli E. (2004). Allelopathy in *Alexandrium* spp.: effect on a natural plankton community and algal monocultures. *Aquatic Microb Ecol* 35:45–56.
- Fladmark K.E., Brustugun O.T., Hovland R., Bøe R., Gjertsen B.T., Zhivotovsky B., Døskeland S.O. (1999). Ultrarapid caspase-3 dependent apoptosis induction by serine/threonine phosphatase inhibitors. *Cell Death Differ* 6:1099–1108.
- Fosso B., Santamaria M., Marzano M., Alonso-Alemany D., Valiente G., Donvito G., Monaco A., Notarangelo P., Pesole G. (2015). BioMaS: a modular pipeline for Bioinformatic analysis of Metagenomic AmpliconS. *BMC Bioinformatics* 16:203.

- Fujiki H., Suganuma M., Suguri H., Yoshizawa S., Takagi K., Nakayasu M., Ojika M., Yamada K., Yasumoto T., Moore R.E., Sugimura T. (1990). New tumor promoters from marine naturel products. In: Hall S., Strichartz G. (Eds.), Marine toxins, origin, structure and molecular pharmacology. ACS Symp Seri 418:234–240.
- Funari E., Testai E. (2008). Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. Crit Rev Toxicol 38(2):97–125.
- Gehringer M.M. (2004). Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: A dualistic response. FEBS Lett 557:1–8.
- Ginn H.P., Leanne A., Pearson Brett A.N. (2009). Hepatotoxin biosynthesis and regulation in cyanobacteria – the putative involvement of nitrogen and iron homeostasis mechanisms. Chiang Mai J Sci 36 (2):200–223.
- Girardin-Andréani C. (2005). Spiruline : système sanguin, système immunitaire et cancer. Phytothérapie 4:158–161.
- Gkelis S., Panou M., Chronis J., Zervou S.K., Christophoridis C., Manolidi K., Ntislidou C., Triantis T.M., Kaloudis T., Hiskia A., Kagalou I., Lazaridou M. (2017). Monitoring a newly re-born patient: water quality and cyanotoxin occurrence in a reconstructed shallow Mediterranean lake. AIOL 8 (1):33–51.
- González E.J., Roldán G. (2019). Eutrophication and phytoplankton: some generalities from lakes and reservoirs of the Americas. In: Turkoglu M. (Eds.), Phytoplankton ecology and dynamics. IntechOpen, pp 1–20.
- Grant C.S., Louda J.W. (2013). Scytonemin-imine, a mahogany-colored UV/Vis sunscreen of cyanobacteria exposed to intense solar radiation. Org Geochem 65:29–36.
- Gray M.W. (1993). Origin and evolution of organelle genomes. Curr Opin Genet Dev 3:884–890.
- Guellati F.Z., Touati H., Tambosco K., Quiblier C., Humbert J.F., Bensouilah B. (2017). Unusual cohabitation and competition between *Planktothrix rubescens* and *Microcystis* sp. (cyanobacteria) in a subtropical reservoir (Hammam Debagh) located in Algeria. PLoS ONE 12 (8):e0183540.

Références bibliographiques

- Harada K.I., Ohtani I., Iwamoto K., Suzuki M., Watanabe M.F., Watanabe M., Terao K. (1994). Isolation of cylindrospermopsin from cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon* 32 (1):73–84.
- Harrat N., Achour S. (2010). Pollution physico-chimique des eaux de barrage de la région d'El Tarf. Impact Sur La Chloration. *Larhyss J* 8 (1):47–54.
- Hawkins P.R., Chandrasena N.R., Jones G.J., Humpage A.R., Falconer I.R. (1997). Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 35 (3):341–346.
- Hernández González S.E., Ahlgreen E., Ahlgreen G. (2018). Fluctuaciones temporales en el fitoplancton y contenido de microcistinas intracelulares en cuatro lagos Nicaragüenses. *Revista Científica Agua y Conocimiento* 3:1–9.
- Hirata K., Yoshitomi S., Dwi S., Iwabe O., Mahakhant A., Polchai J., Miyamoto K. (2003). Bioactivities of Nostocine A produced by a freshwater cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme* TISTR 8169. *J Biosci Bioeng* 95 (5):512–517.
- Hisbergues M., Christiansen G., Rouhiainen L., Sivonen K., Börner T. (2003). PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Arch Microbiol* 180:402–410.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (1994). Group 11. Oxygenic phototrophic bacteria. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th edn, W. R. Hensyl. Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 377–425.
- Howard G., Bartam J., Williams A., Overbo A., Fuente D., Geere J.A. (2020). Domestic water quantity, service level and health, second edition. Geneva: World Health Organization;. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Huisman J., Codd G.A., Paerl H.W., Ibelings B.W., Verspagen J.M.H., Visser P.M. (2018). Cyanobacterial blooms. *Nat Rev Microbiol* 16 (8):471–483.
- Humpage A. (2008). Toxin types, toxicokinetics and toxicodynamics. *Adv Exp Med Biol* 619:383–415.

Références bibliographiques

- Humpage A.R., Fontaine F., Froscio S., Burcham P., Falconer I.R. (2005). Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome p-450 and oxidative stress. *J Toxicol Env Heal Part A* 68:739–753.
- Hunter P.D., Hanley N., Czajkowski M., Mearns K., Tyler A.N., Carvalho L., Codd G. (2012). The effect of risk perception on public preferences and willingness to pay for reductions in the health risks posed by toxic cyanobacterial blooms. *Sci Total Environ* 426:32–44.
- Hur M., Lee I., Tak B.M., Lee H.J., Yu J.J., Cheon S.U., Kim B.S. (2013). Temporal shifts in cyanobacterial communities at different sites on the Nakdong River in Korea. *Water Res* 47:6973–6982.
- Izaguirre G., Jungblut A.D., Neilan B.A. (2007). Benthic cyanobacteria (Oscillatoriaceae) that produce microcystin-LR, isolated from four reservoirs in Southern California. *Water Res* 41 (2):492–498.
- Jang M.H., Ha K., Joo G.J., Takamura N. (2003). Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. *Freshw Biol* 48:1540–1550.
- Jankowiak J., Hattenrath-Lehmann T., Kramer B.J., Ladds M., Gobler C.J. (2019). Deciphering the effects of nitrogen, phosphorus, and temperature on cyanobacterial bloom intensification, diversity, and toxicity in western Lake Erie. *Limnol Oceanogr* 64:1347–1370.
- Jonasson S., Eriksson J., Berntzon L., Spacil Z., Ilag L.L., Ronnevi L.O., Rasmussen U., Bergman B. (2010). Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *Proc Natl Acad Sci* 107 (20):9252–9257.
- Jungblut A.D., Neilan B.A. (2006). Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Arch Microbiol* 185 (2):107–114.
- Kellmann R., Mihali T.K., Jeon Y.J., Pickford R., Pomati F., Neilan B.A. (2008). Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* 74:4044–4053.

- Kerr T., Jones G.J., Negri A. (1995). Hydroxy fatty acid analysis of lipopolysaccharides in cyanobacteria. CSIRO Division of Water Resources, Australia, Summer Studentship report, 73 pp.
- Köker L., Akçaalan R., Albay M., Neilan B.A. (2017). Molecular detection of hepatotoxic cyanobacteria in inland water bodies of the Marmara Region, Turkey. *AIOL* 8 (1):52–60.
- Kolzau S., Wiedner C., Rücker J., Köhler J., Köhler A., Dolman A.M. (2014). Seasonal patterns of nitrogen and phosphorus limitation in four German lakes and the predictability of limitation status from ambient nutrient concentrations. *PloS One* 9 (4):e96065.
- Komárek J. (2006). Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. *Algae* 21 (4):349–375.
- Komarek J. (2010). Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia* 639:245–259.
- Komárek J. (2013). Cyanoprokaryota: 3rd part: heterocystous genera. In: Büdel B., Gärtner G., Krienitz L., Schagerl M. (Eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd. 19 (3). Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, Germany, pp. 1–1130.
- Komárek J. (2016). A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: Principles and applications. *Eur J Phycol* 51:346–353.
- Komárek J., Anagnostidis K. (1999). Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. In: Ettl H., Gärtner G., Heynig H., Mollenhauer D. (Eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/1, Spektrum Akademischer Verlag, pp. 548.
- Komárek J., Anagnostidis K. (2005). Cyanoprokaryota 2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales. In: Büdel B., Krienitz L., Gärtner G., Schagerl M. (Eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/2, Elsevier/Spektrum, Heidelberg, Germany, pp. 759.
- Komárek J., Johansen J.R. (2015). Coccoid cyanobacteria. In: Wehr J.D., Sheath R.G., Kociolek J.P. (Eds.), *Freshwater Algae of North America*, Elsevier London, Waltham, 75–133.

- Komárek J., Kaštovsky J., Mareš J., Johansen J.R. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86:295–335.
- Kromkamp J. (1987). Formation and functional significance of storage products in cyanobacteria. *N Z J Mar Freshwater Res* 21 (3):457–465.
- Krstić S., Aleksovski B., Komárek J. (2017). Rare occurrence of nine *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) in a single lake (Lake Dojran, FYR Macedonia). *Adv Oceanogr Limn* 8 (1):4–21.
- Kuiper-Goodman T., Falconer I., Fitzgerald J. (1999). Human health aspects. In: Chorus I., Bartram J. (Eds.), *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon, London, pp. 113–153.
- Kumar J., Divya S., Tyagi M.B., Kumar A. (2019). Chapter 16 -Cyanobacteria: applications in biotechnology. *Cyanobacteria* 327–346.
- Ladha J.K., Reddy P.M. (2000). The quest for nitrogen fixation in rice. *International Rice Research Institute, Manila*.
- Lage S., Annadotter H., Rasmussen U., Rydberg S. (2015). Biotransfer of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in a eutrophicated freshwater lake. *Mar Drugs* 13 (3):1185–1201.
- Lapage S.P., Sneath P.H.A., Lessel E.F., Skerman V.B.D., Seeliger H.P.R., Clark W.A. (1992). *International Code of Nomenclature of Bacteria, 1990 revision*. American Society for Microbiology, Washington D.C, USA, pp. 199.
- Lavoie I., Laurion I., Warren A., Vincent W.F. (2007). Les fleurs d'eau de cyanobactéries, revue de littérature. *INRS rapport no 916*, xiii, 124 p.
- Leão P.N., Vasconcelos M.T.S.D., Vasconcelos V.M. (2009). Allelopathy in freshwater cyanobacteria. *Crit Rev Microbiol* 35:271–282.
- Lee E., Ryan U.M., Monis P., McGregor G.B., Bath A., Gordon C., Paparini A. (2014). Polyphasic identification of cyanobacterial isolates from Australia. *Water Res* 59:248–261.

- Lee K.L., Jung K.Y., Kim J.H., Kim Y.S., Kim H.S. (2018). Effect of nitrogen and phosphorus on growth and microcystin production in three *Microcystis* species. *J Environ Biol* 39:413–418.
- Lee T.A., Rollwagen-Bollens G., Bollens S.M., Faber-Hammond J.J. (2015). Environmental influence on cyanobacteria abundance and microcystin toxin production in a shallow temperate lake. *Ecotoxicol Environ Saf* 114:318–325.
- Lee Y.K., Lee J.H., Lee H.K. (2001). Microbial symbiosis in marine sponges. *J Microbiol* 39:254–264.
- Lezcano M.A., Morón-López J., Agha R., López-Heras I., Nozal L., Quesada A., El-Shehawry R. (2016). Presence or absence of *mlr* genes and nutrient concentrations co-Determine the microcystin biodegradation efficiency of a natural bacterial community. *Toxins* 8 (11):318.
- Li R., Carmichael W.W., Brittain S., Eaglesham G.K., Shaw G.R., Liu Y., Watanabe M.M. (2001). First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata*. *J Phycol* 37:1121–1126.
- Litvaitis M.K. (2002). A molecular test of cyanobacterial phylogeny: inferences from constraint analyses. *Hydrobiologia* 468 (1–3):135–145.
- Lopes V.R., Ramos V., Martins A., Sousa M., Welker M., Antunes A., Vasconcelos V. (2012). Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. *Mar Environ Res* 73:7–16.
- Lürling M. (2001). Grazing-associated infochemicals induce colony formation in the green alga *Scenedesmus*. *Protest* 152:7–16.
- Lürling M., Mendes e Mello M., van Oosterhout F., de Senerpont Domis L., Marinho M.M. (2018). Response of natural cyanobacteria and algae assemblages to a nutrient pulse and elevated temperature. *Front Microbiol* 9:1851.
- Ma J., Wang P. (2021). Effects of rising atmospheric CO₂ levels on physiological response of cyanobacteria and cyanobacterial bloom development: A review. *Sci Total Environ* 754:141889.

- Mackintosh C., Beattie K.A., Klumpp S., Cohen P., Codd G.A. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett* 264:187–192.
- Magana-Arachchi D.N., Wanigatunge R.P. (2013). First report of genus *Chroococcidiopsis* (cyanobacteria) from Sri Lanka: a potential threat to human health. *J Nati Sci Found* 41 (1):65–68.
- Magoc T., Salzberg S.L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27 (21):2957–2693.
- Mandal M.K., Chanu N.K., Chaurasia N. (2020). Cyanobacterial pigments and their fluorescence characteristics: applications in research and industry. In: Singh P.K., Kumar A., Singh V.K., Shrivastava A.K. (Eds.), *Advances in cyanobacterial biology*. Academic Press, New York, pp 55–72.
- Mantzouki E., Lürling M., Fastner J., de Senerpont Domis L., Wilk-Woźniak E., Koreivienė J. *et al.* (2018). Temperature effects explain continental scale distribution of cyanobacterial toxins. *Toxins* 10 (4):156.
- Mariani M.A., Padedda B.M., Kaštovský J., Buscarinu P., Sechi N., Viridis T., Lugliè A. (2015). Effects of trophic status on microcystin production and the dominance of cyanobacteria in the phytoplankton assemblage of Mediterranean reservoirs. *Sci Rep* 5:17964.
- Markensten K., Moore K., Persson I. (2010). Simulated lake phytoplankton composition shifts toward cyanobacteria dominance in a future warmer climate. *Ecol Appl* 20:752–767.
- Martin M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J* 17:10–12.
- Mayumi T., Kato H., Imanishi S., Kawasaki Y., Hasegawa M., Harada K. (2006). Structural characterization of microcystins by LC/MS/MS under ion trap conditions. *J Antibiot* 59 (11):710–719.
- Mazmouz R., Chapuis-Hugon F., Mann S., Pichon V., Mejean A., Ploux O. (2010). Biosynthesis of cylindrospermopsin and 7-epicylindrospermopsin in *Ocillatoria* sp.

- strain PCC6505: identification of the *cyr* gene cluster and toxin analysis. *Appl Environ Microbiol* 76 (15):4943–4949.
- McGregor G.B., Sendall B.C., Hunt L.T., Eaglesham G.K. (2011). Report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis mediterranea* Skuja (Cyanobacteria/Nostocales). *Harmful Algae* 10 (4):402–410.
- McNeill J., Barrie F.R., Burdet H.M., Demoulin V., Hawksworth D.L., Marhold K., Nicolson D.H., Prado J., Silva P.C., Skog J.E., Wiersema J.H., Turland N.J. (2006). International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code). *Regnum Vegetabile*, 146. A.R.G. Gantner Verlag KG, Ruggell, Liechtenstein., 1–568.
- Mehnert G., Leunert F., Cirés S., Jöhnk K.D., Rücker J., Nixdorf B., Wiedner C. (2010). Competitiveness of invasive and native cyanobacteria from temperate freshwaters under various light and temperature conditions. *J Plankton Res* 32 (7):1009–1021.
- Méjean A., Paci G., Valérie Gautier V., Ploux O. (2014). Biosynthesis of anatoxin-a and analogues (anatoxins) in cyanobacteria. *Toxicon* 91:15–22.
- Merel S. (2009). Caractérisation des sous-produits de chloration de la microcystine-LR et de la cylindrospermopsine. Thèse de Doctorat, Mention : Biologie, Ecole doctorale Vie Agro Santé. Unité de recherche LERES Laboratoire d'Etude et de Recherche en Environnement et Santé Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique S.V.E. de L'université de Rennes 1, 278 pages.
- Merel S., Villarin M.C., Chung K., Snyder S. (2013). Spatial and thematic distribution of research on cyanotoxins. *Toxicon* 76:118–131.
- Meriluoto J., Spoof L., Codd G. (2017). Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, UK; 576.
- Metcalf J.S., Codd G.A. (2012). Cyanotoxins. In: Whitton B.A. (Eds.), Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time. Springer, Dordrecht, Heidelberg, New York: 651–675.
- Metting B., Pyne J.W. (1986). Biologically-active compounds from microalgae. *Enzyme Microb Technol* 8:386–394.

- Mihali T.K., Kellmann R., Muenchhoff J., Barrow K.D., Neilan B.A. (2008). Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 74(3):716–722.
- Miura S., Yokota A. (2006). Isolation and characterization of cyanobacteria from lichen. *J Gen Appl Microbiol* 52:365–374.
- Moffitt M.C., Neilan B.A. (2004). Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Appl Environ Microbiol* 70:6353–6362.
- Mohamed Z.A., Deyab M.A., Abou-Dobara M.I., El-Sayed A.K., El-Raghi W.M. (2015). Occurrence of cyanobacteria and microcystin toxins in raw and treated waters of the Nile River, Egypt: implication for water treatment and human health. *Environ Sci Pollut Res* 22:11716–11727.
- Moreira C., Azevedo J., Antunes A., Vasconcelos V. (2012). Cylindrospermopsin: occurrence, methods of detection and toxicology. *J Appl Microbiol* 114:605–620.
- Moura S., Pinto E. (2010). Synthesis of cyclic guanidine intermediates of anatoxin-a(S) in both racemic and enantiomerically pure forms. *Synlett* 6:967–969.
- Moustaka-Gouni M., Vardaka E., Tryfon E. (2007). Phytoplankton species succession in a shallow Mediterranean lake (L. Kastoria, Greece): steady-state dominance of *Limnothrix redekei*, *Microcystis aeruginosa* and *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Hydrobiologia*, 575, pp. 129–140.
- Msagati T.A., Siame B.A., Shushu D.D. (2006). Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquat Toxicol* 78:382–397.
- Muenchhoff J., Siddiqui K.S., Poljak A., Raftery M.J., Barrow K.D., Neilan B.A. (2010). A novel prokaryotic L-arginine:glycine amidinotransferase is involved in cylindrospermopsin biosynthesis. *FEBS Journal* 277:3844–3860.
- Mulderij G., Mau B., Van Donk E., Gross E.M. (2007). Allelopathic activity of *Stratiotes aloides* on phytoplankton – towards identification of allelopathic substances. *Hydrobiologia* 584 (1):89–100.

- Munari C.S., Rossi R., Mistri M. (2005). Temporal trends in macrobenthos community structure and redundancy in a shallow coastal lagoon (Valli di Comacchio, Northern Adriatic Sea). *Hydrobiologia* 550:95–104.
- Mundt S., Kreitlow S., Nowotny A., Effmert U. (2001). Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria. *Int J Hyg Environ Health* 203:327–334.
- Mur L.R., Skulberg O.M., Utkilen H. (1999). Cyanobacteria in the environment. In: Chorus I., Bartram J. (Eds.), *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. Spon, London, UK. p. 12–111.
- Nakai S., Inoue Y., Hosomi M., Murakami A. (1999). Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes. *Water Sci Technol* 39:47–53.
- Nasri A.B., Bouaïcha N., Fastner J. (2004). First report of a microcystin-containing bloom of the cyanobacteria *Microcystis* spp. in Lake Oubeira, Eastern Algeria. *Arch Environ Contam Toxicol* 46 (2):197–202.
- Nasri H., Bouaïcha N., Kaid Harche M. (2007). A new morphospecies of *Microcystis* sp. forming bloom in the Cheffia Dam (Algeria): seasonal variation of microcystin concentrations in the raw water and their removal in a full-scale treatment plant. *Environ Toxicol* 22 (4):347–356.
- Nasri H., El Herry S., Bouaïcha N. (2008). First reported case of turtle deaths during a toxic *Microcystis* spp. bloom in Lake Oubeira, Algeria. *Ecotoxicol Environ Saf* 71 (2):535–544.
- Neilan B.A., Jacobs D., Deldot T., Blackall L.L., Hawkins P.R., Cox P.T., Goodman A.E. (1997). Ribosomal-RNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *Int J Sys Bacteriol* 47(3):693–697.
- Neilan B.A., Pearson L.A., Moffitt M.C., Mihali K.T., Kaebernick M., Kellmann R., Pomati F. (2008). The genetics and genomics of cyanobacterial toxicity. In: Hudnell K.H. (Eds.), *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. Springer, New York, pp. 417–452.
- Niang I., Ruppel O.C., Abdrabo M.A., Essel A., Lennard C., Padgham J., Urquhart P. (2014). Africa. In: Barros V.R., Field C.B., Dokken D.J., Mastrandrea M.D., Mach

- K.J., Bilir T.E., Chatterjee M., Ebi K.L., Estrada Y.O., Genova R.C., Girma B., Kissel E.S., Levy A.N., MacCracken S., Mastrandrea P.R., White L.L. (Eds.), Climate Change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability. Part B: regional aspects. Contribution of working group II to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 1199–1265.
- Nicholson B.C., Shaw G.R., Morrall J., Senogles P.J., Woods T.A., Papageorgiou J., Kapralos C., Wickramasinghe W., Davis B.C., Eaglesham G.K., Moore M.R. (2003). Chlorination for degrading saxitoxins (paralytic shellfish poisons) in water. *Environ Technol* 24 (11):1341–1348.
- Nogueira I.C., Lobo-da-Cunha A., Vasconcelos V.M. (2006). Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanobacteria) ingestion on *Daphnia magna* midgut and associated diverticula epithelium. *Aquat Toxicol* 80:194–203.
- Norris R.L., Seawright A.A., Shaw G.R., Senogles P., Eaglesham G.K., Smith M.J., Chiswell R.K., Moore M.R. (2002). Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin *in vivo* in the mouse. *Toxicon* 40 (4):471–476.
- Nübel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G. (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl Env Microbiol* 63 (8):3327–3332.
- Nägeli C., Schwendener S. (1877). *Das Mikroskop*, second ed. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- O’Neil J.M., Davis T.W., Burford M.A., Gobler C.J. (2012). The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14:313–334.
- OECD (1982). Eutrophication of water, monitoring, assessment and control. Organization for economic cooperation and development: Paris, France, pp. 154.
- Ohtani I., Moore R.E., Runnegar M.T.C. (1992). Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J Am Chem Soc* 114:7941–7942.

- Otsuka S., Suda S., Shibata S., Oyaizu H., Matsumoto S., Watanabe M.M. (2001). A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kutzing ex Lemmermann 1907 under the rules of the bacteriological code. *Int J Syst Evol Microbiol* 51 :873–879.
- Oudra B., Dadi-El Andaloussi M., Vasconcelos V.M. (2009). Identification and quantification of microcystins from a *Nostoc muscorum* bloom occurring in Oukaïmeden River (High-Atlas mountains of Marrakech, Morocco). *Environ Monit Assess* 149:437–444.
- Oudra B., Loudiki M., Sabour B., Sbiyyaa B., Vasconcelos V. (2002). Etude des blooms toxiques à cyanobactéries dans trois lacs réservoirs du Maroc : résultats préliminaires. *Rev Des Sci De l'Eau* 15 (1):301–313.
- Paerl H.W. (1988). Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine, and inland waters. *Limnol Oceanogr* 33:823–843.
- Paerl H.W., Fulton R.S., Moisander P.H., Dyble J. (2001). Harmful freshwater algal blooms with emphasis on cyanobacteria. *Sci World J* 4:76–113.
- Paerl H.W., Huisman J. (2008). Blooms like it hot. *Science* 320:57–58.
- Paerl H.W., Paul V.J. (2012). Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res* 46 (5):1349–1363.
- Paldavičienė A., Mazur-Marzec H., Razinkovas A. (2009). Toxic cyanobacteria blooms in the Lithuanian part of the Curonian Lagoon. *Oceanologia* 51 (2):203–216.
- Panksep K., Tamm M., Mantzouki E., Rantala-Ylinen A., Laugaste R., Sivonen K., Tammeorg O., Kisand V. (2020). Using Microcystin Gene Copies to Determine Potentially-Toxic Blooms, Example from a Shallow Eutrophic Lake Peipsi. *Toxins* 12:211.
- Pereira D.A., Pimenta A.C.M., Giani A. (2012). Profiles of toxic and non-toxic oligopeptides of *Radiocystis fernandoii* (Cyanobacteria) exposed to three different light intensities. *Microbiol Res* 167:413–421.
- Peters G.A., Meeks J.C. (1989). The *Azolla-Anabaena* symbiosis - Basic Biology. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40:193–210.

- Ploux O., Combes A., Eriksson J., Metcalf J.S. (2017). Chapter 16: β -N-Methylamino-L-Alanine and (S)-2,4-Diaminobutyric Acid. In: Meriluoto J., Spoof L., Codd G.A. (Eds.), Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. John Wiley & Sons Kapittel 14.
- Preusel K., Stuken A., Wiedner C., Chorus I., Fastner J. (2006). First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon* 47:156–162.
- Pruesse E., Quast C., Knittel K., Fuchs B.M., Ludwig W., Peplies J., Glockner F.O. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* 35 (21):7188–96.
- Qiu Y., Yuan T., Kon T., Zurawell R., Huang Y., Graham M., Gabos S., Pang X. (2013). Rapid detection and quantitation of microcystin-producing *Microcystis* using Real-Time PCR. *J Mol Biomark Diagn* S5:006.
- Qui B., Gao K. (2002). Effects of CO₂ enrichment on the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae): physiological responses and relationships with the availability of dissolved inorganic carbon. *J Phycol* 38:721–729.
- Ramos V.M.C., Castelo-Branco R., Leão P.N., Martins J., Carvalhal-Gomes S., Sobrinho da Silva F., Mendonça Filho J.G., Vasconcelos V.M. (2017). Cyanobacterial diversity in microbial mats from the hypersaline lagoon system of Araruama, Brazil: an in-depth polyphasic study. *Front Microbiol* 8:1233.
- Rantala-Ylinen A., Känä S., Wang H., Rouhiainen L., Wahlsten M., Rizzi E., Berg K., Gugger M., Sivonnen K. (2011). Anatoxin-A synthetase gene cluster of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 37 and molecular methods to detect potential producers. *Appl Environ Microbiol* 77 (20):7271–7278.
- Rasmussen U., Johansson C. (2002). Diversity and specificity in cyanobacterial symbiosis biology and environment. *Proc R Ir Acad* 102B 1:53–56.
- Rastogi R.P., Madamwar D., Incharoensakdi A. (2015). Bloom dynamics of cyanobacteria and their toxins: environmental health impacts and mitigation strategies. *Front Microbiol* 6:1254.

- Reynolds C.S. (1987). Cyanobacterial water blooms. *Adv Bot Res* 13:67–143.
- Reynolds C.S. (1996). The plant life of the pelagic. *Verh. int. Ver. theor. angew. Limnol* 26:97–113.
- Reynolds C.S. (2006). *Ecology of phytoplankton (ecology, biodiversity and conservation)*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- Richardson L.L., Stanić D., May A., Brownell A., Gantar M., Campagna S.R. (2014). Ecology and physiology of the pathogenic cyanobacterium *Roseofilum reptotaenium*. *Life (Basel)* 4 (4):968–987.
- Rigosi A., Carey C.C., Ibelings B.W., Brookes J.D. (2014). The interaction between climate warming and eutrophication to promote cyanobacteria is dependent on trophic state and varies among Taxa. *Limnol Oceanogr* 59:99–114.
- Rinehart K.L., Harada K., Namikoshi M., Chen C., Harvis C.A., Munro M.H.G. (1988). Nodularin, microcystin, and configuration of Adda. *J Am Chem Soc* 110 (25):8557–8558.
- Rippka R. (1988). Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzymol* 167:3–27.
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111:1–61.
- Rippka R., Herdman M. (1992). Pasteur Culture Collection of cyanobacterial strains. In: *Axenic culture, catalogue and taxonomic handbook*. Institut Pasteur, Paris, pp. 103.
- Rodgers K.J., Main B.J., Samardzic K. (2018). Cyanobacterial neurotoxins: their occurrence and mechanisms of toxicity. *Neurotox Res* 33 (1):168–177.
- Runnegar M.T., Kong S.M., Zhong Y.Z., Lu S.C. (1995). Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 49:219–225.
- Saker M.L., Welker M., Vasconcelos V.M. (2007). Multiplex PCR for the detection of toxigenic cyanobacteria in dietary supplements produced for human consumption. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:1136–1142.

Références bibliographiques

- Salmaso N., Boscaini A., Capelli C., Cerasino L., Milan M., Putelli S., Tolotti M. (2015). Historical colonisation patterns of *Dolichospermum lemmermannii* (Cyanobacteria) in a deep lake south of the Alps. *Adv Oceanogr Limn* 6 (1/2):33–45.
- Samoudi S., Latour D., Robin J., Sabart M., Misson B., Ait Hammou H., Mouhri K., Loudiki M. (2016). Horizontal distribution of the cell abundance and toxicity of *Microcystis* in a hypereutrophic Moroccan Reservoir. *Contemp Probl Ecology* 9 (5):554–562.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain – terminating inhibitors. *Proc Acad Sci USA* 74 (12):5463–5467.
- Santé Canada (2002). Les toxines cyanobactériennes – Les microcystines-LR, 24 p.
- Saoudi A., Brient L., Boucetta S., Ouzrout R., Bormans M., Bensouilah M. (2017). Management of toxic cyanobacteria for drinking water production of Ain Zada Dam. *Environ Monit Assess* 189:361.
- Savela H., Spoof L., Perälä N., Preede M., Lamminmäki U., Nybom S., Häggqvist K., Meriluoto J., Vehniäinen M. (2015). Detection of cyanobacterial *sxt* genes and paralytic shellfish toxins in freshwater lakes and brackish waters on Åland Islands, Finland. *Harmful Algae* 47:1–10.
- Schembri M.A., Neilan B.A., Saint C.P. (2001). Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ Toxicol* 16:413–421.
- Schindler D.W., Hecky R.W., Findlay D.L., Stainton M.P., Parker B.R., Paterson M., Beaty K.G., Lyng M., Kasian S.E.M. (2008). Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: results of a 37 year whole ecosystem experiment. *PNAS USA* 105:11254–11258.
- Seifert M., McGregor G., Eaglesham G., Wickramasinghe W., Shaw G. (2007). First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae* 6 (1):73–80.

- Šejnohová L., Maršálek B. (2012). *Microcystis*. In: Whitton B.A. (Eds.), Ecology of cyanobacteria. II. Their diversity in space and time. Springer, London, United Kingdom, pp. 195–228.
- Semyalo R.P. (2009). The effects of cyanobacteria on the growth, survival, and behavior of a tropical fish (*Nile Tilapia*) and zooplankton (*Daphnia lumholtzi*). Thesis for the degree Philosophiae Doctor (PhD) at the University of Bergen, Norvège, 26 pages.
- Seo P.S., Yokota A. (2003). The phylogenetic relationships of cyanobacteria inferred from 16S rRNA, *gyrB*, *rpoC1* and *rpoD1* gene sequences. J Gen Appl Microbiol 49 (3):191–203.
- Sguera S. (2008). *Spirulina platensis* et ses constituants : intérêts nutritionnels et activités thérapeutiques. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Faculté de Pharmacie, Université Henri Poincare - Nancy 1. 163 pages.
- Shen X., Lam P.K.S., Shaw G.R., Wickramasinghe W. (2002). Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. Toxicon 40:1499–1501.
- Shiels K., Browne N., Donovan F., Murray P., Saha S.K. (2019). Molecular characterization of twenty-five marine cyanobacteria isolated from coastal regions of Ireland. Biology 8 (3):59.
- Shirai M., Ohtake A., Sano T., Matsumoto S., Sakamoto T., Sato A., Aida T., Harada K., Shimada T., Suzuki M. (1991). Toxicity and toxins of natural blooms and isolated strains of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) and improved procedure for purification of cultures. Appl Environ Microbiol 57:1241–1245.
- Singh J.S., Kumar A., Rai A.N., Singh D.P. (2016). Cyanobacteria: a precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. Front Microbiol 7:529.
- Sivonen K., Jones G. (1999). Cyanobacterial toxins. In : Chorus I., Bartram J. (Eds.), Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London, pp. 41–111.
- Skulberg O.M., Carmichael W.W., Codd G.A., Skulberg R. (1993). Taxonomy of toxic cyanophyceae (Cyanobacteria). In: Falconer I.A. (Eds.), Alga1 toxins in seafood and drinking water. Academic Press, London, pp 145–163.

- Śliwińska-Wilczewska S., Maculewicz J., Barreiro Felpeto A., Latała A. (2018). Allelopathic and bloom-forming picocyanobacteria in a changing World. *Toxins* 10(1):48.
- Sompong U., Hawkins P.R., Besley C., Peerapompisal Y. (2005). The distribution of cyanobacteria across physical and chemical gradients in hot springs in northern Thailand. *FEMS Microbiol Ecol* 52 (3):365–376.
- Song L., Sano T., Li R., Watanabe M.M., Liu Y., Kaya K. (1998). Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. *Phycol Res* 46:19–23.
- Sorokin Y.I., Zakuskina O.Y. (2010). Features of the Comacchio ecosystem transformed during persistent bloom of picocyanobacteria. *J Oceanogr* 66:373–387.
- Spoof L., Berg K.A., Rapala J., Lahti K., Lepisto L., Metcalf J.S., Codd G.A., Meriluoto J. (2006). First Observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). *Environ Toxicol* 21:552–560.
- Steffen M.M., Li Z., Effler T.C., Hauser L.J., Boyer G.L., Wilhelm S.W. (2012). Comparative metagenomics of toxic freshwater cyanobacteria bloom communities on two continents. *PLoS ONE* 7 (8) : e44002.
- Stewart I., Webb P.M., Schluter P.J., Shaw G.R. (2006). Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria-a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. *Environ Health* 5:6.
- Strausberg R.L., Levy S., Rogers Y.H. (2008). Emerging DNA sequencing technologies for human genomic medicine. *Drug Discov. Today* 13:569–577.
- Svirčev Z., Lalić D., Savić G.B., Tokodi N., Backović D.D., Chen L., Meriluoto J., Codd G.A. (2019). Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. *Arch Toxicol* 93:2429–2481.
- Tanabe Y., Tomoharu S., Fumie K., Makoto M.W. (2009). Recombination, cryptic clades and neutral molecular divergence of the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *BMC Evol Biol* 9:115.

- Taton A., Grubisic S., Balthasart P., Hodgson D.A., Laybourn-Parry J., Wilmotte A. (2006). Biogeographical distribution and ecological ranges of benthic cyanobacteria in East Antarctic lakes. *FEMS Microbiol Ecol* 57 (2):272–289.
- Terao K., Ohmori S., Igarashi K., Ohtani I., Watanabe M.F., Harada K.I., Ito E., Watanabe M. (1994). Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon* 32:833–843.
- Tillmanns A.R., Wilson A.E., Pick F.R., Sarnelle O. (2008). Metaanalysis of cyanobacterial effects on zooplankton population growth rate: species specific responses. *Fund Appl Limnol* 171:285–295.
- Tollrian R., Harvell C.D. (1999). The ecology and evolution of inducible defenses. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Torregrosa-Crespo J., Montero Z., Fuentes J., Reig García-Galbis M., Garbayo I., Vílchez C., Martínez-Espinosa R.M. (2018). Exploring the valuable carotenoids for the large-scale production by marine microorganisms. *Mar Drugs* 16 (6):203.
- Touati H., Guellati F.Z., Arif S., Bensouilah M. (2019). Cyanobacteria dynamics in a mediterranean reservoir of the North East of Algeria : vertical and seasonal variability. *J Ecol Eng* 20 (1):93–107.
- Turner R.E., Schroeder W.W., Wiseman W.J. (1987). The role of stratification in the deoxygenation of Mobile Bay and adjacent shelf bottom-waters. *Estuaries* 10:13–19.
- Urrutia-Cordero P., Agha R., Cirés S., Lezcano M.A., Sánchez-Contreras M., Waara K.O., Utkilen H., Quesada A. (2013). Effects of harmful cyanobacteria on the freshwater pathogenic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Aquat Toxicol* 130–131:9–17.
- Valdor R., Aboal M. (2007). Effects of living cyanobacteria, cyanobacterial extracts and ultrastructure of microalgae and bacteria. *Toxicon* 49 (6):769–779.
- Valério E., Chambel L., Paulino S., Faria N., Pereira P., Tenreiro R. (2009). Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. *Microbiology* 155 (2):642–656.

- Villareal T.A., Carpenter E.J. (2003). Buoyancy regulation and the potential for vertical migration in the oceanic cyanobacterium *Trichodesmium*. *Microb Ecol* 45:1–10.
- Walsby A.E. (1978). The gas vesicles of aquatic prokaryotes. *Symp Soc Gen Microbiol* 28:327–358.
- Weiss J.H., Koh J.Y., Choi D.W. (1989). Neurotoxicity of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and β -N-oxalylamino-L-alanine (BOAA) on cultured cortical neurons. *Brain Res* 497 (1):64–71.
- Weng D., Lu Y., Wei Y., Liu Y., Shen P. (2007). The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocytes apoptosis and liver injury in mice. *Toxicology* 232:15–23.
- WHO (2004). Guidelines for drinking water quality, vol. 1, 3rd ed., Geneva.
- WHO (2020). Cyanobacterial toxins: microcystins. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality and Guidelines for safe recreational water environments. Geneva: World Health Organization; (WHO/HEP/ECH/WSH/2020.6). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Wicks H., Thief P.G. (1990). Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertrophic african reservoir. *Environ Sci Technol* 24:1413–1418.
- Wiese M., D’Agostino P.M., Mihali T.K., Moffitt M.C., Neilan B.A. (2010). Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Mar Drugs* 8 (7):2185–2211.
- Willame R., Boutte C., Grubisic S., Wilmotte A., Komárek J., Hoffmann L. (2006). Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. *J Phycol* 42 (6):1312–1332.
- Yéprémian C., Gugger M.F., Briand E., Catherine A., Berger C., Quiblier C., Bernard C. (2007). Microcystin ecotypes in a perennial *Planktothrix agardhii* bloom. *Water Res* 41:4446–4456.
- Yuan J., Yoon K.J. (2021). Overview of PCR methods applied for the identification of freshwater toxigenic cyanobacteria [Online First], IntechOpen,

Références bibliographiques

- Zhang T.T., He M., Wu A.P., Nie L.W. (2009). Allelopathic effects of submerged macrophyte *Chara vulgaris* on toxic *Microcystis aeruginosa*. *Allelopathy J* 23:391–402.
- Zhou B., Cai X., Wang S., Yang X. (2020). Analysis of the Causes of Cyanobacteria Bloom: A Review[J]. *J Resour Ecol* 11 (4):405–413.

ANNEXES

Annexe 1. Composition des milieux de culture

1. Milieu BG11 (Rippka *et al.*, 1979)

Composition	mL/L d'H ₂ O
Solution stock I	10
Solution stock II	10
Solution stock III	10
Solution stock VI	1

- **Solution stock I**

Composition	g/L d'H ₂ O
NaNO ₃	46.7
Ca(NO ₂) ₂ •4H ₂ O	5.9
MgSO ₄ •7H ₂ O	2.5

- **Solution stock II**

Composition	g/L d'H ₂ O
K ₂ HPO ₄	3.1
Na ₂ CO ₂	2.1

- **Solution stock III**

Composition	mL
Solution Fe (2.6 g FeCl ₂ •6H ₂ O dissous dans 100 mL 0.1 N HCl)	10
Solution EDTA (3.9 g EDTA-Na ₂ dissous dans 100 mL 0.1 N NaOH) ...	9.5

- **Solution stock VI**

Composition

1. $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.33 g/100 mL
2. $(\text{NH}_4)_5\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.88 g/100 mL
3. KBr	1.20 g/100 mL
4. KJ	0.83 g/100 mL
5. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.87 g/100 mL
6. $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.55 g/100 mL
7. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.46 g/100 mL
8. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.25 g/100 mL
9. $\text{NiSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.98 g/100 mL
10. $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.41 g/100 mL
11. V_2O_5	0.089 g/1000 mL
12. $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	4.74 g/100 mL
13. H_3BO_3	3.10 g/1000 mL
14. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.23 g/1000 mL

Ajouter 10 mL des solutions 1-12, et 100 mL des solutions 13 et 14 jusqu'à 1 L d' H_2O .

2. Milieu LB

Composition	g/L d'H ₂ O
Tryptone	10
Extrait de levure	5
Sodium chlorure	10
pH=7,0 ± 0,2	

3. Milieu SOC

Composition	
Tryptone	2 %
Extrait de levure	0.5 %
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

Annexe 2. Composition du vecteur pCR™ 2.1-TOPO®

10 ng/μL d'ADN du plasmide dans :

50% Glycérol

50 mM Tris-HCl, pH 7.4 (à 25°C)

1mM EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique)

1 mM DTT (dithiothréitol)

0.1% % Trion X-100

100 μg/mL BSA

Rouge de phénol

Production scientifique

Communication

BENREDJEM Lamia, BERREDJEM Hajira, ABDI Akila, Antonio QUESADA, Maria-Christina CASERO. Occurrence of toxic cyanobacteria in Algerian freshwater, Cheffia reservoir. Les XIIèmes journées nationales de Microbiologie. Hammamet- TUNISIE, Le 18-20 Novembre 2016. (Présentation orale)

Publication

Benredjem, L., Berredjem, H., Abdi, A., Casero, M.C., Quesada, A., Fosso, B., Marzano, M., Pesole, G., Azevedo, J., Vasconcelos, V. Morphological, molecular, and biochemical study of cyanobacteria from a eutrophic Algerian reservoir (Cheffia). *Environ Sci Pollut Res* (2022):29:27624-27635. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17528-w>

Occurrence of toxic cyanobacteria in Algerian freshwater, Cheffia reservoir
BENREDJEM Lamia^{1*}, BERREDJEM Hajira¹, ABDI Akila¹, Antonio QUESADA², Maria-Christina CASERO²

¹Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences, Department of Biochemistry, University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

²Departamento de Biología, Darwin, 2, Universidad Autonoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain
*lamia.benredjem@yahoo.fr

Key-words: diversity, cyanobacteria, toxins, genes, drinking water

Abstract

Eutrophication is considered the most important water quality problem in freshwaters and coastal waters worldwide. One of the key consequences of eutrophication is the occurrence of potentially toxic cyanobacteria that represent a serious threat to the environment and public health.

Addressing the issues of cyanobacteria and toxin production is critical for the effective management of the water environment and the minimization of health risks associated with cyanotoxins. Therefore, a reservoir used for drinking water; Cheffia reservoir, North-Eastern of Algeria; have been studied with respect to the diversity of cyanobacteria and screened for the presence of toxin encoding genes.

The morphological characteristics and 16S rRNA gene of denaturing gradient gel electrophoresis bands of the field samples revealed a large diversity of cyanobacteria belonging to tow orders, Chroococcales and Oscillatoriales. PCR Analyses for the presence of cyanotoxins showed the presence of the *mcyE* gene belonging to the microcystin synthesis gene cluster.

Microcystins have also been implicated as inhibitors of protein phosphatase 1 and 2A and they are suspected to be involved in the promotion of primary liver cancer in humans. The presence of microcystin producing cyanobacterial forms in this water body indicates the crucial need for chronic drinking water studies. Moreover, the research dealing with toxicology of cyanobacteria will lead to the successful establishment of a monitoring program.



Morphological, molecular, and biochemical study of cyanobacteria from a eutrophic Algerian reservoir (Cheffia)

Lamia Benredjem¹ · Hajira Berredjem¹ · Akila Abdi¹ · Maria Cristina Casero² · Antonio Quesada² · Bruno Fosso³ · Marinella Marzano³ · Graziano Pesole^{3,4} · Joana Azevedo⁵ · Vitor Vasconcelos^{5,6} 

Received: 19 May 2021 / Accepted: 10 November 2021 / Published online: 4 January 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

The cyanobacteria management in water bodies requires a deep knowledge of the community composition. Considering the reliable and thorough information provided by the polyphasic approach in cyanobacteria taxonomy, here we assess the cyanobacterial community structure of the Cheffia reservoir from Algeria. Cyanobacteria were identified on the basis of morphological traits and next-generation sequencing (NGS); toxins-related genes were localized in addition to the identification of toxins; temperature and nutrient level of water samples were also determined. The polyphasic approach was essential for cyanobacteria investigation; 28 genera were identified through 16S rRNA metabarcoding with the dominance of taxa from *Microcystis* (34.2%), *Aphanizomenon* (20.1%), and *Planktothrix* (20.0%), and morphological analysis revealed the association in this water body of five species within the genus *Microcystis*: *M. aeruginosa*, *M. novacekii*, *M. panniformis*, *M. ichthyoblabe*, and *M. flos-aquae*. The presence of *mcyE* genotypes was detected; moreover, HPLC–PDA and LC–ESI–MS/MS revealed the production of microcystin-LR. Results obtained in our study are very important since this ecosystem is used for water supply and irrigation; as a consequence, a good water management plan is essential.

Keywords Algeria · Cyanobacterial diversity · Hypereutrophic water · NGS · Polyphasic approach · Toxins

Introduction

Cyanobacteria are prokaryotic and oxygenic organisms that thrive across many aquatic and terrestrial habitats (Whitton, 2012; Codd et al. 2017). Eutrophication, promoted by human activities related to urban, agricultural, and industrial development, and climate change are the main factors determining the cyanobacteria development (O’Neil et al. 2012; González and Roldán, 2019). This phenomenon is a major concern for the sanitary and environmental agencies due to their potential to produce cyanotoxins posing undesirable effects to human and environmental health (Metcalf and Codd, 2012; Moreira et al. 2012; Bouma-Gregson et al. 2018; Wu et al. 2019). The first step, to reduce the effects related to cyanobacteria outgrow, is the identification of the cyanobacterial community in the water body. The microscopic analysis of morphological characteristics is traditionally used in the classification of cyanobacteria (Komárek and Anagnostidis, 1999, 2005; Komárek, 2013); yet, the high morphological variability and the low number of phenotypic characters used lead to serious identification issues (Bittencourt-Oliveira and

Responsible Editor: Philippe Garrigues

✉ Vitor Vasconcelos
vmvascon@fc.up.pt

- ¹ Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, BP 12, 23000 Annaba, Algeria
- ² Departamento de Biología, C/Darwin, 2, Universidad Autónoma de Madrid, ES-28049 Madrid, Spain
- ³ Istituto Di Biomembrane, Bioenergetica E Biotecnologie Molecolari (IBIOM), CNR, Via Amendola 122/O, 70126 Bari, Italy
- ⁴ Dipartimento Di Bioscienze, Biotecnologie E Biofarmaceutica, Università Degli Studi Di Bari “Aldo Moro”, Via Orabona 4, 70126 Bari, Italy
- ⁵ Interdisciplinary Centre of Marine and Environmental Research (CIIMAR/CIMAR), University of Porto, Rua Dos Bragas, 289, 4050-123 Porto, Portugal
- ⁶ Biology Department, Faculty of Sciences, University of Porto, Rua Do Campo Alegre, 4169-007 Porto, Portugal

Piccin-Santos, 2012). Thus, the application of polyphasic taxonomy ensures the accurate identification of cyanobacteria (Nübel et al. 1997; Komárek, 2016). DNA metabarcoding, with the application of high-throughput sequencing technology, is a promising method to deeply explore cyanobacterial diversity (Ramos et al. 2017; Casero et al. 2019). Moreover, detection of toxins production in environmental samples is, also, very important for the monitoring of water resources (Lee et al. 2015). For this purpose, amplification by polymerase chain reaction (PCR) of specific genes related to toxins production is a rapid and effective technique (Belykh et al. 2015; Kurmayer et al. 2017) as well as biochemical analysis.

Increasing levels of eutrophication and cyanobacteria development are expected due to climate change, in particular in the southern Mediterranean and islands (Mariani et al. 2015). Cheffia reservoir, in Algeria, is a water body used for drinking, industrial, and irrigation water. The organic pollution in this reservoir appears to be considerable (Harrat and Achour, 2010). Indeed, this reservoir is connected with the Bounamoussa River which receives inputs from industrial, urban, and agricultural sectors with low treatment levels. Hence, the present study aims to investigate the cyanobacteria community in this subtropical ecosystem using morphological analysis, massive sequencing, toxins-related genes amplification, and chemical features in addition to the determination of physicochemical characteristics of water.

Materials and methods

Study site description and sampling

The study was conducted in Cheffia reservoir (36°07'N and 8°03'E) located in the North-East of Algeria (Agence National des Ressources en Eau, 2004).

The sampling was carried out on 3 different dates at irregular intervals spread over the period October–November 2014. Samples for physical–chemical quality analysis were collected with a polyethylene bottle from a depth of about 30 cm below the water surface, stored at 4 °C, and processed within 24 h. Cyanobacterial samples were collected directly or concentrated from the water surface with plankton net (20-µm mesh size); subsamples for morphological analysis were fixed in the field with Lugol's iodine solution and stored at 4 °C in the dark. For molecular analysis, the remaining samples were filtered through fiberglass filters (0.7 µm approx., Millipore) then stored at –20 °C. For toxins analysis, 100 mL of water was filtered on GF/F filters and analyzed immediately.

Chemical and physical analysis

Temperature (Temp) was determined in situ using Hanna Instruments handheld meter (Hi 98,129). Ammonium (NH_4^+ , mg L^{-1}) concentrations were analyzed using the Spectroquant Merck method following ISO 7150–1. Nitrates (NO_3^- , mg L^{-1}) and nitrites (NO_2^- , mg L^{-1}) concentrations were assessed spectrophotometrically using Merck Kits, analogous to the DIN 38,405–9 methods. Total phosphorus (TP, mg L^{-1}) levels were determined using the ammonium molybdate spectrometric method (ISO 6878: 2004).

Morphological characterization

Microscopic observations were performed out under an Olympus BH-2 photomicroscope (Leica Microsystems, Germany), at 125× and 500× magnifications. The identification of cyanobacteria morphospecies was performed based on morphological traits according to Komárek and Anagnostidis (1999; 2005) and Komárek (2013).

Total DNA extraction and amplifications

Total genomic DNA was extracted from filters using the DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions modified by Lezcano et al. (2016). Purified DNA was preserved at –20 °C until being applied to PCR analysis and sequencing.

The 16S rDNA was amplified by PCRs with specific primers for cyanobacteria, CYA359F and CYA781R (a/b) (Table 1) according to the method of Nübel et al. (1997).

The presence of the following genes: *mcyE*, *cyrJ*, *anaF*, and *sxtI*, related to the production of the common toxins: hepatotoxin microcystin (MC), cylindrospermopsin (CYN), anatoxin (ANA), and saxitoxin (STX), respectively, was checked by PCRs using specific primer pairs (Table 1). The following strains: *M. aeruginosa* UAM 247, *Aphanizomenon issatchenkii* SP 33, *A. gracile* UAM 529, and *A. ovalisporum* UAM 290, from the Autonoma de Madrid University culture collection (Spain), were used as positive controls for the production of MCs, ANAs, SAXs, and CYNs, respectively. The reaction mixes were made up as master mixes, containing 2-µl loading buffer, 1.2 µl MgCl_2 , 0.5 µl deoxynucleotide triphosphate mix (2 mM), 1 µl of each forward and reverse primer (10 mM), 1 µl of genomic DNA, 0.1 µl Taq DNA polymerase, and Milli-Q water yielding a total volume of 18 µl. Thermal cycling was performed on a Peltier thermal cycler PTC

Table 1 Primer sets used for PCR amplification

Target	Primer pair	Sequence (5'–3')	Size (bp)	Reference
16S rRNA	CYA359F CYA781Ra CYA781Rb	GGGGAATYTTCCGCAATGGG GACTACTGGGGTATCTAATCCCAT GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT	422	Nübel et al. (1997)
<i>mcyE</i>	HEPF HEPR	TTTGGGGTTAACTTTTGGGCATAGTC AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGTTT	472	Jungblut and Neilan (2006)
<i>sxtI</i>	sxtaf sxtar	AGCGCTGCCGCTATGGTTGTCG ACGCAATGAGGGCGACACCAC	960	Casero et al. (2014)
<i>cyrJ</i>	cynsulF cynlamR	ACTTCTCTCCTTTCCCTATC GAGTGAAAATGCGTAGAAGTTG	656	Mihali et al. (2008)
<i>anaF</i>	atxoaf atxar	TCGGAAGCGCGATCGCAAATCG GCTTCCTGAGAAGGTCCGCTAG	461	Ballot et al. (2010)

200 (MJ Research, Inc., San Francisco, CA). Afterwards, PCR products were visualized by 1.5% agarose gel electrophoresis with GelRed staining and UV illumination and compared with a molecular weight marker (GeneRuler™ 1 kb DNA ladder).

Illumina-based sequencing and sequences processing

The 16S rRNA gene amplicons from each sample were quantified by fluorimetry with PicoGreen (Invitrogen, CA, USA), pooled at equimolar concentrations and subjected to a 2 × 250 bp paired-end sequencing on the Illumina MiSeq platform (Parque Científico de Madrid, Madrid, Spain).

The raw Illumina MiSeq reads of the 16S rRNA were first quality checked by using FastQC (Available online: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). PCR primers were removed from raw reads by applying cutadapt (Martin, 2011) and the resulting sequences were merged by using FLASH (Magoc and Salzberg, 2011). Following the obtained merged sequences were denoised into ASVs (amplicon sequence variants) (Callahan et al. 2017) by applying DADA2 (version 1.10.1) (Callahan et al. 2016). ASVs were taxonomically annotated by using BioMaS (Fosso et al. 2015) and the release 138 NR 99 of the SILVA database (Pruesse et al. 2007). ASVs assigned as chloroplast were removed from subsequent analysis. Relative sequence abundances were calculated based on the total number of sequences and ASVs per sample. The raw 16S rRNA dataset is available at Sequence Read Archive (SRA) under study PRJNA612648.

Toxins analysis

Filters were extracted twice with methanol 50% (v/v) by sonication for 5 min at 60 Hz, in an ice bath. After centrifugation (4995 g, 5 min, 4 °C), the supernatants were vacuum dried (< 35 °C; < 150 mbar) and the dry crude extracts were

dissolved in 1.5 mL of methanol 50%. Samples were subsequently analyzed by high-performance liquid chromatography with a photodiode array detector (HPLC/PDA) then by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry (LC–ESI–MS/MS). The HPLC/PDA system used a Waters® Alliance e2695 HPLC system (Milford, MA) coupled with a PDA 2998 detector following the method described by Churro et al. (2017). MCs were identified on the basis of their UV spectra (200–300 nm) and retention time with an Empower 2™ Chromatography Data Software. The standard used was the MC-LR (Cyano Biotech GmbH, Berlin).

LC–ESI–MS/MS analysis was carried out in full scan (270–2000 m/z) and collision-induced dissociation (CID) using a Liquid Phase Chromatograph Finnigan Surveyor (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), coupled with a spectrometry detector (MS Mass LCQ Fleet™ ion trap), with electrospray (ESI) interface, including a Surveyor LC pump, a Surveyor auto-sampler, and a surveyor photoelectric diodearray (PDA) detector. Separation was achieved using C₁₈ Hypersil Gold column (100 × 4.6 mm I.D., 5 μm, Thermo-Scientific) kept at 35 °C. The flow rate was set at 0.7 mL/min. The eluents used were acetonitrile (mobile phase A) and water (mobile phase B) both acidified 0.1% formic acid (v/v). The gradient program started at 45% A (held for 5 min), increasing to 90% A in 12 min, turning back to initial conditions in 5 min to equilibrate until 25 min. The injected volume was 10 μL in loop partial mode. The positive ionization mode parameters were as follows: capillary voltage, capillary temperature, tube lens, and normalized collision energy maintained at 22 V, 350 °C, 120 kV, and 35, respectively (Mayumi et al. 2006). Data were processed using Xcalibur™ version 2 Software.

Table 2 Physical and chemical characteristics of Cheffia reservoir water during the period October–November 2014

Sampling date	13 Oct. 2014	09 Nov. 2014	22 Nov. 2014
Temp (°C)	29	22.5	21
NO ₃ [−] (mg L ^{−1})	0.42	3.15	1.07
NO ₂ [−] (mg L ^{−1})	12.92	14.31	11.65
NH ₄ ⁺ (mg L ^{−1})	2.39	1.61	0.62
TP (mg L ^{−1})	2.02	6.30	3.49

Results

Water analysis

Selected water quality parameters data throughout the sampling study period are presented in Table 2. The water temperature on the sampling site showed high values with a mean of 24.0 °C. High values of nutrients were observed, with total inorganic nitrogen and total phosphorus concentrations between 13.34–19.07 mg N L^{−1} and 2.02–6.30 mg P L^{−1}, respectively.

Morphological analysis

Based on taxonomic keys, the cyanobacterial community of Cheffia reservoir was composed of 6 genera from Chroococcales and Oscillatoriales (Figs. 1 and 2), of which *Microcystis* was characterized with wide morphospecies diversity; some of them are identified at the species level as *M. aeruginosa*, *M. novacekii*, *M. panniformis*, *M. ichthyoblabe*, and *M. flos-aquae*. *Microcystis*, *Planktothrix*, and *Planktothricoides* were found from all samples (Table 3).

Analysis of metabarcoding libraries

To assess the qualitative cyanobacteria composition from three samples at Cheffia reservoir, we used high-throughput Illumina sequencing of cyanobacterial 16S rRNA gene (V3–V4 region). The total number of raw reads generated across all samples was 1,132,089. Overall, 271 ASVs were inferred, and according to the taxonomic classification, 57 16S rRNA chloroplast sequences were identified and removed from further analysis.

Cyanobacterial reads in all three 16S rRNA datasets belonged to five orders: Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales, Synechococcales, and Chroococcidiopsidales. A total of 28 cyanobacteria genera were identified. *Microcystis* represented the most abundant genus through 16S rRNA sequencing accounting for 34.2% of the reads followed by the heterocystous diazotroph *Aphanizomenon* (20.1%) and the filamentous solitary trichomes *Planktothrix* (20.0%). *Planktothricoides*, *Cylindrospermopsis*, *Sphaerospermopsis*,

and *Pseudanabaena* were still present in this ecosystem, while in minority, at proportions of 8.6%, 7.1%, 6.0%, and 2.4%, respectively. The fraction of identified cyanobacteria with a percentage less than 1% included members of *Roseofilum* (0.4%), *Cyanobium* (0.4%), and *Phormidium* (0.4%), and the fraction of identified cyanobacteria with a percentage less than 0.1% included members of *Oscillatoria*, *Leptolyngbya*, *Pantalinema*, *Synechocystis*, *Merismopedia*, *Gloeocapsa*, *Prochlorothrix*, *Nodosilinea*, *Tychonema*, *Chroococcidiopsis*, *Aliterella*, *Scytonema*, *Tolypothrix*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Rivularia*, *Arthrospira*, and *Dolichospermum*.

According to the relative abundance values (Fig. 3), differences in cyanobacteria community composition were registered between samples; the first and the third sampling time points (i.e., 13.10.14 and 09.11.14) are more similar compared to the second sample.

Toxin-related genes amplification

The presence of genes encoding for toxins MCs, CYNs, ANAs, and STXs in the investigated community was tested in PCR by using the HEPF/HEPR, cynsulfF/cynamR, AnxgenF/AnxgenR, and sxtIf/sxtIr primer pairs. Positive PCR results were obtained only for HEPF/HEPR, suggesting the occurrence of MCs producing cyanobacteria (Fig. 4).

Microcystins identification

Two major peaks were detected by HPLC–PDA (Fig. 5) with UV spectra characteristic of microcystins; peak 1 was characterized by a spectrum of absorption at 232.2 nm and a retention time at 7.783 min and peak 2 which followed the standard of MC-LR pattern: spectrum of absorption at 238.1 nm and retention time at 8.817 min. The spectrum of LC/ESI–MS analysis (Fig. 6) shows the *m/z* of the parent ion peak (995) of microcystin-LR and *m/z* of product ions after collision-induced dissociation. Indeed, the fragmentation pattern of the *m/z* ion of the second peak did not show any product ions characteristics of MCs.

Discussion

This study aimed to assess the cyanobacterial community in a subtropical reservoir from Algeria, Cheffia reservoir, by using an integrated approach including morphological descriptions, next-generation sequencing, genetics characteristics, and toxin analysis. Combining both morphological and molecular techniques contributed to better estimating the composition of the cyanobacteria community, whereas the microscopic observation underestimates extant cyanobacteria diversity (Li et al., 2019) but allows the cyanobacteria identification up to the species level; however,

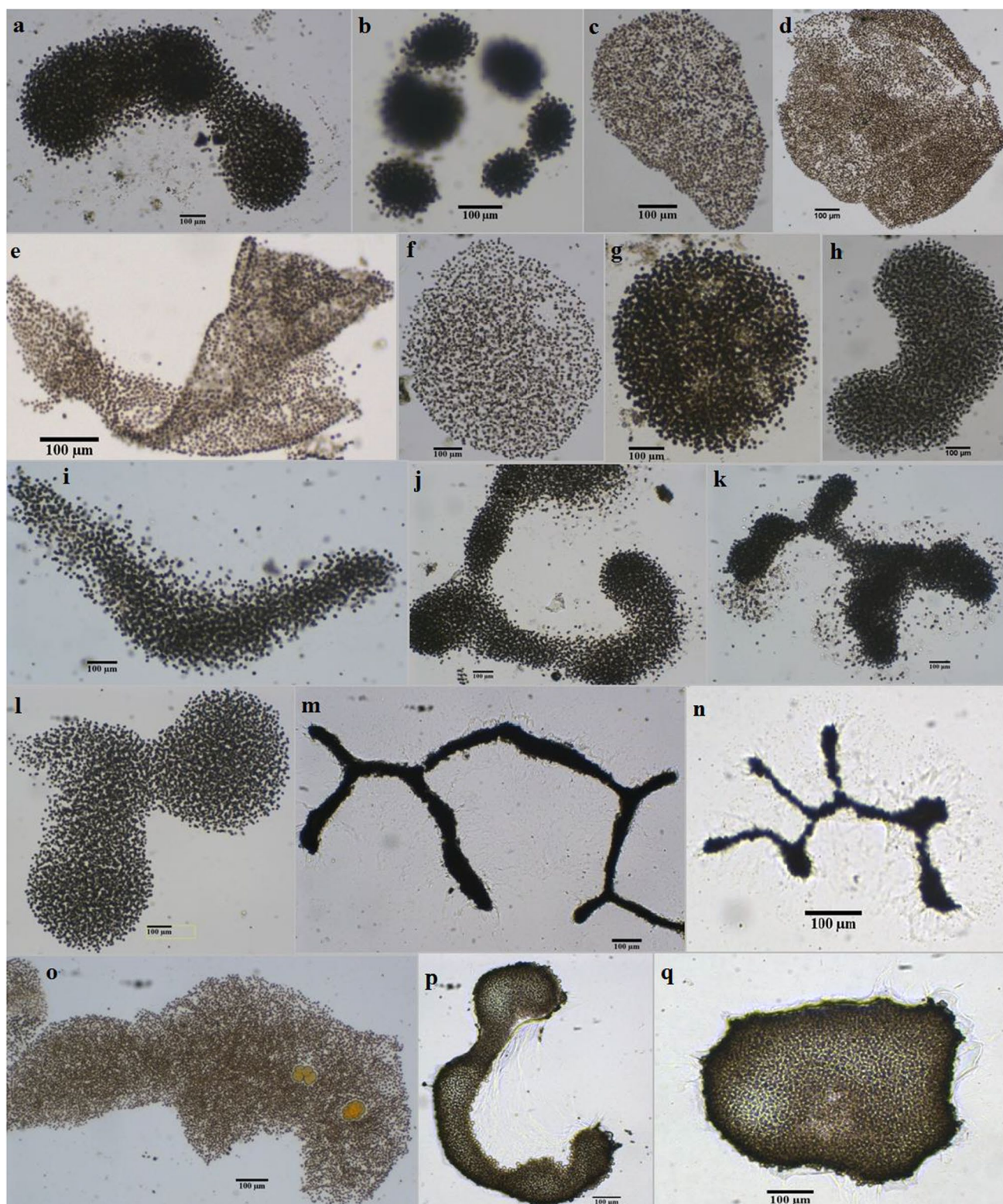


Fig. 1 Optical light microscopy micrographs of the observed colonial cyanobacterial morphotypes in Cheffia reservoir. **a** *M. aeruginosa*, **b** *M. novacekii*, **c** *M. panniformis*, **d–e** *M. ichthyoblabe*, **f–g** *M. flos-*

aquae, **h–q** *Microcystis* sp. Tentative taxonomic classifications were performed according to Komárek and Anagnostidis (1999)

Fig. 2 Optical light microscopy micrographs of the observed filamentous cyanobacterial morphotypes in Cheffia reservoir. **a** *Planktothrix pseudagardhii*, **b** *P. agardhii*, **c** *Planktothricoides raciborskii*, **d** *Phormidium* sp., **e–g** *Oscillatoria* sp., **h** *Aphanizomenon* sp. Tentative taxonomic classifications were performed according to Komárek and Anagnostidis (2005) and Komárek (2013)

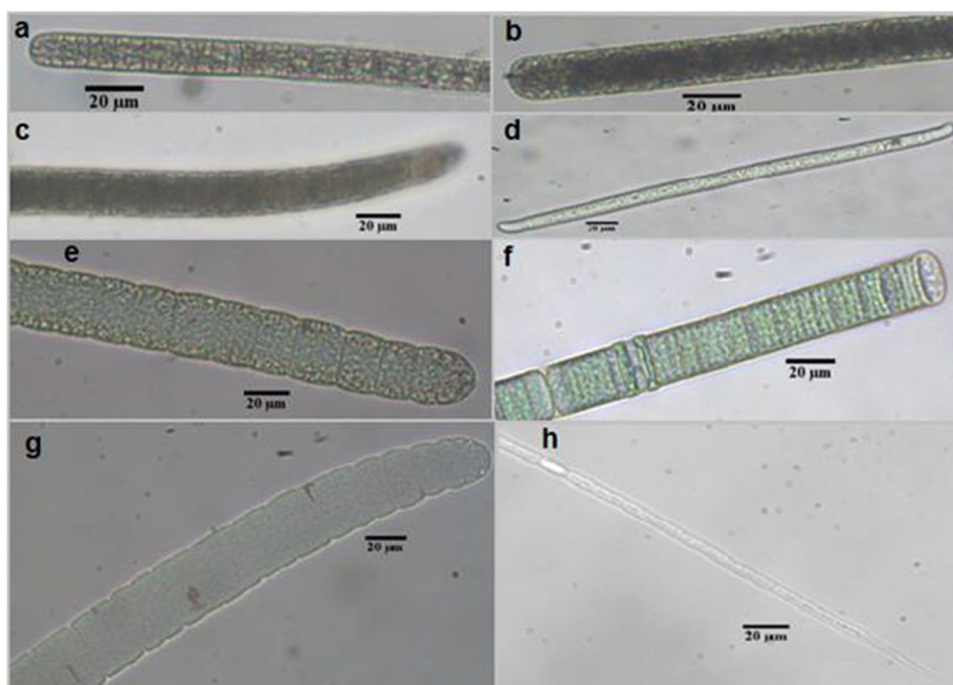


Table 3 Cyanobacteria taxa identified through morphological investigation from Cheffia reservoir during the period October–November 2014

Taxa	13 Oct. 2014	09 Nov. 2014	22 Nov. 2014
<i>M. aeruginosa</i>		x	x
<i>M. novacekii</i>		x	
<i>M. panniformis</i>	x		x
<i>M. ichthyoblabe</i>	x		x
<i>M. flos-aquae</i>			x
<i>Microcystis</i> sp.	x	x	x
<i>P. pseudagardhii</i>	x	x	
<i>P. agardhii</i>	x	x	
<i>Planktothricoides</i>	x	x	x
<i>Oscillatoria</i>	x		
<i>Phormidium</i>	x		
<i>Aphanizomenon</i>			x

molecular analysis is more representative for diversity but serves only for delimiting cyanobacteria taxa at the genus level (Komárek, 2010). In fact, the morphological technique allowed a finer resolution of five morphospecies within the *Microcystis* genus; additionally, 22 genera emerged during the molecular study. Reviewing the scientific literature showed that a considerable number of these taxa namely, *Tolypothrix*, *Nostoc*, *Rivularia*, *Arthrospira*, *Synechocystis*, *Pseudanabaena*, *Chroococcidiopsis*, *Cyanobium*, and *Roseofilum* are of most importance due to their ability to microcystins production (Bláha and Maršálek, 1999;

Domingos et al. 1999; Oudra et al. 2002; Metcalf and Codd, 2012; Pereira et al. 2012; Magana-Arachchi and Wanigatunge, 2013; Richardson et al. 2014).

Physico-chemical parameters indicated that waters in this ecosystem during the period study offered suitable conditions for the development of cyanobacteria because of the fact that phosphorus and nitrogen have been demonstrated as factors related to the success of freshwater cyanobacteria (Jankowiak et al. 2019) and increased cyanobacterial growth rates at temperatures exceeding 20 °C (Paerl and Huisman, 2008). In fact, Cheffia reservoir fell into the hypertrophic level, according to the trophic classification defined by TP concentration of OECD (1982). *Microcystis* (Belykh et al. 2013; Deutsch et al. 2020), Filamentous forms (Reynolds, 1996), *Planktothrix* (Kokocinski et al. 2010; Steffen et al. 2014; Bukowska et al. 2017), and Nostocales species (Salmaso et al. 2015) were found to be characteristic of hypereutrophic water which corroborate with our results. Moreover, global warming is found to be a factor with a major role in favoring the recent spread of Nostocales from tropical to subtropical and temperate regions (Sukenik et al. 2012; Antunes et al. 2015; Budzyńska et al., 2019). Actually, scenarios of climate change are considered in both Africa and the Mediterranean basin, which are amongst the most vulnerable areas to climate change and forecasts are indicating a quite remarkable temperature increase (Niang et al. 2014); so, the effect of the temperature should be considered in cyanobacterial development research in this ecosystem in the future. Furthermore, the variable cyanobacteria distribution observed between samples highlights that further

Fig. 3 Relative abundances (expressed as %) of cyanobacteria in Cheffia reservoir at the genus level. Only taxa with a relative abundance equal or higher to 1% in at least one-time point were shown. Rare taxa were collapsed in other

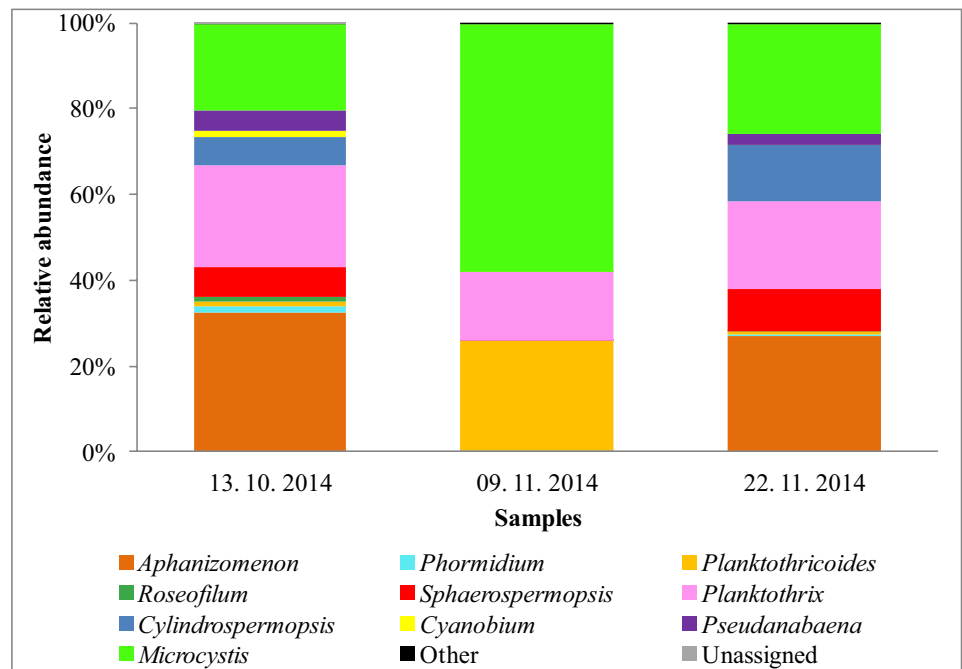


Fig. 4 PCR amplification of *mcyE* gene fragment with HEPF/HEPR primer set. Lanes 1, positive control; lane 2, 13 Oct. 2014; lane 3, 9 Nov. 2014; lane 4, 22 Nov. 2014; lane 5, negative control; M, DNA Marker

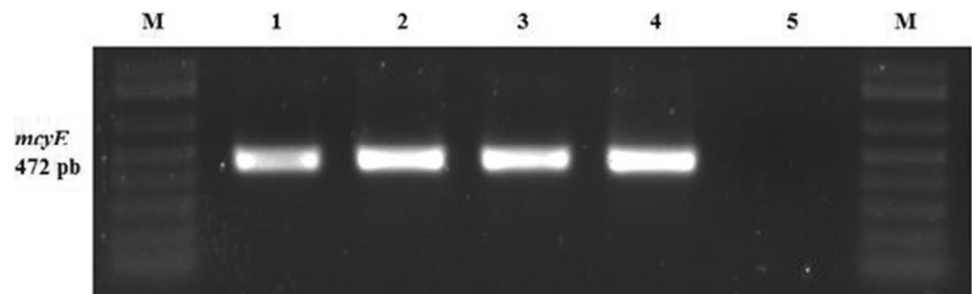
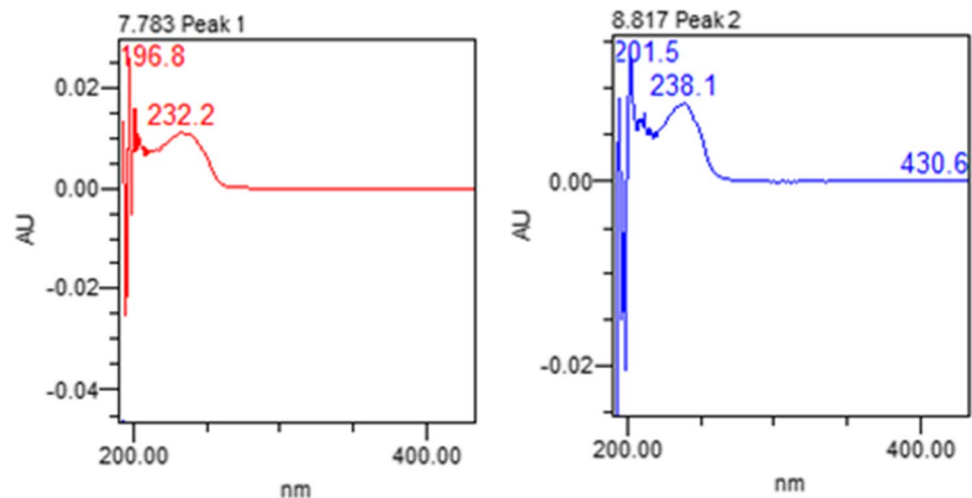


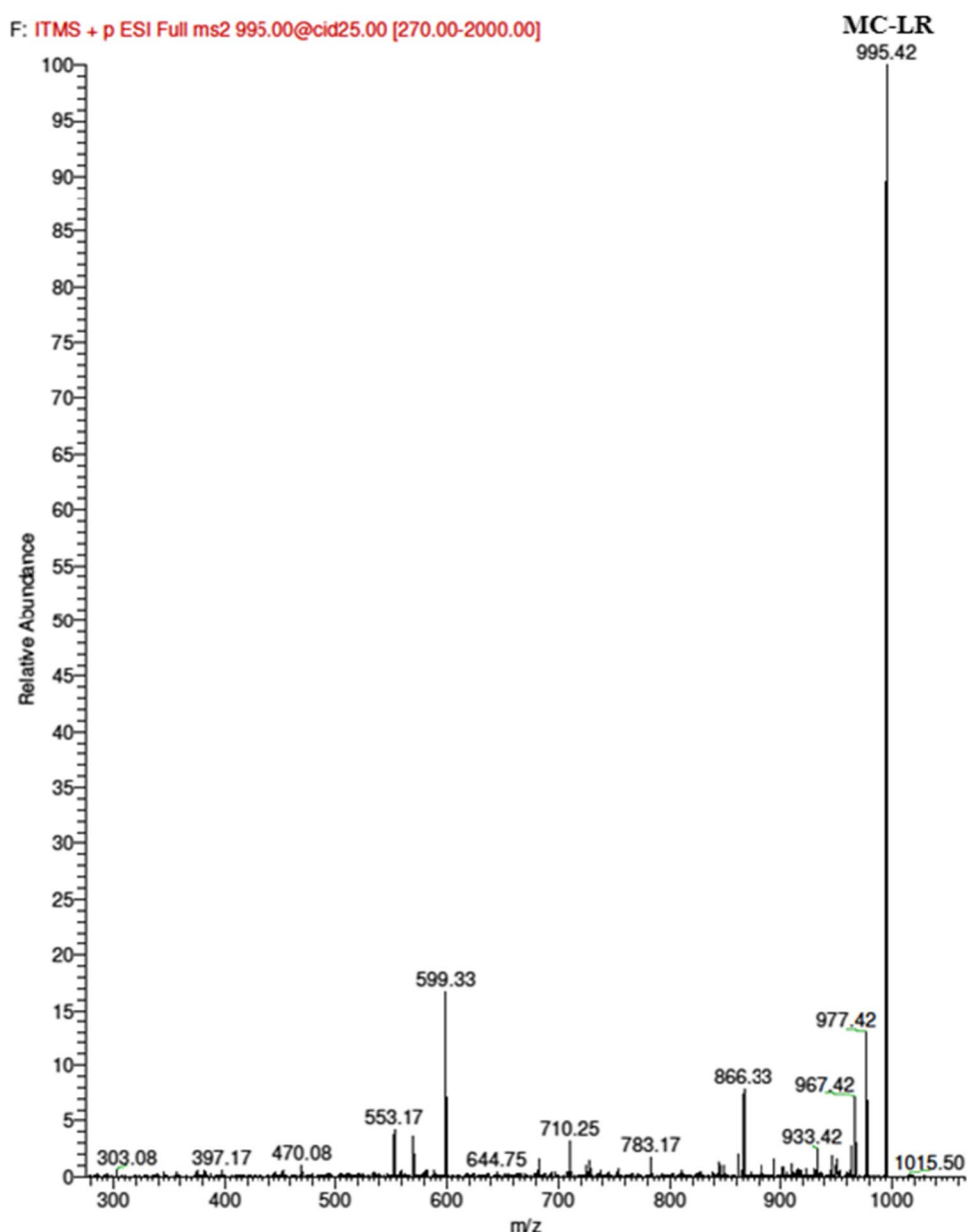
Fig. 5 UV spectra and retention times of peaks detected by HPLC–PDA from cyanobacterial biomass extracts obtained from Cheffia reservoir (abbreviation: AU, absorption units)



investigations using more sampling sizes covering the full annual range and the full water column are needed to explore factors determining cyanobacteria community composition.

Microcystis, one of the dominant genera, showed the co-occurrence of 5 morphospecies. This study is the second report describing the prominent number of morphospecies

Fig. 6 Full-scan electrospray spectrum of the MC-LR (m/z 995.42) identified in cyanobacterial biomass extracts collected from Cheffia reservoir (abbreviations: m/z, mass-to-charge ratio; MC-LR, microcystin-LR)



from the same genus, *Microcystis*, after Krstić et al. (2017) where 9 morphospecies (*M. aeruginosa*, *M. botrys*, *M. flos-aquae*, *M. ichthyoblabe*, *M. novacekii*, *M. protocystis*, *M. smithii*, *M. viridis*, and *M. wesenbergii*) were identified in Lake Dojran (a stable eutrophic lake), FYR Macedonia. In terms of toxicity, most morphospecies identified are recognized as MC producers: *M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe* (Mowe et al. 2015; Lee et al. 2018), and *M. novacekii* (Song et al. 1998).

Moreover, the community of cyanobacteria identified included putative MCs producers. Also, it was demonstrated that the occurrence of *mcy* genes in cells is, generally, correlated with their ability to synthesize microcystin (Panksep et al. 2020). Köker et al. (2017) observed

the co-occurrence of more than one MC producer genus, *Anabaena*, *Microcystis*, and *Planktothrix* in eutrophic and hypertrophic lakes. As suggested by the same authors, this complexity of several genera MC producers was favored by the nutrient-rich waters. While in most cases, strains of *Microcystis* with *mcy* genes produce MCs (Nishizawa et al. 1999; Kaebernick et al. 2001; Tillett et al. 2001; Mikalsen et al. 2003; Qiu et al. 2013; Falcone-Dias et al. 2020), this is not the case for *Planktothrix* strains (Kurmayer et al. 2004; Christiansen et al. 2006). However, the toxicity of *P. agardhii* was recently confirmed in Algerian water bodies (Saoudi et al. 2017). Toxicity from *Microcystis* strains is also well known in Algerian ecosystems, Oubeira lake (Nasri et al. 2008), and Lake des oiseaux (Bouhaddada

et al. 2016), and in neighboring countries with the same climatic conditions, Morocco, Lalla Takerkoust lake reservoir (Oudra et al. 2001; Samoudi et al. 2016), Yaacoub Al Mansour reservoir (Ait Hammou et al. 2014; Ait Hammou et al. 2018), Mansour Eddahbi reservoir, Almassira reservoir (Douma et al. 2010), Aguelmam Azizgza and Dayet Afourgah lakes (Douma et al. 2017); from Tunisian reservoirs; Hjar, Nebhana, Joumine, Séjnène (Fathalli et al. 2011), and Lebna Dam (El Herry et al. 2008); and in Egypt (Abdel-Rahman et al. 1993; Mohamed et al. 2003; Mohamed et al. 2015). *Nostoc* and *Oscillatoria* are also considered among major MC producers in Moroccan (Oudra et al. 2009) and Egyptian (Brittain et al. 2000) water bodies. Effectively, the identification of MC-LR from this water body confirmed that cyanobacteria in this reservoir are MC-producers.

Conclusion

Cyanobacteria in the Cheffia reservoir from the North-East of Algeria was investigated by morphological, molecular, and chemical methods. This ecosystem was characterized by a hypereutrophic level; the polyphasic approach used was successful for the identification of five cyanobacterial orders: the Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales, Synecococcales, and Chroococcidiopsidales. PCR screening of toxin-related genes revealed the *mcyE* gene and the production of MC-LR, the most toxic congener, was confirmed by chemical analysis. In conclusion, it is crucial to keep a monitoring system in this ecosystem and a decision tool to react against toxins patterns and concentrations.

Acknowledgements We thank the staff of the Cheffia Dam, National Agency of Dams and Transfers (ANBT), for their excellent assistance provided for sampling.

Author contributions L.B.: conceptualization, investigation, formal analysis, writing—original draft; H.B.: conceptualization, supervision; A.A.: conceptualization, supervision; M.C.C.: investigation; A.Q.: resources, supervision, review, and editing; B.F.: resources, formal analysis, writing—review and editing; M.M.: resources, formal analysis; G.P.: resources, supervision, review, and editing; J.A.: formal analysis, investigation; V.V.: resources, supervision, funding, review, and editing.

Funding This work was supported by grants provided by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research for Lamia BENREDJEM. CIIMAR acknowledges FCT via UIDB/04423/2020 and UIDP/04423/2020 projects.

Data availability The datasets generated and analyzed during the current study are available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) SRA database under the accession number PRJNA612648.

Declarations

Ethics approval and consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Competing interests The authors declare no competing interests.

References

- Abdel-Rahman S, El-Ayouty YM, Kamael HA (1993) Characterization of heptapeptide toxins extracted from *Microcystis aeruginosa* (Egyptian isolate)—comparison with some synthesized analogs. *Int J Pept Protein Res* 41:1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1993.tb00108.x>
- Agence National Des Ressources En Eau, (2004) Rapport Annuel Interne de l'Agence Nationale des Ressources en Eau, Wilaya de Skikda, Algérie, 32 p.
- Ait Hammou H, Latour D, Sabart M, Samoudi S, Mouhri K, Robin J, Loudiki M (2014) Temporal evolution and vertical stratification of *Microcystis* toxic potential during a first bloom event. *Aquat Ecol* 48:219–228. <https://doi.org/10.1007/s10452-014-9477-0>
- Ait Hammou H, Latour D, Samoudi S, Mouhri K, Douma M, Robin J, Loudiki M (2018) Occurrence of the first toxic *Microcystis* bloom in a recent Moroccan reservoir. *Water Resour* 45:409–417. <https://doi.org/10.1134/S0097807818030028>
- Antunes J, Leão P, Vasconcelos V (2015) *Cylindrospermopsis raciborskii*: Distribution, phylogeography and ecophysiology of a global invasive species. *Front Microbiol* 6:473. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00473>
- Ballot A, Fastner J, Lentz M, Wiedner C (2010) First report of anatoxin-a-producing cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* in northeastern Germany. *Toxicon* 56:964–971. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.06.021>
- Belykh OI, Gladkikh AS, Sorokovikova EG, Tikhonova IV, Potapov SA, Fedorova GA (2013) Microcystin-producing Cyanobacteria in water reservoirs of Russia, Belarus and Ukraine. *Chem Sustain Dev* 21:347–361
- Belykh OI, Gladkikh AS, Sorokovikova EG, Tikhonova IV, Potapov SA, Butina TV (2015) Saxitoxin-Producing cyanobacteria in Lake Baikal. *Contemp Probl Ecol* 8:186–192. <https://doi.org/10.1134/S199542551502002X>
- Bittencourt-Oliveira M do C, Piccin-Santos V (2012) Genetic diversity of Brazilian Cyanobacteria revealed by phylogenetic analysis. In: Caliskan M (ed) Genetic Diversity in Microorganisms. InTech Europe University Campus STeP Ri, Rijeka, pp 275–290. <https://doi.org/10.5772/33137>
- Bláha L, Maršálek B (1999) Microcystin production and toxicity of picocyanobacteria as a risk factor for drinking water treatment plants. *Algol Stud* 92:95–108. https://doi.org/10.1127/algol_stud/92/1999/95
- Bouhaddada R, Nélieu S, Nasri H, Delarue G, Bouaïcha N (2016) High diversity of microcystins in a *Microcystis* bloom from an Algerian lake. *Environ Pollut* 216:836–844. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.055>
- Bouma-Gregson K, Olm MR, Probst AJ, Anantharaman K, Power ME, Banfield JF (2018) Microbial diversity and metabolic potential in cyanotoxin producing cyanobacterial mats throughout a river network. *bioRxiv* 294421. <https://doi.org/10.1101/294421>
- Brittain S, Mohamed ZA, Wang J, Lehmann VKB, Carmichael WW, Rinehart KL, El-Sharouny HM (2000) Isolation and characterization of microcystins from a River Nile strain of *Oscillatoria tenuis*

- Agardh ex Gomont. *Toxicon* 38:1759–1771. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00105-7](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00105-7)
- Budzyńska A, Rosińska J, Pelechata A, Toporowska M, Napiórkowska-Krzebietke A, Kozak A, Messyasz B, Pęczyła W, Kokociński M, Szelag-Wasielewska E, Grabowska M, Mądrecka B, Niedźwiecki M, Alcaraz Parraga P, Pelechaty M, Karpowicz M, Pawlik-Skowrońska B (2019) Environmental factors driving the occurrence of the invasive cyanobacterium *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* (Nostocales) in temperate lakes. *Sci Total Environ* 650:1338–1347. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.144>
- Bukowska A, Kaliński T, Koper M, Kostrzewska-Szlakowska I, Kwiatowski J, Mazur-Marzec H, Jasser I (2017) Predicting blooms of toxic cyanobacteria in eutrophic lakes with diverse cyanobacterial communities. *Sci Rep* 7:8342. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08701-8>
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP (2017) Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J* 11:2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP (2016) DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13:581. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Casero MC, Ballot A, Agha R, Quesada A, Cirés S (2014) Characterization of saxitoxin production and release and phylogeny of sxt genes in paralytic shellfish poisoning toxin-producing *Aphanizomenon gracile*. *Harmful Algae* 37:28–37. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.05.006>
- Casero MC, Velázquez D, Medina-Cobo M, Quesada A, Cirés S (2019) Unmasking the identity of toxigenic cyanobacteria driving a multi-toxin bloom by high-throughput sequencing of cyanotoxins genes and 16S rRNA metabarcoding. *Sci Total Environ* 15:367–378. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.083>
- Christiansen G, Kurmayer R, Liu Q, Börner T (2006) Transposons inactivate biosynthesis of the nonribosomal peptide microcystin in naturally occurring *Planktothrix* spp. *Appl Environ Microbiol* 72:117–123. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.117-123.2006>
- Churro C, Azevedo J, Vasconcelos V, Alexandra S (2017) Detection of a *Planktothrix agardhii* bloom in Portuguese marine coastal waters. *Toxins* 9:391. <https://doi.org/10.3390/toxins9120391>
- Codd GA, Meriluoto J, Metcalf JS (2017) Introduction: Cyanobacteria, cyanotoxins, their human impact, and risk management. In: Codd GA, Meriluoto J, Metcalf JS (ed) *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, pp 1–8. <https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch1>
- Deutsch ES, Alameddine I, Qian SS (2020) Using structural equation modeling to better understand *Microcystis* biovolume dynamics in a mediterranean hypereutrophic reservoir. *Ecol Model* 435:109282. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2020.109282>
- Domingos P, Rubim TK, Molica RJR, Azevedo SMFO, Carmichael WW (1999) First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a Northeast Brazilian drinking water supply. *Environ Toxicol* 14:31–35. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-7278\(199902\)14:1%3C31::AID-TOX6%3E3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7278(199902)14:1%3C31::AID-TOX6%3E3.0.CO;2-B)
- Douma M, Ouahid Y, del Campo FF, Loudiki M, Mouhri K, Oudra B (2010) Identification and quantification of cyanobacterial toxins (microcystins) in two Moroccan drinking-water reservoirs (Mansour Eddahbi, Almassira). *Environ Monit Assess* 160:439–450. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0708-5>
- Douma M, Ouahid Y, Loudiki M, del Campo FF, Oudra B (2017) The first detection of potentially toxic *Microcystis* strains in two Middle Atlas Mountains natural lakes (Morocco). *Environ Monit Assess* 189:39. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5753-x>
- El Herry S, Fathalli A, Jenhani-Ben Rejeb A, Bouaïcha N (2008) Seasonal occurrence and toxicity of *Microcystis* spp. And *Oscillatoria tenuis* in the Lebna Dam. *Tunisia Water Res* 42:1263–1273. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.09.019>
- Falcone-Dias MF, Vaz Rodrigues M, Nielsen JL, de Jonge N, Jørgensen NOG, Alonso DP, David GS, da Silva RJ, Júnior JPA (2020) Occurrence of Cyanobacteria and microcystins in hydroelectric reservoirs used for fish farming. *J Water Health* 18:983–994. <https://doi.org/10.2166/wh.2020.089>
- Fathalli A, Ben Rejeb Jenhani A, Moreira C, Welker M, Romdhane M, Antunes A, Vasconcelos V (2011) Molecular and phylogenetic characterization of potentially toxic cyanobacteria in Tunisian freshwaters. *Syst Appl Microbiol* 34:303–310. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.12.003>
- Fosso B, Santamaria M, Marzano M, Alonso-Aleman D, Valiente G, Donvito G, Monaco A, Notarangelo P, Pesole G (2015) BioMaS: a modular pipeline for Bioinformatic analysis of Metagenomic AmpliconS. *BMC Bioinform* 16:203. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0595-z>
- González EJ, Roldán G (2019) Eutrophication and phytoplankton: some generalities from lakes and reservoirs of the Americas. In: TURKOGLU M (ed) *Phytoplankton ecology and dynamics*. IntechOpen, pp 1–20. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89010>
- Harrat N, Achour S (2010) Pollution physico-chimique des eaux de barrage de la région d'El Tarf. *Impact Sur La Chloration Larhyss Journal* 8:47–54
- Jankowiak J, Hattenrath-Lehmann T, Kramer BJ, Ladds M, Gobler CJ (2019) Deciphering the effects of nitrogen, phosphorus, and temperature on cyanobacterial bloom intensification, diversity, and toxicity in western Lake Erie. *Limnol Oceanogr* 64:1347–1370. <https://doi.org/10.1002/lno.11120>
- Jungblut AD, Neilan BA (2006) Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Arch Microbiol* 185:107–114. <https://doi.org/10.1007/s00203-005-0073-5>
- Kaebnick M, Rohrlack T, Christoffersen K, Neilan BA (2001) A spontaneous mutant of microcystin biosynthesis: genetic characterization and effect on *Daphnia*. *Environ Microbiol* 3:669–679. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00241.x>
- Köker L, Akçaalan R, Albay M, Neilan BA (2017) Molecular detection of hepatotoxic cyanobacteria in inland water bodies of the Marmara Region, Turkey. *AIOL* 8:52–60. <https://doi.org/10.4081/aiol.2017.6394>
- Kokocinski M, Stefaniak K, Mankiewicz-Boczek J, Izydorczyk K, Soininen J (2010) The ecology of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyta) in two hypereutrophic lakes dominated by *Planktothrix agardhii* (Oscillatoriales, Cyanophyta). *Eur J Phycol* 45:365–374. <https://doi.org/10.1080/09670262.2010.492916>
- Komárek J (2010) Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia* 639:245–259. <https://doi.org/10.1007/s10750-009-0031-3>
- Komárek J (2013) Cyanoprokaryota: 3rd part: heterocystous genera. In: Büdel B, Gärtner G, Krienitz L, Schagerl M (ed) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd. 19 (3). Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 1130 p.
- Komárek J (2016) A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *Eur J Phycol* 51:346–353. <https://doi.org/10.1080/09670262.2016.1163738>
- Komárek J, Anagnostidis K (1999) Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. In: Ettl H, Gärtner G, Heynig H, Mollenhauer D (ed) *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/1. Spektrum Akademischer Verlag, 548 p.

- Komárek J, Anagnostidis K (2005) Cyanoprokaryota 2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales. In: Büdel B, Krienitz L, Gärtner G, Schagerl M (ed) Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2. Elsevier/Spektrum, Heidelberg, 759
- Krstić S, Aleksovski B, Komárek J (2017) Rare occurrence of nine *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) in a single lake (Lake Dojran, FYR Macedonia). *Adv Oceanogr Limn* 8:4–21. <https://doi.org/10.4081/aiol.2017.6236>
- Kurmayer R, Christiansen G, Fastner J, Börner T (2004) Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environ Microbiol* 6:831–841. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00626.x>
- Kurmayer R, Sivonen K, Wilmutte A, Salmaso N (2017) Molecular tools for the detection and quantification of toxigenic Cyanobacteria. Wiley: Hoboken, NJ, USA, pp. 163–203. <https://doi.org/10.1002/9781119332169>
- Lee KL, Jung KY, Kim JH, Kim YS, Kim HS (2018) Effect of nitrogen and phosphorus on growth and microcystin production in three *Microcystis* species. *J Environ Biol* 39:413–418. <https://doi.org/10.22438/jeb/39/4/MRN-627>
- Lee TA, Rollwagen-Bollens G, Bollens SM, Faber-Hammond JJ (2015) Environmental influence on cyanobacteria abundance and microcystin toxin production in a shallow temperate lake. *Ecotoxicol Environ Saf* 114:318–325. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.004>
- Lezcano MA, morón-López J, Agha R, López-Heras I, Nozal L, Quesada A, El-Shehawry R (2016) Presence or absence of *mlr* genes and nutrient concentrations co-Determine the microcystin biodegradation efficiency of a natural bacterial community. *Toxins* 8:318. <https://doi.org/10.3390/toxins8110318>
- Li X, Huo S, Zhang J, Ma C, Xiao Z, Zhang H, Xi B, Xia X (2019) Metabarcoding reveals a more complex cyanobacterial community than morphological identification. *Ecol Indic* 107:105653. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105653>
- Magana-Arachchi DN, Wanigatunge RP (2013) First report of genus *Chroococcidiopsis* (cyanobacteria) from Sri Lanka: a potential threat to human health. *J Nati Sci Found* 41:65–68. <https://doi.org/10.4038/jnsf.v41i1.5334>
- Magoc T, Salzberg SL (2011) FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27:2957–2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- Mariani MA, Padedda BM, Kaštokský J, Buscarinu P, Sechi N, Virdis T, Lugliè A (2015) Effects of trophic status on microcystin production and the dominance of cyanobacteria in the phytoplankton assemblage of Mediterranean reservoirs. *Sci Rep* 5:17964. <https://doi.org/10.1038/srep17964>
- Martin M (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J* 17:10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Mayumi T, Kato H, Imanishi S, Kawasaki Y, Hasegawa M, Harada K (2006) – Structural characterization of microcystins by LC/MS/MS under ion trap conditions. *J Antibiot* 59:710–719. <https://doi.org/10.1038/ja.2006.95>
- Metcalf JS, Codd GA (2012) Cyanotoxins. In: Whitton BA (ed) *Ecology of Cyanobacteria II: their diversity in space and time*. Springer, Dordrecht, Heidelberg, New York, pp 651–675. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3>
- Mihali TK, Kellmann R, Muenchhoff J, Barrow KD, Neilan BA (2008) Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 74:716–722. <https://doi.org/10.1128/2FAEM.01988-07>
- Mikalsen B, Boison G, Skulberg OM, Fastner J, Davies W, Gabrielsen TM, Rudi K, Jakobsen KS (2003) Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcvABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *J Bacteriol* 185:2774–2785. <https://doi.org/10.1128/JB.185.9.2774-2785.2003>
- Mohamed ZA, Carmichael WW, Hussein AA (2003) Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. *Environ Toxicol* 18:137–141. <https://doi.org/10.1002/tox.10111>
- Mohamed ZA, Deyab MA, Abou-Dobara MI, El-Sayed AK, El-Raghi WM (2015) Occurrence of cyanobacteria and microcystin toxins in raw and treated waters of the Nile River, Egypt: implication for water treatment and human health. *Environ Sci Pollut Res* 22:11716–11727. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4420-z>
- Moreira C, Azevedo J, Antunes A, Vasconcelos V (2012) Cylindrospermopsin: Occurrence methods of detection and toxicology. *J Appl Microbiol* 114:605–620. <https://doi.org/10.1111/jam.12048>
- Mowe MAD, Porojan C, Abbas F, Mitrovic SM, Lim RP, Furey A, Yeo DCJ (2015) Rising temperatures may increase growth rates and microcystin production in tropical *Microcystis* species. *Harmful Algae* 50:88–98. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.10.011>
- Nasri H, El Herry S, Bouaïcha N (2008) First reported case of turtle deaths during a toxic *Microcystis* spp. bloom in Lake Oubera. *Algeria Ecotoxicol Environ Saf* 71:535–544. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.12.009>
- Niang I, Ruppel OC, Abdrabo MA, Essel A, Lennard C, Padgham J, Urquhart P (2014) Africa. In: Barros VR, Field CB, Dokken DJ, Mastrandrea MD, Mach KJ, Bilir TE, Chatterjee M, Ebi KL, Estrada YO, Genova RC, Girma B, Kissel ES, Levy AN, Maccracken S, Mastrandrea PR, White LL (ed) *Climate change: impacts, adaptation, and vulnerability. Part B: regional aspects. Contribution of working group II to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, pp 1199–1265
- Nishizawa T, Asayama M, Fuji K, Harada KI, Shirai M (1999) Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *J Biochem* 126:520–529. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022481>
- Nübel U, Garcia-Pichel F, Muyzer G (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* 63:3327–3332
- O’Neil JM, Davis TW, Burford MA, Gobler CJ (2012) The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14:313–334. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.027>
- OECD. (1982) Eutrophication of water, monitoring, assessment and control. Organization for economic cooperation and development. Paris, France, 154 p. <https://doi.org/10.1002/iroh.19840690206>
- Oudra B, Dadi-El Andaloussi M, Vasconcelos VM (2009) Identification and quantification of microcystins from a *Nostoc muscorum* bloom occurring in Oukaïmeden River (High-Atlas mountains of Marrakech, Morocco). *Environ Monit Assess* 149:437–444. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0220-y>
- Oudra B, Loudiki L, Sbiyyaa B, Martins R, Vasconcelos V, Namikoshi N (2001) Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of Lalla Takerkoust lake-reservoir (Morocco). *Toxicon* 39:1375–1381. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00093-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00093-9)
- Oudra B, Loudiki M, Vasconcelos V, Sabour B, Sbiyyaa B, Oufdou K, Mezrioui N (2002) Detection and quantification of microcystins from cyanobacteria strains isolated from reservoirs and ponds in Morocco. *Environ Toxicol* 17:32–39. <https://doi.org/10.1002/tox.10029>
- Paerl HW, Huisman J (2008) Blooms like it hot. *Science* 320:57–58. <https://doi.org/10.1126/science.1155398>
- Panksep K, Tamm M, Mantzouki E, Rantala-Ylinen A, Laugaste R, Sivonen K, Tammeorg O, Kisand V (2020) Using microcystin gene copies to determine potentially-toxic blooms, example from

- a Shallow Eutrophic Lake Peipsi. *Toxins* 12:211. <https://doi.org/10.3390/toxins12040211>
- Pereira DA, Pimenta ACM, Giani A (2012) Profiles of toxic and non-toxic oligopeptides of *Radiocystis fernandoii* (Cyanobacteria) exposed to three different light intensities. *Microbiol Res* 167:413–421. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.02.007>
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glockner FO (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* 35:7188–7196. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>
- Qiu Y, Yuan T, Kon T, Zurawell R, Huang Y, Graham M, Gabos S, Pang X (2013) Rapid detection and quantitation of microcystin-producing *Microcystis* using real-time PCR. *J Mol Biomark Diagn S* 5:006. <https://doi.org/10.4172/2155-9929.S5-006>
- Ramos V, Castelo-Branco R, Leão PN, Martins J, Gomes S, Sobrinho Da Silva F, Mendonça Filho JG, Vasconcelos V (2017) Cyanobacterial diversity in microbial mats from the hypersaline lagoon system of Araruama, Brazil: an in-depth polyphasic study. *Front Microbiol* 8:1233. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01233>
- Reynolds CS (1996) The plant life of the pelagic. *Verh Int Ver Theor Angew Limnol* 26:97–113. <https://doi.org/10.1080/03680770.1995.11900695>
- Richardson LL, Stanić D, May A, Brownell A, Gantar M, Campagna SR (2014) Ecology and physiology of the pathogenic cyanobacterium *Roseofilum reptotaenium*. *Life (basel)* 4:968–987. <https://doi.org/10.3390/life4040968>
- Salmaso N, Boscaini A, Capelli C, Cerasino L, Milan M, Putelli S, Tolotti M (2015) Historical colonisation patterns of *Dolichospermum lemmermannii* (Cyanobacteria) in a deep lake south of the Alps. *Adv Oceanogr Limn* 6:33–45. <https://doi.org/10.4081/aiol.2015.5456>
- Samoudi S, Latour D, Robin J, Sabart M, Misson B, Ait Hammou H, Mouhri K, Loudiki M (2016) Horizontal distribution of the cell abundance and toxicity of *Microcystis* in a hypereutrophic Moroccan reservoir. *Contemp Probl Ecology* 9:554–562. <https://doi.org/10.1134/S1995425516050139>
- Saoudi A, Brient L, Boucetta S, Ouzrout R, Bormans M, Bensouilah M (2017) Management of toxic cyanobacteria for drinking water production of Ain Zada Dam. *Environ Monit Assess* 189:361. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6058-4>
- Song L, Sano T, Li R, Watanabe MM, Liu Y, Kaya K (1998) Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. *Phycol Res* 46:19–23. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1835.1998.00120.x>
- Steffen MM, Zhu Z, McKay RML, Wilhelm SW, Bullerjahn GS (2014) Taxonomic assessment of a toxic cyanobacteria shift in hypereutrophic Grand Lake St. Marys (Ohio, USA). *Harmful Algae* 33:12–18. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.12.008>
- Sukenik A, Hadas O, Kaplan A, Quesada A (2012) Invasion of Nostocales (cyanobacteria) to subtropical and temperate freshwater lakes - physiological, regional, and global driving forces. *Front Microbiol* 3:86. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00086>
- Tillett D, Parker DL, Neilan BA (2001) Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. *Appl Environ Microbiol* 67:2810–2818. <https://doi.org/10.1128/aem.67.6.2810-2818.2001>
- Whitton BA (2012) Ecology of Cyanobacteria II their diversity in space and time. Springer, Dordrecht Heidelberg, New York. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3>
- Wu Q, Zhang Y, Li Y, Li J, Zhang X, Li P (2019) Comparison of community composition between *Microcystis* colony-attached and free-living bacteria, and among bacteria attached with *Microcystis* colonies of various sizes in culture. *Aquat Ecol* 53:465–481. <https://doi.org/10.1007/s10452-019-09702-7>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.