



**HAL**  
open science

# Caractérisation des proliférations nostocaléennes anciennes et futures via les akinètes présents dans les sédiments

Benjamin Legrand

► **To cite this version:**

Benjamin Legrand. Caractérisation des proliférations nostocaléennes anciennes et futures via les akinètes présents dans les sédiments. Etudes de l'environnement. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAC109 . tel-02272749

**HAL Id: tel-02272749**

**<https://theses.hal.science/tel-02272749>**

Submitted on 28 Aug 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

N° D. U.

Année : 2017

***ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE,  
ENVIRONNEMENT***

N° d'ordre :

**THESE**

Présentée à l'Université Clermont Auvergne

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

(Spécialité : Gestion de l'environnement)

Soutenance réalisée le : 12 décembre 2017

Par

**Benjamin Legrand**

---

**Caractérisation des proliférations nostocaléennes anciennes et futures *via*  
les akinètes présents dans les sédiments**

---

Devant le Jury composé de :

<b>Cécile Bernard</b>	Professeur	<b>Rapporteur</b>
Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR 7245 MCAM, Paris, France		
<b>Bastiaan Ibelings</b>	Professeur	<b>Rapporteur</b>
Institut F-A. Forel, Versoix, Suisse		
<b>Annick Wilmotte</b>	Chercheur qualifié	<b>Examineur</b>
FRS-FNRS, université de Liège, Liège, Belgique		
<b>Raffaele Siano</b>	Cadre de Recherche	<b>Examineur</b>
IFREMER, Centre de Bretagne, Brest, France		
<b>Delphine Latour</b>	Maître de Conférences	<b>Directrice de thèse</b>
Université Clermont Auvergne, UMR 6023 LMGE, Clermont-Ferrand, France		
<b>Antoine Thouvenot</b>	Directeur général	<b>Co-Directeur de thèse</b>
ATHOS-environnement, Clermont-Ferrand, France		



## Résumé :

Les akinètes sont des cellules de résistance produites par les cyanobactéries de l'ordre des Nostocales. Issues de la différenciation de cellules végétatives, les akinètes sont capables de persister en surface des sédiments pendant la période hivernale puis de germer au printemps pour recoloniser la colonne d'eau. Le suivi des populations pélagiques et benthiques effectué pendant deux années sur le lac d'Aydat a montré que les akinètes présents à la surface des sédiments sont représentatifs de la diversité et de l'abondance, des proliférations nostocaléennes passées. Leur capacité à persister dans les sédiments sur de longues échelles de temps a permis de mettre en évidence la présence de cyanobactéries il y a plusieurs milliers d'années. La présence récurrente d'akinètes dans les sédiments jusqu'à la période actuelle indique la persistance d'un niveau trophique élevé sur l'ensemble de l'histoire de ce lac. Parallèlement, le potentiel toxique des akinètes, étudié *via* la détection des gènes *anaC* et *mcyA*, a montré la co-occurrence de ces deux cyanotoxines dès les premiers blooms cyanobactériens, il y a plus de 6700 ans ainsi que la récurrence d'*anaC*, associé à *Dolichospermum macrosporum*, au moins sur les 30 dernières années. Par ailleurs, d'importantes différences de pourcentage d'intégrité des akinètes ont été observées en fonction des espèces, variant en moyenne de 5 à 60% pour les deux espèces dominantes, *D. macrosporum* et *D. flos-aquae* respectivement. Cette variabilité serait le reflet des interactions écologiques survenues dans la colonne d'eau et traduirait des stratégies écologiques différentes. De même, la capacité et le temps de germination semblent être espèce dépendante, ce qui permettrait un étalement de la période de recrutement en fonction des conditions environnementales. Malgré une perte globale de viabilité avec le temps, des akinètes enfouis depuis 1800 ans dans les sédiments ont révélé leur capacité à germer, confirmant l'importance de ces cellules de résistance dans la pérennisation à long terme des proliférations nostocaléennes.

Mots clés : Akinètes, paléo-indicateur, sédiments, potentiel toxique, intégrité, germination

## Abstract:

Akinetes are resistant cells produced by cyanobacteria of the Nostocales Order. Originating from the differentiation of vegetative cells, Akinetes are able to persist in surface sediment during winter and then germinate in spring to recolonize the water column. Monitoring on pelagic and benthic populations performed during two years in lake Aydat has shown that the akinetes present in surface sediments are representative of diversity and abundances of past nostoclean proliferations. Akinetes capacity to persist in sediment at large time scales has allowed to highlight cyanobacterial presence since several thousand years. Recurrences of akinetes in sediment from 6700 years to present day presume that the trophic level stayed high through the history of this lake. In parallel, the toxic potential of akinetes, studied with the detection of *anaC* and *mcyA* genes, has shown the co-occurrence of anatoxin-a and microcystins since first cyanobacterial blooms, 6700 years ago and the recurrence of *anaC* associated to *Dolichospermum macrosporum* since at least the last 30 years. On the other hand, high differences of intact akinete percentages have been observed depending on the species, with mean values of 5 and 60 % for *D. macrosporum* and *D. flos-aquae* (the two dominant species) respectively. This variability may be the reflect of ecologic interactions which occurred in the water column and may be due to different ecological strategies. Moreover, ability and time of germination seem to be dependent, which may allow to extend the window of recruitment depending on environmental conditions. Despite a high loss of viability over time, some akinetes buried since 1800 years in sediments have shown their ability to germinate, confirming the importance of these resistant cells in the long scale perpetuation of nostoclean blooms.

Keywords: Akinetes, paleoindicator, sediments, toxic potential, integrity, germination



# Remerciements

---

Voilà déjà un peu plus de trois ans que j'ai entamé ma thèse CIFRE au sein du LMGE et de la société ATHOS-environnement. Cette expérience comme toute grande aventure humaine m'a offert la possibilité de rencontrer un nombre inculcable de personnes qui ont toutes, à leur manière, contribuées au bon déroulement de cette thèse. Le temps est maintenant venu de remercier toutes ces personnes grâce à qui, en dépit des épreuves traversées, je garderai un agréable souvenir de cette thèse. La liste est longue et pardonnez-moi si j'omets des personnes dans les mots qui suivent mais ils restent néanmoins dans mon cœur.

Je voudrais commencer par remercier les membres de mon jury, Cécile Bernard, Bastiaan Ibelings, Annick Wilmotte et Raffaele Siano, pour évaluer ces travaux de thèse. Je remercie également Isabelle Domaizon et Jean-François Humbert pour avoir participé à mes deux comités de thèse.

Bien évidemment, je tiens à remercier très chaleureusement mes deux responsables, Delphine et Antoine. Delphine, merci de m'avoir fait confiance à la fin du Master 2. Merci, d'avoir pris la responsabilité de m'encadrer alors qu'à l'époque tu encadrais déjà Kristell. Merci de m'avoir proposé un si beau projet de recherche qui combinait mes principales passions : les milieux aquatiques et l'Histoire. Tu m'as laissé mon autonomie et conduire ces travaux comme je l'entendais mais tu étais souvent disponible pour me guider dans la bonne direction malgré ton emploi du temps toujours surchargé. En bref, merci pour tout. Antoine, merci de m'avoir engagé au sein d'ATHOS. Je sais que la pérennisation d'ATHOS est l'une de vos préoccupations principales et je suis conscient que malgré les subventions il fallait avancer mes salaires ce qui constituait un risque et je voulais vous dire merci de l'avoir pris. Merci pour vos qualités humaines et votre sens de la discussion. Je tenais à vous dire que les grands trajets vers les Pyrénées ne m'ont jamais paru ennuyeux et ce malgré l'absence d'autoradio dans le 4x4.

Merci à l'ensemble du personnel du LMGE, à l'image d'Yvan, Marie-Laure, Clarisse, Anne-Cath, Cécile, François, Fréd, Marie(s), Jean-Pierre, Jeff, Fanny, Hicham, Isa(s), Agnès, Florence, Hermine, Bernard et j'oublie sûrement d'autres personnes. Même si l'on n'a pas ou très peu travaillé ensemble votre bonne humeur et vos discussions ont considérablement égayé l'atmosphère de travail. Téléspore, je voudrai vous remercier de m'avoir accueilli au sein du LMGE et merci de votre considération qui était très appréciable pour le thésard que

j'étais. Merci à Yvette, Nathalie et Brigitte qui m'ont toujours tiré d'affaires moi et mon sens non accru des affaires administratives ! J'ai adoré venir vous « embêter » pendant ces trois ans ! Je tiens aussi à remercier les personnes qui ont travaillé avec moi sur le projet. Anne-Hélène et Jo merci de m'avoir accompagné sur le terrain, c'était toujours vraiment agréable de sortir avec vous ! A-H, d'avoir gérer les souches et les lignes thermiques et surtout merci de penser à mon dos même si cela a fait peur à un gars en paddle ! Je remercie également Jérôme pour ces extractions d'ADN et surtout le design d'amorces PCR que j'ai utilisé en fin de thèse. Merci également à Jean-Pierre et à Fanny qui m'ont initié à la HPLC même si les résultats n'étaient pas à la hauteur de nos espérances. Je pense aussi à l'équipe d'AFYREN, qui part leur bonne humeur et leur énergie contribuait à la bonne ambiance dans les couloirs du LMGE. Merci Régis, Aurélie, Aurélien, Micka, Jérémy j'ai adoré squatter votre machine à café pendant presque 2 ans !

Vient maintenant le tour de mes collègues proches : les doctorants, postdoctorants, contractuels, stagiaires où les précaires comme on nous appelle affectueusement. Au cours de ces trois années, on a le temps de voir un réel turn-over au sein des personnels non permanents. Ainsi, je voudrais remercier les anciens à l'image de Benoît, Kristell, Mélanie, Guillaume, Mathieu, Pierre, Muriel, Stéphanie, Marlène, Julio... J'ai appris beaucoup en échangeant sur vos expériences et c'est toujours agréable de vous croiser dans les couloirs du labo. Marion, je suis fier d'avoir pu travailler avec toi sur PROFECY ne serait-ce que quelques mois. Je n'oublie pas que le projet AKINETs est la petite sœur de PROFECY et j'espère que tu as apprécié la manière dont j'ai développé certaines perspectives de ton ancien projet. Je voudrais te remercier pour tous les bons moments passés à Clermont, à Brest, à Amsterdam ou encore en Chine !

Ensuite, mes pensées vont à l'ensemble des personnes qui ont commencé en même temps et surtout après moi. Max, Léa, Iris, Claire, Jonathan, Matthieu le Breton, Thomas l'expert en carboglace, Princesse Tiphaine, Hélène la reine de la Chouffe, Florent Roussi dit le Rossignol et Jérôme et son rire maléfique ! Vous êtes des personnes géniales et j'ai passé d'innombrables bons moments en votre compagnie ! Flo garde le moral ça va le faire (je sais c'est moi qui dit ça...) et n'oublie pas que tu es le roi des stats ! Jérôme qu'est ce qu'on a pu rigoler du restau chinois et en passant par les Bourdouze ! J'espère que tu seras vite chef de service qu'on aille te mettre un peu la honte au milieu de tes subordonnées !

Amélie, j'ai l'impression que notre rencontre s'est déroulé hier mais cela fait presque déjà trois ans depuis les mini-projets ! J'ai tout de suite apprécié ta rigueur au travail et tes qualités humaines indéniables. J'ai réellement apprécié travailler avec toi au cours de ces différents stages et nous faisons vraiment un duo de choc ! J'espère qu'on pourra un jour retravailler ensemble ! Mais en plus du travail, tu es une personne fantastique et tu es devenue une véritable amie.

Pour finir sur le laboratoire, je voudrais remercier tout particulièrement Laurianne et Louis. Cette thèse n'aurait pas eu la même saveur sans votre présence ! Vous m'avez beaucoup charrié mais vous m'avez surtout soutenu dans les moments difficiles. Lolo, enfin super Lolos, merci de m'avoir écouté me plaindre de tout et n'importe quoi ! Nos longues conversations ont été très importantes pour moi. Ta force de caractère m'a toujours impressionné (j'aimerai bien avoir tes balls lol). Tu es quelqu'un de super au caractère bien trempé et surtout ne change pas, c'est comme ça qu'on t'aime ! Ahhh le Louiss Carless, je ne sais pas où commencer ! Merci à toi aussi pour ton soutien, tes conseils et tes réserves inépuisables de bonbons en tout genre ! Je pourrai m'étendre des heures sur tes qualités mais toutes les personnes qui te côtoient les connaissent autant que moi ! Heureusement que tu l'as eu ce fichu concours sinon je n'aurais pas eu la chance d'avoir un ami comme toi !

Il est venu le temps de remercier l'ensemble de l'équipe d'ATHOS. Il est difficile de trouver les mots aux vues des épreuves que l'on a traversées. Je voudrais juste dire que je ne regrette pas le choix d'avoir fait une CIFRE et d'avoir été intégré au sein de l'équipe était une expérience formidable. Je voudrais commencer par remercier les anciens qui aujourd'hui ont pris des chemins différents. Merci à Magalie, Inès et Romain. Je pense souvent à vous et je tenais à vous dire que j'avais un immense respect pour vous. Marion je ne t'oublierai jamais...

Merci aussi à tous les contractuels à l'image de Gaël ou de Pierre. Un grand merci au reste de l'équipe. Silvana, tu es un véritable pilier de la société, désolé de t'avoir embêté avec l'ANRT. J'adore discuté avec toi et tu es vraiment quelqu'un de formidable. Merci à David, le Mac Giver de l'équipe c'est vraiment sympa de pouvoir échanger avec toi. Merci à Benoît, mon grand Kenji, tu as été un super stagiaire et je pense que tu seras un super chargé d'études ! Merci pour ces tours de bateaux et ta bonne humeur constante quel que soit la situation ! Merci au Gillou, qu'est ce qu'on a pu rigoler depuis une certaine mission de prélèvement de 6 tonnes de sédiments. Mais tu es aussi quelqu'un de professionnel et aussi



une personne formidable. Surtout, ne change pas ! Marie-Eve, merci d'être la personne que tu es ! Tu ne le prends souvent pas très bien quand je dis que tu es pure mais n'y voit pas de roublardise. Tu es là depuis le début et malgré le fait que tu as encaissé tant de choses tu es toujours là pour nous soutenir ! Merci pour tout, et je terminerai juste par deux mots qui te résument si bien : « quelle Femme ! ». Ahh, Alban, il est tellement loin le temps du schtroumpf et oui l'eau a coulé sous les ponts depuis le M1. Le temps passe mais notre amitié reste intacte. Malgré ton implication sans faille dans le boulot tu as toujours un moment pour rigoler, prendre des nouvelles, boire un coup ou aller à la pêche ! Il y aurait tant de choses à dire sur toi. Sache simplement que j'ai beaucoup d'admiration pour toi ! PS : Promis si je rêve d'un brochet d'1m07 je t'emmène à la pêche avec moi !

Mes zamis de l'Aisne, Marina, Hélo, Seb, Clem, Lolo, Tom et François. Pour certains on se connaît depuis la 5<sup>e</sup> ! Malheureusement, je vous ai pas mal négligé au cours des trois dernières années. Mais qu'on ne se soit pas vu de deux semaines ou de deux ans, le plaisir à vous retrouver est toujours immense ! Je passe toujours des bons moments en votre compagnie ! Merci de m'avoir vidé la tête et d'être venus à moi quand je ne pouvais pas venir à vous !

Je tiens à remercier mes grands-parents qui ont contribué à m'inculquer tant de valeurs de la vie. Merci de vous être occupés de moi les mercredis et les vacances. Il y aurait tant de choses à dire, tant de choses que je voudrais vous dire. Sachez simplement, que vous êtes et resteraient à jamais dans mon cœur.

Maman, je ne sais pas par où commencer tellement je te suis redevable. Merci pour mon enfance, si heureuse. Tu m'as enseigné tant de valeurs qu'un jour j'espère transmettre à mes enfants. Moi qui voulais arrêter les études au Bac tu m'as poussé à donner le meilleur de moi-même en me répétant qu'il ne fallait pas que je me trouve un travail mais un métier. Tu m'as toujours encouragé à poursuivre ma vocation vers les milieux aquatiques même si cela impliquait mon départ de l'Aisne vers le Puy De Dôme. Merci de n'avoir jamais cessé de me soutenir et de croire en moi.

Enfin, je tiens à remercier, Marianne qui me supporte depuis plus de 6 ans déjà. Malgré la distance qui nous sépare pour la réalisation de nos thèses respectives, tu étais toujours là dans les moments difficiles. Tu m'as toujours soutenu, souvent relevé, et tu étais toujours là pour moi. Tu m'as supporté et reconforté pendant mes moments de doute. Tu étais là aussi pour fêter mes victoires. Tu braves les tiques pour m'accompagner à la pêche !

Je pense que je mesure à peine la chance d'avoir une compagne telle que toi et maintenant je ne pense plus qu'à la vie à laquelle nous avons si longtemps aspirée.



A mon grand-père, Lucien

« *PERSEVERER !* »

**Lucien Legrand et tant d'autres personnes pleines de bon sens**



---

# Liste des abréviations

---

## Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxiriboNucléique

ANOVA : ANalyse Of Variance

ANTX : Antoxine-a

ARN (RNA): Acide ribonucléique

ARNm (mRNA) : ARN messenger

ARNr 16S : ARN ribosomique constituant la petite sous-unité des ribosomes des procaryotes.

Cal. BP : calibrated Before Present (avant 1950)

CARD-FISH : Catalyzed Reporter Deposition Fluorescent in situ Hybridization

CIFRE : Conventions Industrielles de Formation par la Recherche

DAPI : 4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole

DF : Degree of Freedom

DW : Dry Weight

GC-MS ; Gas Chromatography-Mass Spectrometry

GVP : Gas Vesicle Protein

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

I.C.N.B. International Code of Botanical Nomenclature

I.C.P.N : International Code of Nomenclature of Prokaryotes

LC-MS/MS : Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry

MANOVA : Multiple ANalyse Of Variance

MC : Microcystine

PCC : Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria

PCR : Polymerase Chain Reaction

PSI : Photosystème I

PSII : Photosystème II

qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

ROS : Reactive oxygen species

UV : Ultra-violet

---

# Index des Illustrations

---

---

## Chapitre 1 :

---

**Figure 1 :** Schéma de l'organisation structurale d'une cellule végétative de cyanobactérie d'après Adams and Duggan, (1999). A : membrane des thylacoïdes, B : enveloppe cellulaire, C : carboxysome, CPG : granules de cyanophycine, T : thylacoïdes, P : granules de polyphosphate, N : nucléoplasme, G : granules de glycogène, PB : phycobilisome, GV : vésicules à gaz. *Page 32*

**Figure 2 :** Principaux plans d'organisation des cyanobactéries d'après Couté et Leitao, (2005) et Bernard, (2014). *Page 33*

**Figure 3 :** Graphiques représentant la moyenne du pourcentage maximal du taux de croissance de 4 groupes phytoplanctoniques en fonction de la température, d'après Paerl et al., (2011) et Paerl and Otten., (2013). *Page 35*

**Figure 4 :** Compétition pour le phosphore entre la cyanobactérie *Planktothrix agardhii* et la prchlorophyte *Prochlorothrix hollandica* où le phosphore est apporté de manière constante (A) ou pour par pulse tous les 12 jours (B). Les lignes pleines indiquent les résultats des expériences alors que les lignes en pointillé sont issues des prédictions du modèle de compétitions d'après Ducobu et al., (1998) et Huisman et al., (2005). *Page 36*

**Figure 5 :** Modèle conceptuel des interactions des 5 facteurs biotiques majeurs intervenant dans le déclin des blooms cyanobactériens. Les relations trophiques sont représentées par des flèches de couleur orange pour la boucle microbienne, violet pour le « virale shunt » et bleu pour la boucle fongique. + : effet positif; - : effet négatif; 0 : pas d'effet; d'après (Gerphagnon et al., 2015). *Page 38*

**Figure 6 :** Principaux facteurs identifiés comme contrôlant les blooms cyanobactériens d'après Paerl and Otten, (2013). *Page 39*

**Tableau 1 :** Grandes catégories de cyanotoxines (modifié de Mankiewicz-boczek et al., (2003); Merel et al., (2013); Paerl and Otten, (2013); Bernard, (2014)). \* injectée par voie intra-péritonéale dans la souris, (1) Merel et al., (2013), (2) Méjean et al., (2014), (3) Sivonen, (2009), (4)Yadav et al., (2011).  
Abréviations : Ana : *Anabaenopsis*; Apha : *Aphanizomenon*; Cyl : *Cylindrospermopsis*; Cyl : *Cylindrospermum*; Dol : *Dolichospermum*; Hap : *Hapalosiphon*; Lin : *Lingbya*; Mic : *Microcystis*; Nos : *Nostoc*; Osc : *Oscillatoria*; Pho : *Phormidium*; Pla : *Planktothrix*; Pro : *Prochlorococcus*; Rap : *Raphidiopsis*; Sch : *Schizothrix*; Sym : *Symploca*; Syn : *Synechococcus*; Ume : *Umezakia*.  
*Page 41*



**Tableau 2 :** Différents seuils de suivis et de la gestion associée des baignades en milieux dulcicoles en fonction de la concentration en cellules toxigènes et en microcystines (Source ARS 63, 2016).  
*Page 42*

**Figure 7 :** Représentations schématiques de la voie de biosynthèse des microcystines A) (modifiés d'après Dittmann et al., (2013) et Bernard, (2014)) et de la structure moléculaire de microcystine LR B) (modifié d'après Fewer et al., (2007) et Misson, (2011)). *Page 45*

**Figure 8 :** Représentations des structures moléculaires de l'anatoxine-a (A, B) et de ses principaux homologues. *Page 46*

**Figure 9 :** Cluster de gènes de l'anatoxine-a chez différentes espèces cyanobactériennes A) et voie de biosynthèse de l'anatoxine-a B) d'après Méjean et al., (2014). *Page 48*

**Figure 10 :** Photographies illustrant la diversité morphologique des akinètes (A) en fonction des espèces du genre *Anabaena* (université du Colorado, <http://dbmuseblade.colorado.edu>). a) *Anabaena oscillatrioides* b) *Anabaena inaequalis* c) *Anabaena spherica* d) *Anabaena sp.* 71 e) *Anabaena cylindrica*. *Page 54*

**Figure 11 :** Représentation simplifiée du cycle de vie des Nostocales en zone tempérée d'après Hense and Beckmann, (2006). *Page 55*

**Figure 12 :** Photographies d'akinètes de *Dolichospermum macrosporum*. a) Plusieurs akinètes sur long filament b) akinètes sur filament court c) akinète vide sur filament d) akinète seul e) akinète seul et vide. (Photographies par B. Legrand). *Page 57*

**Figure 13 :** Photographies en lumière naturelle d'akinètes d'*Anabaena smithii* A) (Takano et al., 2008) et en épifluorescence d'*Anabaena macrospora* B) (Gerphagnon et al., 2013a) parasités par des chytridies. Le cycle du parasite se résume en 6 étapes (Gerphagnon et al., 2013a) 1) Enkystement 2) Prosporange 3) Expansion 4) Bourgeonnement 5) Stade mature 6) Libération des zoospores. Les 6 étapes sont regroupées en 3 phases : Phase jeune (1,2), Phase de maturation (3,4,5) et phase vide (6). Les barres d'échelle de la figure A) sont de 20µm. Prosporange (P) and Papille (Pa). *Page 60*

**Figure 14 :** Les différentes étapes de la germination chez les akinètes d'*Anabaena ovalisporum* d'après Kaplan-levy et al., (2010). a) akinète seul et 2 akinètes connectés à un filament de cellules végétatives. b) Akinète granuleux mature. c) Rupture de l'enveloppe de l'akinète. d)-g). Akinète germant. h) Jeune filament ou hormogonie; les barres noires horizontales indiquent 10 µm. *Page 63*

**Tableau 3 :** Principaux facteurs initiant la germination des akinètes d'après Kaplan-levy et al., (2010). *Page 64*

**Figure 15 :** Schéma conceptuel des processus influençant la distribution horizontale et la taille du pool d'akinètes dans les lacs profonds des régions tempérées selon Ramm et al., (2017). + ou – indique l'augmentation ou la diminution du pool d'akinètes. *Page 67*

**Figure 16:** Schéma représentant les différents processus intervenant dans la sédimentation (Pourriot et Meybeck, 1995). *Page 69*

**Figure 17 :** Paléo-indicateurs utilisés en paléo-limnologie. a) Grain de pollen b) Frustule de diatomée c) Reste de cladocère d) Capsule céphalique chironome d'après Smol, (2014). *Page 70*

**Figure 18:** Estimation de la concentration en phosphore total d'après le peuplement de diatomées persistant dans les sédiments lacustres, d'après Alric et al., (2013), Capo, (2016) A) et Miras et al., (2015) B). *Page 72*

**Figure 19:** Photographies illustrant la diversité des formes de résistance zooplanctoniques pouvant être retrouvées dans les sédiments lacustres. Diversité des œufs de résistance de branchiopodes (200-400µm) A), œufs de résistance sphériques retrouvés chez les copépodes calanoïdes (80-200µm) B). Ephippies retrouvées chez les cladocères possédant une (comme chez *Bosmina sp*) ou deux (comme chez *Daphnia sp*) formes de résistance (400-500µm) C). Types de monogonontes chez les rotifères (80-200µm) D). D'après Viitasalo and Katajisto., (1994) et Brendonck and De Meester., (2003). *Page 73*

**Figure 20 :** Photographies d'akinètes « fossiles » d'*Aphanizomenon* (1-8) et d'*Anabaena* (9-17) ainsi que ces deux genres mélangés (18-19) prises en microscopie optique (x1000), d'après Van Geel et al., (1994). *Page 75*

**Tableau 4 :** Pigments retrouvés communément dans les sédiments lacustres avec leur affinité taxonomique (liste non exhaustive). Le degré relatif de stabilité et de préservation est classé de (1) pour les plus stables à (4) pour les moins stables. (-) représente une stabilité non déterminé. D'après Leavitt and Hodgson, (2001). *Page 77*

**Figure 21:** Schéma d'un réseau trophique pélagique lacustre mettant en évidence comment l'analyse de l'ADN dans le sédiment peut cibler les organismes présents dans le système pélagique. Le type d'ADN est spécifié comme intracellulaire pour les cystes, propagules et formes de résistance et comme étant extracellulaire (ADN extraC), d'après Domaizon et al., (2017). *Page 78*

---

## Chapitre 2 :

---

### Article 1 :

**Table 1:** Main characteristics of the different cyanobacterial strains used. *Page 92*

**Table 2:** Main geographic, morphometric and biological characteristics of the sampled lakes. Respectively *Aph* corresponds to *Aphanizomenon* genus, *Aphanoc.* to *Aphanocapsa*, *Aphanot.* to *Aphanothece*, *Cyl.* to *Cylindrospermopsis*, *Dol.* to *Dolichospermum*; *Lim.* to *Limnothrix*, *Mic.* to *Microcystis*; *Pseu.* to *Pseudanabaena*; *Syn.* to *Synechococcus*; *Wor.* To *Woronichinia*. *Page 92*

**Table 3:** Primers used to amplify *anaC* and *anaF* genes. *Page 94*

**Table 4:** PCR programs used to amplify *anaC* and *anaF* genes by classical and nested PCR. *Page 94*

**Table 5:** Results of the amplification of *anaF* and *anaC* genes by PCR with all tested samples depending on the set of primers used. +++ represented samples which the band intensity was at least 10% of the positive control intensity band, + between 2 and 10%, ± below 2% and – without specific PCR product. NS represented samples with several non-specific bands which make it impossible to know if the sample was positive or not. *Page 97*

**Figure 1:** Electrophoresis of the different tested sets of primers for the second nested PCR. *Ayd-S a* corresponds to the pure sample from Aydat sediment and *Ayd-S b* to a dilution of the same sample by a factor of 10. The strain *Phormidium favosum* PMC 240.04 has been used as a positive control. *C –* corresponds to the negative control. *Page 99*

**Figure 2:** Electrophoresis gel with representative from Table 3 used primers. The *W* and *S* correspond to the type of sample (*W* for water and *S* for sediment) and the first 3 letters correspond to the abbreviation of the sampled site referred in Table 1 excepted for *C –* which corresponds to the negative control and *PMC 240.04* and *D.14* which correspond to *P. favosum* PMC 240.04 and *Dolichospermum 14* considered as positive control. *Page 99*

### Article 2 :

**Figure 1:** Bathymetric map of Lake Aydat and sampling station locations. *Page 108*

**Table 1:** Primers used during PCR to amplify target genes. *Page 111*

**Figure 2:** Photomicrographs of akinetes with different light emissions. From right to left: natural, green and blue light. Lane (A) represents an intact akinete of *Dolichospermum flos-aquae*. The three

others lanes represent akinetes of *Dolichospermum macrosporum*. Lanes (B, C, and D) show an intact akinete, a lysed akinete with some residues, and an empty akinete, respectively. *Page 112*

**Table 2:** ANOVA 1 tests on the steps of the isolation protocol for each cyanobacterial cellular culture and type. Letters represent significant differences from post hoc Tukey test. *Page 113*

**Figure 3:** Cyanobacterial vegetative cell and intact akinete abundances depending on the treatment (A) and percentage of intact akinetes which resisted all treatment steps (B). *Page 114*

**Figure 4:** Percentage of resistant akinetes after the akinete isolation process from Lake Aydat sediment for the species and the season. (A) Detail for each sampling station, (B) Mean for the whole lake. *Page 116*

**Table 3:** Presence/absence of Cyanobacterial 16S rRNA gene and targeted ANTX genes in intact akinetes from cyanobacterial cultures and sediment samples from Lake Aydat. *Page 117*

---

## Chapitre 3 :

---

### Article 3:

**Figure 1:** Bathymetric map of Lake Aydat, showing sampling station locations. The base bathymetric map was created using Surfer (version 7.02). *Page 131*

**Figure 2:** Photomicrographs, in natural light, of both vegetative cells and akinetes (a) of *D. macrosporum* (A and B) and *D. flos-aquae* (C to E). *Page 132*

**Figure 3:** Temporal variations in *D. macrosporum* vegetative cells and akinetes from the 2014 (A) and 2015 (B) blooms for each studied location. *Page 134*

**Figure 4:** Estimated numbers of *Dolichospermum macrosporum* vegetative cells and akinetes in the water column and akinetes in sediment in 2014 (A) and 2015 (B). *Page 135*

**Figure 5:** Spatial distributions of akinetes in Lake Aydat sediment in December 2014, April 2015, and December 2015 for *D. macrosporum* (A) and *D. flos-aquae* (B). *Page 137*

**Figure 6:** Percentages of intact akinetes in Lake Aydat sediment according to the species, the area (pelagic versus littoral zones), and the sampling period. *Page 138*

**Figure 7:** Photomicrographs, in natural light, of *D. macrosporum* akinete germination, from intact akinete (top left) to hormogonia (young filament) (bottom right). *Page 139*

**Figure 8:** Percentages of germinated akinetes in Lake Aydat sediment in April 2015 according to the species and the lake zone (pelagic versus littoral zones). *Page 140*

**Figure 9:** Percentages of akinete germination for *D. macrosporum* (A) and *D. flos-aquae* (B). *Page 141*

**Figure S1:** Photomicrographs of (A) *D. macrosporum* and (B) *D. flos-aquae* hormogonia. *Page 150*

**Table S1:** Student tests highlighting the spatial and temporal differences of akinete distributions in sediment (\*\*\*) represents a  $p$  value  $\leq 0.001$ , \*\* represents  $0.01 \leq p$  value  $< 0.001$  and \* represents  $0.05 \leq p$  value  $< 0.01$ ). *Page 150*

---

## Chapitre 4 :

---

### Article 4 :

**Figure 1:** Chronology of the sediment core: (A) decrease of  $^{210}\text{Pb}$ ; (B) peaks of  $^{137}\text{Cs}$  and  $^{241}\text{Am}$ ; and (C) magnetic susceptibility. *Page 161*

**Figure 2:** Distributions of total, *D. macrosporum* and *D. flos-aquae* akinetes through the sediment core. *Page 162*

**Figure 3:** Percentage of intact akinetes of *D. macrosporum* and *D. flos-aquae* through the sediment core. *Page 163*

**Figure 4:** Detection of the targeted genes in total sediment. Layers represent the sampling performed along the sediment core (79 samples). *Page 164*

**Figure 5:** Detection of the targeted genes in intact akinetes. *Page 165*

**Figure 6:** Individual factor map from the multiple factor analysis (MFA). *Page 166*

**Figure 7 :** Bathymetric map of Lake Aydat. Star represents the point where the core has sampled. *Page 171*

**Table 1:** Primers used to detect targeted genes. [17], [19] , [60] and [61] represent Rantala-Ylinen et al., (2011); Legrand et al., (2016b); Nubel et al., (1997) and Hisbergues et al., (2003) respectively. *Page 174*

**Figure S1:** Relative percentage along the sediment core between total akinetes of *D. macrosporum* and *D. flos-aquae*. *Page 176*

## Article 5 :

**Figure 1:** Bathymetric map of Lake Aydat(A) (the star represent the sampling point of the core), age model of the core from (Lavrieux et al., 2013) (B) (blue lines represent analyzed samples and blue circles analyses samples for the germination experiment) and different akinete morphotypes encountered (C) (a) *Dolichospermum macrosporum*, b) *D. flos-aquae* c) *Dolichospermum sp.* d) *Aphanizomenon sp.*). Page 179

**Table1:** Primers used to amplify targeted genes. Page 182

**Figure 2:** Distributions of total, *D. macrosporum* and *D. flos-aquae*, *Dolichospermum sp.* and *Aphanizomenon sp.* akinetes through the sediment core. Page 183

**Figure 3:** Number of intact akinetes of each studied species present along the core. Page 185

**Figure 4:** Evolution of percentages of intact akinetes for each studied species along the core. Page 186

**Figure 5:** Proportions of the different morphotypes extracted for each analyzed samples (A) for the germination experiment (B). Page 187

**Figure 6:** Detection of the targeted genes in total sediment along the core. Page 188

**Figure S1:** Evolution of the akinetes morphotype proportions through the sediment core. Page 193

---

## Chapitre 5 :

---

**Tableau 1 :** Comparaison du protocole Ludox-Sytox Green avec d'autres protocoles d'extraction-observation des akinètes utilisés dans la littérature. Page 199

**Figure 1 :** Schéma détaillant les principes de l'extraction des akinètes avec le ludox et les possibles applications. Page 200

**Figure 2 :** Comparaison des populations pélagiques de *D. macrosporum* entre 2014 et 2015, A) Cellules végétatives, B) Akinètes. Tous ces pourcentages sont exprimés par rapport à la population pélagique de *D. macroporum* de 2014 (100%). Page 203

**Figure 3 :** Enveloppes d'akinètes (a) après une lyse bactérienne A), virale B) et fongique C). Akinètes

d'*Anabaena cylindrica* A), de *Cylindrospermopsis raciborskii* B), et de *Dolichospermum macrosporum* C). Photographies d'après Yamamoto and Suzuki, (1977) A), Pollard and Young, (2010) B), et de B. Legrand C). *Page 205*

**Figure 4 :** A) Akinètes intègres de *D. flos-aquae* issus d'une pelote fécale retrouvée dans le sédiment du lac d'Aydat, B) Akinètes germant de *Nodularia sp.* issu d'une pelote fécale retrouvée dans le sédiment de l'estuaire de Peel-Harvey d'après Huber, (1984). *Page 208*

**Figure 5 :** Schéma résumant les principaux facteurs écologiques rencontrés de la formation des akinètes dans la colonne d'eau à leur enfouissement dans le sédiment profond. *Page 211*

**Figure 6:** Colonisation de la colonne d'eau par les akinètes en fonction de la zone considérée (représentation basée sur le lac dimictique tel le lac d'Aydat). *Page 213*

**Figure 7 :** Schéma expliquant les intérêts de l'utilisation de la nested PCR. *Page 215*

**Figure 8:** Schéma expliquant l'intérêt d'analyser le potentiel toxique des sédiments bruts et des akinètes intègres. *Page 217*

---

# Sommaire

---

<b>Remerciements</b> .....	5
<b>Liste des abréviations</b> .....	13
<b>Index des Illustrations</b> .....	15
<b>Sommaire</b> .....	23

---

## Chapitre 1 : Introduction générale

---

I) Contexte scientifique.....	29
II) Analyse bibliographique .....	31
1. Généralités sur les cyanobactéries.....	31
2. Les proliférations cyanobactériennes : facteurs de contrôle et conséquences écologiques.....	34
a. Facteurs abiotiques impliqués dans le contrôle des blooms cyanobactériens .....	34
b. Facteurs biotiques impliqués dans le contrôle des blooms cyanobactériens .....	37
c. Conséquences des proliférations cyanobactériennes.....	40
3. Les cyanotoxines associées aux proliférations cyanobactériennes : focus sur les microcystines et l'anatoxine-a.....	43
a. Biosynthèses et mode d'action des microcystines et de l'anatoxine-a.....	43
b. Déterminisme de la production des microcystines et de l'anatoxine-a.....	49
c. Rôle écologiques des microcystines et de l'anatoxine-a .....	50
4. L'akinète dans le cycle de vie des Nostocales .....	53
a. Particularités des Nostocales .....	53
b. Différenciation et production des akinètes dans la colonne d'eau.....	55
c. Les akinètes dans les interactions trophiques .....	59
d. Phase de survie benthique et résistance des akinètes.....	60
e. Le recrutement printanier des Nostocales .....	62



5. Les sédiments : véritables archives benthiques.....	68
a. Fonctionnement du compartiment benthique .....	68
b. Reconstruction des communautés passées <i>via</i> les macro-restes .....	69
c. Reconstruction des communautés passées <i>via</i> des molécules .....	76
III) Objectifs et organisation de la thèse.....	80

---

## **Chapitre 2 : Mise en évidence du potentiel toxique des akinètes**

---

I) Introduction.....	85
II) Article 1.....	87
III) Article 2.....	103

---

## **Chapitre 3 : Relation entre akinètes dans le sédiment récent et cellules végétatives dans la colonne d'eau**

---

I) Introduction.....	125
II) Article 3.....	127

---

## **Chapitre 4 : La persistance des akinètes à moyen et à long termes dans le sédiment**

---

I) Introduction.....	153
II) Article 4.....	156
III) Article 5.....	177

---

## **Chapitre 5 : Discussion générale**

---

I) Rappel des objectifs de la thèse .....	197
II) Les akinètes dans les sédiments : marqueurs des proliférations passées ? .....	198
1. Mise en évidence des akinètes présents dans le sédiment.....	198
2. La diversité nostocaléenne planctonique correspond-elle à celle des akinètes présents dans le sédiment ? .....	201

3.	L'abondance des akinètes benthiques est-elle proportionnelle à celle des populations pélagiques précédentes ? .....	202
1.	Persistance des akinètes de la colonne d'eau aux sédiments profonds .....	205
III)	Intérêt d'évaluer l'intégrité des akinètes .....	207
1.	L'intégrité des akinètes, un critère espèces-spécifiques.....	207
2.	Le maintien de l'intégrité des akinètes est-il le reflet de leur viabilité ?.....	209
3.	Implication de la germination des akinètes dans la mise en place de la future population pélagique .....	212
IV)	Mise en évidence du potentiel toxique des akinètes .....	214
1.	Mise en œuvre méthodologique .....	214
2.	Mise en évidence et caractérisation du potentiel toxique des akinètes .....	216
3.	Applications, limites et intérêts d'une analyse multiparamètres .....	217
V)	Conclusion et Perspectives.....	218
	<b>Références bibliographiques</b> .....	221
	<b>Annexes</b> .....	255
I)	Annexe 1 : Les souches anciennes isolées du sédiment du lac d'Aydat.....	256
1.	Souche 1 provenant de l'échantillon 3269 cal. BP.....	256
a.	Photographies prises en microscopie optique (lumière naturelle).....	256
b.	Photographies prises en microscopie optique en épifluorescence .....	257
2.	Souche 2 provenant de l'échantillon 4274 cal. BP.....	258
a.	Photographies prises en microscopie optique (lumière naturelle).....	258
b.	Photographies prises en microscopie optique en épifluorescence .....	259
II)	Annexe 2 : Portfolio de compétences.....	260
III)	Annexe 3 : AEM cover (Décembre 2017) .....	269



---

# **Chapitre 1 :**

## **Introduction générale**

---



## I) Contexte scientifique

---

Depuis la fin de la seconde guerre mondiale, les activités humaines *via* des rejets domestiques, agricoles et industrielles ont contribué à la dégradation des écosystèmes lenticques accélérant de manière exponentielle le phénomène naturel d'eutrophisation des systèmes lacustres. En effet, les apports excessifs en nutriments notamment en azote et en phosphore sont directement utilisables au sein des réseaux trophiques aquatiques et, en premier lieu, par les producteurs primaires dont les cyanobactéries font naturellement partie (Paerl and Otten, 2013).

Durant ces épisodes, les cyanobactéries deviennent dominantes par rapport aux autres organismes phytoplanctoniques notamment grâce à divers adaptations morphologiques et physiologiques (formation de colonies ou filaments, synthèse de vésicules à gaz, utilisation de l'azote atmosphérique...). Durant ces proliférations, la biomasse cyanobactérienne est si importante qu'elle génère d'importantes nuisances d'ordre écologique, sanitaire et économique (Chorus and Bartram, 1999). Ces organismes photosynthétiques peuvent notamment être responsables de désoxygénation totale de la colonne d'eau, occasionnant une importante mortalité chez les organismes aérobies (Barica, 1975). De plus, les cyanobactéries de par leur morphologie et leur faible qualité nutritionnelle sont difficilement assimilables pour les organismes zooplanctoniques créant ainsi de véritables impasses trophiques et par conséquent, entraînent une diminution de la diversité à l'échelle de l'écosystème entier (Huisman et al., 2005).

Concernant les activités humaines, les blooms cyanobactériens sont une source importante de nuisances. La couleur de l'eau et la forte odeur parfois associées aux efflorescences sont à l'origine d'une baisse de fréquentation des sites touristiques. Cependant, la plus forte contrainte concerne la capacité de production de diverses cyanotoxines. Ces cyanotoxines, souvent dangereuses pour l'Homme, contraignent les gestionnaires de plans d'eau à usage récréatif d'en interdire l'accès. Ces mêmes cyanotoxines peuvent contaminer les ressources en eau potable, obligeant les distributeurs à des traitements contraignants et coûteux. Ainsi, les conséquences écologiques et sociétales de l'eutrophisation des écosystèmes aquatiques sont à l'origine d'importantes pertes économiques évaluées à plusieurs milliards de dollars par an aux Etats-Unis (Dodds et al., 2009).

Parmi toutes les cyanobactéries existantes, l'ordre des Nostocales n'est pas le plus étudiée (i.e Chroococcales) (Merel et al., 2013), mais les espèces appartenant à cet ordre sont capables de proliférer sur de nombreux continents. En effet, les espèces de cet ordre ont une répartition géographique conséquente touchant aussi bien l'hémisphère nord que l'hémisphère sud, les zones tempérées ou les zones tropicales. De plus, certains genres comme *Aphanizomenon* (Cirés et al., 2013b) ou *Cylindrospermopsis* (Briand et al., 2004; Mehnert et al., 2010) sont considérés comme invasifs. Cette caractéristique est favorisée par le réchauffement global qui facilite l'expansion géographique de ces espèces (Padisák, 1997; Isvánovics et al., 2000; Sukenik et al., 2012a). Pour finir, les différentes espèces de cet ordre sont capables de synthétiser une multitude de cyanotoxines (Bernard, 2014), telles la microcystine, l'anatoxine-a ou encore la cylindrospermospine. Par conséquent, il est actuellement encore difficile d'estimer l'évolution des risques liés aux proliférations nostocaléennes dans un contexte de réchauffement climatique dans des systèmes lacustres fortement anthropisés.

Les cyanobactéries appartenant à cet ordre sont de forme filamenteuse et sont caractérisées par l'aptitude des cellules végétatives à se différencier en deux types cellulaires spécialisés : les hétérocystes et les akinètes (Kaplan-levy et al., 2010). Les hétérocystes sont des cellules impliquées dans la fixation de l'azote atmosphérique alors que les akinètes constituent des cellules de résistances (Hense and Beckmann, 2006). Ces dernières sont nécessaires à la majorité des espèces nostocaléennes présentes en zone tempérée (Mehnert et al., 2014). En effet, elles sont formées lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (hiver), persistent à la surface des sédiments et germent pour former de nouveaux filaments lorsque les conditions redeviennent propices à leur développement (printemps) (Hense and Beckmann, 2006). Ces akinètes ont aussi la capacité de persister des centaines d'années dans les sédiments pouvant potentiellement être utilisés comme marqueurs des proliférations passées (Eilers et al., 2004).

La caractérisation des proliférations passées a de nombreux avantages aussi bien dans le domaine de la recherche fondamentale que pour la gestion des plans d'eau. Dans le cadre d'un suivi de la qualité de l'eau sans donnée préalable, il peut s'avérer utile de savoir si le site étudié est sujet à des développements récurrents de cyanobactéries et si les espèces qui prolifèrent sont capables de synthétiser des toxines. Or, la détermination du potentiel toxique d'une prolifération cyanobactérienne demande des comptages et analyses de cyanotoxines réguliers durant l'ensemble de la période de croissance. La mise en place d'un tel suivi

s'avère couteux et parfois inapproprié car les efflorescences peuvent être soudaines et/ou hétérogènes spatialement. Des solutions plus intégratives demandent donc à être développées. Parallèlement, les gestionnaires de plans d'eau souhaiteraient pouvoir anticiper le risque associé à la production de cyanotoxines en vue d'une meilleure gestion. Cependant, peu d'outils permettent à l'heure actuelle d'évaluer l'abondance et le caractère toxique d'une prolifération cyanobactérienne future.

Dans ce contexte, il apparaît nécessaire de proposer des outils de caractérisation des blooms passés et de travailler sur l'anticipation des proliférations futures. Les capacités de résistance et l'implication des akinètes dans le cycle annuel de développement des Nostocales semblent constituer des caractéristiques d'intérêt à l'utilisation de ces cellules en tant que marqueur des proliférations passées et à venir. Même si les akinètes ne sont pas représentatifs de l'ensemble des cyanobactéries, la large distribution géographique des Nostocales dans les eaux de surfaces renforce l'intérêt porté à ces cellules de résistances.

## **II) Analyse bibliographique**

---

### **1. Généralités sur les cyanobactéries**

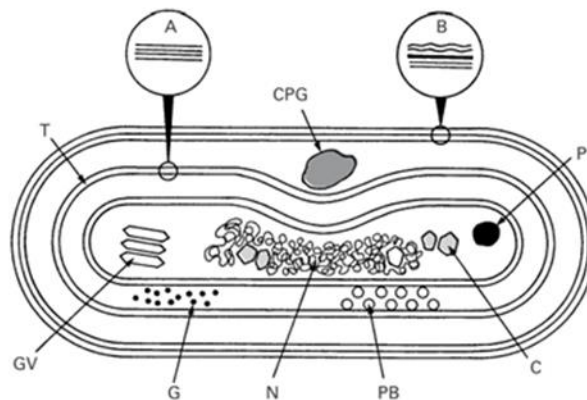
Les cyanobactéries sont des micro-organismes très anciens qui seraient apparus entre 3,5 et 2,7 milliards d'années dans les milieux océaniques (Schopf, 1996). Ces procaryotes gram négatifs sont photosynthétiques et sont à l'origine de l'oxygénation de l'atmosphère terrestre (2,5 à 0,5 milliards d'années) (Canfield, 2005; Cavalier-Smith, 2010). Ces organismes ont été aussi nécessaires à la photosynthèse eucaryote puisqu'elles ont aussi un rôle prédominant dans la théorie de l'endosymbiose (McFadden, 2001; Kutschera and Niklas, 2005).

Les cyanobactéries présentent des propriétés communes avec les organismes photosynthétiques eucaryotes et les bactéries. Ainsi, elles disposent d'une paroi cellulaire contenant des peptidoglycane comme chez toutes les bactéries gram négatif, une absence de noyau, de plaste et de mitochondrie (Fay and Van Baalen, 1987). Cependant, comme les micro-algues eucaryotes, les cyanobactéries possèdent de la chlorophylle a (et non de la bactériochlorophylle comme les autres procaryotes photosynthétiques) ainsi que des caroténoïdes ( $\beta$ -carotène, zéaxanthine, échinénone, canthaxanthine et myxoxanthophylle). Elles possèdent aussi un photosystème complexe (PSI et II) et des pigments accessoires particuliers, les phycobilines (phycocyanine, allophycocyanine, phycoérythrine,



phycoérythrocyanine), localisés à l'extérieur de la membrane des thylakoïdes. Ces pigments accessoires constituent le premier complexe collecteur d'énergie lumineuse du photosystème II et ils sont responsables de la couleur bleue ou rouge de certaines cyanobactéries. Les cyanobactéries réalisent ainsi une photosynthèse oxygénique et utilisent l'eau comme donneur d'électrons (Bernard, 2014).

Les cyanobactéries possèdent plusieurs formes de réserves. Les réserves azotées sont constituées par la cyanophycine (polypeptide constitué d'arginine et d'asparagine) tandis que les réserves carbonées sont composées par de l'amidon cyanophycéen et des gouttelettes lipidiques. Certaines cyanobactéries possèdent par ailleurs des granules d'acide poly- $\beta$ -hydroxybutyrique (PHB), ainsi que des carboxysomes (contenant l'enzyme RuBisCo permettant la fixation du carbone inorganique) (Adams and Duggan, 1999).

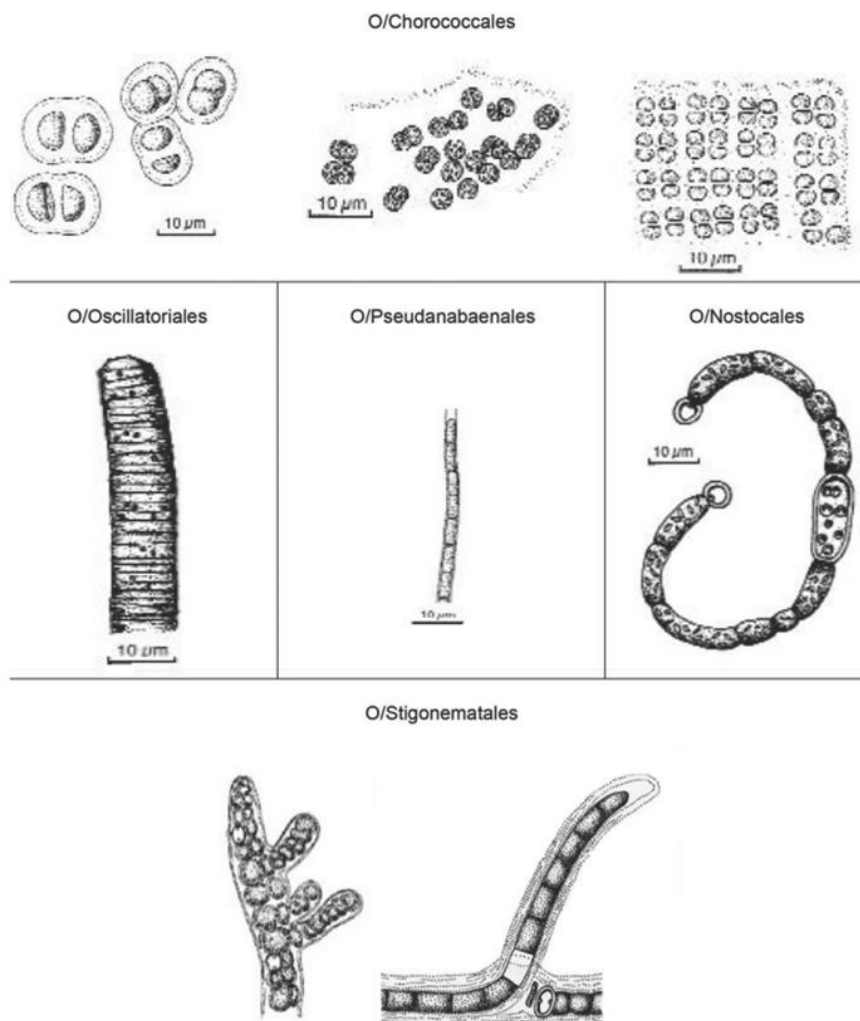


**Figure 1 : Schéma de l'organisation structurale d'une cellule végétative de cyanobactérie d'après Adams and Duggan, (1999). A : membrane des thylacoïdes, B : enveloppe cellulaire, C : carboxysome, CPG : granules de cyanophycine, T : thylacoïdes, P : granules de polyphosphate, N : nucléoplasme, G : granules de glycogène, PB : phycobilisome, GV : vésicules à gaz.**

La reproduction des cyanobactéries est uniquement asexuée et elle repose sur une simple multiplication végétative (voie amitotique ou fission binaire) ou sur la formation de spores (nanocystes, endospores, akinètes). Les cyanobactéries sont généralement classées suivant des critères morphologiques. Malgré, une diversité de formes et de tailles très importantes les cyanobactéries sont regroupées en trois grands types d'organisation morphologique : unicellulaire, coloniale et filamenteuse pluricellulaire (Figure 2). La classification des cyanobactéries dépend à la fois du Code International de Nomenclature Botanique (I.C.N.B) et du Code International de Nomenclature des Bactéries (I.C.N.B). La classification selon

Hoffmann et al. (2005), est l'une des plus récentes et reconnait six ordres (Chroococcales, Oscillatoriales, Pseudanabaenales, Nostocales, Stigonematales et Synechococcales), scindés en 30 familles et plus de 250 genres. Néanmoins, la classification phylogénétique montre de fortes discordances avec la classification basée uniquement sur les critères morphologiques. Par conséquent, il est très probable que la classification de ces organismes soit amenée à évoluer avec le développement d'outils et d'analyse bioinformatique. Des remaniements sont d'ores et déjà observés : le plus marquant pour la suite de ce manuscrit, est la scission du genre *Anabaena* en deux nouveaux genres : les *Anabaena* benthiques conservent ce nom de genre alors que les *Anabaena* planctoniques sont désormais nommées *Dolichospermum* (Komárek, 2015).

**Figure 2 : Principaux plans d'organisation des cyanobactéries d'après Couté et Leitao, (2005) et Bernard, (2014).**



Les cyanobactéries unicellulaires peuvent présenter des formes de type sphérique, cylindrique ou ovoïde (Synechococcales). Leur multiplication se fait par fission binaire. Les cellules cyanobactériennes peuvent aussi se regrouper en agrégats au sein d'un mucilage afin de former des colonies (Chroococcales). Les formes filamenteuses sont issues de divisions cellulaires sur un plan unique et leurs organisations peuvent être unisériées mais aussi plurisériées. Chez les formes filamenteuses, les trichomes se brisent au niveau des nécriides (cellules dégénérescentes), des hétérocystes, ou en donnant des fragments pluricellulaires, les hormogonies. Certains ordres cyanobactériens, les Nostocales et les Stigonématales, ont la capacité de produire des cellules spécialisées à partir de la différenciation de cellules végétatives et ayant pour rôles respectifs de fixer l'azote atmosphérique (hétérocyste) et de résister à des conditions environnementales défavorables (akinète). Les principales caractéristiques de ces cellules spécialisées seront détaillées dans la suite de ce manuscrit.

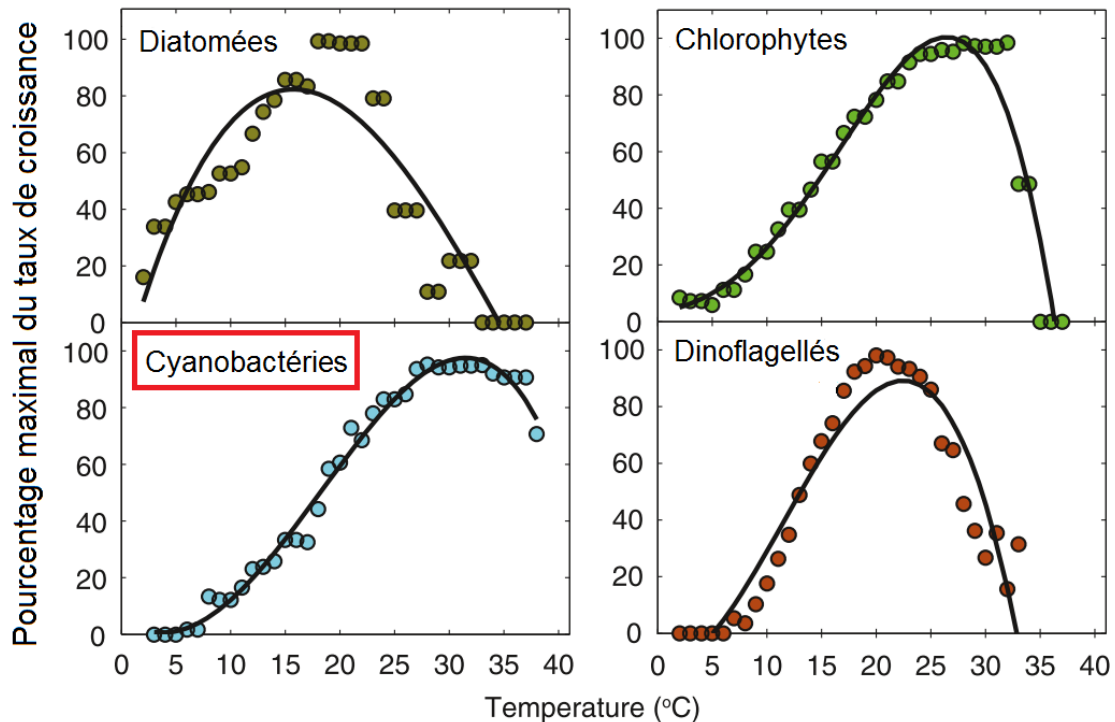
De par cette diversité, les cyanobactéries sont ainsi capables de vivre sous tous les climats (Padisák, 1997), des plus tempérés aux plus arides sans oublier les plus glacials (Chorus and Bartram, 1999). Ces organismes peuvent aussi proliférer dans des écosystèmes extrêmes tels les sources d'eau chaude du Yellowstone (Lau et al., 2005).

## 2. Les proliférations cyanobactériennes : facteurs de contrôle et conséquences écologiques

### a. Facteurs abiotiques impliqués dans le contrôle des blooms cyanobactériens

Les facteurs écologiques conditionnent la dynamique phytoplanctonique et par extension celle des blooms cyanobactériens. La nature du bassin versant (surfacier, géologie, topographie...) et du plan d'eau (surface, bathymétrie, géologie...) vont pouvoir jouer directement ou indirectement sur les paramètres physico-chimiques de l'eau (Bernard, 2014) constituant ainsi l'ensemble des facteurs abiotiques *sensus stricto*. Parmi ces facteurs, la température de l'eau et en particulier les fortes températures semblent particulièrement avantager les cyanobactéries. En effet, les cyanobactéries ont en général un taux de croissance optimal à des températures supérieures à 25°C. Les cyanobactéries possèdent même l'optimum de croissance aux températures les plus élevées considérant tous les autres groupes phytoplanctoniques (Figure 3) (Paerl et al., 2011). Ainsi, les cyanobactéries bénéficient d'un avantage compétitif non négligeable lorsque la température augmente (Reynolds, 2006). Ce

paramètre explique leur dominance lors des périodes estivales et le réchauffement global est considéré comme ayant un impact croissant sur la nature et l'intensité des blooms cyanobactériens (Paerl and Paul, 2012; Bernard, 2014). De plus, les températures élevées renforcent la stratification de la colonne d'eau ayant pour conséquence une stabilité physique de l'épilimnion. Durant cette période de stabilité les cyanobactéries sont particulièrement avantagées vis-à-vis des autres groupes phytoplanctoniques (Jöhnk et al., 2008).

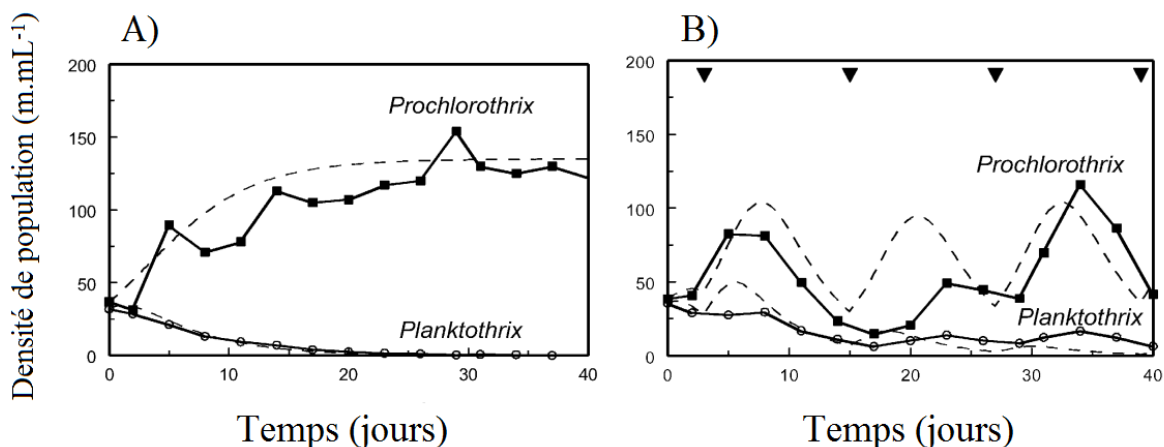


**Figure 3 : Graphiques représentant la moyenne du pourcentage maximal du taux de croissance de 4 groupes phytoplanctoniques en fonction de la température, d'après Paerl et al., (2011) et Paerl and Otten., (2013).**

Grâce à la combinaison de caractéristiques cellulaires et à des mécanismes de stockage et de consommation de carbohydrates, les cyanobactéries sont capables de réguler leur flottabilité dans la colonne d'eau et ainsi d'éviter la sédimentation (Brookes et al., 1999). Plus précisément, certaines cyanobactéries sont capables de se déplacer dans la colonne d'eau par glissement et par rotation hélicoïdale des filaments tournant sur eux-mêmes (Hoiczuk, 2000). Certains genres (*Microcystis*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon*,...) possèdent également des vésicules à gaz, structures cylindriques creuses remplies de gaz et dont la paroi est constituée d'un seul type de protéine appelée gas vesicle protein (GVP) (Walsby, 1994). Ces vésicules à gaz ont une densité 8 fois inférieure à celle de l'eau. Elles confèrent ainsi aux cyanobactéries qui en possèdent une flottabilité de base qu'elles régulent en fonction des conditions de leur

environnement. L'optimisation de leur position verticale dans la colonne d'eau est réalisée *via* un ballast d'hydrates de carbone résultant de l'activité photosynthétique des cellules (Rabouille et al., 2003). L'utilisation ou l'accumulation de molécules carbonées denses leur permet notamment de réaliser des migrations verticales journalières et d'optimiser les processus de photosynthèse.

Ces conditions physiques particulières (i.e forte stabilité de la colonne d'eau) vont aussi jouer sur la concentration en nutriments dans la zone euphotique. Les flux de nutriments entre l'hypolimnion et l'épilimnion sont très limités durant la période estivale et les nutriments deviennent généralement limitant dans la zone euphotique (Sarmiento et al., 2004). Ayant la capacité de fixer l'azote atmosphérique grâce aux cellules spécialisées que sont les hétérocystes, les cyanobactéries hétérocystées peuvent s'affranchir de cette limitation, du moins concernant l'azote. Par ailleurs, l'augmentation actuelle des flux de nutriments, notamment d'azote et de phosphore, entraînant une eutrophisation croissante des masses d'eau, favorise le développement des cyanobactéries. En effet, la majorité des cyanobactéries sont effectivement de faibles compétiteurs vis-à-vis du phosphore par rapport à la majorité des groupes phytoplanctoniques tels que les diatomées, les prochlorophytes ou les chlorophycées (Figure 4). Cette caractéristique explique en partie pourquoi les cyanobactéries ne sont que très rarement dominantes en milieu oligotrophe où le phosphore est un facteur limitant (Duarte and Canfield, 1992; Huisman et al., 2005).



**Figure 4 :** Compétition pour le phosphore entre la cyanobactérie *Planktothrix agardhii* et la prechlorophyte *Prochlorothrix hollandica* où le phosphore est apporté de manière constante (A) ou pour par pulse tous les 12 jours (B). Les lignes pleines indiquent les résultats des expériences alors que les lignes en pointillés sont issues des prédictions du modèle de compétitions d'après Ducobu et al., (1998) et Huisman et al., (2005).

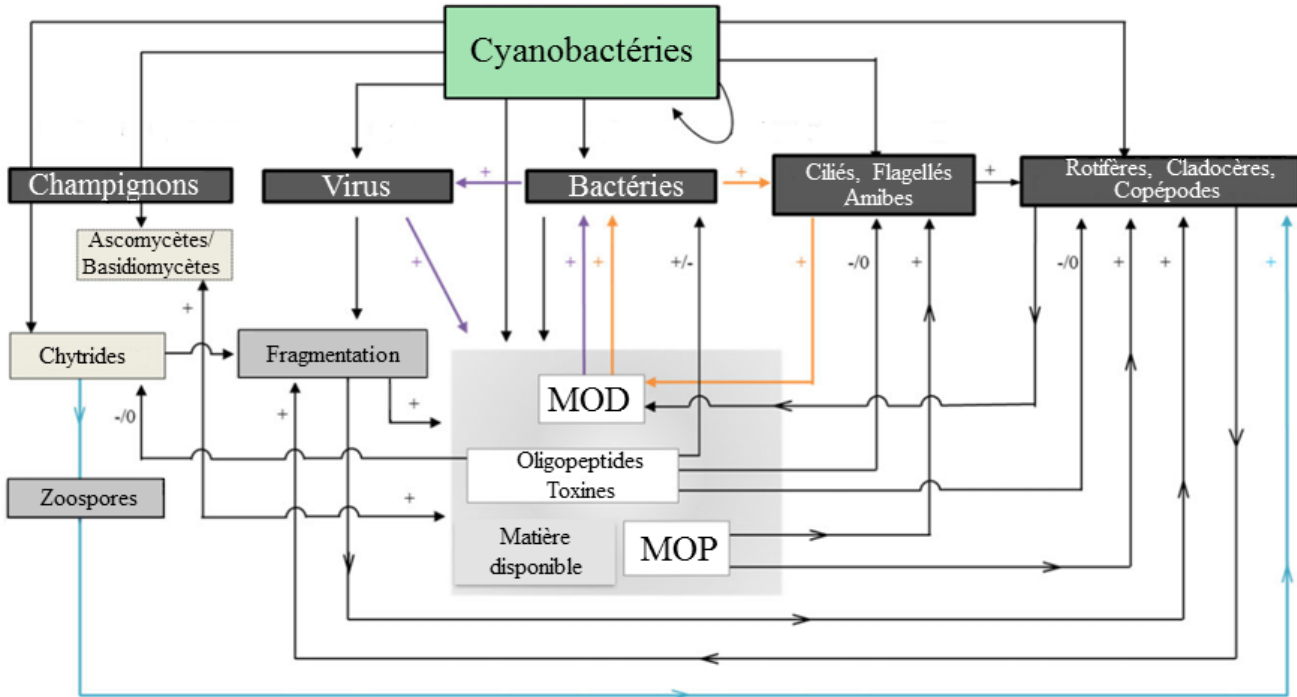
En milieu eutrophe, les cyanobactéries ne sont plus en compétition directe pour le phosphore avec les autres organismes phytoplanctoniques et grâce à leur croissance relativement rapide (Huisman et al., 2005) peuvent se développer jusqu'à former d'importantes efflorescences. Cet enrichissement des milieux aquatiques peut être ponctuel ou diffus et est depuis plusieurs dizaines d'années majoritairement lié aux activités humaines. Cette eutrophisation anthropique est identifiée comme l'une des causes majoritaire de la recrudescence des blooms cyanobactériens à l'heure actuelle (Schindler et al., 1973; Xu et al., 2010; Lewis et al., 2011; Paerl et al., 2011; Paerl and Otten, 2013).

D'autres facteurs chimiques, beaucoup moins connus et sûrement moins prépondérants, pourraient néanmoins favoriser les proliférations cyanobactériennes en assurant le rôle de cofacteurs enzymatiques tels le Fer, le Molybdène ou d'autres éléments traces métalliques. (Howarth et al., 1988; Paerl and Otten, 2013).

### **b. Facteurs biotiques impliqués dans le contrôle des blooms cyanobactériens**

Les interactions trophiques conditionnent aussi les efflorescences cyanobactériennes. Malgré cela, le nombre d'études est encore faible par rapport à celui focalisé sur l'impact des facteurs physico-chimiques (Gerphagnon et al., 2015). Cependant, une diversité d'organismes, allant des virus aux métazoaires, peut interagir avec les cyanobactéries. Comme la majorité des organismes, les cyanobactéries ont des prédateurs. Le broutage des cyanobactéries par le zooplancton (incluant rhizopodes, ciliés, rotifères et crustacées) peut amener à une diminution significative de leur biomasse (Sommer et al., 1986, 2012). Cependant, les formes coloniales ou filamenteuses peuvent interférer mécaniquement avec le système de filtration d'organismes zooplanctoniques empêchant ainsi l'ingestion des cyanobactéries et pouvant conduire à la mort du prédateur (Paerl and Otten, 2013). Néanmoins, des adaptations morphologiques et comportementales conduisent les brouteurs à contourner la contrainte de taille. Les petites espèces de cladocères, possèdent des ouvertures pour la filtration plus petites et ne peuvent pas par conséquent ingérer les filaments ou les colonies (Demott et al., 2001). De plus, il a été aussi démontré que les petites espèces de cladocères étaient plus tolérantes à une exposition à la microcystine que les plus grandes (Guo and Xie, 2006). Certaines espèces de copépodes sont capables de brouter en cassant de longs filaments cyanobactériens les rendant ainsi assimilables pour les espèces filtreuses non sélective (Kâ et al., 2012). Les protozoaires prédateurs possèdent aussi des adaptations leur

permettant d'ingérer des filaments cyanobactériens (Canter et al., 1990). Par exemple, certaines espèces de ciliées sont spécialisées dans l'ingestion de filament cyanobactériens. Cette ingestion est rendu possible grâce à une structure contractile : le panier cytopharygien (Vigues et al., 1999). Comme le paragraphe précédent l'illustre, il n'existe pas de règle précise quant à la capacité de contrôle des brouteurs vis-à-vis des cyanobactéries. Ce contrôle top down résulte donc d'un processus espèce spécifique entre l'hôte et son prédateur (Lemaire et al., 2012; Gerphagnon et al., 2015).



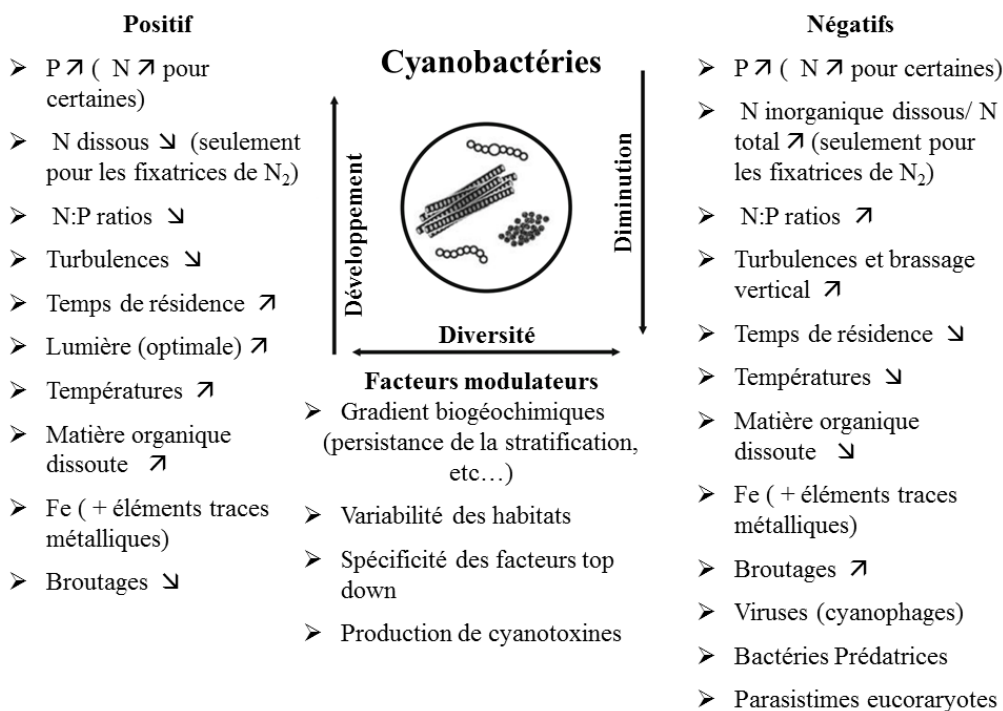
**Figure 5 : Modèle conceptuel des interactions des 5 facteurs biotiques majeurs intervenant dans le déclin des blooms cyanobactériens. Les relations trophiques sont représentées par des flèches de couleur orange pour la boucle microbienne, violet pour le « virale shunt » et bleu pour la boucle fongique. + : effet positif; - : effet négatif; 0 : pas d'effet; d'après Gerphagnon et al., (2015).**

Dans le milieu naturel, les cyanobactéries sont associées avec d'autres micro-organismes, en particulier avec des bactéries hétérotrophes (Liu et al., 2014). Des interactions mutualistes ont déjà été mises en évidence entre ces deux groupes de micro-organismes mais de nombreuses bactéries hétérotrophes sont également capables de lyser les cyanobactéries pour les utiliser comme sources de nourriture (Yamamoto et al., 1993). Les cyanophages, virus spécifiques des cyanobactéries, sont aussi capables de lyser leur hôte (Suttle, 2000). Les chytrides (i.e Chytridiomycota) peuvent aussi parasiter les cyanobactéries conduisant dans la totalité des cas à la lyse des cellules hôtes. Tous ces organismes, peuvent contribuer au déclin



de blooms cyanobactériens. Par exemple, Pollard and Young, (2010) estiment que la lyse viral a réduit l'abondance de *C. raciborskii* de 86% en 5 jours. Cependant, ce déclin *via* la lyse des populations cyanobactériennes n'est pas toujours exhaustif. La spécificité du parasite à cibler plusieurs genres/espèces/génotypes en serait la principale raison. En effet, certaines espèces de chytrides sont capables d'infecter plusieurs espèces ou genres de cyanobactéries (Davis et al., 2003) alors que d'autres vont cibler des espèces précises voire même un type cellulaire particulier (Takano et al., 2008). Les cyanophages peuvent aussi être spécifiques : le cyanophage Ma-LMM01 a causé la lyse de seulement 1 genotype de *Microcystis aeruginosa* sur 16 testés (Yoshida et al., 2006).

En plus de contribuer au déclin de l'efflorescence, ces lyses cellulaires microbiennes sont aussi un moyen de sortir de l'impasse trophique engendrée par les cyanobactéries (Figure 5). Tous ces mécanismes sont définis dans la boucle microbienne (*sensus stricto*), la boucle fongique et virale en fonction du Phylum considéré (Kagami et al., 2007, 2014; Gerphagnon et al., 2015). Ils permettent ainsi la redistribution de la biomasse cyanobactérienne aux autres composants de l'écosystème sous forme de matière organique dissoute et particulaire. Un unique facteur biotique ne peut cependant conditionner à lui seul la régulation et la disparition de blooms cyanobactériens. Il s'agirait plutôt du résultat de l'ensemble des interactions trophiques couplées aux facteurs abiotiques (Figure 6) (Gerphagnon et al., 2015). A l'heure actuelle, tous les mécanismes ne sont pas encore clairement définis, rendant la prédiction et l'anticipation des blooms cyanobactériens difficiles.



**Figure 6 : Principaux facteurs identifiés comme contrôlant les blooms cyanobactériens d'après Paerl and Otten, (2013).**



### c. Conséquences des proliférations cyanobactériennes

Les proliférations cyanobactériennes sont connues pour avoir des conséquences néfastes d'ordre écologiques, sanitaires et économiques. Au sein de l'écosystème, les blooms cyanobactériens peuvent induire un déséquilibre du fonctionnement des réseaux trophiques. Durant ces blooms, les cyanobactéries peuvent représenter jusqu'à plus de 99% de la biomasse phytoplanctonique, impliquant une chute importante de la diversité de ce niveau trophique. De plus, de nombreuses espèces cyanobactériennes, de par leur morphologie (coloniales ou filamenteuses), sont difficilement consommables par les prédateurs (Gerphagnon, 2013a). Les cyanobactéries sont aussi considérées comme des ressources de mauvaises qualités nutritionnelles par rapport au phytoplancton eucaryotes (Burns, 1987; Lampert, 1987) notamment de par l'absence de stérols (Martin-creuzburg et al., 2008) et de certains acides gras polyinsaturés essentiels pour le zooplancton comme par exemple l'acide eicosapentaénoïque (C20:5  $\omega$ -3) (Ahlgren et al., 1990; Müller-Navarra et al., 2000). Ceci a pour conséquence une diminution de la biomasse et de la diversité des niveaux trophiques supérieurs. Les proliférations cyanobactériennes peuvent aussi être responsables de mortalités piscicoles en provoquant, par respiration, une anoxie nocturne de toute la colonne d'eau. Ce phénomène est ainsi appelée « summer kill » (Barica, 1975; Carpenter et al., 1998).

Mais la principale nuisance induite par les cyanobactéries reste la capacité de produire des cyanotoxines. Ces cyanotoxines sont des molécules issues du métabolisme secondaire des cyanobactéries. Leur nature chimique peut être très différente et elles sont classées en fonction de l'organe cible qu'elles peuvent atteindre. Leur toxicité est très variable (Tableau 1) ce qui rend difficile la gestion du risque induit par les efflorescences cyanobactériennes (Bernard, 2014).

De nombreuses études référencent la mort d'organismes aquatiques (Jochimsem et al., 1998; Zimba et al., 2001) ou terrestres (Delvin et al., 1977; Gugger et al., 2005; Cadel-Six et al., 2007; Faassen et al., 2012) après contact ou ingestion d'une cyanotoxine. A l'heure actuelle, un cas de mortalité humaine lié à la microcystine a été avéré dans un hôpital du Brésil où une cinquantaine de personnes sont décédées suite à une hémodialyse effectuée avec de l'eau contaminée avec des microcystines (Jochimsem et al., 1998). Suite à ces différents événements, le risque sanitaire dans les zones récréatives fut considéré à l'échelle mondiale et aussi à l'échelle nationale. En France, un suivi de la présence des espèces potentiellement toxique et de la quantification de la microcystine LR est mandaté par les Agences Régionales

de la Santé (ARS). Cette surveillance s'effectue dans les captages d'eau potable et les zones de baignade suivant le schéma décrit dans le Tableau 2. Par conséquent, les moyens mis en place pour les suivis et les conséquences directes des proliférations cyanobactériennes (fermeture de baignade, interdiction d'activités nautiques...) impliquent un coût financier non négligeable. Par exemple, les conséquences écologiques et sociétales liées à l'eutrophisation des systèmes aquatiques auraient un coût de 2,2 milliards de dollars par an aux Etats-Unis (Dodds et al., 2009).

**Tableau 1 : Grandes catégories de cyanotoxines (modifié de Mankiewicz-boczek et al., (2003); Merel et al., (2013); Paerl and Otten, (2013); Bernard, (2014)). \* injectée par voie intrapéritonéale dans la souris, (1) Merel et al., (2013), (2) Méjean et al., (2014), (3) Sivonen, (2009), (4)Yadav et al., (2011). Abréviations : Ana : *Anabaenopsis*; Apha : *Aphanizomenon*; Cyl : *Cylindrospermopsis*; Cyli : *Cylindrospermum*; Dol : *Dolichospermum*; Hap : *Hapalosiphon*; Lin : *Lingbya*; Mic : *Microcystis*; Nos : *Nostoc*; Osc : *Oscillatoria*; Pho : *Phormidium*; Pla : *Planktothrix*; Pro : *Prochlorococcus*; Rap : *Raphidiopsis*; Sch : *Schizothrix*; Sym : *Symploca*; Syn : *Synechococcus*; Ume : *Umezakia***

Toxine	Organe(s) primaire(s) ciblé(s) chez les mammifères	Exemple de genres producteurs	DL <sub>50</sub> (µg.kg <sup>-1</sup> )*
<b>HEPATOXINES</b>			
Microcystines	Foie	<i>Mic, Osc, Pla, Nos, Dol, Hap, Ana, Dol</i>	25-150 <sup>(1)</sup> (Pour les plus toxiques)
Nodularines	Foie	<i>Nodularia</i>	30-70 <sup>(1)</sup>
<b>CYTOTOXINES</b>			
Cylindrospermopsines	Foie, reins, rate, intestin, cœur, thymus	<i>Apha, Cyl, Lyn, Osc, Rap, Ume, Dol</i>	2100 <sup>(1)</sup>
<b>NEUROTOXINES</b>			
anatoxin-a	Synapses	<i>Dol, Aph, Cyli, Osc, Pho, Rap</i>	375 <sup>(1)</sup>
anatoxin-a(s)	Synapses	<i>Dol, Osc, Pho, Dol, Aph</i>	31 <sup>(1)</sup>
Homoanatoxin-a	Synapses	<i>Osc, Hyd, Pho,</i>	Similaire à ANTX <sup>(2)</sup>
Saxitoxins	Axones	<i>Aph, Dol, Cyl, Lyn, Pla</i>	10 <sup>(1)</sup>
Neosaxitoxins	Axones	<i>Aph, Dol</i>	10 <sup>(3)</sup>
BMAA	Neurones	<i>Dol, Aph, Cyl, Nos, Lin, Osc, Pro, Syn</i>	ND
<b>DERMATOTOXINES</b>			
Lingbyotoxins-a	Peau	<i>Lyn, Osc, Sch</i>	250 <sup>(1)</sup> souris non matures
Debromoaplysiatoxines	Peau	<i>Lingbya</i>	
Aplysiatoxines	Peau	<i>Lyn, Phor, Sch, Sym, Osc, Sch</i>	300 <sup>(4)</sup>
<b>TOXINES IRRITANTES</b>			
Lipopolysaccharides	Tout tissu exposé	Tous	45 000-190 000 <sup>(4)</sup>

**Tableau 2 : Différents seuils de suivis et de la gestion associée des baignades en milieux dulcicoles en fonction de la concentration en cellules toxigènes et en microcystines (Source ARS 63, 2016).**

Suivi des eaux de baignades dulcicoles (source ARS)			
Niveau	Cellules toxigènes.mL <sup>-1</sup>	[Microcystines]	Gestion
la	<20 000		Activité normale
lb			
IIa	>100 000	< 25 µg.L-1	Interdiction de la baignade
IIb		> 25 µg.L-1	Interdiction de les toutes activités sur le plan d'eau
III	Formation d'écumes cyanobactériennes		Interdiction de les toutes activités sur le plan d'eau

Depuis plusieurs années, il a été mis en évidence que certaines cyanotoxines telles que les microcystines, étaient capables d'être bio-accumulées dans les réseaux trophiques (Ibelings and Chorus, 2007; Bire et al., 2016). Par exemple, l'accumulation de cyanotoxines dans les poissons peut se faire par voie orale, en assimilant les toxines *via* les branchies ou même la peau. Mais elle peut se faire aussi par l'intermédiaire de l'ingestion du phytoplancton pour les organismes phytoplanctonophages ou par l'ingestion d'organismes filtreurs comme les bivalves (Ibelings and Chorus, 2007). Concernant la bio-magnification, il est difficile de mettre en évidence une tendance globale et celle-ci semble dépendante des organismes et des toxines considérés. Par exemple, dans le lac IJsselmeer (Pays-Bas), la concentration en microcystine d'espèces filtreuses (*Dreissena*) est toujours bien supérieure à celle d'espèces appartenant à des niveaux trophiques plus élevés (Ibelings et al., 2005). Cependant, il a déjà été mis en évidence que certains organismes zooplanctoniques pouvaient accumuler jusqu'à 12 fois plus de microcystine que les organismes phytoplanctoniques testés. Les poissons bio-accumuleraient de manière variable cette cyanotoxine en fonction de l'espèce, du régime alimentaire et des tissu considérés lors de l'analyse (Kozłowski-Suzuki et al., 2012). Il existe ainsi un risque sanitaire lié à la consommation de chairs de poissons contaminés ou d'autres organismes exposés, ce qui peut conduire à l'interdiction temporaire de la pêche professionnelle et de loisir durant des épisodes de proliférations cyanobactériennes (Bire et al., 2016).

### 3. Les cyanotoxines associées aux proliférations cyanobactériennes : focus sur les microcystines et l'anatoxine-a.

#### a. Biosynthèses et mode d'action des microcystines et de l'anatoxine-a

Les microcystines sont de loin les cyanotoxines les plus étudiées dans le monde. En effet, celles-ci représentent plus de la moitié des études menées sur les cyanotoxines (Merel et al., 2013). Cet intérêt est lié à l'ubiquité du principal genre qui les produit : *Microcystis*. Ce genre est présent sur tous les continents de l'équateur aux régions froides (Misson, 2011) et est même capable de coloniser les écosystèmes saumâtres (Lehman et al., 2005, 2008). En plus d'être synthétisées par un des genres les plus communs, les microcystines peuvent également être produites par une pléiade de genre appartenant à tous les grands ordres cyanobactériens (Tableau 1) (Bernard, 2014).

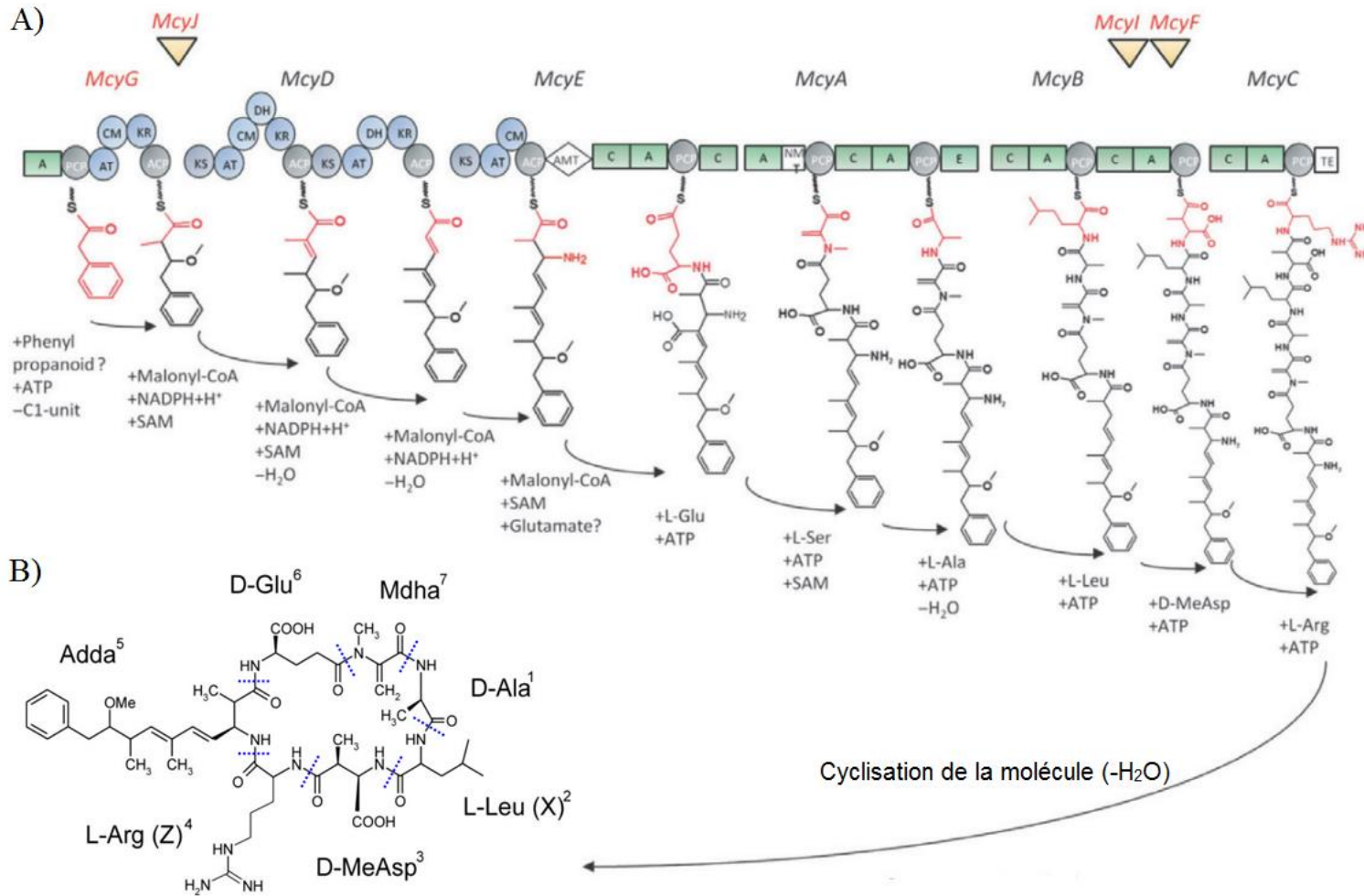
Les microcystines sont constituées de petits peptides cycliques composés de 7 acides aminés dont 5 sont conservés et 2 sont variables. Ces acides aminés variables, couplés aux divers modifications structurales des acides aminés constants permettent la formation de près de 90 variants identifiés (Welker and Von Dören, 2006). Ces variants sont nommés selon les acides aminés occupant les positions variables. Par exemple, la microcystine-LR porte une leucine (L) en position 2 et une arginine (R) en position 4 (Figure 7). En milieu naturel, tous ces variants n'ont pas la même fréquence d'apparition et le variant LR apparait comme le plus fréquemment retrouvé (Kaarina Sivonen and Jones, 1999).

La biosynthèse de la microcystine intervient par voie non-ribosomale et a d'abord été mis en évidence chez *Microcystis* (Dittmann et al., 1997) et ensuite chez *Planktothrix* (Christiansen et al., 2003) puis *Anaebaena* (Rouhiainen et al., 2004). Cette biosynthèse est codée par un cluster de 10 gènes (*mcyA* à *mcyJ*) organisés en 2 opérons, dont la transcription est régulée par un promoteur central commun et bidirectionnel. Cette synthèse fait intervenir différentes enzymes qui assemblent et modifient les acides aminés composant la microcystine. Elles sont composées des polykétides synthases, des peptides synthétases non ribosomales et d'enzymes impliquées dans le « tailoring » de certains acides aminés. L'export des microcystines serait possible par le gène *mcyH* codant pour un transporteur de type ABC

(Pearson et al., 2004). L'inactivation d'un seul de ces 10 gènes est suffisante pour bloquer la synthèse des microcystines (Pearson et al., 2004).

Les microcystines affectent particulièrement le foie d'où leur classification en tant qu'hépatotoxine. En effet, ces toxines ont la capacité de pénétrer spécifiquement dans les cellules hépatiques *via* le système de transport actif des acides biliaires (Eriksson et al., 1990). La toxicité des microcystines au niveau intracellulaire s'exprime par une forte inhibition de l'activité des protéines phosphates de type 1 et 2a (Mackintosh et al., 1990). Cette inhibition entraîne alors des perturbations du cycle cellulaire, de la structure cellulaire, de voies métaboliques ou intervient dans la régulation de la voie apoptotique (Falconer, 2005). Par conséquent, tous les vertébrés en contact avec ces toxines peuvent être affectés mais la plupart des organismes eucaryotes le sont aussi puisqu'ils possèdent aussi ces protéines phosphatases (Babica et al., 2006; Wilson et al., 2006).

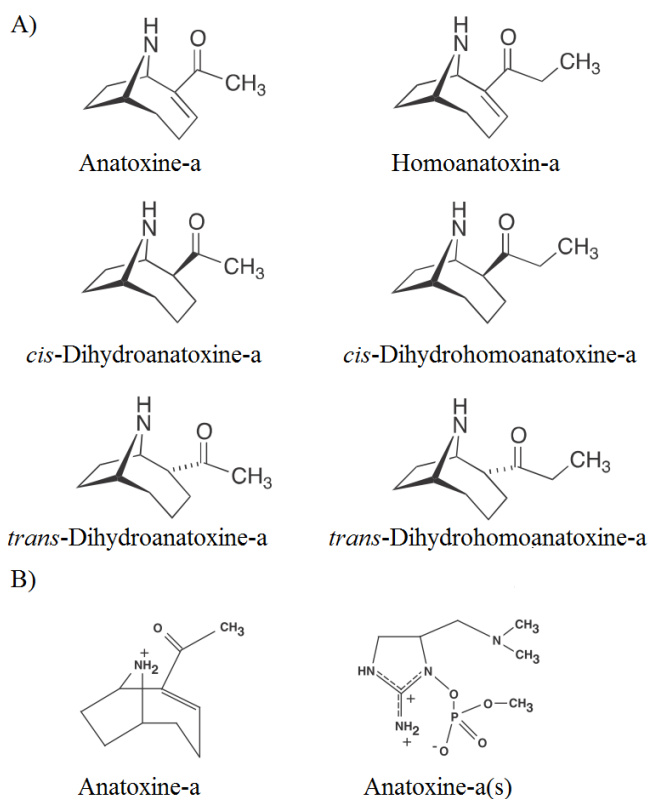
Ainsi, les microcystines sont capables d'affecter la majorité des eucaryotes présents dans les milieux aquatiques, comme par exemple les prédateurs potentiels des cyanobactéries. En effet, elles peuvent affecter le taux de filtrations, de croissance ou encore induire une forte mortalité chez les organismes zooplanctoniques (DeMott et al., 1991; Rohrlack et al., 2001; Jang et al., 2003; Guo and Xie, 2006). De plus, il a déjà été mis en évidence que les microcystines pouvaient intervenir dans la réduction de la virulence de chytrides parasites de *Planktothrix* (Rohrlack et al., 2013). Chez les producteurs primaires, la synthèse de microcystine peut entraîner une réduction de la diversité spécifique (Sedmak and Kosi, 1998) ainsi que des effets délétères au niveau cellulaire pouvant aller de la réduction de la croissance à d'importantes modifications morphologiques et physiologiques (Singh et al., 2001; Mitrovic et al., 2005; Ou et al., 2005; Sedmak and Elersek, 2006;).



Les noms des enzymes biochimiquement caractérisées sont représentés en rouge. Les autres réactions sont basées sur des analyses bioinformatiques. Les acides aminés et les unités acides carboxyliques incorporées ou modifiées par des protéines individuelles sont aussi notées en rouges. Domaines PKS : KS: ketoacyl synthase, AT: acyltransferase, DH, déhydratase, KR, ketoreductase, ACP, acyl carrier protein, CM, C-methyltransferase; AMT: glutamate-semialdehyde aminotransferase; NRPS domains: A: adenylation domain, C: condensation domain, E: epimerization domain; NMT: N-methyltransferase; PCP: peptidyl carrier protein, TE: thioesterase domain. (1) D-alanine, (2) L-leucine, (3) acide D-erythro-β-méthylaspartique, (4) L-arginine, (5) acide 3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-dienoïc, (6) D-glutamate, (7) N-méthyl-déhydroalanine. X et Z (positions 2 et 4) représentent les deux acides aminés variables de la molécule.

Figure 7 : Représentations schématiques de la voie de biosynthèse des microcystines A) (modifiés d'après Dittmann et al., (2013) et Bernard, (2014)) et de la structure moléculaire de microcystine LR B) (modifié d'après Fewer et al., (2007) et Misson, (2011)).

L'anatoxine-a (ANTX) ou Very Fast Death Factor (Gorham et al., 1964), est historiquement l'une des premières cyanotoxine caractérisée dans les années 1970 à partir d'une souche d'*Anabaena flos-aquae* isolée et purifiée d'un bloom sur le lac Burton (Canada) qui avait causé la mort de bétail (Delvin et al., 1977). L'anatoxine-a ou C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO ou 2-acetyl-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-ène (Figure 8) appartient à la famille des alcaloïdes hydrosolubles (Kaebernick and Neilan, 2001; Sanchez et al., 2014). Ce composé possède un poids moléculaire assez faible (165 g.mol<sup>-1</sup>) (Carmichael, 1992). Cependant l'anatoxine-a est hautement toxique avec une dose létale minimale de 0.25mg.kg<sup>-1</sup> (injectée par voie intra-péritonéale dans la souris) (Méjean et al., 2014). En effet, l'anatoxine-a va agir sur les vertébrés en perturbant les transmissions des impulsions nerveuses au niveau des synapses (Osswald et al., 2007a). Plus précisément, l'anatoxine-a va ouvrir les canaux sodiques en se liant à la place de l'acétylcholine aux récepteurs nicotiques et muscariniques. Cela va induire une contraction musculaire liée à la dépolarisation postsynaptique comme sous l'action de l'acétylcholine. Cependant, l'anatoxine-a n'est pas dégradée par l'acétylcholinestérase et reste dans les récepteurs provoquant une contraction musculaire continue qui va induire une paralysie des muscles concernés. Lorsque le système respiratoire est atteint, l'oxygénation du système nerveux central devient insuffisante provoquant dès lors la mort de manière foudroyante (Méjean et al., 2014).



**Figure 8 : Représentations des structures moléculaires de l'anatoxine-a (A, B) et de ses principaux homologues.**

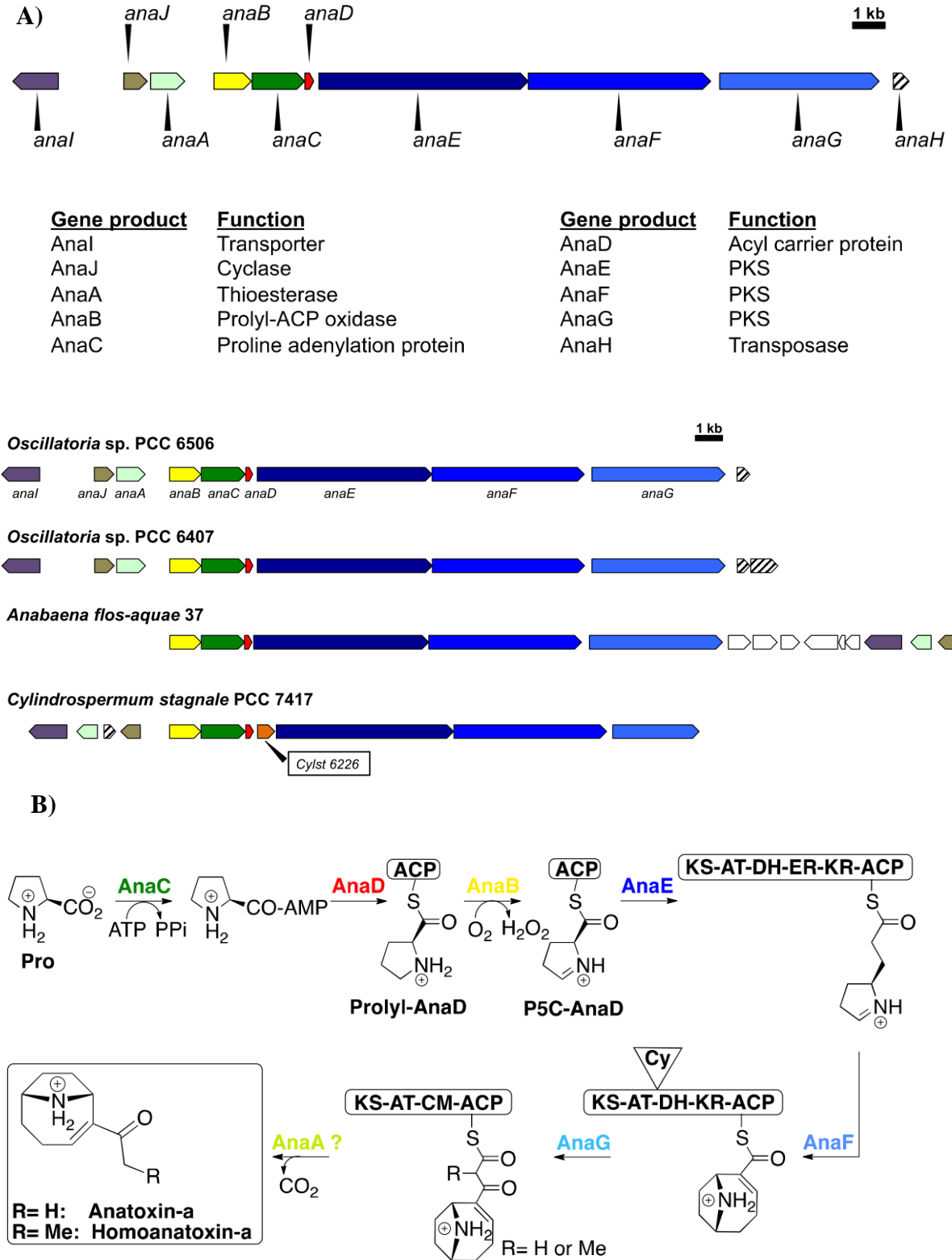
Cette cyanotoxine est principalement synthétisée par des cyanobactéries filamenteuses appartenant aux ordres des Oscillatoriales et des Nostocales (Tableau 1) mais aussi par d'autres genres tels *Microcystis* (Bernard, 2014). L'anatoxine-a fut d'abord isolée de blooms toxiques en lac (Delvin et al., 1977; Sivonen et al., 1989; Rapala et al., 1993) mais un réel regain d'intérêt est apparu après la mort de chiens sur les rivières Loue (Gugger et al., 2005), Tarn (Cadel-Six et al., 2007) (France), et Hutt (Wood et al., 2007) causées par des cyanobactéries benthiques productrices d'anatoxine-a. Les milieux lacustres ne sont pas épargnés par les proliférations toxiques benthiques. En effet, l'empoisonnement de chiens ayant bu de l'eau contaminée en anatoxine-a a été reporté dans le lac IJmeer (Pays-Bas) (Faassen et al., 2012). Dans ce contexte, d'autres études furent menées en milieu pélagique lacustre et l'anatoxine-a fut aussi détectée dans le Stolpsee (Allemagne) (Ballot et al., 2010b) et dans le lac d'Aydat (France) (Sabart et al., 2015).

Comme pour la microcystine, la biosynthèse de l'anatoxine-a intervient par voie non-ribosomale. Le cluster de gènes impliqué dans cette voie de biosynthèse est constitué de 10 gènes (*anaA* à *anaJ*) codant pour un complexe d'enzymes multifonctionnelles (Figure 9B)). Ces enzymes sont principalement représentées par des polykétides synthases (PKS) et des peptides synthases non ribosomales (NRPS). La voie de synthèse est amorcée par la proline qui sera prise en charge par les PKS et les NRPS. La position de ces gènes dans le cluster est variable suivant les espèces cyanobactériennes considérées (Figure 9A)) (Rantala-Ylinen et al., 2011; Shih et al., 2013; Méjean et al., 2014; Jiang et al., 2015).

L'anatoxine-a possède des homologues proches de par leur structure moléculaire. Les plus communs sont l'homoanatoxine-a et la dihydroanatoxine-a (Méjean et al., 2014). Mais ils en existent d'autres tels la dihydrohomoanatoxine-a ou l'anatoxine-a(s) (Figure 8). Bien que l'homoanatoxine-a possède un mode d'action et une toxicité similaire à l'anatoxine-a (Wonnacott et al., 1992), les dihydroanatoxine-a possèdent une toxicité environ 10 fois inférieure à son homologue (Wonnacott et al., 1991).



Chapitre 1 : Introduction générale



KS: ketosynthase; AT: acyltransferase; KR: ketoreductase; DH: hydratase;  
ER: enoylreductase; ACP: acyl carrier protein; Cy: cyclase; CM: methyltransferase

Figure 9 : Cluster de gènes de l’anatoxine-a chez différentes espèces cyanobactériennes A) et voie de biosynthèse de l’anatoxine-a B) d’après Méjean et al., (2014).

## b. Déterminisme de la production des microcystines et de l'anatoxine-a.

Malgré les avancées méthodologiques en chimie analytique (Chen et al., 2012) ou en biologie moléculaire (Rantala-Ylinen et al., 2011), la prédiction de la production des cyanotoxines en milieux naturels restent encore à l'heure actuelle vraiment compliquée. Différents facteurs environnementaux et mécanismes intrinsèques aux cyanobactéries peuvent intervenir et favoriser ou non la production de microcystine ou d'anatoxine-a.

Tout d'abord, la production de toxine peut être variable selon l'espèce ou le genre considéré (Méjean et al., 2014). En effet, la concentration en anatoxine-a est de 0.2 mg.g<sup>-1</sup> DW pour *Aphanizomenon issatschenkoi* (Ballot et al., 2010a) alors qu'elle est de 13mg.g<sup>-1</sup> DW pour *Anabaeana flos-aquae* NRC-44-1 (Harada et al., 1993) et *Anabanea flos-aquae* 37 (Sivonen et al., 1989; Rantala-Ylinen et al., 2011).

Ensuite, la diversité génétique intraspécifique joue un rôle important dans ce déterminisme. Au sein même d'une prolifération mono-spécifique plusieurs génotypes peuvent coexister. Certains génotypes possèdent les gènes impliqués dans la biosynthèse de ces cyanotoxines et d'autres non. En parallèle de l'évolution de la biomasse d'un bloom, la succession ou la dominance de ces différents génotypes peut varier dans le temps et dans l'espace et par conséquent conditionner la production de l'une de ces cyanotoxines. Ce phénomène est bien connu pour les microcystines (Briand et al., 2009; Sabart et al., 2010) (Briand et al., 2008) et commence à se confirmer concernant l'anatoxine-a (Sabart et al., 2015; Wang et al., 2015). Cette évolution spatio-temporelle *via* la succession des différents génotypes résulte aussi des facteurs de croissance et de compétition entre souches toxiques et non-toxiques (Misson, 2011). Il semblerait ainsi que les souches toxiques soient plus compétitrices que les non-toxiques en situation de forte intensité lumineuse (Kardinaal et al., 2007), de forte disponibilité en nutriments (Vezie et al., 2002), de faible concentration en CO<sub>2</sub> dissous (Waal et al., 2011) et d'augmentation de la température (Davis et al., 2009).

En plus des facteurs interspécifiques ou génétiques, l'état physiologique de la cellule peut aussi influencer la synthèse de ces cyanotoxines. Par exemple, il est communément admis que la production de microcystines est maximale durant les phases de croissance exponentielle et/ou lorsque les conditions de croissance sont optimales (Kaebernick and Neilan, 2001; Downing et al., 2005; Yéprémian et al., 2007).

L'effet des facteurs physico-chimiques tels la température (Rapala and Sivonen, 1998), l'intensité lumineuse (Rapala et al., 1993), la concentration en nutriments (Heath et al., 2014) ou encore la concentration en métaux lourds (Harland et al., 2013) est avérée sur la production de l'anatoxine-a (Wood et al., 2017) mais reste encore aléatoire. En effet, la réponse à ces stimuli est généralement souche-dépendante et tous les verrous qui régulent les mécanismes généraux de la production d'anatoxine-a sont encore loin d'être levés (Neilan et al., 2013; Méjean et al., 2014; Pearson et al., 2016). Cependant Jiang et al., (2015) ont réussi à détecter des transcrits de *anaA*, *anaJ*, *anaF* et *anaG* chez *Cuspidothrix issatschenkoi* CHABD3 alors que l'anatoxine-a n'a pas été détectée dans cette souche. Cela pourrait suggérer une régulation de la cyanotoxine à un niveau post-transcriptionnel.

Les facteurs environnementaux de régulation de la production de cyanotoxines sont encore mal connus, principalement à cause d'un manque de standardisations et d'interprétations communes des études déjà réalisées (Neilan et al., 2013). Néanmoins, l'azote semble particulièrement affecter la production des microcystines. Une étude combinant approches *in situ* et expérimentales a mis en évidence une corrélation entre la limitation en azote et un faible quota cellulaire en microcystine (Horst et al., 2014). De plus, Van de Waal et al., (2009) ont observé une augmentation de quota-cellulaire en microcystines, particulièrement en microcystine-RR (variant le plus riche en azote) après un apport en excès d'azote appuyant ainsi la théorie stœchiométrique et les interactions biotiques (production primaire, herbivorie, décomposition, etc. (Lacroix and Danger, 2008) (la théorie stœchiométrique étudie les liens entre la composition des organismes en éléments chimiques (tels le carbone, l'azote ou le phosphore)). La lumière pourrait aussi particulièrement affecter la production de microcystine. Par exemple, une surexpression des gènes de synthèse a déjà été observée avec une augmentation de l'intensité lumineuse et inversement (Kaebernick et al., 2000).

### c. Rôle écologiques des microcystines et de l'anatoxine-a

Identifier et comprendre les potentiels rôles écologiques des cyanotoxines pourraient à terme aider au développement de nouvelles stratégies de management vis-à-vis des cyanobactéries toxiques (Pearson et al., 2016). Cependant, les rôles écologiques des cyanotoxines à l'heure actuelle, n'ont pas encore été clairement identifiés dans la littérature.

De nombreux travaux de recherche mettent en évidence différents rôles possibles que pourraient avoir les microcystines dans leur environnement. Tout d'abord les microcystines

pourraient être impliquées dans les interactions biotiques. Les impacts sur divers niveaux trophiques décrits précédemment, associés à l'augmentation de production de microcystines en présence de producteurs primaires ou de prédateurs (Legrand et al., 2003), sont à l'origine de l'hypothèse d'un rôle allélopathique de ces microcystines. Ces molécules serviraient à limiter la compétition pour les ressources ainsi que la prédation et le parasitisme. Certains auteurs vont plus loin et émettent l'hypothèse que la production de microcystines chez les souches productrices (dans ce cas de *Planktothrix rubescens* et *P. agardhii*) favoriserait le potentiel de colonisation et de dominance dans le milieu. Ainsi par la production de toxines, *Planktothrix* aurait un rôle de constructeur de niche à l'échelle écosystémique ce qui peut résulter en une plus grande habilité à monopoliser les ressources, plus de rétrocontrôle positif, et en une résilience accrue dans des conditions environnementales stables (Kurmayer et al., 2016). Cependant, ce rôle de défense anti-eucaryotes est controversé par des analyses bio-informatiques du cluster de gènes impliqué dans la biosynthèse des microcystines et révélant l'antériorité de ces gènes comparativement aux lignées eucaryotes (Rantala et al., 2004). Par conséquent, la toxicité ne correspondrait pas à la fonction première de ces molécules.

Les microcystines pourraient aussi avoir un rôle de messenger extracellulaire au sein des différentes colonies de *Microcystis* (Pearson et al., 2016). Cette hypothèse s'appuie sur le fait que les microcystines peuvent être relarguées dans le milieu. De plus, un ajout de microcystines dans le milieu de culture peut conduire à des changements phénotypiques au sein de colonies de *Microcystis* et à la synthèse d'autres métabolites secondaires (Schatz et al., 2007; Gan et al., 2012). Les microcystines pourraient donc bien jouer un rôle de molécule signal, induisant notamment la régulation de leur propre production. De plus, ces microcystines sont principalement présentes au sein des cellules productrices et ne sont relarguées dans le milieu que lorsque ces dernières sont lysées. Ainsi, la détection de microcystines dans le milieu extérieur pourrait donc être perçue comme un signal d'une importante mortalité cellulaire (Schatz et al., 2007). En réponses, les cellules encore vivantes s'agrègeraient plus facilement, augmenteraient leur vitesse de division, la production de pigments et de microcystines afin d'améliorer leur survie dans un contexte environnemental défavorable ayant entraîné la mort de leurs congénères (Sedmak and Elersek, 2006; Kehr et al., 2006, Schatz et al., 2007; Misson, 2011).

Les importantes quantités présentes au sein des cellules productrices laissent envisager que les microcystines pourraient aussi avoir un rôle intracellulaire, en étant un messenger intracellulaire ou en modulant la stabilité et/ou la fonction de certaines protéines (Zilliges et

al., 2011). Les microcystines possèdent aussi des propriétés chélatrices et même sidérophore. En effet, la meilleure assimilation du fer pour les souches toxiques, combinée à un meilleur taux de survie de ces dernières en cas de carence en fer (Lyck et al., 1996) laisse présager un rôle de protection des cellules toxiques par les microcystines dans un milieu sévèrement carencé en fer (Alexova et al., 2011).

La régulation de la synthèse de microcystine par le stress oxydatif est à l'origine de la dernière fonction intracellulaire hypothétique attribuée aux microcystines. En effet, lors d'un surplus d'énergie lumineuse, les photosystèmes des cyanobactéries utilisent l'oxygène comme accepteur d'électron de substitution dans le but de dissiper l'énergie excédentaire emmagasinée par les photosystèmes (Visser et al., 1995; Latifi et al., 2009). Ce processus induit aussi la formation de ROS, en quantité proportionnelle à l'intensité lumineuse reçue. La production de ROS pourraient être aussi induite par une carence en fer (Latifi et al., 2009). Ainsi, le surplus de lumière et la disponibilité en fer pourraient par conséquent jouer indirectement sur la production de microcystines, *via* le déclenchement d'un stress oxydatif. Ainsi, une souche de *Microcystis* toxique s'est montrée plus résistante à la présence de peroxyde d'hydrogène que son homologue muté spécifiquement sur un gène de microcystine (souche PCC7806 et son mutant  $\Delta mcyB$ ) : le mutant présentait une importante dépigmentation démontrant la dégradation de son appareil photosynthétique (Zilliges et al., 2011).

Ces différents travaux ont conduit à l'émergence d'un rôle hypothétique de protection contre le stress oxydatif (Alexova et al., 2011; Zilliges et al., 2011). Ainsi, ce rôle pourrait s'exprimer *via* la liaison des microcystines à différentes protéines impliquées dans le métabolisme primaire des espèces productrices (Misson, 2011; Zilliges et al., 2011).

Actuellement, dans la littérature, aucune de ces divers hypothèses n'est prédominante et les différents rôles évoqués pourraient être le fruit de différentes étapes de l'évolution et de la diversification des toxines au cours du temps, permettant l'acquisition de différentes fonctions qui ont un réel intérêt dans le contexte naturel (Pearson et al., 2016).

Les rôles de l'anatoxine-a et de ces principaux homologues restent encore relativement méconnus (Osswald et al., 2007b; Wood et al., 2007). Certains auteurs suggèrent néanmoins que ces cyanotoxines seraient impliquées dans la phase initiale de colonisation des cyanobactéries benthiques (Harland et al., 2013; Heath et al., 2014) en dépit du fait que les producteurs planctoniques ne requièrent pas de phase d'attachement à un support (Sivonen and Jones, 1999). L'anatoxine-a et ces homologues, au même titre que les microcystines,

pourraient être aussi impliqués dans des interactions intra- ou inter-spécifiques telles l'allélopathie ou le chimiotactisme (Harland et al., 2013).

## **4. L'akinète dans le cycle de vie des Nostocales**

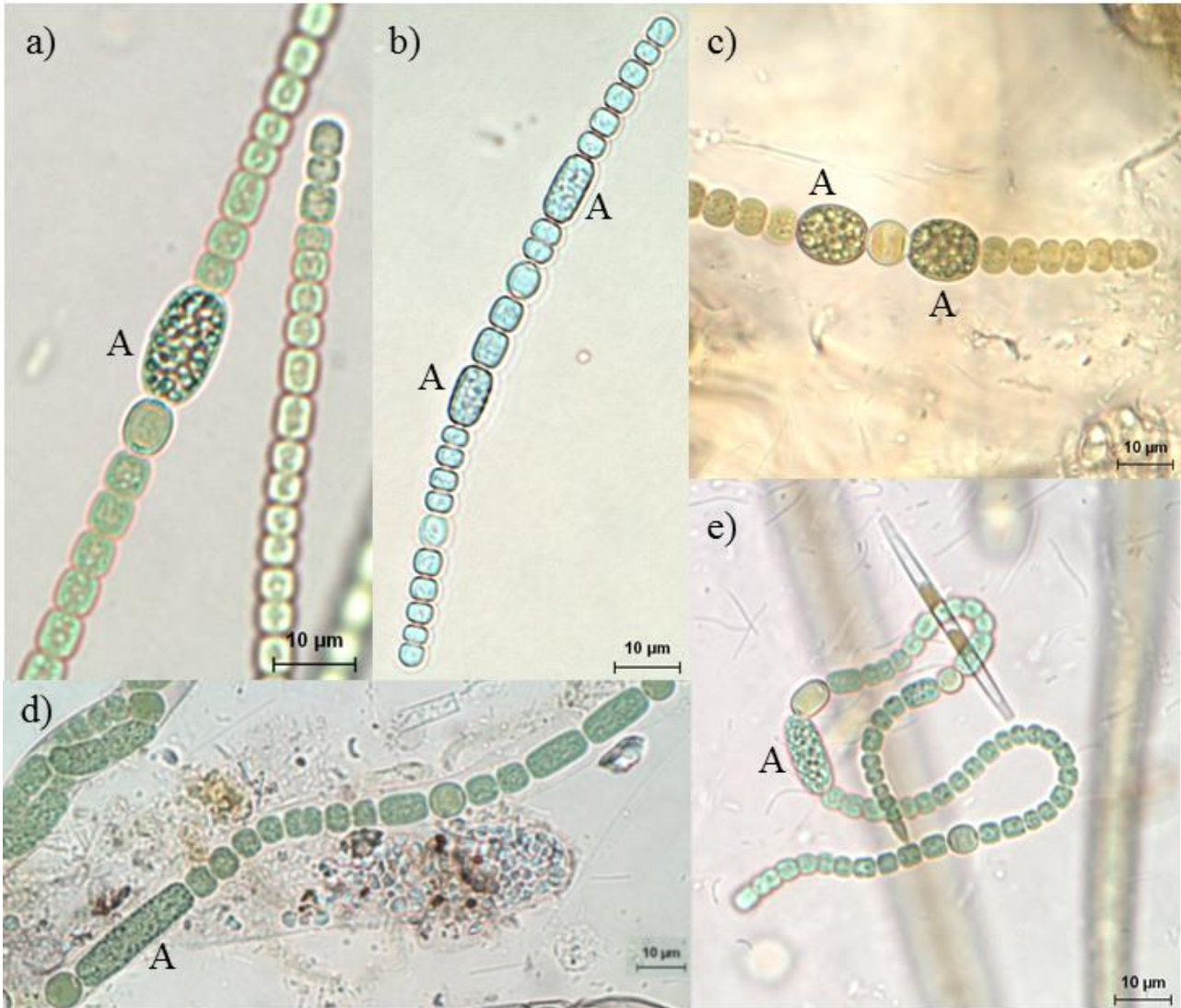
### **a. Particularités des Nostocales**

Les Nostocales sont un ordre cyanobactérien possédant une vaste répartition géographique, présents sur tous les continents y compris en Antarctique. De plus, de nombreux genres appartenant à cet ordre sont capables de synthétiser une large gamme de cyanotoxine (cf Tableau 1). Comme les Stigonématales, les Nostocales peuvent, à partir de la différenciation de cellules végétatives, produire des cellules spécialisées : les akinètes et les hétérocystes.

Les hétérocystes sont des cellules à paroi épaisse, capables de fixer et d'utiliser l'azote atmosphérique par réduction du  $N_2$  en  $NH_4^+$  catalysée par une enzyme : la nitrogénase. L'activité de cette enzyme nécessite un environnement très faiblement oxygéné. Par conséquent, la création d'un environnement microaérobie est nécessaire et impose des modifications d'ordre structural et métabolique durant la différenciation des cellules végétatives en hétérocystes. Tout d'abord, leur paroi s'épaissit afin de limiter la diffusion des gaz. La photosynthèse et par conséquent la production d'oxygène associée n'est plus possible par la perte d'activité de PSII. Enfin, la respiration et d'autres mécanismes vont permettre d'éliminer les des traces d'oxygènes résiduelles (Adams and Duggan, 1999). Cependant, les hétérocystes ne sont produits que lorsque le milieu devient carencé en azote car elles sont dépendantes du métabolisme des cellules adjacentes pour leur alimentation énergétique. Cela peut néanmoins leur conférer un avantage écologique conséquent par rapport à d'autres organismes phytoplanctoniques (Wolk, et al., 2004; Gerphagnon, 2013b).

Véritables cellules de résistance, les akinètes sont considérés comme des spores assurant la pérennité et la dispersion des cyanobactéries filamenteuses hétérocystés (i.e Nostocales et aussi Stigonematales). Malgré des morphologies variées propre à chaque espèce (Figure 10), les akinètes possèdent un biovolume toujours supérieur (jusqu'à 10 fois) par rapport aux cellules végétatives (Adams and Duggan, 1999).





**Figure 10 : Photographies illustrant la diversité morphologique des akinètes (A) en fonction des espèces du genre *Anabaena* (université du Colorado, <http://dbmuseblade.colorado.edu>). a) *Anabaena oscillatrioides* b) *Anabaena inaequalis* c) *Anabaena spherica* d) *Anabaena* sp 71 e) *Anabaena cylindrica*.**

De nos jours, même si l'ensemble des facteurs intrinsèques et environnementaux impliqués dans le cycle de vie des cyanobactéries restent mal définis (Hense and Beckmann, 2006), les grandes étapes de leur cycle annuel sont bien identifiées. En zone tempérée, la plupart cyanobactéries, incluant l'ordre des Nostocales, possèdent un cycle de vie méroplanctoniques. Celui-ci se compose d'une phase de vie planctonique et d'une phase de survie benthique, articulées par des processus de recrutement benthique et de sédimentation (Reynolds and Rogers, 1976; Reynolds, 1981). Concernant les Nostocales, l'akinète est le seul type cellulaire présent dans toutes les étapes du cycle de vie (Figure 11). Par conséquent, il joue un rôle prédominant dans la pérennité et la dispersion de cet ordre cyanobactérien.

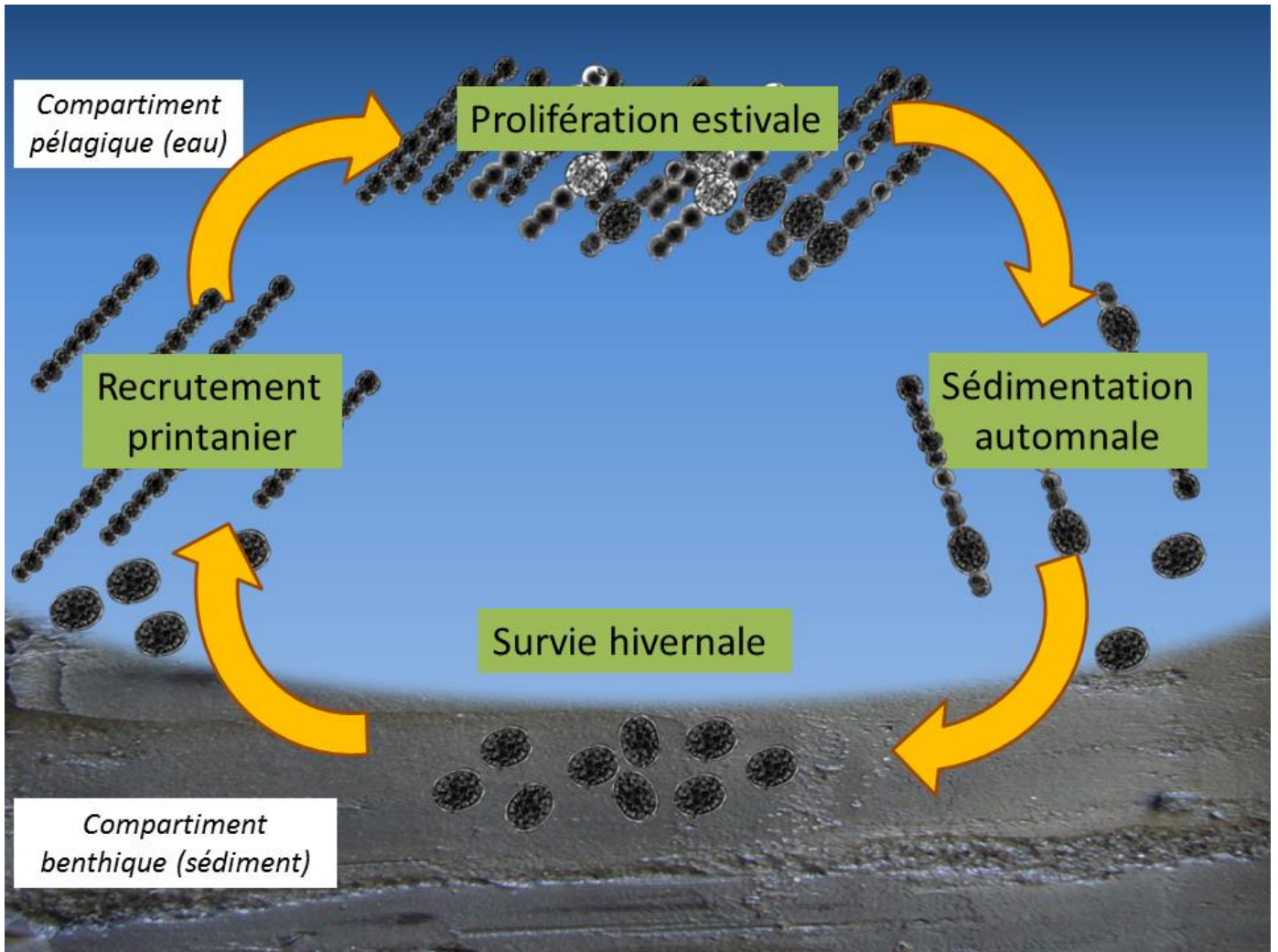


Figure 11 : Représentation simplifiée du cycle de vie des Nostocales en zone tempérée d'après Hense and Beckmann, (2006).

### b. Différenciation et production des akinètes dans la colonne d'eau.

Chez de nombreuses espèces appartenant aux genres *Anabaena*, *Nostoc*, *Cylindrospermum*, *Gloeotrichia*, les akinètes peuvent être formés de manière adjacentes ou non par rapport aux hétérocystes. Par exemple, la différenciation de cellules végétatives en akinètes de certaines espèces d'*Anabaena* ou de *Nostoc* s'initie à mi-chemin entre deux hétérocystes et se propage sur d'autres cellules végétatives adjacentes. Le nombre d'akinètes formés sur un même trichome peut être très important (Figure 12 a)), jusqu'à former des chainettes où les cellules végétatives sont toutes différenciées (Sarma, 2012).

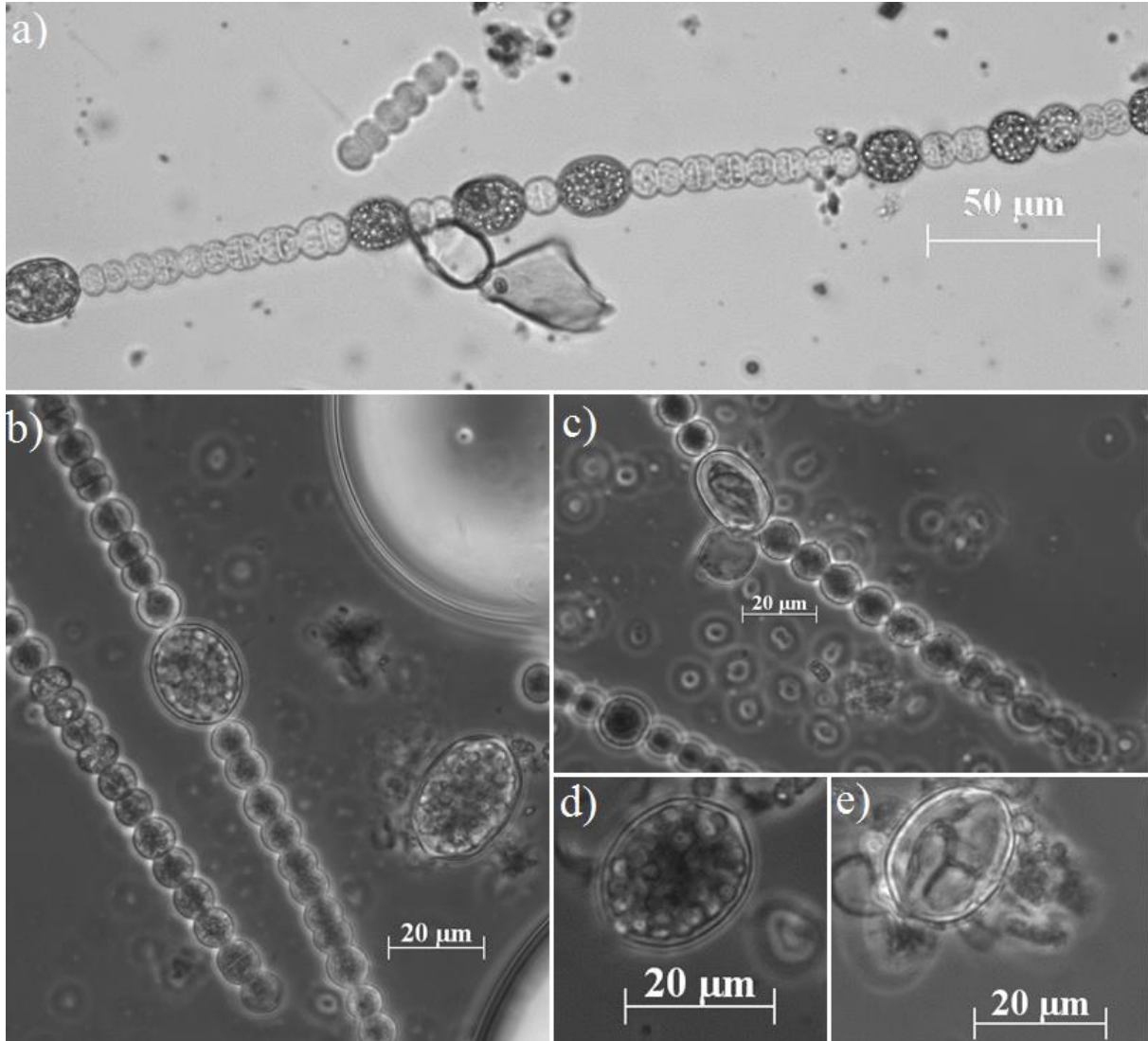
Les akinètes nouvellement formés sont entourés par une paroi épaisse ainsi que par une enveloppe extracellulaire composée de couches multiples. Cette enveloppe est riche en



polysaccharides et en glycolipides (Cardemil and Wolk, 1981). De par leur rôle d'entité de résistance, le contenu cellulaire des akinètes est riche en réserves. Par exemple, ces cellules accumulent des composés comme le glycogène jusqu'à 16 fois plus que dans les cellules végétatives (Gleason et al., 2008). Les granules lipidiques et aussi les pigments comme la cyanophycine y sont aussi fortement abondants (Sarma, 2012) et peut atteindre jusqu'à 2% du volume final de l'akinète mature (Sukenik et al., 2015). La machinerie cellulaire est aussi démultipliée mais diffère en fonction des espèces. En effet, Sukenik et al. (2012b) ont mis en évidence que le contenu chromosomique des akinètes d'*Anabaena ovalisporum* augmentent jusqu'à 450 copies, soit 15 fois supérieur à celui des cellules végétatives. Les akinètes de *Cylindrospermum* possèdent même jusqu'à 30 fois plus d'ADN que les cellules végétatives alors le contenu en ADN est équivalent entre akinètes et cellules végétatives d'*Anabaena cylindrica* (Sarma, 2012). Ces accumulations de réserve sont nécessaires pour reprendre une activité cellulaire après de long période de dormance (Sukenik et al., 2012b). En effet, les akinètes ont une activité métabolique réduite par rapport aux cellules végétatives se traduisant par une diminution de l'activité respiratoire et surtout de photosynthèse qui peut dans certains cas être réduite à néant (Thiel and Wolk, 1983; Sukenik et al., 2015). Cependant, Thiel and Wolk, (1983) ont mis en évidence que les akinètes de *Nodularia spongiaeforme* étaient capables d'assimiler du  $SO_4^{2-}$  pour synthétiser des protéines, suggérant un rôle important de ces molécules dans la maintenance de ces cellules.

Même si classiquement les akinètes représentent des cellules de résistance, ils peuvent être présents sur les filaments dès le début de la phase de développement des cellules végétatives. Ces akinètes serviraient alors au soutien de la population et contribueraient à une meilleure dissémination des cyanobactéries dans le milieu (Baker, 1999; Baker and Bellifemine, 2000). Deux types d'akinètes d'*Anabaena flos-aquae* sont d'ailleurs observés dans le réservoir de Bugach (Russie) (Kravchuk et al., 2006). Le premier type servirait de forme de résistance classique pour résister à l'hiver. En revanche, le second germerait peu après sa formation et serait affecté à la « reproduction » végétatives des populations pélagiques déjà présentes. L'observation d'une forte concentration d'enveloppes vides d'akinètes (Figure 12. e) dans la colonne d'eau du lac Melangsee (Allemagne) suggère aussi une germination pélagique de soutien de populations déjà établies (Rücker et al., 2009). Ce rôle de dissémination, dans un contexte de réchauffement globale (Sukenik et al., 2012a), permettrait aussi à certaines espèces d'*Aphanizomenon* (Cirés et al., 2013b) et de *Cylindrospermopsis* (Briand et al., 2004), considérées comme invasives, d'étendre leur zone

de répartition des milieux tropicaux vers les zones tempérées (Padišák, 1997; Mehnert et al., 2014). En effet, les vecteurs anthropiques et aviaires favoriseraient cette dissémination (Neilan et al., 2003) et permettraient ainsi l'établissement de nouvelles populations de Nostocales dans un milieu nouvellement propice pour ces dernières (Isvànovics et al., 2000; Sukenik et al., 2012a).



**Figure 12 : Photographies d'akinètes de *Dolichospermum macrosporum*. a) Plusieurs akinètes sur long filament b) akinètes sur filament court c) akinète vide sur filament d) akinète seul e) akinète seul et vide. (Photographies par B. Legrand).**

Néanmoins, la majorité de la production des akinètes démarre généralement lorsque le maximum de biomasse de cellules végétatives est atteint (Räsänen et al., 2006b; Rucker et al., 2009). A partir de là, l'implication d'une multitude de facteurs environnementaux a déjà été mise en évidence dans la différenciation des cellules végétatives en akinètes. L'un des plus

impactant serait la lumière. Tout d'abord, l'intensité lumineuse, qu'elle soit trop faible (Adams and Duggan, 1999) ou trop élevée (Moore et al., 2005) induit la formation d'akinètes. La qualité de la lumière peut aussi favoriser la différenciation des akinètes. Par exemple, une exposition à une lumière rouge ou à une lumière verte permet d'induire une concentration plus importante en akinètes plutôt qu'une lumière bleue (Thompson et al., 2009). La lumière bleue pourrait même inhiber la formation d'akinètes (Thompson et al., 2009; Kaplan-levy et al., 2010).

La température et notamment une diminution de celle-ci peut aussi conduire à la production des akinètes (Kravchuk et al., 2006; Cirés et al., 2013b) Par exemple, une diminution de la température de 25 à 20°C conduit à une concentration maximale en akinètes par *Cylindrospermopsis racoborskii* (Rücker et al., 2009). Des variations rapides de température liées notamment à un cycle jour/nuit induisent aussi la différenciation d'akinètes de *C. raciborskii* notamment lors de nuits particulièrement fraîches (à partir de 15°C) (Moore et al., 2005).

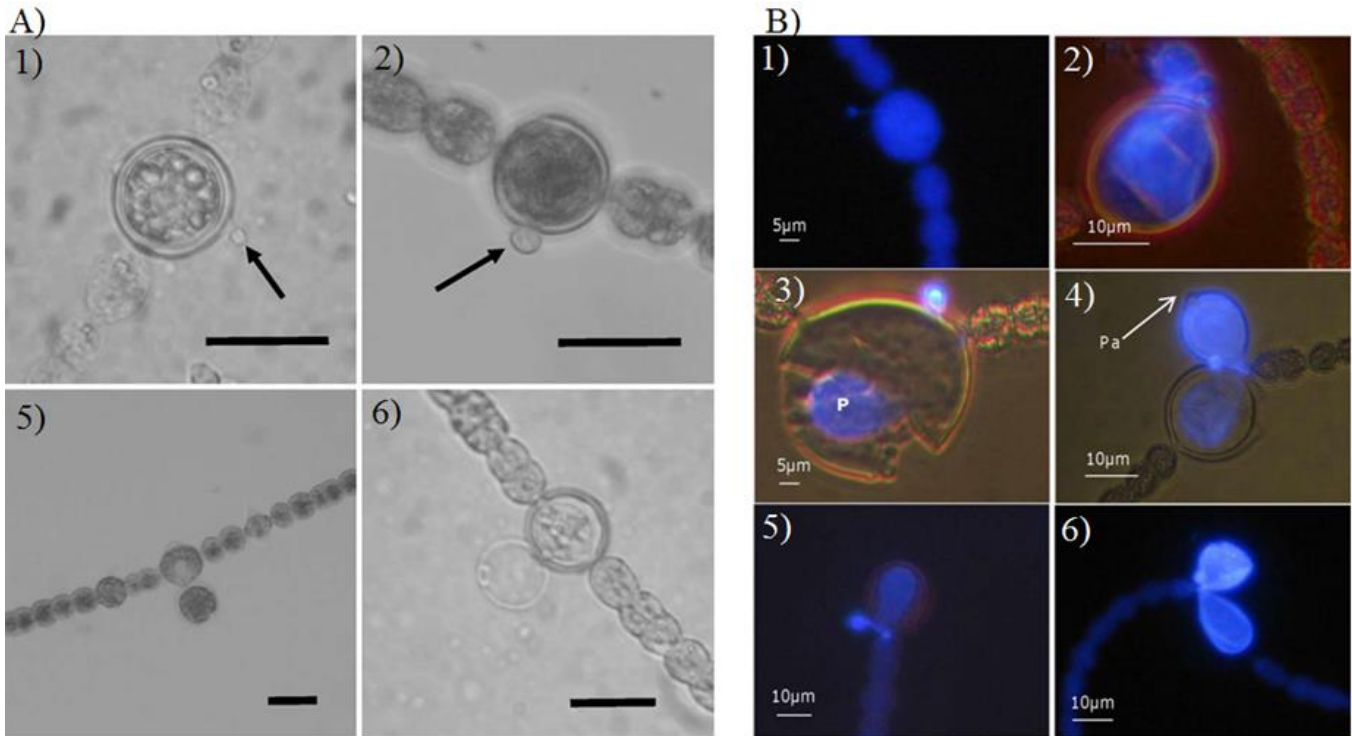
Les carences en nutriments jouent aussi sur ce mécanisme de formation (Kaplan-levy et al., 2010). Les orthophosphates sont les plus connus et leur importance a été mise en évidence dès le début des années 1980 (Nichols et Adams, 1982; Herdman, 1987, 1988). Certains ions peuvent aussi être mis en cause. Par exemple, la formation d'akinètes chez *Aphanizomenon ovalisporum* est amorcée 3 à 7 jours après une mise sous carence de l'ion potassium ( $K^+$ ) (Sukenik et al., 2013).

Il est très difficile d'identifier un facteur prédominant par rapport aux autres. Par exemple, une même étude a mis en évidence que le meilleur facteur déclenchant la différenciation des akinètes était la diminution de la lumière pour *Anabaena variabilis* ATCC 29413 alors qu'il s'agit d'une carence en orthophosphate pour *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, respectivement une espèce planctonique dulcicole et une espèce terrestre (Perez et al., 2016). Ces différences amènent à la conclusion que la régulation de la différenciation des akinètes chez les Nostocales suit un processus espèces-spécifiques (Cirés et al., 2013b). De plus, le processus de différenciation semble toujours conditionné en réponse à des contraintes environnementales défavorables à la croissance des cellules végétatives. Par conséquent, des facteurs d'origines variées pourraient induire une réponse physiologique identique conduisant à la différenciation de cellules végétatives en akinètes (Adams and Duggan, 1999).

### c. Les akinètes dans les interactions trophiques

Les akinètes, étant seuls ou encore sur des filaments, vont interagir avec les autres composantes du réseau trophique. Les facteurs non spécifiques affectant les cellules végétatives peuvent aussi toucher les akinètes. Les akinètes d'*Anabaena variabilis* sont tolérants à une exposition d'enzymes digestives telles les lysosymes, la lipase ou encore l' $\alpha$ -amylase (Fay, 1988) retrouvées chez les mammifères mais aussi chez les cladocères (Dall et Moriarty, 1983). Fay (1988) a aussi mis en évidence que des akinètes pouvaient résister au transit digestif de la Daphnie. En effet, le pourcentage d'akinètes capables de germer retrouvé dans la solution nourricière (pelotes fécales incluses) est compris entre 25% en début d'expérience et 2.9% après 24h d'incubation. De plus, 2,3% des akinètes retrouvés dans le tube digestif des Daphnies après 5h d'incubation sont encore capables de germer. Les auteurs en concluent que la viabilité des akinètes dépendrait de la quantité de nourriture ingérée, du temps de transit (moins de nourriture ingérée est synonyme d'une digestion plus efficace) et du nombre de passages à travers le tube digestif des Daphnies. L'analogie avec le milieu naturel est encore actuellement difficile et le rôle du broutage par le zooplancton sur la résistance des akinètes reste encore méconnu.

Rares sont les études concernant directement l'impact des facteurs biotiques sur les akinètes et la mise en évidence du parasitisme des akinètes par le phylum des Chytridiomycota (i.e Chytrides) reste le plus connu. De manière générale, le parasitisme des akinètes va entraîner la lyse cellulaire de celui-ci (Figure 13). C'est ainsi le cas de *Rhizosyphon akinetum* qui est connu pour être une espèce de Chytride parasite spécifique des akinètes du genre *Anabaena* (Canter, 1951) (Figure 13). La prévalence d'infection de *R. akinetum* peut varier durant un même bloom et en fonction des années (Gerphagnon et al., 2013a, 2013b). Par exemple, en 2010 et 2011, celle-ci affecte respectivement de 4% à 36% des akinètes matures d'*Anabaena macrospora* du lac d'Aydat (France) (Gerphagnon et al., 2013b). En lysant les akinètes, le parasitisme fongique exerce ainsi un contrôle direct sur les communautés de Nostocales et leur capacité de multiplication. De plus, cela contribue à un contrôle top down indirect en réduisant la taille des filaments les rendant plus facilement assimilables pour de nombreux organismes zooplanctoniques (Gerphagnon et al., 2013a, 2015).



**Figure 13 : Photographies en lumière naturelle d’akinètes d’*Anabaena smithii* A) (Takano et al., 2008) et en épifluorescence d’*Anabaena macrospora* B) (Gerphagnon et al., 2013a) parasités par des chytridres. Le cycle du parasite se résume en 6 étapes (Gerphagnon et al., 2013a) 1) Enkystement 2) Prosporange 3) Expansion 4) Bourgeonnement 5) Stade mature 6) Libération des zoospores. Les 6 étapes sont regroupées en 3 phases : Phase jeune (1,2), Phase de maturation (3,4,5) et phase vide (6). Les barres d’échelle de la figure A) sont de 20µm. Prosporange (P) and Papille (Pa).**

#### d. Phase de survie benthique et résistance des akinètes

Grâce à leur densité supérieure à celle de l’eau (autour de  $1,2 \text{ g.cm}^{-3}$  pour *Anabaena cylindrica* (Hori et al., 2002), les akinètes seuls (Hori et al., 2003) sédimentent naturellement jusqu’au compartiment benthique. Quelques études mettent en évidence une distribution spatiale hétérogène des akinètes dans le sédiment de surface. Par exemple, la répartition des akinètes d’*Anabaena flos-aquae* est assez équilibrée entre zone littorale peu profonde et pélagique du sédiment de surface du réservoir de Bugach (Sibérie, Russie) (Kravchuk and Ivanova, 2009). Cependant, de fortes accumulations d’akinètes sont observées dans les sédiments fins (i.e silt), le long des lits de macrophytes dans la zone littorale de ce réservoir. En effet, les macrophytes de par leur forme accumuleraient les cyanobactéries et par conséquent les akinètes. Les racines de ces macrophytes stabiliseraient aussi le sédiment de surface et favoriseraient la persistance des akinètes (Kravchuk and Anisimova, 2012). Dans des réservoirs espagnols, la concentration en akinètes est plus importante dans les zones

proches du barrage (Cirés et al., 2013a). Les auteurs expliquent que cette accumulation serait liée au courant induit par la rivière qui entrainerait les particules sédimentaires, incluant les akinètes, jusqu'au mur du barrage. Récemment, Ramm et al., (2017) ont montré que les akinètes s'accumulaient dans les zones profondes du lac d'origine glaciaire de Scharmützel (Allemagne). Ce phénomène serait lié avec les pentes abruptes du lac qui favoriserait l'accumulation des akinètes dans les fosses de sédimentation.

Quelle que soit la répartition des akinètes dans le sédiment de surface, ces cellules sont soumises à différentes contraintes. Seuls les akinètes matures sont capables de persister dans les sédiments lorsque les conditions environnementales sont défavorables au développement des cellules végétatives, le plus fréquemment en hiver (Sutherland et al., 1979). Par conséquent, il n'y aura pas de développement et d'augmentation de biomasse dans le compartiment benthique. Cette étape est donc considérée comme une phase de survie benthique.

Les contraintes abiotiques qu'impose le sédiment sont bien connues : absence de lumière, température basse et anoxie. Généralement, les akinètes durant la phase benthique sont capables de supporter ces contraintes (Kaplan-levy et al., 2010). Les facteurs biotiques quant à eux sont beaucoup moins connus. Parmi eux, la bioturbation semble être un des facteurs biotiques les plus importants intervenant dans la phase benthique. L'impact d'organismes benthiques comme l'écrevisse est réelle sur l'enfouissement ou la facilitation de la remise en suspension des akinètes présents dans le sédiment de surface (Yamamoto, 2010). Ensuite, il existe un impact des invertébrés benthiques (Stahl-Delbanco and Hansson, 2002; Karlson et al., 2012) et zooplanctoniques (Kearns et al., 1996). Ces organismes sortent de diapause ou ne sont que peu ou pas actif l'hiver, mais aucune données n'est disponible sur leur influence sur le pool benthique hivernal.

Ces notions de perte de viabilité par ces différents facteurs abiotiques et biotiques amènent à la caractérisation de l'intégrité de l'akinètes dans l'eau et surtout dans le sédiment. Généralement la viabilité d'un akinète est évaluée comme la capacité de l'akinète à germer (Livingstone and Jaworski, 1980; Reddy, 1983; Rucker et al., 2009; Wood et al., 2009). Certains auteurs considèrent aussi un akinète comme intact voire comme viable quand il semble intact sous lumière naturelle ou à épifluorescence (Thiel and Wolk, 1983; Baker and Bellifemine, 2000; Rucker et al., 2009; Ramm et al., 2012). Par exemple, Ramm et al., (2017) basent leur caractérisation des akinètes intact sur le fait de voir clairement leur cytoplasme. A

l'heure actuelle, il existe très peu d'informations sur le pourcentage d'akinètes intègres dans le sédiment. A notre connaissance, seul Rücker et al., (2009) s'intéressent aux nombres d'akinètes intacts dans le sédiment du lac Melansgee (Allemagne) débouchant sur une pourcentage situé entre 20 et 30% pour les akinètes de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

#### e. Le recrutement printanier des Nostocales

Le processus de recrutement benthique est défini par la transition entre la phase de survie benthique et de développement planctonique. Cette étape est essentielle au succès écologique de nombreuses espèces cyanobactériennes. En effet, des modèles mathématiques ont permis d'estimer que sans le recrutement benthique, le nombre de blooms de *Microcystis* pourrait diminuer de plus de 50% (Verspagen et al., 2005). Pour les Nostocales, ce processus est conditionné par la germination des akinètes (Figure 14). Cette transition s'effectue par la « migration » des cellules se trouvant à la surface du sédiment vers la colonne d'eau. A partir du printemps, les conditions environnementales redeviennent favorables : augmentation de l'intensité lumineuse, de la photopériode et de la température. Ces changements de conditions environnementales favorisent la germination des akinètes (Tableau 3). Dans la littérature, un consensus s'accorde sur le fait que la lumière serait nécessaire à la germination des akinètes (Kaplan-levy et al., 2010). Cependant, la germination des akinètes d'*Anabaena variabilis* et d'*Anabaena azollae* a été mise en évidence à l'obscurité en présence de fructose (Neely-Fisher et al., 1989). Les auteurs y expliquent que le fructose agirait comme un substitut de photosynthétats rendant possible la germination à l'obscurité.

La germination des akinètes est un processus rapide. Celle-ci commence par la division cellulaire se produisant dans la plupart des cas à l'intérieur de l'enveloppe (Baker and Bellifemine, 2000; Hori et al., 2003; Moore et al., 2004). L'expansion des quatre cellules nouvellement formées conduit à une augmentation de la pression de turgescence qui finit par faire céder l'enveloppe, libérant ainsi le néo-filament (Figure 14.c)) (Kaplan-levy et al., 2010). Certains auteurs émettent aussi l'hypothèse que la reprise d'activité métabolique pourrait être associée avec la synthèse d'enzymes qui fragiliseraient l'enveloppe (Meeks et al., 2002a). Le jeune filament ou hormogonie (Figure 14. g,h)) synthétise des vésicules à gaz (ou aérotopes) lui permettant de réguler sa flottabilité et ainsi de remonter dans la colonne d'eau. La synthèse de ces vésicules se produit à partir du stade hormogonie et est relativement longue (supérieure à 1 jour) (Oliver, 1994) et coûteuse en énergie (Hense and Beckmann, 2006).



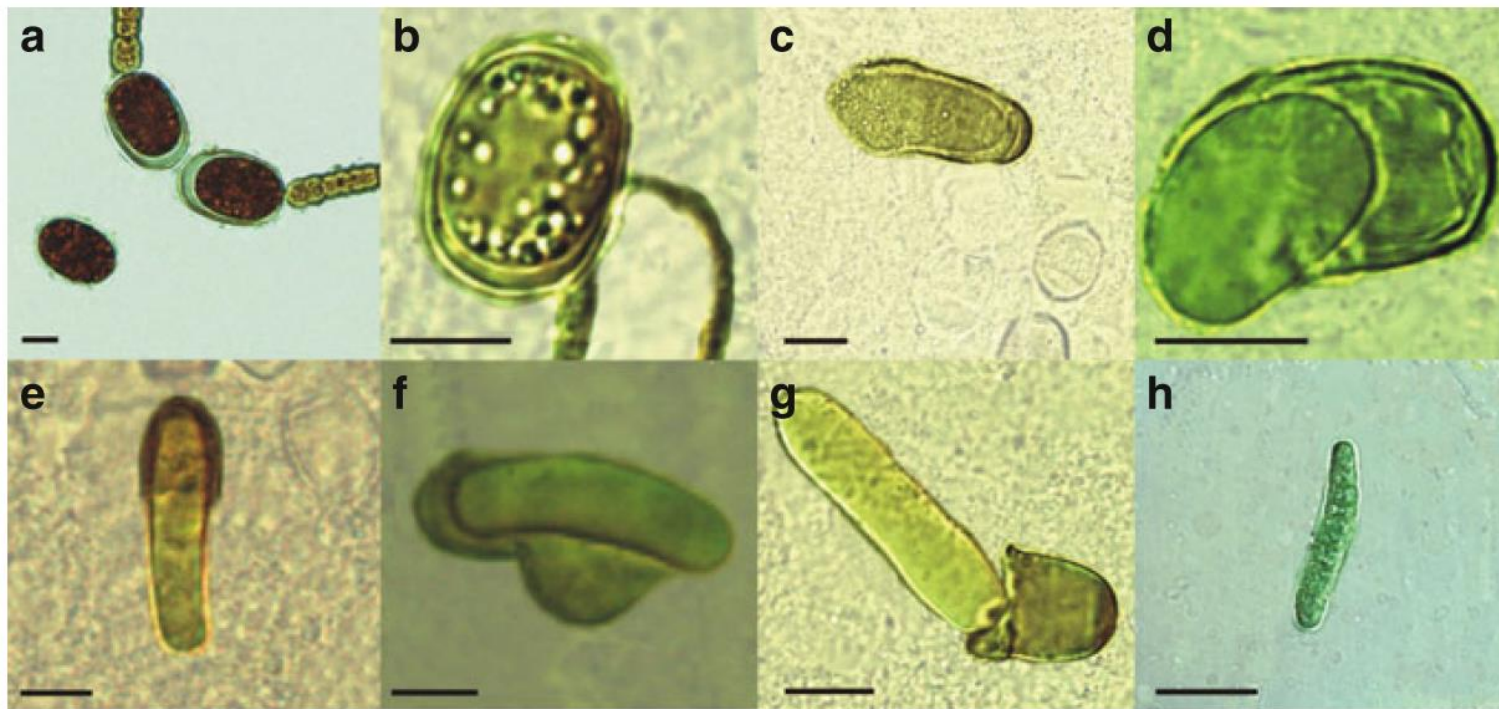


Figure 14 : Les différentes étapes de la germination chez les akinètes d'*Anabaena ovalisporum* d'après Kaplan-levy et al.,(2010). a) akinete seul et 2 akinètes connectés à un filament de cellules végétatives. b) Akinète granuleux mature. c) Rupture de l'enveloppe de l'akinète. d)-g). Akinète germant. h) Jeune filament ou hormogonie; les barres noires horizontales indiquent 10 µm.



**Tableau 3 : Principaux facteurs initiant la germination des akinètes d'après (Kaplan-levy et al., 2010).**

Facteurs environnementaux	Genres ou espèces	Références	Observation
Lumière	<i>Anabaena cylindrica</i>	Yamamoto, (1976)	Pas de germination sans lumière
	<i>Nodularia spumigena</i>	Huber, (1985)	La lumière de faible intensité est suffisante pour la germination (0,04 mol.photons.m <sup>-2</sup> .j <sup>-1</sup> )
	<i>Anabaena iyengarii</i>	Agrawal and Singh, (2000)	(0,5 mol.photons.m <sup>-2</sup> .j <sup>-1</sup> )
	<i>Anabaean circinalis</i>	van Dok and Hart, (1997)	
	<i>Anabaena, Aphanizomenon</i>	Karlsson-Elfgren and Brunberg, (2004)	
	<i>Gleotrichia echinulata</i>	Karlsson-Elfgren et al., (2004)	
	<i>Anabaena circinalis</i>	Thompson et al., (2009)	
	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Kim et al., (2005)	
	<i>Nodularia spumigena</i> <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Myers et al., (2010) Moore et al., 2005	
Qualité de la lumière	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Wiedner et al., (2007)	Lumière rouge pour germer
	<i>Nodularia spumigena</i>	Huber, (1985)	
	<i>Anabaena doliolum, Fischrella mucicola</i>	Kaushik et kumar, (1970)	Germination sans lumière photosynthétique
Température	<i>Nostoc, Anabaena vaginicola</i>	Rai and Pandey, (1981)	
	<i>Anabaenopsis arnoldii</i>	Pandey and Takpasayi, (1981) ; Reddy, (1983)	Optimum de germination à l'optimum thermique de croissance des cellules végétatives
	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Wiedner et al., (2007)	
	<i>Anabaenopsis circinalis</i>	Fay, (1988)	L'incubation à des températures élevées réduit le taux de germination
Phosphate	<i>Anabaena circilans</i>	Thompson et al., (2009)	Le phosphate est indispensable à la germination
	<i>Anabaena circilans</i>	van Dok and Hart., (1997)	
	<i>Nodularia spumigena</i>	Huber, (1985)	
Oxygène	<i>Nostoc PCC 7524</i>	Chauvat et al., (1982)	L'oxygène est essentiel pour la germination
	<i>Anabaena circinalis</i>	Kezhi et al., (1985)	
Mélange de sédiment et resuspension	<i>Gleotrichia echinulata</i>	Stahl-Delbance and Hansson, (2002), Karlsson-Elfgren et al., (2004)	La germination est favorisée par la resuspension du sédiment de surface
	<i>Anabaena, Aphanizomenon</i>	Karlsson-Elfgren and Brunberg, (2004)	Idem
	<i>Aphanizomenon ovalisporum</i>	Hadas et al., (1999)	
	<i>Anabaena circilans</i>	Baket and Bellifemine, (2000)	
	<i>Anabaena sp</i>	Rengefors et al., (2004)	
	<i>Anabaena cylindrica</i>	Yamamoto, (1976)	

La notion d'inoculum benthique a vu le jour dès le début de la caractérisation du cycle de vie des Nostocales. En effet, ce concept s'appuie sur le fait qu'il existerait une relation entre le nombre akinètes présents dans le sédiment et l'intensité du bloom suivant. Dès 1984, Huber, (1984) évoque l'importance de la taille de l'inoculum benthique dans la mise en place des blooms de *Nodularia*. Cette relation quantitative entre akinètes dans le sédiment de surface et blooms dans la colonne est précisée dans une étude focalisée sur *Cylindrospermopsis raciborskii* dans le lac Balaton (Hongrie) (Padisák, 2003). En effet, il est estimé qu'un pool d'akinètes variant entre 103 and 105 akinètes.cm<sup>2</sup> de sédiment de surface était suffisant à l'initiation d'un bloom. Cependant, un nombre très faible d'akinètes intègres de *C. raciborskii* (tout au plus quelques milliers.mL<sup>-1</sup> de sédiment frais) en hiver 2005 a tout de même conduit à un bloom en été 2006 dans le lac Melangsee (Allemagne) (Rücker et al., 2009). Ainsi d'autres facteurs prédominants interviennent dans le succès du recrutement de *C. raciborskii* et seule la taille de l'inoculum ne peut conditionner entièrement le futur bloom. Néanmoins, d'autres études ont essayé de quantifier la contribution des akinètes dans l'établissement de populations pélagiques. Par exemple, Cirés et al., (2013a) ont estimé que seulement 0.02 à 0.5% des akinètes du sédiment de retenues de barrage en Espagne pouvait être remobilisés dans la colonne d'eau pendant l'hiver et le printemps. Des résultats assez similaires sont reportés dans le lac Limmaren (Suède) avec une contribution des akinètes estimée de 0.0003 à 0.5% (Karlsson-Elfgren and Brunberg, 2004). Cela semble confirmer que le succès du recrutement n'est pas essentiellement lié au nombre d'akinètes présents mais plutôt aux conditions environnementales favorisant la germination et le développement des cellules végétatives dans la colonne d'eau.

Les facteurs biotiques peuvent aussi jouer sur le succès du recrutement. La bioturbation engendrée par les organismes benthiques tels les écrivisses peuvent favoriser donc la remise en suspension de ces cellules (Yamamoto, 2010). De plus la macrofaune benthique peut avoir différents effets sur les akinètes. Ces effets peuvent être divisés en deux catégories et sont dépendants de l'espèce considérée. En effet, la première catégorie, le remaniement de particules, se produit lors de la construction de terrier ainsi que pendant leur maintenance intégrant ingestion et défécation de l'organisme considéré. Ensuite la seconde catégorie est la ventilation du terrier. Elle consiste à créer des mouvements d'eau qui se trouve dans le terrier à des fins de respiration ou de nutrition (Karlson et al., 2012). Dans les deux cas, l'effet le plus bénéfique est tout simplement la remise en suspension de ces akinètes dans l'eau favorisant ainsi leur recrutement (Stahl-Delbanco and Hansson, 2002). Les effets délétères se

résumé en un enfouissement plus profond ou en une destruction de l'akinète ou de l'hormogonie par ingestion (Karlsson et al., 2012). Cependant, comme dans la colonne d'eau, la viabilité des akinètes après ingestion par des macroinvertébrés benthiques n'a été que très peu étudiée. Huber, (1984) a toutefois réussi à faire germer des akinètes du genre *Nodularia* issus de pelotes fécales du sédiment de l'estuaire de Peel-Harvey (Australie). Ces processus de bioturbations sont variables dans le temps et dans l'espace, d'autant plus que les communautés présentes sont différentes suivant la zone du lac étudiée (i.e littorale *versus* pélagique) (Kearns et al., 1996). La zone littorale du lac Dagstorpsjön (Suède) est en effet plus propice au recrutement des akinètes que la zone pélagique. La première zone est souvent dominée par *Azellus aquaticus* qui favorisent le recrutement des akinètes alors que les zones profondes sont dominées par les chironomes favorisant leur enfouissement (Stahl-Delbanco and Hansson, 2002).

Beaucoup d'auteurs basent leurs hypothèses sur un recrutement différentiel en fonction de la zone du lac considérée (Karlsson-Elfgren et al., 2004; Karlsson-Elfgren and Brunberg, 2004; Rengefors and Gustafsson, 2004; Ramm et al., 2017). Par exemple, Karlsson-Elfgren et al., (2004) émettent l'hypothèse que les sédiments de zone peu profonde du lac Erken (Suède) sont plus impliqués dans le recrutement de *Gloeorichia echinulata* que les sédiments des zones profondes. En effet, en zone littorale ou peu profonde, les sédiments peuvent recevoir de la lumière, se réchauffent plus rapidement et peuvent être facilement exposés à la remise en suspension (Tsuji-mura et al., 2000; Verspagen et al., 2004) et donc favoriseraient la reprise d'activité cellulaire. Au contraire, dans les zones profondes, les conditions s'avèrent totalement différentes (pas de pénétration de la lumière, anoxie, remise en suspension limitée) et paraissent peu propice à la germination des akinètes (Ramm et al., 2017). Un nombre beaucoup plus important de filaments d'*Aphanizomenon flos-aquae* et d'*Anabaena circinalis* a d'ailleurs été retrouvé dans des cloches benthiques placées en milieu peu profond du lac Limmaren (Suède) par rapport au milieu profond (Karlsson-Elfgren and Brunberg, 2004). Ramm et al., (2017) vont plus loin dans ce sens et considèrent que les akinètes présents sous la zone photique ne sont plus impliqués dans la formation de nouvelles populations pélagiques et se retrouvent donc perdus dans l'obscurité (Figure 15). Les cellules végétatives recolonisent la couche de surface avec une fenêtre qui va de quelques jours à quelques semaines (Hense and Beckmann, 2006). Dès lors, la phase de croissance et de développement pélagique peut à nouveau recommencer.

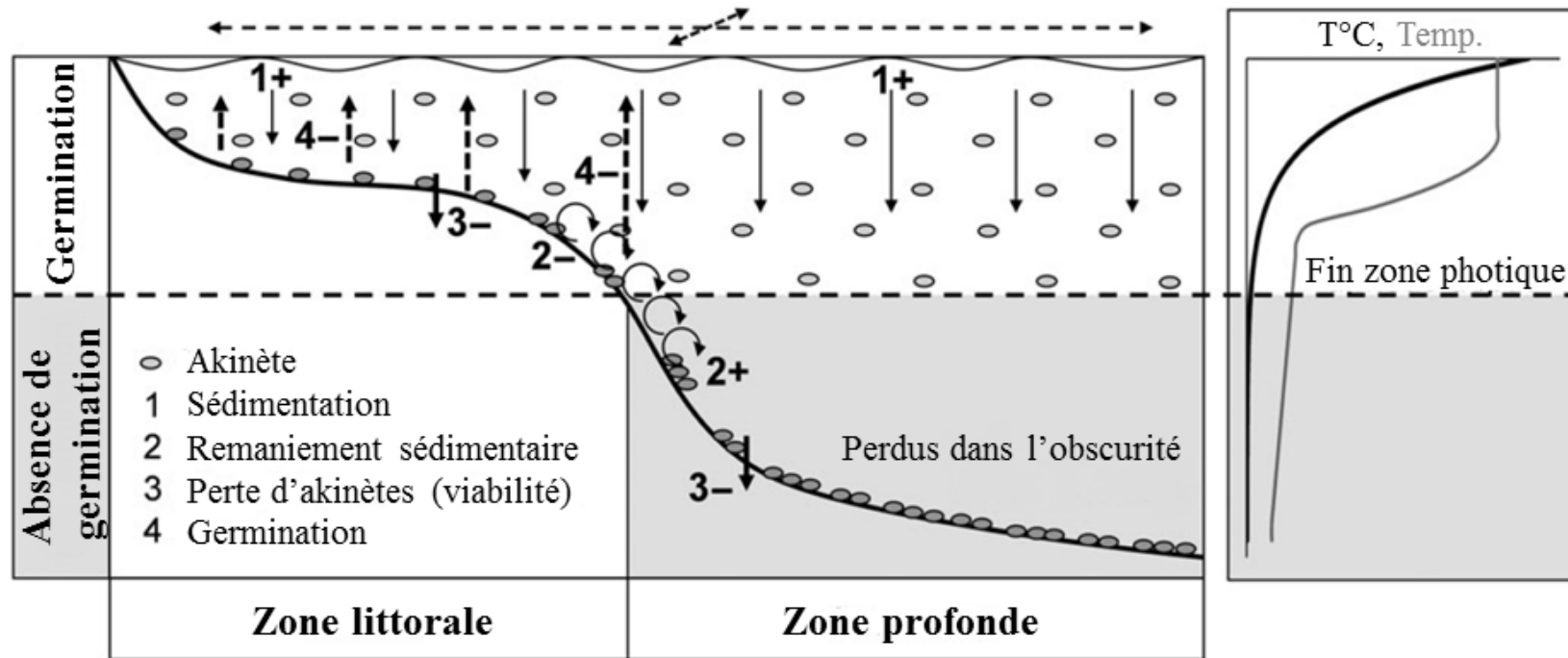


Figure 15 : Schéma conceptuel des processus influençant la distribution horizontale et la taille du pool d'akinètes dans les lacs profonds des régions tempérées selon Ramm et al., (2017). + ou - indique l'augmentation ou la diminution du pool d'akinètes.

## 5. Les sédiments : véritables archives benthiques

### a. Fonctionnement du compartiment benthique

Le sédiment est formé par l'ensemble des particules qui décantent de la colonne d'eau par gravité et est constitué de deux phases. La phase liquide formant la matrice du milieu et la phase solide, composée par des particules de taille et de nature différentes. La sédimentation est le fruit d'interactions entre de multiples facteurs tels que l'hydrologie, le stock sédimentaire, la géologie du bassin versant et le climat (Figure 16). Tous ces facteurs forment un équilibre dynamique favorisant ou non le dépôt de matière (Dai and Liu, 2013). Cet équilibre est variable dans le temps et dans l'espace pour un même système (Ward, 1989). Les milieux lacustres ont deux voies majoritaires de sédimentation : la sédimentation autochtone et allochtone. Les apports autochtones sont issus directement de la production biologique dans la colonne d'eau. Plus précisément, ces apports sont constitués de toutes les particules biogéniques sédimentant dans la colonne d'eau incluant la décomposition et l'excrétion des organismes présents (Pourriot et Meybeck, 1995). Le statut trophique d'un milieu conditionne la production biologique et par extension aussi les apports autochtones. La comparaison du taux de deux lacs subalpins en est la parfaite illustration. Le Pusiano, lac oligotrophe, a un taux de sédimentation de  $1\ 300\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{an}^{-1}$  alors que le taux de sédimentation du lac eutrophe du Mezzola est de  $11\ 400\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{an}^{-1}$  (Pettine et al., 2000). Les origines des apports allochtones sont multiples. L'érosion directe des berges, le ruissellement et les apports par gravité constituent les principales sources de particules. Ces sources sont conditionnées par d'autres facteurs comme par exemple la nature du substrat géologique, les conditions climatiques ou encore la topographie du bassin versant. Des apports anecdotiques par leur faible proportion ou leur restriction temporelle sont néanmoins existants. Ils peuvent être résumés à la poussière, les apports de feuilles mortes ou encore le pollen (Pourriot et Meybeck, 1995).

Malgré cette diversité, le sédiment s'accumule au fond des masses d'eau lenticques suivant les principes de la stratigraphie. Ainsi, les restes et débris d'algues, de macroinvertébrés et autres particules issus de la production autochtone du système permettront de déterminer indirectement l'évolution de l'état de ce système sur de grandes séquences temporelles (Pourriot and Meybeck, 1995; Capo et al., 2015). Grâce au développement des techniques de radiochronologie, les paléo-limnologues sont en mesure d'estimer l'âge du sédiment étudié. Par exemple, la datation au  $^{210}\text{Pb}$  permet de dater le sédiment sur des périodes allant de quelques années à plus de 150 ans alors que le  $^{14}\text{C}$  permet la datation de sédiment jusqu'à

50000 ans (Smol, 2014). Ainsi, la paléo-limnologie se présente comme un outil puissant pour retracer l'histoire des systèmes aquatiques et de pouvoir ainsi mettre en relation cette évolution avec des paramètres globaux tel le réchauffement climatique ou encore l'anthropisation (Smol, 2014).

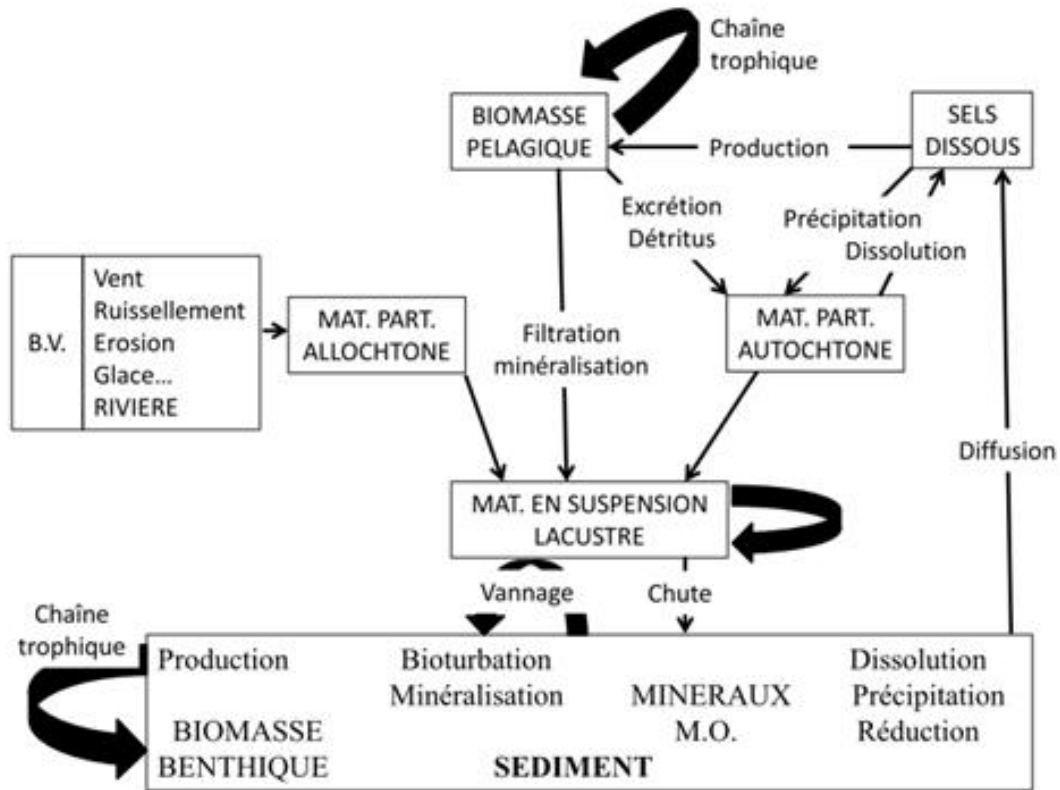


Figure 16: Schéma représentant les différents processus intervenant dans la sédimentation (Pourriot et Meybeck, 1995).

## b. Reconstruction des communautés passées *via* les macrorestes

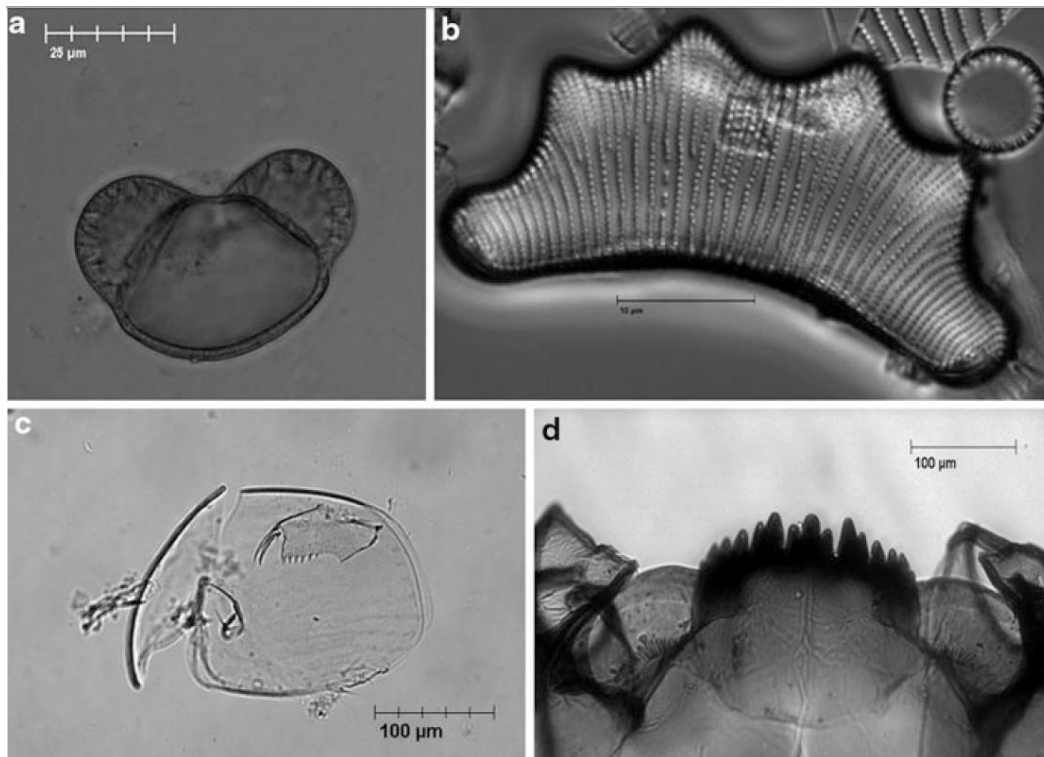
### *Biodindicateurs et Pollens*

Avant de définir les paléo-indicateurs, un principe important de la paléo-écologie doit être défini : il s'agit du principe d'actualisme. Celui-ci est un des principes de base de la géologie moderne en formulant le postulat que les phénomènes passés se produisent de la même manière que les ceux des temps modernes (Ravachol and Beorchia, 2011). Ainsi en paléo-limnologie, si des organismes actuels sont caractéristiques d'une condition particulière (statut trophique, préférendum thermique...) et que ces organismes sont aussi retrouvés dans

une séquence sédimentaire plus ancienne, il pourra être conclut que lors de cette séquence, les conditions étaient similaires à celles des organismes vivants actuellement.

Ces organismes paléo-indicateurs sont quasiment tous issus de la production biologique du système mais néanmoins quelques-uns peuvent être d'origines différentes. Les grains de pollen en sont la parfaite illustration (Figure 17.a). Ces paléo-indicateurs ne sont pas directement représentatifs du système aquatique considéré mais plutôt des environs terrestres donnant ainsi des informations complémentaires sur l'occupation du bassin versant. Ainsi, en étudiant la dynamique des différentes espèces mais aussi des différentes strates (herbacées *versus* arborescente), il est possible de mettre en évidence différents évènements climatiques (Seppä et al., 2004; Herzsuh et al., 2010) mais aussi des impacts liés à l'action de l'Homme (Tonkox and Possnert, 2016; Rull et al., 2017). Par exemple, grâce à une étude palynologique effectuée sur le sédiment du lac d'Aydat (France), des impacts anthropiques furent mis en évidence dès le Néolithique (4600-4300 cal. BP) et l'Age de bronze (3900-3500 cal. BP) (Miras et al., 2015).

Les paléo-indicateurs issus de la production interne d'un système peuvent provenir de différents niveaux trophiques et peuvent inclure un organisme entier, des formes de résistance ou des fragments d'organismes (Capo, 2016) (Figure 17).

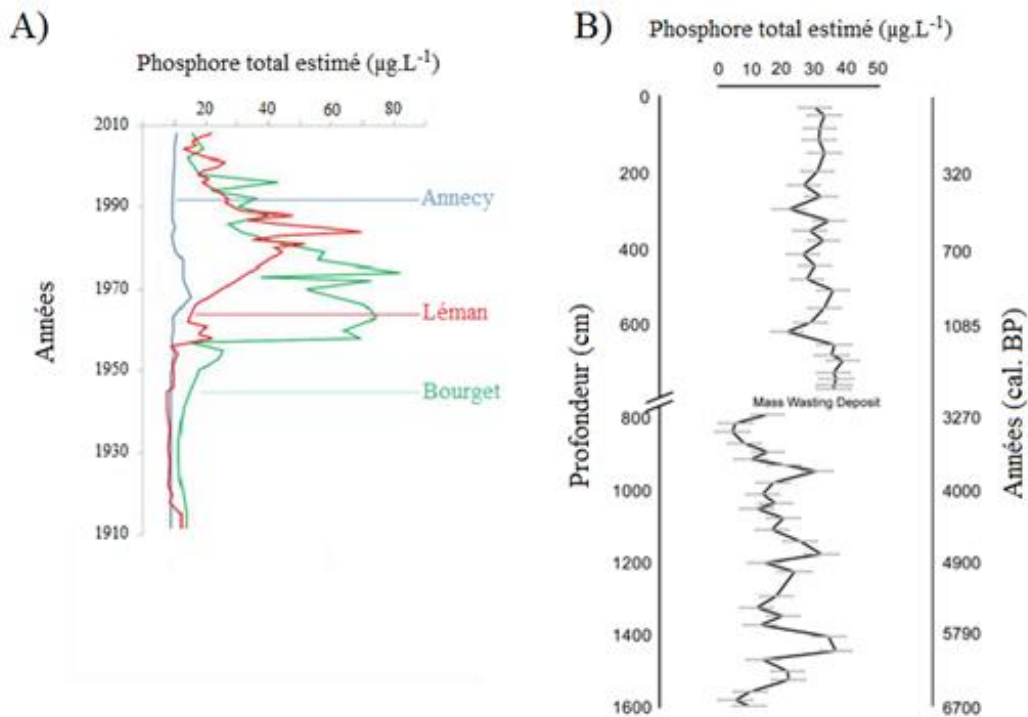


**Figure 17 : Paléo-indicateurs utilisés en paléo-limnologie. a) Grain de pollen b) Frustule de diatomée c) Reste de cladocère d) Capsule céphalique chironome d'après Smol, (2014).**

Parmi les divers indicateurs existants, les diatomées (Figure 17.b) forment un groupe particulièrement intéressant pour étudier les écosystèmes passés. En effet, le frustule siliceux de ces organismes est capable de persister des dizaines (Wang et al., 2012) voire des centaines de milliers d'années (VanLandingham, 2009) dans le sédiment. De plus, les diatomées possèdent une diversité taxonomique vraiment importante et sont retrouvées à travers un important gradient de conditions limnologiques (Julius and Theriot, 2010; Rühland et al., 2015). Ainsi, des changements de paramètres physiques et ou chimiques au sein des écosystèmes aquatiques peuvent induire des modifications chez les communautés diatomiques (Rühland et al., 2015). De nombreux taxa ont des préférences bien définies liées un micro-habitat donné (Julius and Theriot, 2010). Ainsi, ces taxons diatomiques offrent la possibilité d'identifier les changements environnementaux et climatiques d'un système donné (Smol, 1988, 2010). Par exemple, la température de l'air, la composition piscicole et surtout la concentration en phosphore total sont les principaux facteurs expliquant la dynamique temporelle des communautés diatomiques des lacs Léman, d'Annecy et du Bourget (France) mis en évidence grâce à des séquences sédimentaires (Berthon et al., 2014). La connaissance des préférences écologiques permet désormais d'extrapoler une concentration en phosphore total en analysant la composition et la structure des communautés diatomiques (Alric et al., 2013, Miras et al., 2015) (Figure 18). Pour finir, leur frustule peut être parée d'ornementations qui sont un critère solide de discrimination entre les différentes espèces et permet ainsi d'affiner la résolution taxonomique et par conséquent la résolution d'analyse.

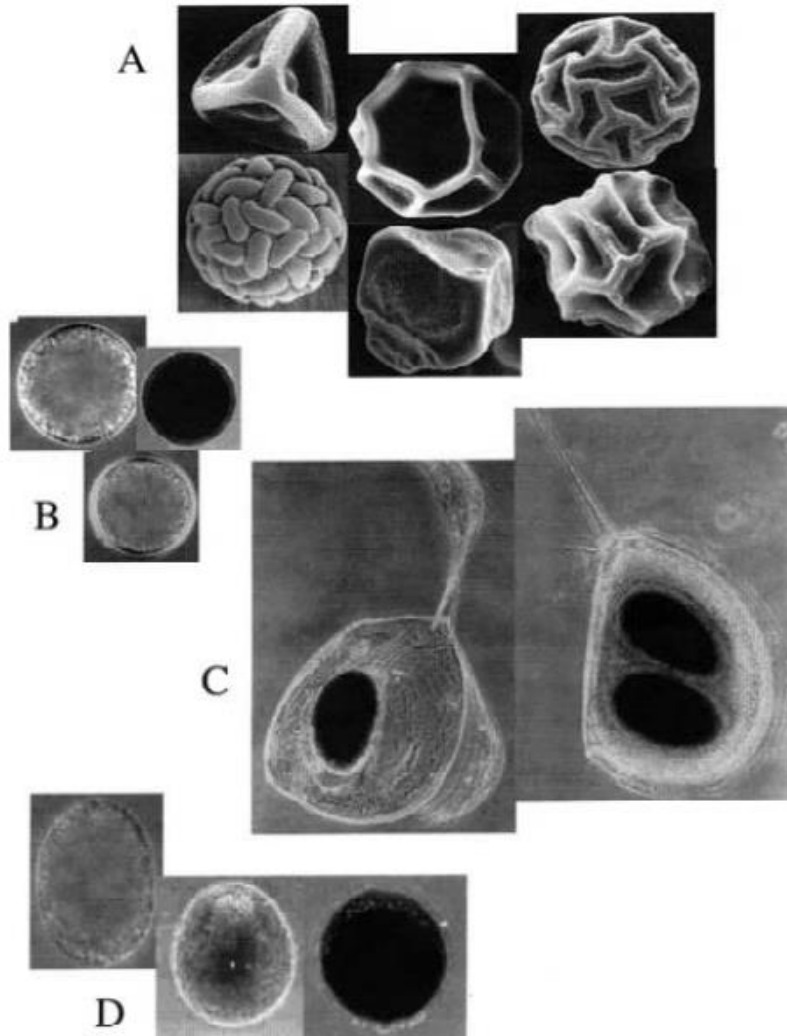
D'autres organismes peuvent aussi servir de marqueurs, mais cependant leur diversité taxonomique et écologique reste restreinte par rapport aux Diatomées. Cependant, ils peuvent être de bon outils pour mettre en évidence des phénomènes d'eutrophisation, comme les cystes de Chrysophycées dans de nombreux systèmes lacustres (Tippett, 1964; Carney and Sandgren, 1983).





**Figure 18 : Estimation de la concentration en phosphore total d'après le peuplement de diatomées persistant dans les sédiments lacustres, d'après Alric et al., (2013); Capo, (2016) A) et Miras et al., (2015) B).**

Plusieurs autres biomarqueurs existent pour retracer des changements au niveau des populations et des communautés notamment *via* les restes d'organismes zooplanctoniques tel que des restes de carapaces de cladocères ou de copépodes (Capo, 2016). La caractérisation des fossiles de cladocères a permis de reconstruire les différentes successions des communautés de ce groupe zooplanctonique sur 2500 ans d'histoire du lac Piramide inférieure (Népal) (Nevalainen et al., 2014). Il apparaît que ces successions seraient contrôlées par des mécanismes « bottom up ». Les restes de daphnies retrouvés dans le sédiment du lac d'Annecy ont aussi permis d'estimer la concentration en phosphore totale dans la colonne d'eau depuis les années 1850 (Berthon et al., 2014; Capo, 2016). Il est même possible de reconstruire ces successions et même par exemple d'estimer des paléo-températures à partir d'éphippies de Cladocères (Jeppesen et al., 2002; Luoto et al., 2015). En réalité, de nombreux œufs ou formes de résistance zooplanctoniques sont capables de persister dans le sédiment et par conséquent peuvent fournir de bons paléo-indicateurs (Brendonck and De Meester, 2003) (Figure 19). Des fragments d'organismes peuvent aussi être utilisées comme les capsules céphaliques de chironomes (Gajewski et al., 2005; Millet et al., 2009).



**Figure 19 : Photographies illustrant la diversité des formes de résistances zooplanctoniques pouvant être retrouvées dans les sédiments lacustres. Diversité des œufs de résistance de branchiopodes (200-400µm) A), œufs de résistance sphériques retrouvés chez les copépodes calanoïdes (80-200µm) B). Ephippies retrouvées chez les cladocères possédant une (comme chez *Bosmina sp*) ou deux (comme chez *Daphnia sp.*) formes de résistance (400-500µm) C). Types de monogonontes chez les rotifères (80-200µm) D). D'après Viitasalo and Katajisto., (1994) et Brendonck and De Meester., (2003).**

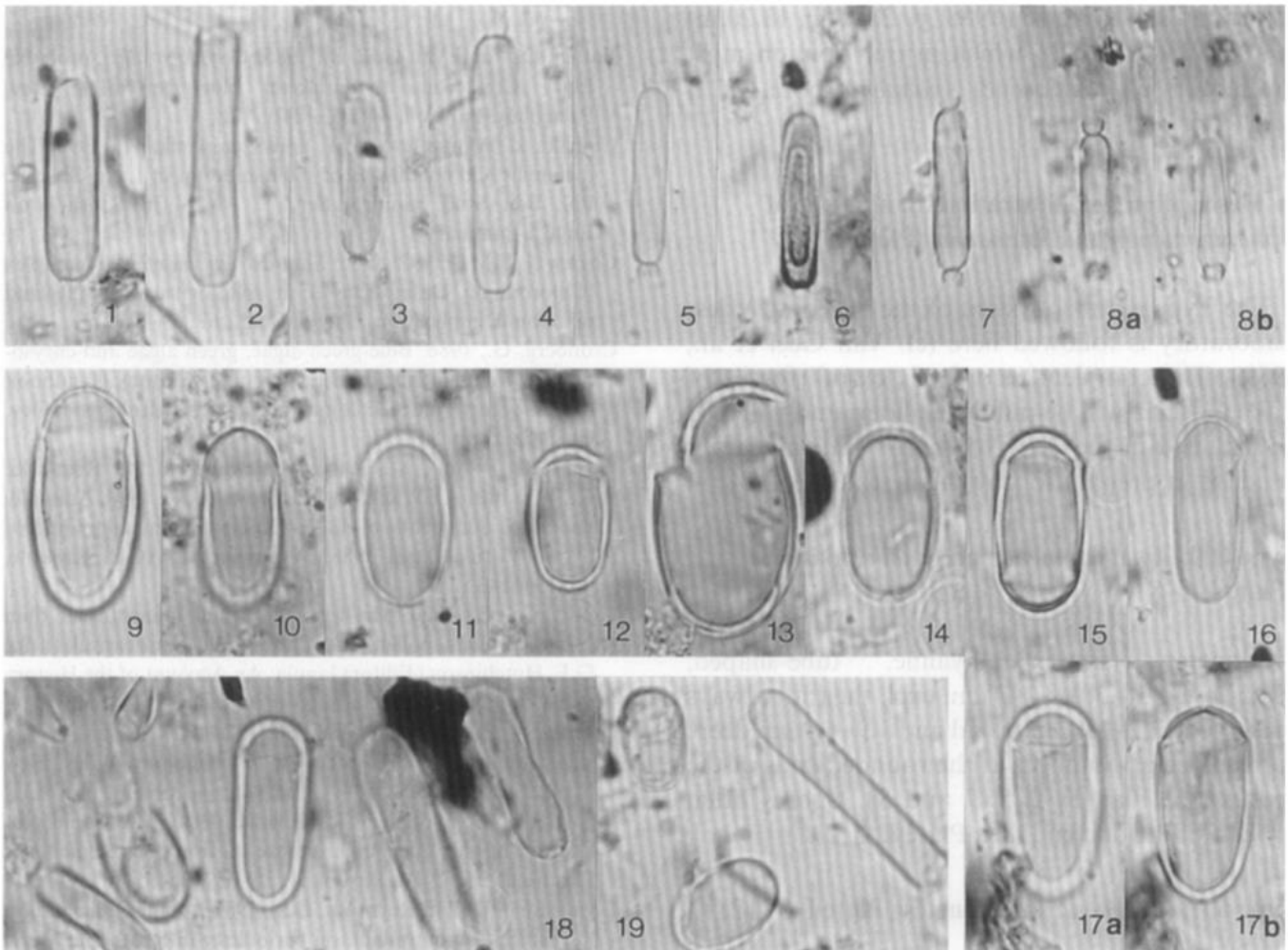
*Les akinètes en paléo-écologie*

De par leur aptitude à persister dans les sédiments, les akinètes ont déjà fait l'objet d'études paléo-environnementales. Par exemple, Van Geel et al., (1994) ont dénombré des akinètes « fossiles » issus de sédiment de plus de 4000 ans du lac Gosciaz (Pologne). Des akinètes d'*Anabaena* âgés de 1500 ans ont aussi été retrouvés dans le lac d'Aydat (France) (Miras et al., 2015). Même si les akinètes retrouvés dans le sédiment sont des marqueurs de la présence des cyanobactéries, il est difficile de confronter une concentration en akinètes dans les sédiments avec une biomasse cyanobactérienne passée (Räsänen et al., 2006). Cependant, quelques rares études se sont essayées à établir la relation entre akinètes dans le sédiment et cellules végétatives dans la colonne d'eau avec des résultats mitigés. Par exemple, une étude s'est focalisée sur la relation entre le nombre de filament dans la colonne d'eau et les akinètes retrouvés dans le sédiment du lac Pyhäjärvi (Finlande) intégrant ainsi une carotte sédimentaire de 30 cm et 20 ans de dénombrements sur la colonne d'eau (Räsänen et al., 2006). Les auteurs émettent l'hypothèse qu'il n'y a pas de relation entre ces deux composantes à cause d'un manque de régularité de la sporulation du genre *Anabaena* (Livingstone, 1984). Au contraire, des études réalisées sur le sédiment du lac Brome (Canada) intégrant plus de 150 ans d'histoire révèlent une corrélation positive entre le nombre d'akinètes présents dans le sédiment et la concentration en aphanizophylle (pigment cyanobactérien caractéristique des hétérocystées) suggérant un lien étroit entre populations pélagiques passées et akinètes dans le sédiment (Blin, 2009).

Les akinètes seuls (Livingstone and Jaworski, 1980; Räsänen et al., 2006) ou en association avec d'autres indicateurs biologiques (Van Geel et al., 1994; Eilers et al., 2004; Blin, 2009; Miras et al., 2015) sont généralement utilisés comme marqueur de l'eutrophisation. Par exemple, une énorme augmentation de la quantité d'akinètes d'*Anabaena* et d'*Aphanizomenon* retrouvés dans du sédiment âgé de 1000 ans est interprétée comme une récurrence cyanobactérienne liée à l'intensification de l'agriculture sur le bassin versant du lac Gosciaz (Pologne) (Van Geel et al., 1994). L'apparition et l'augmentation du nombre d'akinètes d'*Aphanizomenon* depuis 150 ans laisse présumer un changement des communautés phytoplanctoniques lié à une eutrophisation du milieu depuis ce laps de temps sur le lac Klamath (Etats-Unis) (Eilers et al., 2004).

Malgré l'utilisation des akinètes en paléo-limnologie, un manque d'harmonisation entre les études, notamment au niveau méthodologique, est clairement visible. En effet, il n'y a pas

de protocole bien défini pour extraire et dénombrer les akinètes du sédiment. Par exemple, l'extraction d'akinètes inclus dans les études palynologiques sont issus d'un protocole destructif et par conséquent le dénombrement ne se fait qu'à partir des enveloppes résiduelles des akinètes (Geel et al., 1994; Miras et al., 2015) (Figure 20). D'autres études favorisent la dilution du sédiment (Eilers et al., 2004) et l'observation en microscopie optique inversée ou droite. Cependant, la dilution du sédiment rend difficile le dénombrement de faibles quantités d'akinètes. De plus, malgré des dilutions importantes, les particules sédimentaires encore présentes constituent un bruit de fond ralentissant et limitant la résolution du dénombrement (Ramm et al., 2012). Les unités pour caractériser les quantités d'akinètes sont aussi source de divergences. Les akinètes peuvent être rapportés à un pourcentage total de grains de pollen comptés (Miras et al., 2015), ou être exprimés en millilitre de sédiment ou en gramme sec de sédiment (Räsänen et al., 2006) et même en gramme sec de matière organique (Blin, 2009).



**Figure 20 : Photographies d'akinètes « fossiles » d'*Aphanizomenon* (1-8) et d'*Anabaena* (9-17) ainsi que ces deux genres mélangés (18-19) prises en microscopie optique (x1000), d'après Van Geel et al., (1994).**

### c. Reconstruction des communautés passées *via* des molécules

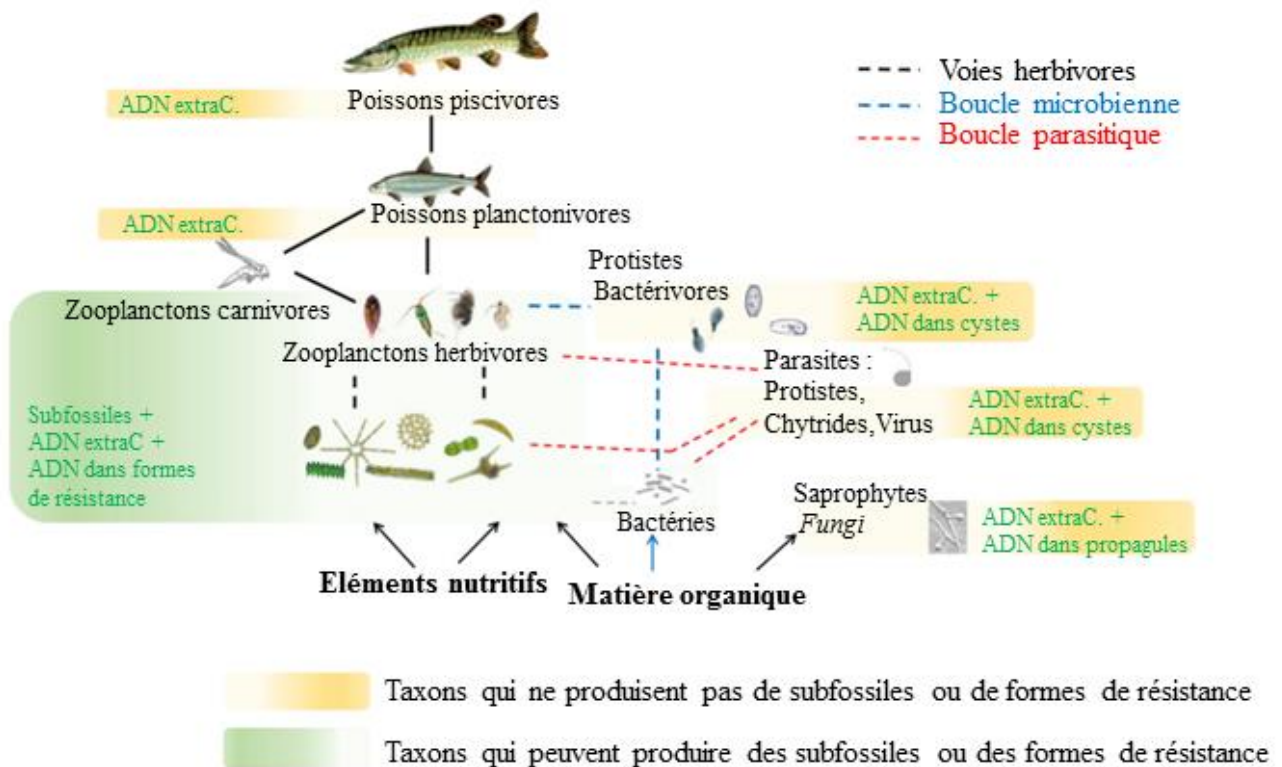
Depuis quelques dizaines d'années, l'essor de techniques comme la biologie moléculaire ainsi que la chimie analytique a permis d'identifier des indicateurs moléculaires préservés dans le sédiment et reflétant des événements passés. La détection et la quantification des pigments issus d'organismes phytoplanctoniques fut l'un des premiers marqueurs mis en évidence (Fox et al., 1944) grâce à des méthodes de chimie telle la HPLC (Zapata et al., 2000). Les pigments présentent de nombreux intérêts : ils ont une diversité importante, certains sont spécifiques de groupes taxonomiques et ils peuvent être de nature chimique variée leur conférant différentes propriétés de conservation dans le sédiment (Leavitt and Hodgson, 2001) (Tableau 4). Certains pigments, tels l'échinénone ou la zéaxanthine, sont ainsi spécifiques des cyanobactéries et même de certains groupes cyanobactériens (Aphanizophylle pour les Nostocales). L'utilisation de ces pigments comme marqueurs d'évènements passés est semblable à celle des akinètes. En effet, une augmentation de la concentration en pigment au fil du sédiment est traduite comme une augmentation de la concentration en cyanobactéries souvent lié à un processus d'eutrophisation (Poutanen et al., 2001; Rabalais et al., 2004). De manière plus globale, la combinaison de plusieurs pigments spécifiques permettraient de mettre en évidence les changements et les shifts aux niveaux des communautés phytoplanctoniques (Pal and Pick, 2015).

**Tableau 4: Pigments retrouvés communément dans les sédiments lacustres avec leur affinité taxonomique (liste non exhaustive). Le degré relatif de stabilité et de préservation est classé de (1) pour les plus stables à (4) pour les moins stables. (-) représente une stabilité non déterminée.**

D'après Leavitt and Hodgson, (2001).

Pigment	Stabilité	Affinité
$\beta$ , $\beta$ -carotène	1	<i>Plantae</i> , <i>Algae</i> , quelques bactéries phototrophes
$\beta$ , $\alpha$ -carotène	2	Cryptophytes, Chrysophytes, Dinophytes, quelques Chlorophytes
$\beta$ -isorenieratène	1	<i>Chlorobiacea</i> (Bactéries vertes sulfureuses)
Isorenieratene	1	<i>Chlorobiacea</i>
Alloxanthine	1	Cryptophytes
Fucoxanthine	2	Dinophytes, Bacillariophytes, Chrysophytes
Diatoxanthine	2	Bacillariophytes, Dinophytes, Chrysophytes
Diadinoxanthine	3	Dinophytes, Bacillariophytes, Chrysophytes, Cryptophytes
Dinoxanthine	-	Dinophytes
Péridinine	4	Dinophytes
Echinénone	1	Cyanobactéries
Zéaxanthine	1	Cyanobactéries
Canthaxanthine	1	Cyanobactéries coloniales, tissus herbivores
Myxoxanthophylle	2	Cyanobactéries coloniales
Scytonémine	-	Cyanobactéries coloniales
Oscillaxanthine	2	Cyanobactéries (Oscillatoriales)
Aphanizophylle	2	Cyanobactéries (Nostocales)
Lutéine	1	Chlorophytes, Euglénophytes, <i>Plantae</i>
Néoxanthine	4	Chlorophytes, Euglénophytes, <i>Plantae</i>
Violaxanthine	4	Chlorophytes, Euglénophytes, <i>Plantae</i>
Okénone	1	Bactéries pourpres sulfureuses
Astaxanthine	4	Invertébrés, quelques Chlorophytes
Chlorophylle <i>a</i>	3	<i>Plantae</i> , <i>Algae</i>
Chlorophylle <i>b</i>	2	<i>Plantae</i> , Chromophytes, Euglénophytes
Chlorophylle <i>c</i>	4	Dynophytes, Bacillariophytes, Chrysophytes
Phéophitine <i>a</i>	1	Produit de dégradation de la chloryphyllle <i>a</i>
Phéophitine <i>b</i>	2	Produit de dégradation de la chloryphyllle <i>b</i>
Phéophorbide <i>a</i>	3	Produit de dégradation de la chloryphyllle <i>a</i> (broutage, Diatomées senescentes)
Pyro-phéopigments	2	Produit de dégradations de la phéophorbide <i>a</i>

Cependant l'étude de la diversité, aussi bien de grands groupes taxonomiques que de groupes plus restreints, fut grandement révolutionnée par le développement des outils de biologie moléculaire et plus particulièrement par l'intermédiaire des techniques de NGS (Next-generation sequencing) (Capo et al., 2015). Tout d'abord, les conditions environnementales du sédiment permettent une relative bonne conservation de l'ADN au moins pendant plusieurs dizaines, voire centaines d'années (Domaizon et al., 2013). Mais l'un des réels intérêts d'utiliser l'ADN est de pouvoir accéder à des taxons qui ne sont pas traditionnellement considérés en paléo-limnologie ne possédant pas de forme de résistance distinctes qui peuvent persister dans les sédiments (Savichtcheva et al., 2015; Domaizon et al., 2017). Comme l'analyse des pigments, l'analyse de l'ADN se base sur un marqueur moléculaire mais dépasse le cadre des organismes photosynthétiques et peut englober tous les organismes présents dans un écosystème (Figure 21). Ainsi l'étude de l'ADN environnementale permet d'accéder à des informations passées sur des poissons (Turner et al., 2015), du zooplancton (Monchamp et al., 2017) et à tous les métabolismes microbiens (Borrel et al., 2012; Capo et al., 2017; Domaizon et al., 2017).



**Figure 21: Schéma d'un réseau trophique pélagique lacustre mettant en évidence comment l'analyse de l'ADN dans le sédiment peut cibler les organismes présents dans le système pélagique. Le type d'ADN est spécifié comme intracellulaire pour les cystes, propagules et formes de résistance et comme étant extracellulaire (ADN extraC), d'après Domaizon et al., (2017).**



Indépendamment de l'organisme ciblé, l'étude de l'ADN en paléo-limnologie peut répondre à de nombreux objectifs (Domaizon et al., 2017). Concernant les cyanobactéries, des études récentes mettent en avant la diversité des communautés passées surtout dans des lacs alpins ou péri-alpins. Par exemple, Domaizon et al., (2013), mettent en évidence des changements de diversité chez les picocyanobactéries en fonction de l'évolution trophique du lac du Bourget (France) en intégrant 100 ans de dépôts sédimentaires. Plus précisément, les auteurs montrent que les changements de température et de concentration en phosphore affectent la dynamique des communautés de *Synechococcus*, altérant leur structure et induisant des changements dans la composition génotypique. Cette technique a aussi permis de souligner que les effets couplés de la température et de la concentration en phosphore sont favorables au développement de *Planktothrix* quand le lac du Bourget est mésotrophe (Savichtcheva et al., 2015). Lorsque le lac est eutrophe, des séquences affiliées à *Anabaena* et *Microcystis* sont détectées. Grâce au séquençage par synthèse (Illumina), Monchamp et al., (2016) ont réussi à reconstruire l'historique des communautés cyanobactériennes présentes sur les lacs Greifensee et Zurich (Suisse), intégrant plus d'une centaine d'années sur chacun de ces deux sites. Cette recherche souligne le fait que les dénombrements microscopiques pourraient par rapport aux NGS sous-estimer le nombre de taxons présents dans la colonne d'eau. En effet, la richesse spécifique des Chroococcales et des Synechococcales est plus importante lorsqu'elle est déterminée par les outils de génétique que par la microscopie. Ces approches permettent aussi de se focaliser sur la détection d'un gène, par exemple celui impliqué dans la biosynthèse de la microcystine, *mcyA* (Monchamp et al., 2016). Dans le sédiment du lac Zurich, sa détection est associée à des séquences affiliées à *Planktothrix rubescens* mettant ainsi en évidence la recrudescence de ce génotype toxique depuis le début du 20<sup>e</sup> siècle. Très peu d'autres études se sont focalisées sur la détection de ces gènes dans le sédiment. Pourtant, en détectant des marqueurs moléculaires associés à *mcyE* et *ndaF* (impliqués respectivement dans la biosynthèse des microcystines et de la nodularine) dans le sédiment de surface dans de lacs Kenyans, Dadheech et al., (2009) concluent sur l'intérêt d'utiliser ces marqueurs pour mettre en évidence les génotypes toxiques présents sur un site d'intérêt. En effet, l'étude du sédiment permet d'intégrer l'ensemble des génotypes présents dans la colonne d'eau sans néanmoins pouvoir mettre en évidence leurs dynamiques temporelles saisonnières (Kim et al., 2010).

Concernant les toxines à proprement parlées, certaines de ces molécules ont été détectées dans du sédiment ancien (plusieurs milliers d'années). Par exemple, de la



cyliospermospine produite il y a plus de 4700 ans fut détectée et quantifiée dans le sédiment du lac Griffin (Etats-Unis) (Waters, 2016). En dépit du fait que la diversité des espèces productrices soit impossible à définir dans ce cas, la présence et la persistance de cyanotoxines dans les sédiments donne des informations non négligeables quant à la toxicité des souches passées (Waters, 2016).

Tous ces marqueurs des événements passés, qu'ils s'agissent d'organismes entiers, de formes de résistance ou encore de molécules, possèdent de nombreux avantages. Néanmoins, tous présentent également des limites qu'il faudra nécessairement prendre en compte en fonction de la question scientifique considérée.

### **III) Objectifs et organisation de la thèse**

---

Dans un contexte global où les écosystèmes lacustres subissent d'importants forçages anthropiques, les risques associés aux proliférations cyanobactériennes sont de plus en plus récurrents. Même si les conditions favorisant ces proliférations sont bien connues, l'anticipation des blooms reste compliquée. En effet, de nombreux sites stratégiques ne sont suivis que depuis peu et de manière ponctuelle, limitant ainsi la compréhension des mécanismes écologiques propre à chacun. De plus, les études portant sur de longues échelles temporelles restent encore peu courantes en dépit du fait qu'elles soient intégratrices des processus globaux affectant l'écosystème tels la pression anthropique ou encore le réchauffement climatique.

Le principal objectif de cette thèse CIFRE était de tester la pertinence d'utiliser les akinètes présents dans les sédiments comme outil de caractérisation des blooms passés de Nostocales sur une échelle temporelle allant de un an à plusieurs milliers d'années. Il s'agissait également d'améliorer la caractérisation des akinètes dans le compartiment benthique afin de comprendre les relations existant entre ces cellules et les futures proliférations. Ainsi, les principales questions auxquelles je voulais apporter des éléments de réponses sont les suivantes :

- ✓ Les akinètes présents dans les sédiments sont-ils représentatifs de la diversité et de l'abondance des blooms passés ?
- ✓ Comment évolue la distribution des akinètes présents dans les sédiments sur le long terme ? Quels facteurs pourraient jouer sur ces distributions ?

## Chapitre 1 : Introduction générale

- ✓ Quel est le pool d'akinètes benthiques encore capable de germer ? Comment ce pool évolue en fonction du temps ? à l'échelle saisonnière ? centenaire ? millénaire ?
- ✓ Est-il possible d'estimer le potentiel toxique des efflorescences nostocaléennes *via* les akinètes présents dans les sédiments ? Plus largement, comment évolue la distribution des géotypes toxiques sur de larges échelles temporelles ?

La suite de ce manuscrit est organisée en quatre chapitres dont les trois premiers présenteront, sous forme d'articles, les résultats obtenus durant ces travaux de thèse.

Le chapitre 2 se focalise sur **la mise en évidence du potentiel toxique des akinètes**. Il est divisé en deux parties, chacune correspondant à un article scientifique :

**Article 1 :** *Molecular tools to detect anatoxin-a genes in aquatic ecosystems: Toward a new nested PCR-based method.* **Benjamin Legrand**, Jerome Lesobre, Jonathan Colombet, Delphine Latour and Marion Sabart (article publié dans *Harmful algae*).

**Article 2 :** Characterization of akinetes from cyanobacterial strains and lake sediment: A study of their resistance and toxic potential. **Benjamin Legrand**, Amélie Lamarque, Marion Sabart and Delphine Latour (article publié dans *Harmful algae*).

Le chapitre 3 concerne la caractérisation **des relations existantes entre akinètes dans le sédiment récent et cellules végétatives dans la colonne d'eau** correspondant à l'article scientifique suivant :

**Article 3 :** *Akinetes may be representative of past nostocalean Blooms: a case study of their benthic spatiotemporal distribution and potential for germination in a eutrophic lake.* **Benjamin Legrand**, Anne-Hélène Le Jeune, Jonathan Colombet, Antoine Thouvenot and Delphine Latour (article publié dans *Applied and Environmental Microbiology*).

Le chapitre 4 correspond à **la persistance des akinètes à moyen et à long terme dans le sédiment** et est composé par deux articles scientifiques :

**Article 4 :** *Benthic Archives Reveal Recurrence and Dominance of Toxigenic Cyanobacteria in a Eutrophic Lake over the Last 220 Years.* **Benjamin Legrand**, Amélie Lamarque, Marion Sabart and Delphine Latour (article publié dans *Toxins*)

*Chapitre 1 : Introduction générale*

**Article 5 :** *Investigating the long-term recurrence of nostocalean cyanobacteria through a 6 700 years core in a eutrophic Lake.* **Benjamin Legrand**, Yannick Miras, Jérôme Lesobre, Matthieu Dussauze, Delphine Latour.

Le dernier chapitre correspond à la discussion générale de l'ensemble de ces résultats et aux principales perspectives scientifiques que ces travaux pourraient induire.

---

**Chapitre 2 :**  
**Mise en évidence du potentiel**  
**toxique des akinètes**

---



## I) Introduction

---

Les connaissances sur le potentiel toxique des akinètes durant la phase de survie benthique sont inexistantes. En effet, les études qui se focalisent sur cette phase se concentrent sur le dénombrement des akinètes et parfois sur le potentiel de germination de ces cellules de résistance (Karlsson-Elfgren and Brunberg, 2004; Kravchuk et al., 2011; Cirés et al., 2013a; Ramm et al., 2017). Cependant, même si les conditions de survie des akinètes à la surface du sédiment sont bien décrites (i.e tolérance à l'obscurité, anoxie etc... (Kaplan-levy et al., 2010)), la caractérisation de l'intégrité et par extension, la caractérisation de la résistance de ces cellules restent très peu étudiées (Chapitre 1, II, 4). De plus, les études existantes sont très difficiles à comparer entre elles et se focalisent généralement sur une seule souche d'intérêt (Baker and Bellifemine, 2000; Hori et al., 2003). Par conséquent à l'heure actuelle, il reste difficile de comparer la tolérance d'akinètes appartenant à différent(e)s genres/espèces vis-à-vis d'un facteur écologique.

Lorsque les akinètes sont encore intacts dans les sédiments, ils peuvent concentrer plusieurs dizaines de fois leur génome par rapport à des cellules végétatives (Sukenic et al., 2012b). Par conséquent, les akinètes peuvent être considérés comme porteurs de l'ensemble du contenu génétique des blooms passés de Nostocales. En effet, des travaux récents (Sukenic et al., 2012b) suggèrent que la composition génétique des akinètes est similaire à celle des cellules végétatives. Cependant, aucune étude n'a mis en évidence la présence de gènes impliqués dans la synthèse de cyanotoxines dans ce type cellulaire. La quantification et la détection de gènes impliqués dans la biosynthèse de cyanotoxines dans les sédiments restent également peu étudiées. Les principales études se concentrent principalement sur les microcystines. En effet, la détection et la quantification de certains gènes impliqués dans la biosynthèse de cette cyanotoxine, et parfois de leurs transcrits, ont déjà été réalisées et quantifiés dans les sédiments lacustres de surface et profond (Ihle et al., 2005; Kim et al., 2010; Misson et al., 2011a). Récemment, *mcyA* a été détecté dans des carottes sédimentaires issues des lacs Greifensee et Zurich (Suisse) intégrant plus de 100 ans d'histoire (Monchamp et al., 2016). En revanche, toutes les études disponibles à l'heure actuelle concernant la détection des gènes de la biosynthèse de l'anatoxine-a ne sont réalisées qu'en milieu lotique (Cadel-Six et al., 2007; Gugger et al., 2005; Wood et al., 2007) ou dans la colonne d'eau en milieu lacustre (Ballot et al., 2010a; Rantala-Ylinen et al., 2011; Sabart et al., 2015) et rien n'a encore été proposé concernant la phase benthique de ces milieux lacustres.

Dans ce contexte, les travaux détaillés dans ce chapitre se focalisent sur plusieurs aspects permettant de mettre en évidence le potentiel toxique des akinètes. Dans un premier temps, la mise au point d'un protocole de biologie moléculaire permettant de détecter un gène impliqué dans la biosynthèse de l'anatoxine-a, présent en faible quantité et surtout à partir d'une matrice riche en inhibiteurs qu'est le sédiment lacustre, a été nécessaire. Pour se faire, la majorité des amorces existant dans la littérature, ciblant soit le gène *anaC* ou le gène *anaF*, ont été testées suivant une démarche la plus intégrative possible. Par conséquent, ces couples d'amorces furent d'abord testés sur un panel de cultures cyanobactériennes regroupant 2 souches non productrices d'anatoxine-a (témoin négatif) et 7 autres productrices, regroupant 4 genres distincts (*Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* et *Phormidium*) issus de 2 ordres différents (Nostocales et Oscillatoriales). Ensuite, les amorces ont été testées sur 14 sites différents principalement localisés dans le Massif Central, regroupant à la fois des échantillons d'eau et de sédiment. Ces sites présentaient un gradient d'hétérogénéité important de par leur nature (naturel, plan d'eau, barrage), leur statut trophique (oligo-mesotrophe à hyper-eutrophe), la composition spécifique et la biomasse cyanobactérienne présentes.

Suite à la sélection du protocole le plus performant, la recherche de gènes impliqués dans la biosynthèse de l'anatoxine-a a été entreprise dans les akinètes, selon la même stratégie que celle employée ci-dessus. Tout d'abord, la première partie de ces travaux s'est focalisée sur 4 souches cyanobactériennes appartenant à 3 genres différents : *Aphanizomenon*, *Dolichospermum*, productrices d'anatoxine-a, et *Cylindrospermopsis*, non productrice. Ensuite, la seconde partie de ces travaux a porté sur des sédiments de surface prélevés sur le lac d'Aydat (63) en Décembre 2014 et Avril 2015. Après adaptation d'un protocole utilisé pour extraire les colonies de *Microcystis* du sédiment (Misson, 2011), les akinètes de 2 espèces de *Dolichospermum* ont ainsi pu être étudiés. Afin de caractériser uniquement les akinètes, le protocole a été prolongé pour éliminer toutes les cellules végétatives cyanobactériennes et l'ADN libre présents dans les échantillons d'akinètes. Pour être complet dans cette caractérisation des akinètes benthiques, nous souhaitons être en mesure d'identifier précisément les akinètes intègres, c'est-à-dire ceux non lysés et donc potentiellement capables de germer. Le développement de ce protocole multi-étapes a également permis de comparer la résistance d'akinètes issus de 6 espèces différentes, et au cours de 2 saisons différentes pour les échantillons environnementaux, vis-à-vis de différents facteurs abiotiques.

## **II) Article 1**

---

### **Molecular tools to detect anatoxin-a genes in aquatic ecosystems: Toward a new nested PCR-based method**

Benjamin Legrand<sup>a,b,c,\*</sup>, Jerome Lesobre<sup>a,b</sup>, Jonathan Colombet<sup>a,b</sup>, Delphine Latour<sup>a,b</sup>, Marion Sabart<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, LMGE, BP 10448, Clermont-Ferrand F-63000, France

<sup>b</sup>CNRS, UMR 6023, LMGE, BP 80026, Aubiere Cedex F-63171, France

<sup>c</sup>Athos-environnement, 112 Avenue du Brézet, Clermont-Ferrand F-63100, France

**Article publié dans**

**Harmful Algae 58, 16-22 (2016)**

Received: 10 May 2016; Received in revised form: 11 July 2016; Accepted: 12 July 2016

Academic Editor: Christopher J. Gobler





## Abstract

Over the last few decades, cyanobacterial mass occurrence has become a recurrent feature of aquatic ecosystems. This has led to ecosystem exposure and health hazards associated with cyanotoxin production. The neurotoxin anatoxin-a and its homologs can be synthesized by benthic cyanobacterial species in lotic systems, but also by planktonic lacustrine species such as *Dolichospermum* (also known as *Anabaena*). However, only a few studies have focused on anatoxin-a occurrence and its biosynthesis genes in freshwater lakes. The initial aim of this study was to evaluate the molecular tools available in the literature to detect anatoxin-a biosynthesis genes in lacustrine environments. Having tested different sets of PCR primers, we found that some sets of primers, such as *anxC*, were too specific and did not amplify anatoxin-a biosynthesis genes in all producing strains. On the other hand, some sets of primers, such as *atxoa*, seemed not to be specific enough, amplifying numerous non-specific bands in environmental samples, especially those from sediments. Furthermore, *anaC* and *anaF* amplification exhibited different band intensities during electrophoresis, suggesting a high variation in number of gene copies between samples. As a result, we proposed a new nested PCR-based method which considerably improved the amplification of the *anaC* gene in our environmental samples, eliminating non-specific bands and weak detections. Using this tool, our study also highlighted that anatoxin-a genes are widely distributed throughout freshwater lakes. This suggests the need for further ecological investigations into anatoxin-a in these ecosystems.

## 1. Introduction

Cyanobacterial proliferations are known to be common in aquatic ecosystems worldwide (Paerl et al., 2011). These microorganisms are able to produce toxins which can be divided into classes of molecules depending on their toxic action: hepatotoxic, neurotoxic and dermatotoxic. The presence of these cyanotoxins in freshwater can cause environmental, economic and health problems (Chorus and Bartram, 1999; Codd et al., 1999). The hepatotoxic microcystins are the most ubiquitous and the most highly studied of the cyanotoxins; around half of the literature on cyanobacterial toxins focuses on them (Merel et al., 2013). However, a multitude of other cyanotoxins exists, which may also represent potential hazards for animals and human beings (Briand et al., 2003). Among these cyanotoxins, anatoxin-a (ANTX) is a neurotoxic alkaloid which binds to the nicotinic acetylcholine receptors of mammals, inducing muscular paralysis which can lead to death (Carmichael, 1992). Anatoxin-a and its homologs can be synthesized by several cyanobacterium species, especially by species belonging to the Oscillatoriales and Nostocales orders (Harada et al., 1993; Mann et al., 2012). This toxin was mostly studied in lotic environments after cases of dog poisoning (Gugger et al., 2005; Cadel-Six et al., 2007; Wood et al., 2012), but recent studies also highlighted its occurrence in several lacustrine systems (Ballot et al., 2010b; Rantala-Ylinen et al., 2011; Sabart et al., 2015).

ANTX has frequently been detected and quantified in cyanobacterial cultures and environmental samples using selective and sensitive analytical chemical methods such as LC-MS (Chen et al., 2012) or GC-MC (Zotou et al., 1993).

Recent advances in molecular technology have made it possible to identify and characterize biosynthesis ANTX gene clusters. Firstly, ANTX biosynthesis gene clusters have been sequenced and characterized in certain cyanobacterial strains: *Oscillatoria sp.* PCC 6506 (Méjean et al., 2009), *Anabaena sp.* 37 (Rantala-Ylinen et al., 2011), *Oscillatoria sp.* PCC 6407 and *Cylindrospermum stagnale* PCC 7417 (Shih et al., 2013) and recently in three strains of *Cuspidothrix issatschenkoi* CHABD3, RM-6 and LBRI48 (Jiang et al., 2015). This cluster is composed of 10 genes, called *ana*, termed *anaA* to *anaJ* (Mejean et al., 2014). Based on this discovery, a few sets of general or genus-specific PCR primers have been designed to target specific synthesis genes, particularly *anaC* (Rantala-Ylinen et al., 2011) and *anaF* (Cadel-Six et al., 2009; Ballot et al., 2010a). However, the primers only became available recently and have not been applied to a large number of different samples yet, especially in lacustrine environments. Furthermore, it has not been possible to detect *anaC*

genes reliably in environmental samples, probably due to problems related to primer specificity (Sabart et al., 2015).

In this context, our first objective was to test the molecular tools available in the literature for the amplification of *ana* genes. Our second objective was to develop and optimize a nested PCR method based on existing molecular tools to improve the detection of ANTX genes in environmental samples. For this purpose, we compared the amplification of *ana* genes in cyanobacterial strains and planktonic and benthic samples from several French lakes where proliferations of potentially ANTX-producing cyanobacteria occur.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Cyanobacterial strains*

Seven ANTX-producing strains and two non-producing strains were used in our study (Table 1). All these strains were purchased from the University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry, Division of Microbiology and Biotechnology Helsinki (HAMBI) and the Paris Museum Collection (PMC).

A few milliliters of each cyanobacterial culture were centrifuged into pellet cells. The pellets were stored at -20°C until molecular analyses were carried out.

### *2.2. Field sampling and samples used*

We sampled fourteen lakes located in the center of France. They were chosen because cyanobacteria were abundant, with various genera present, sometimes forming blooms. All these lakes showed large degrees of heterogeneity in terms of trophic status, maximal depth ( $z_{\max}$ ), area, origin and altitude (Table 2). Villerest dam was sampled at two different geographic points, the first next to the dam and the second in Presle at the start of the reservoir. All the other lakes were sampled at their deepest point.

Surface water (0.5 m depth) was collected in the summers of 2011 and 2012 at six lakes using an 8 L Van Dorn Bottle. Water samples were stored in dark, cool conditions until their transfer to the laboratory. 1–0.75 L of water sample were filtered using 8 mm polycarbonate filters (TETP filters Merck Millipore) using a vacuum pump. Sediment was sampled between 2011 and 2013 using a sediment corer (UWITEC devices, Mondsee, Austria). Cores were immediately opened on return to the laboratory and the top layer of sediment (2 cm) was collected. Filters and sediment samples were stored at 20°C until molecular analyses were carried out.

Chapitre 2 : Mise en évidence du potentiel toxique des akinètes

**Table 1: Main characteristics of the different cyanobacterial strains used.**

Strain	ANTX producer	Origin	Country	Collection	Reference
<i>P. favosum</i> PMC 204.04	+	Loue River	France	PMC	Gugger et al., (2005)
<i>O. agardhii</i> 193	+	Lake Hormajärvi	Finland	HAMBI	Sivonen et al., (1989)
<i>D. flos-aquae</i> 14	+	Lake Sääskjärvi	Finland	HAMBI	Sivonen et al., (1989)
<i>D. circinalis</i> 54	+	Lake Sääskjärvi	Finland	HAMBI	Sivonen et al., (1989)
<i>D. circinalis</i> 86	+	Lake Villikkalanjärvi	Finland	HAMBI	Sivonen et al., (1989)
<i>D. mendotae</i> 130	+	Lake Säyhteenjärvi	Finland	HAMBI	Rapala et al., (1993)
<i>A. flos-aquae</i> 3	+	Lake Långsjön	Finland	HAMBI	Sivonen et al., (1989)
<i>A. gracile</i> PMC 627.10	-	Champs-sur-Marne water body	France	PMC	Leudreux et al., (2010)
<i>C. raciborskii</i> PMC 98.14	-	Francs pecheurs Pound	France	PMC	Bernard et al., (2003)

**Table 2: Main geographic, morphometric and biological characteristics of the sampled lakes Respectively *Aph* corresponds to *Aphanizomenon* genus, *Aphanoc.* to *Aphanocapsa*, *Aphanot.* to *Aphanothece*, *Cyl.* to *Cylindrospermopsis*, *Dol.* to *Dolichospermum*; *Lim.* to *Limnothrix*, *Mic.* to *Microcystis*; *Pseu.* to *Pseudanabaena*; *Syn.* to *Synechococcus*; *Wor.* To *Woronichinia*.**

	Type	Trophic statut	Area (ha)	Depth max (m)	Altitude (m)	Lattitude N	Longitude E	Sampling	Main genus present	Cyanobacterial cells concentration (cells.mL <sup>-1</sup> )
Aydat	Natural	Hypereutrophic	60	15	825	45°39'50.58"	2°59'04.09"	Water/sediment	<i>Dol., Aph.</i>	80 000
Pavin	Natural	Oligomesotrophic	44	92	1 192	45°29'45.38"	2°53'17.53"	Water	<i>Syn., Dol.</i>	170 000
Villerest dam	Dam	Hypereutrophic	770	40	320	45°59'10"	4°2'53.99"	Water/sediment	<i>Mic., Aph., Dol.</i>	250 000
Villerest Presle						45°55'55.4"	4°01'58.5"	Water	<i>Mic., Wor., Pseu.</i>	50 000
Grangent	Dam	Hypereutrophic	365	50	420	45°28'0.95"	4°14'53.63"	Water	<i>Microcystis</i>	50 000 000
Fades-Besserves	Dam	Eutrophic	385	60	497	45°54'47.05"	2°45'08.39"	Water/sediment	<i>Lim., Dol., Pseu.</i>	10 000
Cournon	Artificial	Hypereutrophic	6	5	352	45°44'31.45"	3°13'07.93"	Water	<i>Cyl., Dol., Aph., Pseu.</i>	40 000
Cunlhat	Artificial	Eutrophic	4	3.2	497	45°37'24.35"	3°33'34.42"	Sediment	<i>Aphanoc., Syn.</i>	
Tour d'Auvergne	Artificial	Mesotrophic	5	6	932	45°32'01.93"	2°41'04.27"	Sediment	<i>Syn., Aphano.</i>	
St. Rémy	Artificial	Eutrophic	14	7	640	45°53'41.21"	3°36'01.11"	Sediment	<i>Syn., Aphano.</i>	
Lavalette	Dam	Meso-eutrophic	205	60	802	45°8'59.82"	4°12'42.37"	Sediment	<i>Dol.</i>	
Aubusson	Artificial	Mesotrophic	28	13	408	45°44'51.68"	3°36'28.44"	Sediment	<i>Aphanoc., Aphanot.</i>	
Ambert	Artificial	Eutrophic	2.5	2.5	528	45°32'53.05"	3°43'59.27"	Sediment	<i>Aphanoc., Aphanot.</i>	
Lapeyrouse	Artificial	Eutrophic	25	8.5	490	46°13'24.56"	2°52'00.18"	Sediment	<i>Aphanoc., Aphanot.</i>	
Ile Charlemagne	Artificial	Eutrophic	28	3	92	47°53'40.99"	1°56'40.99"	Sediment	<i>Dol.</i>	

### 2.3. DNA extraction

DNA extraction from cyanobacterial strains and water samples was performed following a phenol-chloroform procedure as described in Sabart et al. (2015). 500  $\mu\text{L}$  of cell lysis buffer (0.05 M Tris-HCl, 0.05 M NaCl, 0.05M EDTA at pH 8) was passed through the filters. Then samples were sonicated (20 s, 50% cycles, 20 kHz, Sonoplus HD2070, Bandelin). 50  $\mu\text{L}$  of lysozyme (50 mg  $\text{L}^{-1}$ ) was added and the tubes were incubated at 37 °C for 60 min. 50  $\mu\text{L}$  of SDS (10%) was then added prior to incubation at 70°C for a further 15 min. After that, samples underwent a classic phenol-chloroform extraction with ethanol DNA precipitation.

Genomic DNA from sediment samples was extracted using the FastDNA<sup>®</sup> Spin kit for soil (MP biomedical<sup>®</sup>) following the manufacturer's instructions.

DNA concentration in each sample was estimated using a UV spectrophotometer (Nanodrop<sup>®</sup> ND 2000), and samples were stored at 20 °C until further analysis.

### 2.4. PCR amplifications

#### 2.4.1. Cyanobacterial 16S rRNA gene amplification

The cyanobacterial 16S rRNA gene was amplified by PCR using cyanobacterial specific primers from Nubel et al. (1997) in order to check for the presence of cyanobacterial DNA after the extraction process and the absence of PCR inhibitors in the samples prior to *ana* gene amplification.

#### 2.4.2. *anaF* and *anaC* gene amplification

Five sets of primers described in the literature were used in this study. Three of them, *anaC*-gen-2, *anxgen* and *anxC*, targeted the *anaC* gene whereas *antx* and the set of primers *atxoa-f* and *atxa-r* targeted the *anaF* gene (Table 3).

For all used primer sets used, the PCR mixture and program were optimized. Each reaction was carried out in a final volume of 25  $\mu\text{L}$  and included 5  $\mu\text{L}$  Colorless GoTaq<sup>®</sup> Flexi 5X Buffer, 0.2 mM of each corresponding primer, 0.2 mM desoxynucleoside triphosphate (dNTP), 3 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.625 U GoTaq G2 Hot Start Polymerase (Promega, France). For the *atxoa* primer set, 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 1.5 U of the same Taq were used. Bovine Serum Albumin (BSA) was added to each reaction at 3 mg.mL<sup>-1</sup> except for *atxoa* (4 mg mL<sup>-1</sup>) and *anaC*-gen-2 (1 mg mL<sup>-1</sup>). 20–40 ng of environmental DNA was used. PCR programs are detailed in Table 4.

**Table 3: Primers used to amplify *anaC* and *anaF* genes.**

Primer name	Sequence (5'-3')	Target gene	Type of primers	Gene Amplicon size (bp)	Application	References
anaC-gen-F2	TCTGGTATTCAAGTMCCTCYAT	<i>anaC</i>	General	366	General PCR, sequencing, RFLP	Sabart et al., (2015) modified from Rantala-Ylinen et al., (2011)
anaC-gen-R2	CCCAATARCCTGTCATCAA					
anxgen-F2	ATGGTCAGAGGTTTTACAAG	<i>anaC</i>	General	861	General PCR, sequencing	Modified from Rantala-Ylinen et al., (2011)
anxgen-R	CGACTCTTAATCATGCGATC					
anxC-F	TGAGGGAACAAGTGAGTT	<i>anaC</i>	Designed and tested only with <i>Dolichospermum sp.</i> 37	813	Sequencing	Rantala-Ylinen et al., (2011)
anxC-R	ATCATCTCCGATCCCAATCC					
anaC-anab-F	GCCCGATATTGAAACAAGT	<i>anaC</i>	Dolichospermun specific	263	Genus-specific PCR	Rantala-Ylinen et al., (2011)
anaC-anab-R	CACCCTCTGGAGATTGTTTA					
antx-F	CGCAAATCGATGCTCACTTA	<i>anaF</i>	General	412	General PCR	Cadel-Six et al., (2009)
antx-R	CCACTGGCTCCATCTTGATT					
atxoa-F	TCGGAAGCGCGATCGCAAATCG	<i>anaF</i>	General	461	General PCR	Ballot et al., (2010)
atxa-R	GCTTCCTGAGAAGGTCCGCTAG					

**Table 4: PCR programs used to amplify *anaC* and *anaF* genes by classical and nested PCR.**

Name of primers	Initial denaturation 95°C	Number of cycles	Cycles PCR	Final elongation 72°C
Atxoa	10min	35	60s at 95°C, 60s at 59°C, 60s at 72°C	10min
Anxgen-2	2min	40	30s at 95°C, 60s at 55°C, 60s at 72°C	5min
AnxC	10min	40	30s at 95°C, 60s at 55°C, 60s at 72°C	5min
Antx	2min	40	30s at 95°C, 45s at 55°C, 60s at 72°C	5min
Antx 2	2min	40	30s at 95°C, 45s at 55°C, 60s at 72°C	5min
AnaC-gen-2	2min	40	30s at 95°C, 30s at 58°C, 30s at 72°C	5min
AnaC Anab	2min	35	30s at 95°C, 60s at 50°C, 45s at 72°C	10min
Nested	5min	35	30s at 95°C, 66s at 55°C, 60s at 72°C	5min

### 2.4.3. *anaC* gene nested PCR

To improve the amplification signal of the *anaC* gene in environmental samples, we developed a nested PCR method based on the use of anxgen and anaCgen primers (Rantala-Ylinen et al., 2011). The first PCR was performed with the anxgen primers as described above. PCR products were then purified. Firstly, 1.5  $\mu\text{L}$  Sodium acetate 3M (pH: 5.2) and 37.5  $\mu\text{L}$  cold 100% ethanol were added to 15  $\mu\text{L}$  PCR product. Solutions were incubated for at least 1 h at  $-20^{\circ}\text{C}$  and then centrifuged at 15,000 rcf, at  $4^{\circ}\text{C}$  for 20 min. Supernatants were thrown away and the pellets were put into suspension in 100  $\mu\text{L}$  cold ethanol 70%. Samples were centrifuged again for 10 min under the same conditions. Finally, the pellets were dried for 10 min in a concentrator 5301<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg, Germany) and once again put into suspension in 20  $\mu\text{L}$  molecular water. In the second PCR with purified products, several sets of primers were tested to determine the best couple in terms of band intensity and specificity of the amplification. The four combinations of primers anxgen-F2/anxgen-R, anxgen-F2/anaC-gen-R2, anaC-gen-F2/anxgen-R, and anaC-gen-F2/anaC-gen-R2 provided amplicon sizes of 861, 707, 520 and 366 pb respectively. Amplification reaction mixtures were prepared as described above with 1  $\mu\text{L}$  purified PCR products. The PCR procedure used is detailed in Table 4.

### 2.4.4. Visualization of PCR products and their ‘semi-quantification’

PCR products were put into 1% agarose gel with  $0.3\text{ mg L}^{-1}$  ethidium bromide and migrated in a TAE buffer 0.5X at 100 V for 30 min. Gels were put under UV light and investigated using Gel Imager (ScienceTech) with the software VisionWorksLS vers.6.5 (Upland, USA). Band localization and intensity from electrophoresis gels were defined with GelAnalyser vers. 2010a ([www.gelanalyzer.com](http://www.gelanalyzer.com)). Estimation of band intensity was performed using this software and samples were classified into 4 groups: positive samples in which the band intensity was at least 10% of the positive control intensity band; weakly positive samples of 2–10%, almost undetectable samples were below 2%, and negative samples where no PCR product was observed. *Phormidium favosum* PMC 240.04 and *D.14* were used as positive controls.

### 2.4.5. Cloning and sequencing of the *ana* genes

Selected PCR products were sequenced to confirm the amplification of the expected gene (*anaC* or *anaF*). Positive PCR products were cloned with the pGEM<sup>®</sup>-T Vector System II kit



(Promega, France) following the manufacturer's instructions. Some white colonies were randomly picked from each clone library and tested by PCR. Plasmids were extracted from positive colonies using the NucleoSpin Plasmid kit<sup>®</sup> (Macherey-Nagel, France). MWG biotech performed sequencing using the commercial SP6 primers. *anaC* and *anaF* gene sequences were confirmed by BLAST. They have been deposited in the GenBank-EMBL database under the accession numbers KX096803-KX096819.

### 3. Results

#### 3.1. Optimization of the *anaC* gene detection by nested PCR

The cyanobacterial 16S rRNA gene was detected easily, with high band intensity, in all studied samples (Table 5), eliminating the possibility of PCR inhibitions.

Having established this, four primer combinations were tested in order to choose the best set for the second PCR. Electrophoresis resulted in different patterns that allowed us to choose the more specific primer pairs (Fig. 1). The set anxgen-F2/anxgen-R showed a single, specific band for the positive control *Phormidium favosum* PMC 240.04 but several non-specific bands were present in the sediment samples. Specific and non-specific products were also detected with the sets anxgen-F2/anaC-gen-R2 and anaC-gen-F2/ anaC-gen-R2 either for the positive control and/or the sediment samples.

The set anaC-gen-F2/anxgen-R was the only one which provided a single PCR product with the expected size (520 pb) in the three kinds of samples. Thus, this set was chosen to be used for the second PCR for all the tested strains and environmental samples.

#### 3.2. PCR detection in the cyanobacterial strains

The amplification of *anaC* and *anaF* genes with the tested sets of primers exhibited different patterns (Table 5). For the *anaC* gene, high band intensity was observed for all positive PCR products. The primers anaC-anab and anxC only gave positive results for the *Dolichospermum* strains (also known as *Anabaena*, Komàrek (2015)). On the contrary, *anaC* gene was amplified in all ANTX producer strains with anxgen-2, anaCgen-2 and nested PCR. The amplification of the *anaF* gene with axtoa primers produced high band intensity for all cyanobacterial cultures, except for *Aphanizomenon flos-aquae* 3, where the detection was low (only 1% of the fluorescence intensity of the positive control). Detection of the *anaF* gene using antx primers was positive in all strains except for *Dolichospermum* 54 and *A. flos-aquae* 3. Finally, the *anaC* and *anaF* genes were not detected in the non-ANTX producer

**Table 5: Results of the amplification of *anaF* and *anaC* genes by PCR with all tested samples depending on the set of primers used. +++ represented samples which the band intensity was at least 10% of the positive control intensity band, + between 2 and 10%, ± below 2% and – without specific PCR product. NS represented samples with several non-specific bands which make it impossible to know if the sample was positive or not.**

	Primers name	Cyanobacterial 16S rRNA gene	<i>anaF</i> gene		<i>anaC</i> gene				
			atxoa	antx	anaCanab	anxC	anxgen-2	anaCgen-2	nested
Cyanobacterial strains	<i>P. favosum</i> PMC 204.04	+++	+++	+++	–	–	+++	+++	+++
ANTX producer strains	<i>O. agardhii</i> 193	+++	+++	+++	–	–	+++	+++	+++
	<i>D. flos-aquae</i> 14	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	<i>D. circinalis</i> 54	+++	+++	–	+++	+++	+++	+++	+++
	<i>D. circinalis</i> 86	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	<i>D. mendotae</i> 130	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	<i>A. flos-aquae</i> 3	+++	+	–	–	–	+++	+++	+++
	<i>A. gracile</i> PMC 627.10	+++	–	–	–	–	–	–	–
	<i>C. raciborskii</i> PMC 98.14	+++	–	–	–	–	–	–	–
Water samples	Aydat	+++	–	–	–	+++	–	–	–
	Pavin	+++	+	+	–	–	+++	+++	+++
	Villerest dam	+++	NS	–	–	+++	+++	+++	+++
	Villerest Presle	+++	NS	–	–	+/-	–	–	+++
	Grangent	+++	+	–	+/-	–	–	–	–
	Fades-Besserves	+++	–	–	–	–	–	–	+++
	Cournon	+++	+	+	–	–	–	–	+++
Sediment samples	Aydat	+++	+++	–	–	–	–	+/-	+++
	Villerest dam	+++	+++	–	–	NS	+	+	+++
	Fades-Besserves	+++	+	–	–	+++	+++	+	+++
	Cunlhat	+++	NS	–	–	NS	+	–	+++
	Tour d’Auvergne	+++	NS	–	–	NS	NS	–	–
	St. Rémy	+++	NS	+/-	–	+++	+	+++	+++
	Lavalette	+++	+	–	–	+	–	–	+++
	Aubusson	+++	+++	–	–	–	–	+	+++
	Ambert	+++	NS	–	–	+/-	–	+++	+++
	Lapeyrouse	+++	–	–	–	NS	+++	+	+++
	Ile Charlemagne	+++	NS	–	–	NS	–	–	+++

strains, *Cylindrospermopsis raciborskii* PMC 98.14 and *Aphanizomenon gracile* PMC 627.10, for all of the primers used (Table 5).

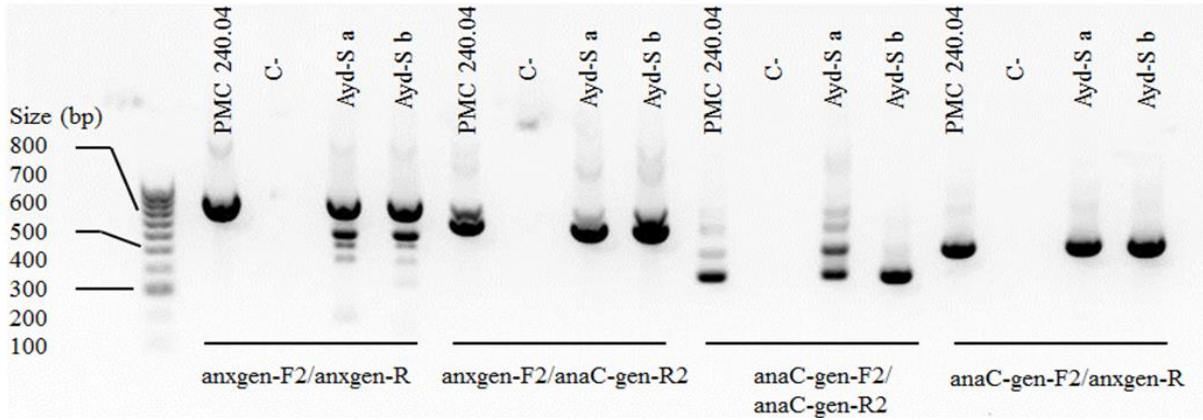
### 3.3. PCR detection in environmental samples

Results obtained for *anaC* and *anaF* gene detection were more variable in the environmental samples than in the cyanobacterial strains. Indeed, almost all samples lacked positive amplification for all the tested sets of primers for a single gene. For example, the *anaF* gene was weakly detected in sediment from Lavalette with *atxoa* primers, but not with *antx* primers. The same applies to *anaC*, as this gene was detected using nested PCR whereas it was weakly highlighted with *anxC* and not detected at all with *anaC-anab*, *anxgen-2*, *anaCgen-2* (Table 5).

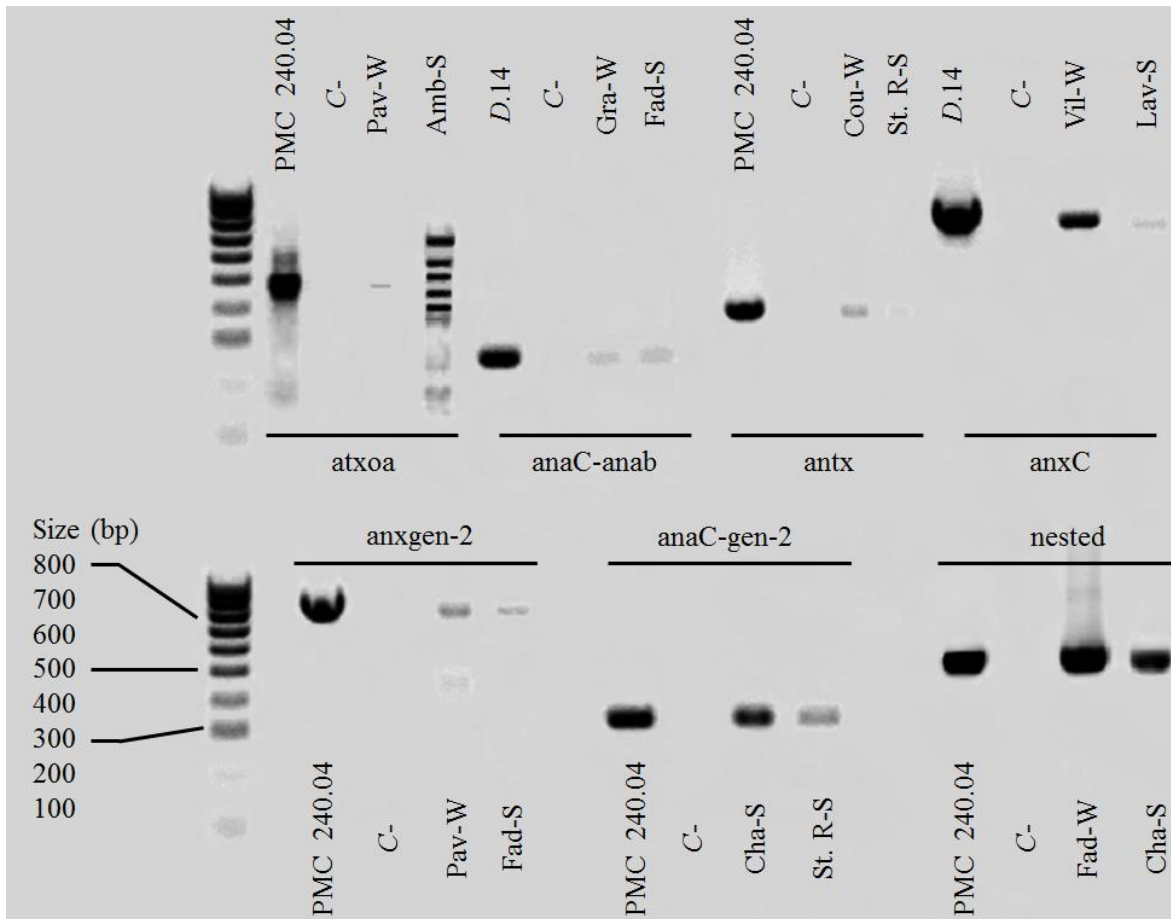
Furthermore, several samples presented some non-specific bands despite the PCR optimization with *atxoa*, *anxC* and *anxgen-2* primer sets. This was particularly true in sediment samples, with five out of eleven samples exhibiting these non-specific bands with *atxoa* primers (see for example Amb-S sample on Fig. 2).

*Antx* and *anaCanab* primers gave few positive results in both water and sediment samples (Table 5). Only one sample was positive in the sediments of St. Remy and Fades-Besserves for *antx* and *anaCanab*, respectively. In the water samples, two positive results were obtained with *antx* (Pavin and Cournon) and one with *anaCanab* (Grangent). Furthermore, their band intensities were weak or almost undetectable during electrophoresis (Fig. 2).

More positive results for *anaC* gene detection in environmental samples were obtained with the general sets of primers *anxgen-2*, *anaC-gen-2* (7–8 positive samples out of 17). However, the nested PCR provided the highest number of positive results, with only 3 negative samples (sediment from la Tour d'Auvergne, and water samples from Grangent and Aydat). Nested PCR also highlighted the *anaC* gene in samples where this gene was not detected by any other set of primers used, such as the water sample from Fades-Besserves and sediment from Ile Charlemagne. Finally, all positive samples showed high band intensity (at least 10% of the positive control) and no aspecific products were found with this method in any of the samples.



**Fig. 1:** Electrophoresis of the different tested sets of primers for the second nested PCR. Ayd-S a corresponds to the pure sample from Aydat sediment and Ayd-S b to a dilution of the same sample by a factor of 10. The strain *Phormidium favosum* PMC 240.04 has been used as a positive control. C – corresponds to the negative control.



**Fig. 2:** Electrophoresis gel with representative from Table 3 used primers. The W and S correspond to the type of sample (W for water and S for sediment) and the first 3 letters correspond to the abbreviation of the sampled site referred in Table 1 excepted for C – which corresponds to the negative control and PMC 240.04 and D.14 which correspond to *P. favosum* PMC 240.04 and *Dolichospermum* 14 considered as positive control.

## 4. Discussion

### 4.1. Assessment of existing molecular tools for detecting anatoxin-a genes

In this study, we compared the primers available for the amplification of *ana* genes in cyanobacteria. Our investigations were performed on nine cyanobacterial strains and eighteen lake samples from both planktonic and benthic compartments in order to determine the most suitable tools to conduct further ecological studies on anatoxin-a in lacustrine ecosystems. Overall, the universal sets of primers atxoa (Ballot et al., 2010a), anxgen-2 and anaCgen-2 (Rantala-Ylinen et al., 2011) produced a positive amplification with high band intensity and no non-specific bands in almost all ANTX producing cyanobacterial strains. *Dolichospermum* specific primers anaC-anab and anxC amplified the *anaC* gene in the ANTX producer *Dolichospermum* strains alone, confirming the specificity of these primers (Rantala-Ylinen et al., 2011). However the non-detection of *anaF* with antx primers for *D.* 54 and *A.* 3 suggests that these primers were also too specific.

Moreover, on a given environmental sample for an individual gene, some primers produced a positive amplification while others did not (Table 5, Fig. 2). Although DNA from environmental samples may contain some inhibitors such as humic and fulvic acids (Jackson et al., 1997; Pan et al., 2002) which may affect the efficiency of PCR (Yilmaz et al., 2009), the amplification of the cyanobacterial 16S rRNA gene in all tested samples rules out the inhibition of PCR as an explanation for the absence of amplification of the *ana* genes. In addition, results obtained for the environmental samples confirm the over-specificity of some primers described above and in a previous study (Sabart et al., 2015).

In addition, other tested primers, such as atxoa or anxC, showed a pattern with several non-specific bands for the environmental samples, in particular the sediment samples. These non-specific bands were closely related to the potential PCR products in term of size and DNA concentration, making it hard to determine the presence or absence of *anaC* and *anaF* genes (Fig. 1). This observed pattern may be explained firstly by a lack of specificity in these primers, combined with an ultra-dilution of the targeted genes in environmental matrices. Indeed, outside bloom periods in a water column, and especially in sediment, cyanobacteria are not the dominant phylum (Haller et al., 2011). Consequently, cyanobacterial DNA is diluted by DNA from other phyla such as Bacteria and Archaea.

All these results suggest that the currently available primers are not well suited to the detection of the *ana* gene in complex environmental matrices or in samples with potentially

low numbers of the target genes. Problems of primer specificity highlighted here may be due to a high sequence variability of ANTX biosynthesis genes between genera, but also within the same genus. Indeed, to our knowledge, the *ana* gene cluster has only been entirely sequenced for one *Dolichospermum* strain, one *Oscillatoria* strain and three *Cuspidothrix* strains. Furthermore, little is known about the genetic diversity of these genes in the environment. This high variability may lead to the non-detection of ANTX genes or to an underestimation of cyanotoxin producers in complex environmental matrices as previously suggested (Sabart et al., 2015; Shams et al., 2015).

#### *4.2. Nested PCR: a better approach for the detection of the anaC gene in lacustrine environments*

Nested PCR is a successive double-PCR method currently used in several domains, such as biomedicine and parasite detection (Berkhout et al., 1995). This method is particularly suited to the detection of genes where they occur in a minority (Vissers et al., 2009), even for cases where only a small number of the target gene are present in a sample (Parvathi et al., 2007). By means of these properties, nested PCR has already been used to detect target genes in water (Vissers et al., 2009), as well as in sediment samples (Williamson et al., 1999). Furthermore, some authors have already highlighted the toxic potential of microcystin using this method (Nonneman and Zimba, 2002).

To our knowledge, this is the first documentation of the *anaC* gene being amplified using nested PCR on environmental samples. This method alleviates the drawbacks described above, and allows us to obtain a sufficient amplification product, without the non-specific or weak bands observed using the classic PCR (Rantala-Ylinen et al., 2011, in this study). Moreover, the better resolution of nested PCR may allow us to detect the presence of *anaC* whereas it might have been missed using classic PCR. Indeed, only two water samples which were positive with just one set of primers were not positive with nested PCR, corresponding to 13% of failure with the whole tested samples. However, this proportion is low compared to classic PCR. Indeed, the percentage of failure was at least of 47% for classic PCR. Moreover, nested PCR allowed the detection of *anaC* in three samples in which the gene was not detected at all with classical PCR, and five samples in which it was slightly detected with only one set of primers, increasing the detection by 50% (e.g. water from Presle, sediment from Aydat, Villerest, Lavalette and Aubusson, Table 5).

Thus, although this method greatly increases the *anaC* gene detection compared to classic PCR methods, improvements are needed in the primers' design to systematically detect all

*anaC* genes. However, a better design of *ana* primers will be possible only when new *ana* genes clusters from cyanobacterial strains will be sequenced.

Despite these problems of primers specificity, the sensitivity of nested PCR could be a reliable tool for monitoring the toxic potential of cyanobacteria in lacustrine environments as it is applicable to any environmental sample. Moreover, by sequencing the PCR amplicons, this method can brought information on the cyanobacterial species possessing the target genes. The nested PCR method is complementary to the recently developed real-time quantitative PCR targeting the *anaC* gene and applied to environmental samples (Wang et al., 2015). Indeed, quantitative PCR quantifies the gene copies number in the samples, and thus is useful for studying the dynamics of the potentially toxic genotypes in the environment.

In conclusion, our study highlights that molecular tools to detect ANTX biosynthesis genes are limited in a number of ways, particularly with respect to the specificity of available primers. This makes it difficult to detect these genes in complex matrices, leading to the development of a nested PCR method. The use of nested PCR in our field samples allowed us to detect the *anaC* gene in most of the studied lakes, including both water and sediment samples. Our work revealed a major and unexpected occurrence of this gene in our studied sites, and this is probably the case for a lot of other lacustrine ecosystems. Nevertheless, further investigations are required to better understand the occurrence and distribution of *ana* genes in freshwater environments.

### **Acknowledgments**

This work was funded by the Fonds Europe´ en de De´veloppement Re´gional (FEDER; n8 PRESAGE 34103) and the Etablissement Public Loire in the program “Plan Loire Grandeur Nature 2007-2013” by way of a postdoctoral fellowship associated to the PROFECY project. BL was supported by a CIFRE PhD fellowship from the French National association for Research and Technology (ANRT) in the AKINET project funded by the Loire-Bretagne Water Agency (AELB). We thank Marianne Coulon and Fran Van Wyk de Vries for helping to improve the English text. We also gratefully acknowledge the editor and the reviewers for their helpful comments and suggestions.[CG].

### III) Article 2

---

## Characterization of akinetes from cyanobacterial strains and lake sediment: A study of their resistance and toxic potential

Benjamin Legrand<sup>a,b,c,\*</sup>, Amélie Lamarque<sup>a,b</sup>, Marion Sabart<sup>a,b</sup>, Delphine Latour<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, LMGE, BP 10448, Clermont-Ferrand F-63000, France

<sup>b</sup>CNRS, UMR 6023, LMGE, BP 80026, Aubiere Cedex F-63171, France

<sup>c</sup>Athos-environnement, 112 Avenue du Brézet, Clermont-Ferrand F-63100, France

Article publié dans

**Harmful Algae 59**, 42-50 (2016)

Received: 23 May 2016; Received in revised form: 13 September 2016; Accepted: 15 September 2016

Academic Editor: Christopher J. Gobler





**ABSTRACT**

Nostocalean cyanobacteria are known to proliferate abundantly in eutrophic aquatic ecosystems, and to produce several cyanotoxins, including anatoxin-a. In this study, we investigated both the resistance and toxic potential of the akinetes (resistant cells), using cyanobacterial cultures and akinetes extracted from the sediment of Lake Aydat (France) sampled in the winter and spring. Intact and lysed akinetes were differentiated using a double control based on the autofluorescence of akinetes and SYTOX-green staining. The percentage of resistant akinetes found in several different abiotic stress conditions was highly variable, depending on the species and also on the sampling season. Thus, the resistance of akinetes and their ability to germinate seems to follow a species-specific process, and akinetes can undergo physiologic changes during the sedimentary phase of the Nostocale life cycle. This study also revealed the first evidence of anatoxin-a genes in akinetes, with *anaC* and *anaF* genes detected in akinetes from all cyanobacterial producer cultures. The low number of *anaC* genes, almost exclusively detected using nested PCR, in the sediment at Lake Aydat suggests a limited but existent past population of toxic Nostocales in this lake. Given the key role of akinetes in the annual cycle and subsequent summer proliferation, it can be interesting to integrate the surveillance of akinetes in the management of lakes exposed to recurrent cyanobacterial blooms.

Keywords: Cyanobacteria, nostocales, intact akinete, isolation protocol, abiotic resistance *anaC* and *anaF* genes, anatoxin-a

## 1. Introduction

Over the last few decades, cyanobacterial blooms have become recurrent in marine and freshwater eutrophic ecosystems (Heisler et al., 2008; Paerl et al., 2011; Lei et al., 2014). These blooms contribute to casualties in fish (Osswald et al., 2007a), cattle (Devlin et al., 1977), dogs (Gugger et al., 2005), and even humans (Pouria et al., 1998) due to cyanotoxin production by cyanobacteria. These toxins are diverse and are classified depending on their toxic action. Anatoxin-a (ANTX), which is a neurotoxin, was the first cyanotoxin to be described, isolated and functionally defined (Huber, 1972). Anatoxin-a is an alkaloid that acts as a potent nicotinic acetylcholine receptor agonist, causing toxic effects including muscle fasciculation, gasping, convulsions and death by respiratory arrest in vertebrates (Carmichael, 1992; Ballot et al., 2010a). ANTX has been detected in rivers and lakes in Europe, North America, Japan and New Zealand (Namikoshi et al., 2003; Gugger et al., 2005; Shih et al., 2013; Méjean et al., 2014; Sabart et al., 2015). Recently, advances in molecular tools have led to specific primers being designed to investigate the gene cluster of ANTX (Rantala-Ylinen et al., 2011). The *ana* gene cluster is composed of 10 genes from *anaA* to *anaJ*, and is under 1 to several kb in length (Méjean et al., 2014). Most previous work has focused on *anaC* and *anaF*, making the PCR primers for these two genes powerful tools for detecting ANTX genes in laboratory strains or for environmental monitoring (Ballot et al., 2010a; Sabart et al., 2015). Nevertheless, the few data concerning ANTX occurrence in the environment do not enable the potential spatio-temporal dynamics of this toxin to be determined (Sabart et al., 2015; Ruiz et al., 2013; Gobler et al., 2007). Therefore an increased understanding of their dynamics by means of further data and more sensitive tools is needed to aid management of ANTX in lakes.

ANTX is produced by several genera: *Phormidium* (Wood et al., 2012), *Oscillatoria* (Méjean et al., 2009), *Anabaena* (Devlin et al., 1977) (i.e. *Dolichospermum* (Komàrek, 2015)), *Aphanizomenon* (Rapala et al., 1993). The ability of Nostocale cyanobacteria, such as *Dolichospermum*, to differentiate their vegetative cells into heterocysts and akinetes (Argueta et al., 2006) means that they play a key role in the life cycle of these organisms in temperate zones (Mehnert et al., 2014). For example, when the environmental conditions become unfavorable for Nostocales, certain vegetative cells start to differentiate into akinetes. These akinetes settle down onto the surface of the sediment and overwinter there, in this resting stage (Kravchuk and Ivanova, 2009). In spring, when environmental conditions become favorable again, the akinetes germinate and young filaments rise back up through the water column (Rücker et al., 2009). On the other hand, the akinetes may also play an important role

in cyanobacterial populations during a bloom (Baker and Bellifemine, 2000). Moreover, as the genome in akinetes can be multiplied 15-fold compared to vegetative cells (Sukenik et al., 2012), these resting cells also contribute to the conservation of their genetic heritage through time. These characteristics make akinetes important links between two successive Nostocales blooms. Thus, studying akinetes in the sediment could provide a better understanding of the previous bloom and may make it possible to anticipate future proliferations, and in particular their toxic potential. To assess these hypotheses and potentially use them in cyanobacterial bloom management, it is first necessary to confirm the presence of ANTX genes in akinetes, and secondly, to determine the resistance of akinetes several cyanobacterial species and their response to the length of time spent in the sediment. Thus, the aims of this study are to develop a method for isolating, identifying and counting intact akinetes; then to target ANTX genes which are only found in the akinetes, to highlight the potential role of these resting cells in the transfer of the capacity for ANTX biosynthesis to the next cyanobacterial generation. Hence, we used cyanobacterial cultures of known ANTX producers to develop the methodological protocol, before applying this method to field samples of surface sediment from Lake Aydat where ANTX had already been detected (Sabart et al., 2015).

## 2. Materials and methods

### 2.1 Cyanobacterial strains

In this study, four cyanobacterial species derived from cultures were used. Three of them had the ability to produce anatoxin-a (ANTX) (Rapala et al., 1993; Rouhiainen et al., 1995). *Aphanizomenon flos-aquae* strain 3, *Dolichospermum mendotae* strain 130 and *Dolichospermum circinalis* 86 were respectively isolated from Lake Langsjön, Lake Säuhteenjärvi and Lake Villikkalanjärvi (Finland), during 1986 bloom events (Sivonen et al., 1989; Rapala et al., 1993; Rouhiainen et al., 1995). *Cylindrospermopsis raciborskii* PMC 98.14 was isolated from the “Francs-Pêcheurs” pond in Viry- Châtillon (France). This strain is known to be a non-producer of neurotoxin (Bernard et al., 2003). Cultures were grown using Z8X medium at 20°C with a continuous white light. To induce akinete formation, stationary cultures were put in these conditions without phosphorus. After three weeks, the cultures were progressively placed at 4°C without light.

### 2.2 Studied location and Sampling Strategy

Lake Aydat (45839 0 48 00 N, 02859 0 04 00 E) is a naturally dammed lake which is located in the Massif Central (France) at 838 m above sea level. It originates from the damming of the river Veyre by a basaltic lava flow which occurred 7500 years ago. This river is now the only tributary for the lake. The lake spreads over 60 ha and its maximal depth is 15 m. Lake Aydat is known to have a eutrophic status with autumnal blooms of *Dolichospermum* (Gerphagnon et al., 2013a; Sabart et al., 2015). Following the bloom, two series of sediment sampling were carried out using a sediment corer (UWITEC devices, Mondsee, Austria). The first was performed after the sedimentation of cyanobacterial particles on 17 December, 2014, and the second just before the beginning of akinete recruitment, on 14 April, 2015. Water supernatant was eliminated by siphoning. The water sediment interface was placed into tubes and kept in dark conditions at 4 °C until analysis. For each series, the same 5 points were sampled: P1, P2, P3, P4 and P5 (Fig. 1).



Fig. 1. Bathymetric map of Lake Aydat and sampling station locations.

### *2.3 Sediment akinete extraction*

Akinetes in the surface sediment were extracted using a density gradient; for each sample 109 mL of sediment were used. For 1 mL of sediment 1.3 mL of ludox and 2.3 mL of distilled water were added. After sonication (40s, frequency: 50%, power: 80 W, Sonoplus Bandelin<sup>®</sup>), the solution was centrifuged at 12,000 x g for 30 min. Then, the ludox supernatant was pipetted and filtered under pressure (around 53 kPa) using a 10 mm nylon filtration tissue. This was then cleaned with a minimal volume of distilled water. In order to remove larger particles (organic and mineral particles but also Chroococcales colonies), the solution was washed firstly through a 100 µm, and then through a 50 µm nylon filtration tissue. Lastly, the akinetes were put in a final volume of 4.9 mL of distilled water.

### *2.4 Akinete isolation*

In order to isolate the akinetes alone, several steps were necessary to eliminate all vegetative cells from cultures or sediment. Firstly, culture and sediment solutions were sonicated (30 s, frequency: 50%, power: 80 W, Sonoplus Bandelin<sup>®</sup>). In order to eliminate vegetative cells, samples underwent a treatment with lysozyme. For an optimal result, 1:50 (v/v) of lysozyme 1 mg.mL<sup>-1</sup> and 1:10 (v/v) of Tris-HCl 100 mM were added to the solution and incubated in the dark at 25 °C for 1 h. In order to stop the reaction, samples were centrifuged at 10,600 x g at 4 °C for 10 min. Pellets were dried using a concentrator 5301<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg Germany) for 15 min. 200 µL of distilled water was added to the pellet and the solution was homogenized by pipetting. Samples were then treated with turbo DNase following the manufacturer's instructions. Finally, solutions containing akinetes were centrifuged (10,000 x g) and suspended in 500 µL of molecular water. This step was repeated 3 times and the supernatants of these 3 washes (W1, W2, W3) were collected and analyzed by PCR to check that all DNA residues were eliminated. After these washes, pellets were once again suspended in 500 µL of molecular water and the samples were ready for DNA extraction.

### *2.5 Microscope counts*

In order to discriminate intact akinetes from empty ones, 1 µL of SYTOX GREEN 1 (50 mM) was added for 1 mL of isolated akinete solution, following Gerphagnon et al. (2013b). The resulting solutions were incubated in the dark for at least 30 min. 50 µL of this solution was filtered using a 0.2 µM or 8 µM filter (GTTP or TEPT filters respectively, Merck Milipore, Tullagreen, Ireland) for cyanobacterial cultures and sediment samples respectively. A quarter of the filter was placed under a cover on a slide and counted by performing transects

of the whole sample (x 200 magnification) using an epifluorescence microscope (Laborlux S, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). The akinete number was determined in triplicate for each step of the isolation protocol. Two counts were performed for each step: the first at 546 nm to determine intact akinetes still containing chlorophyll pigments; and the second at 488 nm to discriminate damaged akinetes with SYTOX green staining.

#### 2.6 Germination of intact akinetes from sediment

Intact akinetes extracted from the sediment were placed in 600  $\mu\text{L}$  of BG11. In this case, the akinetes did not undergo an isolation protocol (only the akinetes used for DNA analysis underwent the isolation protocol). The akinete solutions were incubated at 20°C with continuous white light (6  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Experiments were carried out in triplicate and 50  $\mu\text{L}$  of each triplicate were collected and counted every twelve hours. A germinated akinete is considered to be one which has broken its wall or has a young filament issuing from a germinated akinete (between four and sixteen cells).

#### 2.7 DNA extraction and cyanobacterial 16S rRNA gene amplification

The DNA of each akinete sample was extracted using a FastDNA<sup>®</sup> Spin kit for soil (MP biomedical<sup>®</sup>), following the manufacturer's instructions. The presence of cyanobacterial DNA was determined by performing a cyanobacterial 16S rRNA gene PCR with a set of primers from Nubel et al. (1997). The PCR mixture was composed of 5  $\mu\text{L}$  of colorless GoTaq<sup>®</sup> flexi 5X Buffer, 2.5 mM of  $\text{MgCl}_2$  solution, 0.2 mM of dNTPS, 0.4 mM of each primer, 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  of Bovine Serum Albumin (BSA), and 1.5 U GoTaq<sup>®</sup> G3 Hot Start Polymerase in a final volume of 25  $\mu\text{L}$ . The PCR program was 94°C for 5 min, 30 cycles of 94°C for 1 min, 56°C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final elongation of 72°C for 10 min.

#### 2.8 ANTX-a gene amplification

Three kinds of PCR were performed in order to detect the presence of the ANTX gene cluster in the samples. Two of these targeted the *anaC* gene and the other *anaF* (Table 1). The *anaC*-gen-F2 and R2 were used under the same conditions as Sabart et al. (2015), while the *anaC* nested PCR used the same conditions as Legrand et al. (2016a).

The nested PCR 1 program was 95°C for 5 min, 35 cycles of 95°C for 1 min, 52 °C for 1 min 72°C for 30 s and a final elongation of 72°C for 10 min. The nested PCR 2 program differed from the first program by steps of 30 s during 35 denaturation cycles and elongation and a melting temperature of 55 °C during hybridization. At the end of this, the PCR products were purified by ethanol precipitation, as in Legrand et al. (2016a).

## Chapitre 2 : Mise en évidence du potentiel toxique des akinètes

The last PCR, which targeted the *anaF* gene using the atxa-F and atxa-R primers, was performed based on Ballot et al. (2010a). The PCR mixture was exactly the same composition as for the anaC-gen-F2 and R2 couple. The PCR program was 95°C for 10 min, 35 cycles of 95°C for 1 min, 59°C for 1 min, 72°C for 25 sec, and a final extension of 72°C for 10 min.

**Table 1: Primers used during PCR to amplify target genes.**

Type of PCR	Primer name	Sequence (5'-3')	Target gene	Gene Amplicon size (bp)	References
Classic PCR	cya359F cya781R	GGGGAATYTTCCGCAATGGG GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT	Cyanobacterial 16S rRNA gene	403	Nubel et al., (1997)
Classic PCR	anaC-gen-F2 anaC-gen-R2	TCTGGTATTCAGTMCCCTCYAT CCCAATARCCTGTCATCAA	<i>anaC</i>	366	Rantala-Ylinen et al. (2011) and Sabart et al., (2015)
Nested PCR 1	anxgen-F2 anxgen-R	ATGGTCAGAGGTTTTACAAG CGACTCTTAATCATGCGATC	<i>anaC</i>	861	Legrand et al., (2016) modified from Rantala-Ylinen et al. (2011)
Nested PCR 2	anaCgen-F2 anxgen-R	TCTGGTATTCAGTMCCCTCYAT CGACTCTTAATCATGCGATC	<i>anaC</i>	519	Legrand et al., (2016) modified from Rantala-Ylinen et al. (2011)
Classic PCR	atxa-F atxa-R	TCGGAAGCGCGATCGCAAATCG GCTTCCTGAGAAGGTCGCTAG	<i>anaF</i>	461	Ballot et al., (2010)

### 2.9 Statistical analysis

Shapiro–Wilk and Bartlett tests were performed on all data in order to check if samples followed a normal distribution and if homoscedasticity variance was respected. These tests were carried out with Past software vers. 3.04 and XLSTAT vers. 2015.3.01.19199 respectively. Then data was submitted to log<sub>10</sub> normalization (Warton et al., 2006; Litchman et al., 2007) and the two first tests were performed again.

In order to determine whether the isolation protocol used induced a significant loss of akinete and vegetative cell concentrations, a one way ANOVA was performed for each condition (Past software). Then, in order to see which steps of the isolation protocol might have affected the cellular concentrations, a post hoc Tukey test was carried out with a 5% level of significance.

Finally, to detect if differences exist, due to the species and the sampling season, in the percentage of resistant akinetes over the whole isolation protocol, a two way ANOVA was performed with a post hoc Tukey test with a 5% level of significance.

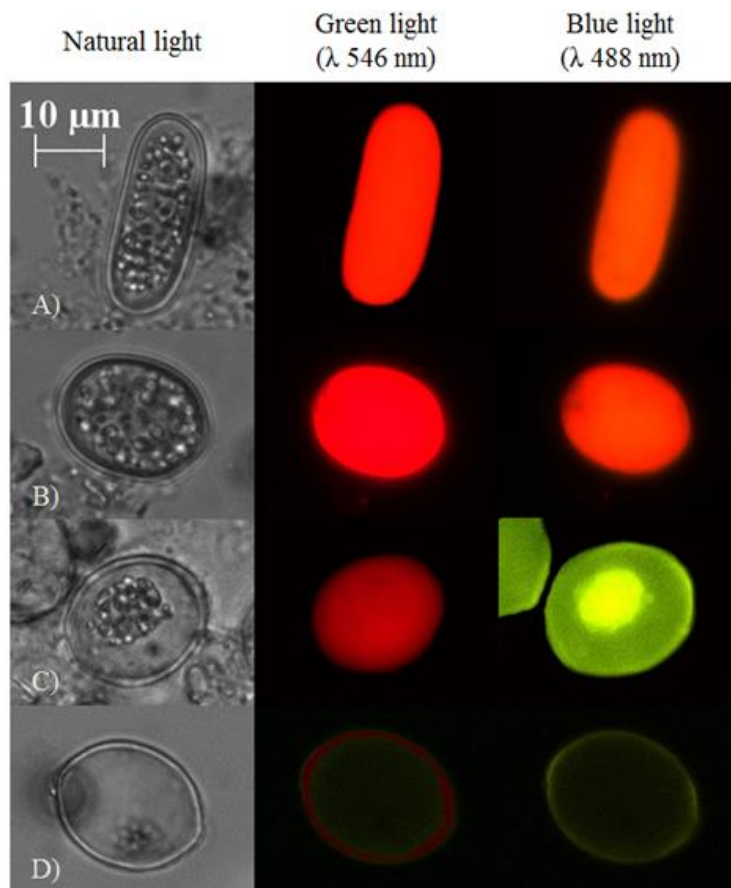


### 3. Results

#### 3.1 Discrimination of akinete types using SYTOX green®

The addition of SYTOX green to the akinete solution allows the different states of the akinete to be distinguished (Fig. 2). Intact akinetes appeared red under both green and blue fluorescence. Empty akinetes with some cell residue (Fig. 2C) can appear red under green light fluorescence, but with SYTOX green marking they are yellow under blue light excitation. The emission of fluorescence for empty akinetes without cell residues was weaker than the other states. These akinetes (Fig. 2D) show no or limited fluorescence under red light excitation, whereas under blue light emission they appear yellow due to SYTOX green marking on DNA residues on the cellular walls.

Furthermore, germination experiments have been carried out with intact akinetes extracted from sediment samples. 93% ( $\pm 6$ ) and 96% ( $\pm 6$ ) of intact akinetes of *Dolichospermum macrosporum* and *flos-aquae* germinated after three and six days of incubation respectively.



**Fig. 2:** Photomicrographs of akinetes with different light emissions. From right to left: natural, green and blue light. Lane (A) represents an intact akinete of *Dolichospermum flos-aquae*. The three others lanes represent akinetes of *Dolichospermum macrosporum*. Lanes (B, C, and D) show an intact akinete, a lysed akinete with some residues, and an empty akinete, respectively.

### 3.2 Akinete isolation from cyanobacterial cultures

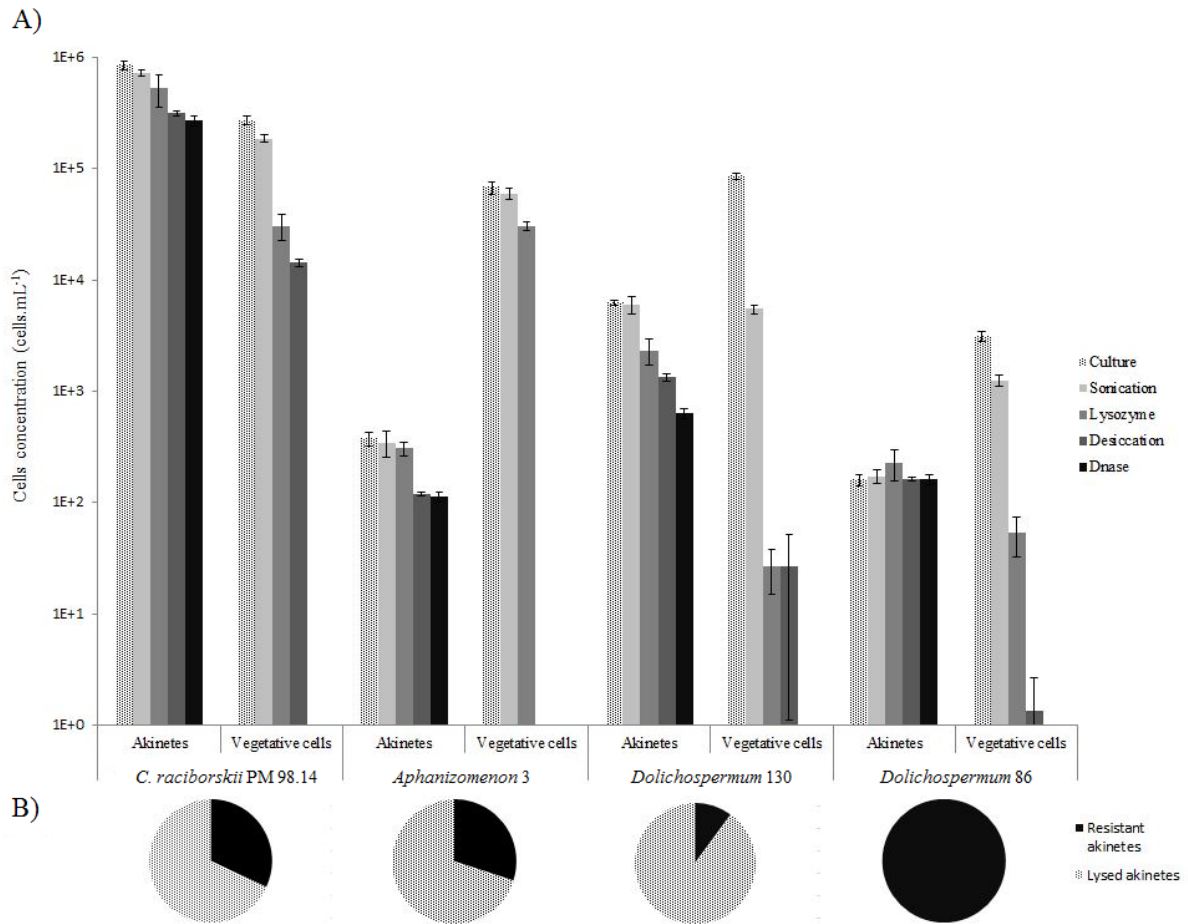
Using the results from the SYTOX green stain, we focused only on intact akinetes, and for the rest of the study only those akinetes which remained intact during the isolation protocol were considered as resistant akinetes.

The ratio akinete: vegetative cells is variable depending on the species: *Aphanizomenon* 3, *Dolichospermum* 130 and 86 showed very low ratios of akinetes, with only 0.05, 5 and 7% of formed akinetes, respectively, whereas *Cylindrospermopsis raciborskii* PMC 98.14 had 76%. During the different treatment steps vegetative cells showed a major decrease, resulting in a “staircase” profile. This decrease was not significant after the sonication step, apart from *Dolichospermum* 130 (Table 2), when the number of vegetative cells fell significantly after each step until they disappeared completely after the desiccation step for *Aphanizomenon* 3 and the DNase step for the others (Fig. 3-A).

The dynamics of the akinete concentration during isolation process varied depending on the species and allowed us to determine resistant akinetes (Fig. 3A and B). The sonication step did not affect the akinete concentration for any species. The number of akinetes of *Dolichospermum* 86 did not shown any significant change during the different treatment steps and stayed at around 160 akinetes per mL of medium, which revealed the most resistant species tested (Fig. 3, Table 2). *Cylindrospermopsis raciborskii* PMC 98.14 and *Aphanizomenon* 3 gave similar results with a progressive decline of resistant akinetes between each step (Fig. 3, Table 2) reaching respectively 32% and 30% of resistant akinetes at the end of treatment. *Dolichospermum* 130 underwent a series of reductions of akinete number, from the lysozyme step to the final DNase step (Fig. 3A, Table 2). Finally, *Dolichospermum* 130 had the lowest percentage of final resistant akinetes, at 10% (Fig. 3B).

**Table 2: ANOVA 1 tests on the steps of the isolation protocol for each cyanobacterial cellular culture and type. Letters represent significant differences from post hoc Tukey test.**

	Vegetatives cells				Akinetes			
	C. PM 98.14	A. 3	D. 130	D. 86	C. PM 98.14	A. 3	D. 130	D. 86
ANOVA 1 <i>p</i> value	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,14826
Cultures	a	a	a	a	a	a	a	a
Sonication	a	a	b	a	ab	a	a	a
Lysozymes	b	b	c	b	bc	a	b	a
Desiccation	c	c	cd	c	cd	b	c	a
Dnase	d	c	d	c	d	b	d	a



**Fig. 3: Cyanobacterial vegetative cell and intact akinete abundances depending on the treatment (A) and percentage of intact akinetes which resisted all treatment steps (B).**

### 3.3 Akinete extraction and isolation from Lake Aydat sediments

The ludox protocol was used to extract akinetes from sediment in Lake Aydat. Two dominant species were observed: *Dolichospermum macrosporum* and *Dolichospermum flos-aquae*. The number of intact akinetes in each sample was very heterogeneous for both species, with values of between 800 and 6000 extracted akinetes per gram of dry sediment (gDW<sup>-1</sup>) for *D. macrosporum*, and between 100 and 2900 akinetes gDW<sup>-1</sup> of sediment for *D. flos-aquae*. By the end of the final treatment step all residual Chroococcale colonies had been eliminated, with only resistant intact akinetes remaining in each sample.

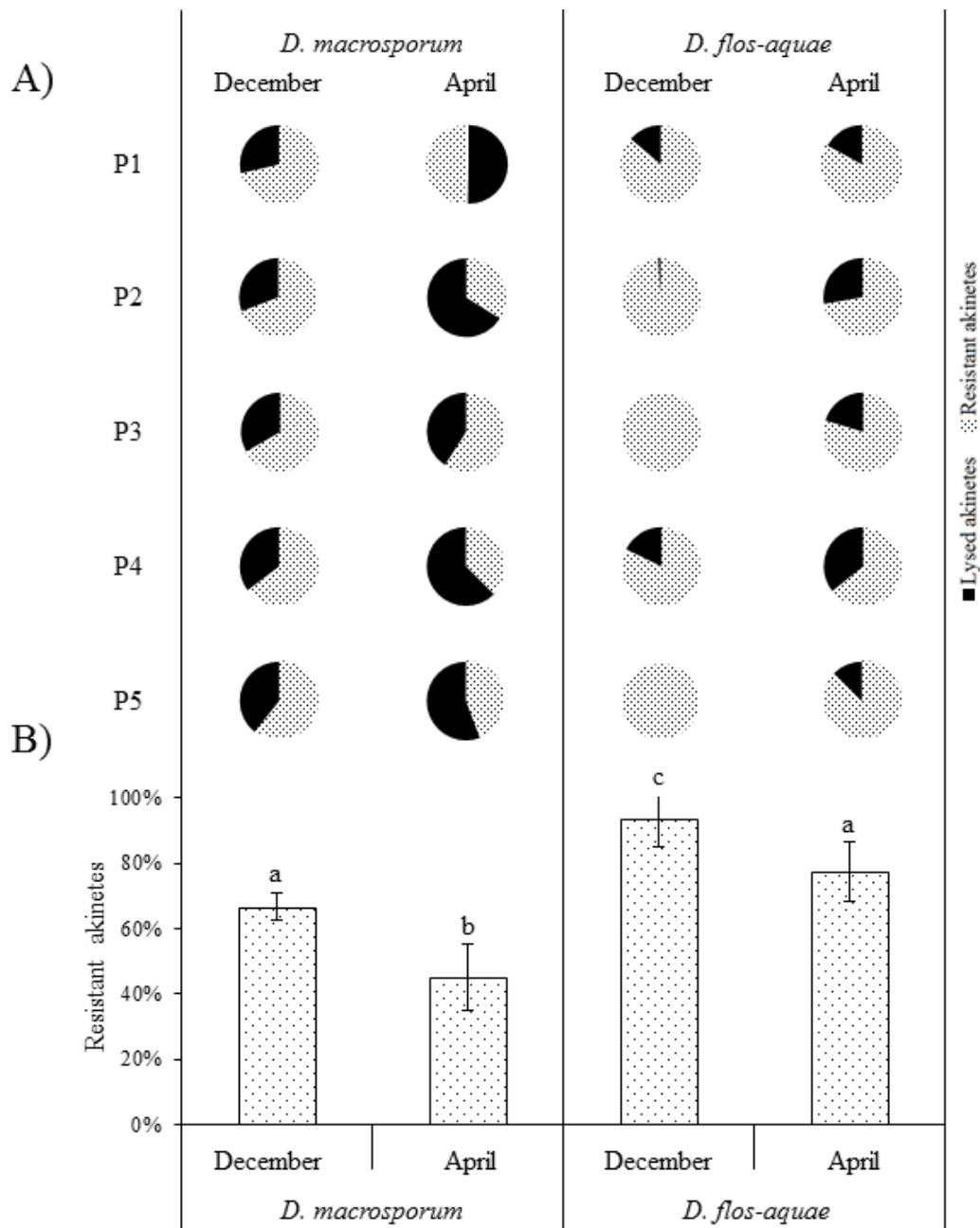
The percentage of resistant akinete at the end of the treatment seemed to be variable within a species. Values ranged between 34 and 71% (P2apr and P1dec) for *Dolichospermum macrosporum* and between 64 and 100% (P4avr and P3dec; P5dec) for *Dolichospermum flos-aquae* (Fig. 4A). There also appears to be a difference in resistance with the season. In December 2014 this percentage was predominantly between 61–71% and 82–100% for *D. macrosporum* and *D. flos-aquae* respectively, whereas values for April 2015 were between

34–59% and 64–87%. The mean percentage of resistant akinete resulting from the isolation protocol significantly changes with the season and the species (two way ANOVA with  $p = 0.00018$  and  $p = 2.16 \cdot 10^{-06}$  respectively, with  $DF = 19$ ) (Fig. 4B). Indeed, the percentage of resistant akinetes of *D. macrosporum* was significantly lower in April 2015 (45%  $\pm 10$ ) than in December 2014 (67%  $\pm 4$ ) ( $p = 0.0015$  with a post hoc Tukey test (Tt)). The same trend was clearly visible for *D. flos-aquae*, with 77%  $\pm 9$  in April 2015 and 94%  $\pm 8$  resistant akinetes in December 2014. This difference was also significant ( $p = 0.02$  with Tt). The percentage of intact akinetes present at the end of the treatments was also statically different depending on the species: in December 2014, the percentage of resistant akinetes was lower for *D. macrosporum* than *D. flos-aque* ( $p = 0.007$  with Tt), as well as in April 2015 ( $p = 0.0002$  with Tt).

### 3.4. Anatoxin-a gene in akinetes

To highlight the toxic potential of akinetes, we first worked on cyanobacterial cultures after having eliminated all vegetative cells. In all types of akinete samples (from cultures or sediment) and for each sample, the presence of cyanobacterial 16S rRNA gene was detected (Table 3). For each sample too, the 3 DNA washes (W1, 2, 3) were analyzed in PCR and no DNA was amplified for any gene. With respect to the culture samples, no ANTX genes were detected in *Cylindrospermopsis raciborskii* PM 98.14. On the contrary, all studied ANTX genes: *anaC* (classical and nested PCR) and *anaF* were detected in the ANTX producer strains *Aphanizomenon* 3, *Dolichospermum* 130 and 86.

There is a greater contrast in the results for akinetes extracted from Lake Aydat sediment. Firstly, *anaF* gene was not found in any sediment sample (Table 3). P5apr was the only sediment sample which was positive for *anaC* during electrophoresis after classic PCR. This sample was also positive for the same gene when using nested PCR. The presence of *anaC* gene was also detected in P1apr, P2apr and P4dec using nested PCR.



**Fig. 4: Percentage of resistant akinetes after the akinete isolation process from Lake Aydat sediment for the species and the season. (A) Detail for each sampling station, (B) Mean for the whole lake.**

**Table 3: Presence/absence of Cyanobacterial 16S rRNA gene and targeted ANTX genes in intact akinetes from cyanobacterial cultures and sediment samples from Lake Aydat.**

	Cyanobacterial 16S rRNA gene		<i>anaC</i>		Nested <i>anaC</i>		<i>anaF</i>	
	Sample	W <sub>1,2,3</sub>	Sample	W <sub>1,2,3</sub>	Sample	W <sub>1,2,3</sub>	Sample	W <sub>1,2,3</sub>
<i>C. raciborskii</i> PM 98.14	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aphanizomenon</i> 3	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Dolichospermum</i> 130	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Dolichospermum</i> 86	+	-	+	-	+	-	+	-
P1 <sub>dec</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-
P1 <sub>apr</sub>	+	-	-	-	+	-	-	-
P2 <sub>dec</sub>	+	-	-	-	+	-	-	-
P2 <sub>apr</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-
P3 <sub>dec</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-
P3 <sub>apr</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-
P4 <sub>dec</sub>	+	-	-	-	+	-	-	-
P4 <sub>apr</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-
P5 <sub>dec</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-
P5 <sub>apr</sub>	+	-	+	-	+	-	-	-

## 4. Discussion

### 4.1 Discrimination of akinete physiological states

Most studies focus on akinete germination to describe the different physiological states of the akinete. An akinete which has the ability to germinate is considered as being viable (Livingstone and Jaworski, 1980; Reddy, 1983; Hori et al., 2003; Wood et al., 2009). However, akinete germination is difficult to control and may fluctuate due to a number of parameters, such as temperature (Baker and Bellifemine, 2000; Cirés et al., 2013a), light (Rücker et al., 2009), O<sub>2</sub> concentrations (Yamamoto, 1976) and even the akinete extraction protocol (Hori et al., 2003). Furthermore, some authors consider akinetes as being viable or intact, when they seem intact under light or epifluorescence microscope (Thiel and Wolk, 1983; Baker and Bellifemine, 2000; Rücker et al., 2009; Ramm et al., 2012). However, the distinction between intact and slightly damaged akinetes, for example the first stage of akinetes being parasitized by fungi (Gerphagnon et al., 2013a) is impossible to detect using just the akinetes' natural autofluorescence. Ramm et al. (2012) proposed a CARD-FISH protocol to assist in the identification and quantification of akinetes. This method is time consuming (more than seven hours) with several sensitive steps, and success depends of the specificity of the probes used. Indeed, Ramm et al. (2012) have shown that only 73% of the *Anabaena* and *Aphanizomenon* strains (out of a total of 22 strains) were correctly labeled. Furthermore, this method does not allow all the different physiological states of akinetes to be identified. However, the combination of SYTOX green staining and autofluorescence control under green light (546 nm) is successful at carrying this out. Indeed, the SYTOX green, which stains the nucleic acids of permeabilized cells after only 30 min of incubation, allows the damaged akinetes to be clearly identified. In contrast, the intact akinetes (with intact cell

walls) are not visible with SYTOX green staining but they still contain photosynthetic pigments that are visible under green light. Thus, the double control based on the autofluorescence of the akinetes in green light and the SYTOX green staining in blue light allows the akinetes to be fully characterized, and is an easier and faster method than testing akinete germination. It is currently thought that intact akinetes are not necessarily viable and might not be able to germinate again. However, the high rate of germination of akinetes considered as intact, based on the SYTOX green method of *Dolichospermum macrosporum* and *Dolichospermum flos-aquae*, suggests that intact akinetes are also viable using this method.

The use of this staining protocol on sediment samples, combined with ludox extraction, gave reproducible and reliable results. Density gradients have already been used for extracting akinetes from sediment (Hori et al., 2002) and colonies of *Microcystis* from sediment samples (Verspagen et al., 2004; Misson et al., 2011b). The ludox has a density of  $1.4 \text{ g.cm}^{-3}$ , and can thus retain the akinetes since they have a density of around  $1.2 \text{ g.cm}^{-3}$  for *Anabaena cylindrica* (Hori et al., 2002). Furthermore the diatoms, with their heavy silica frustule, form pellets, thus limiting the risk of confusion between akinetes and diatoms which was raised by Ramm et al. (2012).

#### 4.2 Resistance of intact akinetes

Investigating new protocols to isolate akinetes from vegetative cells in cultures and lake sediment allows us also to test the resistance of akinetes to different abiotic stress conditions. In general, the resistance of intact akinetes depends on the species considered. Indeed, only the cyanobacterial culture of *D. 86* has akinetes which all resist, without loss, to our treatment. The other cultures used had lower akinete resistance (between 10 and 30%) which may be explained by differences in stress tolerance depending on the species. Similar results were obtained from sediment samples, with *Dolichospermum flos-aquae* akinetes being more resistant than the other species. This difference between species or even between strains to any factor has already been noted. For example, akinetes from some strains of *Anabaena cylindrica* are able to resist desiccation (Hori et al., 2003) while others do not (Baker and Bellifemine, 2000). The preferendum and tolerance thresholds of akinetes may depend on species-specific processes. Furthermore, the percentage of akinetes formed in cyanobacterial cultures is also highly variable depending on the species, under the same conditions with akinete inductors (Meeks et al., 2002b; Kaplan-Levy et al., 2010; Sukenik et al., 2013). Similar results seem to confirm that akinete differentiation was also triggered with a species-

specific regulation by environmental factors (Cirés et al., 2013a). Each cyanobacterial strain may be adapted to its own environment, and this kind of process contributes to explaining the distribution of Nostocales species in various ecosystems.

Seasonal changes may also affect the resistance of the akinetes. For example, akinetes in Lake Aydat sediment are more sensitive in April than in December. This trend is again more marked for *Dolichospermum macrosporum* than for *Dolichospermum flos-aquae*, probably relating once more to a species-specific difference. This greater sensitivity in April may also indicate a difference of physiologic state, which could correspond to a pre-germination state: some akinete species have a maturation period before germination is possible (Karlsson-Elfgren and Brunberg, 2004). Furthermore, 40% of the *D. macrosporum* akinetes from sediment sampled in April germinated after an incubation period of only 12 h, whereas akinetes from December took at least 3 days to germinate. This change in state may occur when spring conditions become favorable, making it possible for akinetes to germinate very quickly when these conditions are fulfilled. This suggests that the germination of akinetes of different species is not synchronous under the same environmental conditions in a lake. This could partly explain the succession of several nostocale species in a water column during the summer period.

#### 4.3 Highlighting the toxic potential of the akinetes

*anaC* and *anaF* PCRs were positive for the strains *Aphanizomenon* 3, *Dolichospermum* 86 and 130 which are known to be ANTX producers. This is the first study where anatoxin-a genes have specifically been highlighted in akinetes, although this result is not unexpected, given that the genome in akinete can be multiplied by 15-fold relative to vegetative cells (Sukenik et al., 2012b). The *anaC* ANTX gene was also detected in akinetes from Lake Aydat sediment, though only in a few samples. The non-detection of *anaF* gene in intact akinetes from the sediment may be due to a problem of specificity in the primers used. Indeed, this has been already noted for primers in the detection of ANTX genes in water samples (Sabart et al., 2015). Furthermore, the axtoa set of primers may to be inadequate for the detection of *anaF* in environmental matrices especially in sediment samples due to patterns with several non-specific bands. These bands are closely related to the band of interest in terms in size and DNA concentration, which makes it impossible to determine the presence or absence of the *anaF* gene in environmental samples (Legrand et al., 2016a).

Thus, positive detection of the *anaC* gene has been preferentially obtained using nested PCR in four sediment samples compared to only one with classic PCR. The nested PCR may



make it possible to detect a low number of a targeted gene, hence increasing the resolution of detection of classic PCR (Parvathi et al., 2007; Legrand et al., 2016a). This low percentage of positive samples, and especially the fact that these samples have been predominantly detected with nested PCR, seems to indicate a low percentage of akinetes that possess the ANTX genes. Moreover, the benthic spatio-temporal distribution of akinetes possessing ANTX genes appeared heterogeneous, with no general trend with respect to sampling station or season. It is now known, as for microcystin, that the proportion of genotypes possessing ANTX genes can change during the bloom period within a single sampling station (Graham et al., 2006; Sabart et al., 2015). Nevertheless, the heterogeneous benthic distribution of potential ANTX producers observed in Lake Aydat just after the bloom sedimentation process also suggests a heterogeneous distribution of potential ANTX producers within sampling sites occurring in the same lake. The same results were also found for MC producers (Briand et al., 2009), but no explanation was given. The changes observed in the benthic distribution of ANTX akinetes between December and April seem also to indicate that horizontal transport of benthic material, including akinetes, occurred during the winter period. Thus, in order to get a good overview of the ANTX potential of a lake, it appears necessary to sample several stations in benthic compartments.

Moreover, in addition to the geographic distribution of these akinetes in sediment, their temporal distribution should also be taken into account. Recent studies have highlighted genes involved in biosynthesis as well as cyanotoxin from sediment samples dating back several hundreds or thousands of years (Martinez De La Escalera et al., 2014; Waters, 2016). Thus the vertical distribution of akinetes in sediment may be used as a marker of the toxic potential of previous cyanobacterial proliferations.

#### ***4.4 Applications in terms of management: akinetes in sediment as a tool for lake assessment***

The role of the akinete life cycle is primordial and their contribution to new blooms may be essential (Hense and Beckmann, 2006). However, it is very difficult to quantify the contribution of akinetes to new blooms, and the parameters influencing the mobilization of akinetes may be very different from those regulating cyanobacterial vegetative cell growth and bloom formations. Nevertheless, for initial studies of new ecosystems, the detection of akinetes in the sediment can provide useful information. For example, the presence of akinetes at the sediment surface attests of the recent presence of a nostocalean proliferation. A more accurate investigation of deeper sediment, coupled with sediment dating, can also

provide information about the recurrence of cyanobacterial proliferations, their relative abundance from year to another, and the species which are present. In addition, determining whether akinetes possess ANTX biosynthesis genes could contribute interesting information in terms of management, as the presence of this gene may reflect a past toxic bloom. Even if the relationship between akinetes in the sediment and the bloom cannot be directly establish, the presence of ANTX gene in the sediment is a sign of the toxic potential of the future bloom. This would allow authorities to set up a management program and to reduce the toxic risk.

In this study we have only looked at the ANTX genes, but it is known that nostocalean species may also possess the ability to produce microcystin (Rapala and Sivonen, 1998) and cylindrospermospin (Shaw et al., 1999). Thus, investigation into several cyanotoxins genes conserved in akinetes in the sediment would provide a useful assessment of the potential toxins present in the lake. The study of akinete genes in sediment has the advantage of eliminating the temporal variability of cyanotoxins often observed in the water column (Sabart et al., 2015, 2010). Sporadic water analyses during the bloom period can potentially fail to detect cyanotoxins due to the spatio-temporal variations of cyanotoxin production, while sediment analysis allows the whole proliferation period to be sampled.

## **5. Conclusion**

This study develops a new method for distinguishing the different physiological states of akinetes. It highlights that the resistance of akinetes to abiotic factors is species-specific. The environmental conditions, depending on the season, also affect the sensitivity of akinetes, and thus the time-scale of the germination process. This can partly explain the temporal variation in planktonic emergence between different cyanobacterial species, with some appearing earlier in spring in the water column than others. This study also revealed the presence of anatoxin-a genes in akinetes, in both cyanobacterial cultures and the natural environment. Given their resilience over time and the key role they play in the annual life cycle of cyanobacteria, akinetes emerge as markers of the toxic potential of both past and future cyanobacterial proliferations. Nevertheless, a better understanding of the relationship between the spatio-temporal distribution of akinetes in sediment and the planktonic cyanobacterial abundance and toxicity is now needed to apply these findings to lake management.

## **6. Acknowledgments**

B.L. was supported by a Ph.D fellowship from the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie in collaboration with the society Athos-environnement in the context of

## *Chapitre 2 : Mise en évidence du potentiel toxique des akinètes*

Conventions Industrielles de Formation par la REcherche. This work was also funded by l'Agence de l'Eau Loire-Bretagne. We thank Antoine Thouvenot for his support during the field sampling, and Marianne Coulon and Fran Van Wyk de Vries for helping to improve the English text. We also gratefully acknowledge the editor and the reviewers for their helpful comments and suggestions. [CG].

---

**Chapitre 3 :**  
**Relation entre akinètes dans le**  
**sédiment récent et cellules végétatives**  
**dans la colonne d'eau**

---

*Chapitre 3 : Relation entre akinètes dans le sédiment récent et cellules  
végétatives dans la colonne d'eau*

## I) Introduction

---

Au cours du cycle de vie des Nostocales, la phase de persistance benthique constitue une véritable clé de voûte entre la précédente et la future population pélagique (Hense and Beckmann, 2006; Mehnert et al., 2014). Ainsi, les akinètes à la surface du sédiment seraient à la fois des marqueurs des populations passées mais aussi des indicateurs quant à la future prolifération.

Cependant, aucune étude ne s'intéresse précisément à la relation entre populations pélagiques passées et akinètes à la surface des sédiments. A ma connaissance, seuls Rücker et al., (2009) émettent l'hypothèse, sans explication précise, que la taille de l'inoculum d'akinètes présents à la surface des sédiments est proportionnelle à l'abondance de la population pélagique de *C. raciborskii* de l'année précédente (lac Melangsee, Allemagne). De plus malgré le fait que les facteurs induisant la formation des akinètes soient bien connus en milieux contrôlés (Kaplan-levy et al., 2010), il existe un important manque de connaissance sur l'efficacité de production en milieu naturel. En effet, la majorité des études portant sur la formation des akinètes sont basées à partir d'akinètes de culture (Kaplan-levy et al., 2010; Sarma, 2012; Sukenik et al., 2013). Quelques rares études se focalisent sur l'intensité de sporulation en milieu naturel (Mehnert et al., 2014) mais elle n'a jamais été mesurée sur la même espèce en intégrant plusieurs années de suivis.

L'implication des akinètes dans la mise en place de nouvelles populations pélagiques est plus étudiée, même si le manque de caractérisation fiable de l'intégrité des akinètes (limitée à l'observation du cytoplasme en microscopie optique) induit probablement une sous-estimation importante du pool d'akinètes capables de germer. Un consensus scientifique s'accorde à dire que les akinètes ont besoin de lumière pour germer et par conséquent ceux retrouvés sous la zone euphotique ne participeraient pas à la mise en place de nouvelles populations. Cependant, certaines cyanobactéries, comme *Anabaena azollae*, possède des akinètes capables de germer à l'obscurité en présence de fructose (Neely-Fisher et al., 1989). De plus, les processus de remise en suspension du sédiment, induisant un recrutement passif, peuvent favoriser l'accès à la lumière des akinètes présents dans les sédiments profonds et ainsi leur germination. Ce processus a déjà été observé pour des colonies de *Microcystis* issues de zones profondes lacustres (Misson and Latour, 2012). La matière particulaire, et les akinètes en particulier, sont mobilisés lors des mouvements sédimentaires hivernaux et préférentiellement stockés dans les zones lacustres profondes (Cirés et al., 2013a). Ainsi, une

### Chapitre 3 : Relation entre akinètes dans le sédiment récent et cellules végétatives dans la colonne d'eau

importante sous-estimation du pool d'akinètes capables de germer pourrait être générée par le manque d'intérêt porté à la zone aphotique. Dans ce contexte, il apparaît difficile d'établir le lien entre l'abondance des akinètes dans les sédiments et celle de la future prolifération planctonique.

Ainsi, l'un des objectifs principaux de ce chapitre est d'évaluer dans quelle mesure les akinètes présents à la surface des sédiments sont représentatifs des populations pélagiques nostocaléennes passées. Ce point se focalisera principalement sur la comparaison des populations pélagiques et benthiques de *D. macrosporum* sur trois points géographiques du lac d'Aydat. D'autres paramètres seront aussi considérés pour répondre à cet objectif comme par exemple l'estimation de la variabilité annuelle de sporulation des akinètes de *D. macrosporum*. Afin de mieux comprendre la relation entre populations pélagiques et benthiques, la caractérisation de l'évolution des distributions spatiales des akinètes dans les sédiments de surface à travers l'hiver sera aussi entreprise. Ainsi, deux ans de suivis contrastés (2014 : bloom important de *D. macrosporum*; 2015 : pas de prolifération) ont été entrepris sur la totalité de la colonne d'eau et à la surface des sédiments du lac d'Aydat.

Le second objectif de ce chapitre concerne la contribution des akinètes dans la formation des futures proliférations. Ainsi, grâce aux outils microscopiques développés au cours de cette thèse, il est possible de caractériser le pool d'akinètes encore intègres à la surface des sédiments et son évolution de l'hiver jusqu'au printemps. Ce dernier point permettra de mettre en évidence les mécanismes auxquels les akinètes seraient soumis durant la période hivernale et ainsi de caractériser au mieux l'inoculum benthique susceptible d'intervenir dans la formation de la nouvelle population pélagique. Pour finir, la combinaison d'observations *in situ* et d'expérimentations en milieux contrôlés permettra de mettre en évidence le potentiel de germination des akinètes intègres. En effet, la caractérisation de la germination des akinètes permettrait d'identifier le pool d'akinètes viables présent à la surface des sédiments et de constater comment il pourrait évoluer en fonction de la saison, de la zone de prélèvement et de l'espèce considérée.

## **II) Article 3**

---

### **Akinetes may be representative of past nostocalean Blooms: a case study of their benthic spatiotemporal distribution and potential for germination in a eutrophic lake**

Benjamin Legrand<sup>a,b,c</sup>, Anne-Hélène Le Jeune<sup>a,b</sup>, Jonathan Colombet<sup>a,b</sup>, Antoine Thouvenot<sup>c</sup>,  
Delphine Latour<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Université Clermont Auvergne, Laboratoire Microorganismes : Génome, et Environnement,  
BP 10448, Clermont-Ferrand, France;

<sup>b</sup>CNRS, UMR 6023, Laboratoire Microorganismes, Génome, et Environnement, BP 80026,  
Aubiere, France

<sup>c</sup>Athos Environnement, Clermont-Ferrand, France

**Article publié dans**

**Applied and Environmental Microbiology 83:e01571-17 (.2017)**

Received: 19 July 2017; Accepted: 20 September 2017 Accepted manuscript posted online:  
29 September 2017

Academic Editor: Harold L. Drake



*Chapitre 3 : Relation entre akinètes dans le sédiment récent et cellules  
végétatives dans la colonne d'eau*

## Abstract

Monitoring of water and surface sediment in a French eutrophic lake (Lake Aydat) was carried out over a 2-year period in order to determine whether akinetes in sediment could be representative of the most recent bloom and to estimate their germination potential. Sediment analysis revealed two akinete species, *Dolichospermum macrosporum* and *Dolichospermum flos-aquae*, present in the same proportions as observed for the pelagic populations. Moreover, similar spatial patterns observed for vegetative cells in the water column and akinete distributions in the sediment suggest that akinetes in the sediment may be representative of the previous bloom. However, the relationship between akinetes in the sediment and vegetative cells in the water column was not linear, and other factors may interfere. For example, our results highlighted horizontal transport of akinetes during the winter. The benthic overwinter phase did not seem to influence the percentages of intact akinetes, which remained stable at approximately 7% and 60% for *D. macrosporum* and *D. flos-aquae*, respectively. These percentages may thus be the result of processes that occurred in the water column. The intact overwintering akinetes showed germination rates of up to 90% after 72 h for *D. flos-aquae* or 144 h for *D. macrosporum*. The difference in akinete germination rates between these two species demonstrates different ecological strategies, which serve to expand the window for germination in time and space and thus optimize colonization of the water column by nostocalean cyanobacteria.

## Importance

Cyanobacteria have the ability to proliferate and to form blooms. These blooms can then affect the local ecology, health, and economy. The akinete, a resistant cell type that persists in sediment, is an important intermediate phase between previous and future blooms. We monitored the water column and the surface sediment of a French eutrophic lake (Lake Aydat) to investigate the relationship between vegetative cells in the water column and akinetes in the sediment. This study focused on the characterization of spatiotemporal akinete distributions, cellular integrity, and germination potential. Species-specific ecological strategies were highlighted and may partly explain the temporal succession of species in the water column. Akinetes may also be used to understand past nostocalean blooms and to predict future ones.

**Keywords:** cyanobacterial bloom, akinete, annual life cycle, cellular integrity, germination rate

## **Introduction**

Over the past decades, the recurrent degradation of freshwater systems due to anthropization has led to a rocketing number of cyanobacterial proliferations (Merel et al., 2013). Key to the ecological success of cyanobacteria in temperate zones is their ability to overcome unfavorable conditions in the benthic compartment (Cirés et al., 2013a). Cyanobacterial orders use different strategies to persist in sediments. For example, Nostocales can produce akinetes, specialized resting cells that are able to survive when environmental conditions are unfavorable for vegetative cells (Hense and Beckman, 2006). These unfavorable conditions are generally seasonal and occur at the end of the summer or during the autumn, due to factors such as decreases in the photoperiod or light intensity (Myers et al., 2010) or the temperature (Li et al., 1999). Induction of akinete formation can also be triggered by other factors, such as depletion of phosphorus (Rother and Fay, 1977) or potassium (Sukenik et al., 2013). The high resistance of akinetes means that they are able to survive in sediment for several decades (Livingstone et Jaworski, 1980; Wood et al., 2009). As a result, some studies have used akinetes as indicators of former cyanobacterial blooms (Van Geel et al., 1994; Eilers et al., 2004). However, no clear relationship between the abundance of past vegetative cells in the water column and akinetes present in sediments has yet been demonstrated. Moreover, although the general factors triggering akinete induction are known, more precise details concerning the specific levels remain unknown, i.e., whether the production of akinetes is the same for all species under environmental conditions. In addition, it is not known whether this production of akinetes is stable over time for each species and thus whether akinetes in the sediment can be considered good indicators of past cyanobacterial blooms. In the spring and/or when environmental conditions become favorable again, akinetes germinate into young filaments, called hormogonia, and colonize the water column to initiate the next proliferation (Rücker et al., 2009). Like akinete formation, the germination process is understood in a general way but not sufficiently to estimate the contribution of germinating akinetes to the next cyanobacterial proliferation. Indeed, because the growth requirements for Nostocales species differ, the potential for akinetes germination should depend on specific factors, which need to be investigated more thoroughly.

In this context, our first aim was to determine whether akinetes present in surface sediment are representative of the most recent bloom. Our second aim was to investigate the distribution of benthic akinetes and their viability dynamics during the winter. Finally, our last aim was to estimate the specific germination potential of two akinete species in the spring.

Chapitre 3 : Relation entre akinètes dans le sédiment récent et cellules végétales dans la colonne d'eau

We carried out fieldwork in the French eutrophic Lake Aydat, monitoring the water column and sediment for bloom-forming and non-bloom-forming species (*Dolichospermum macrosporum* and *Dolichospermum flos-aquae*, respectively) over a 2-year period (Fig. 1). We also investigated the global distribution of akinetes in the surface sediment, based on the number of intact akinetes present, and lastly focused on akinete germination in order to estimate the real pool of viable akinetes.

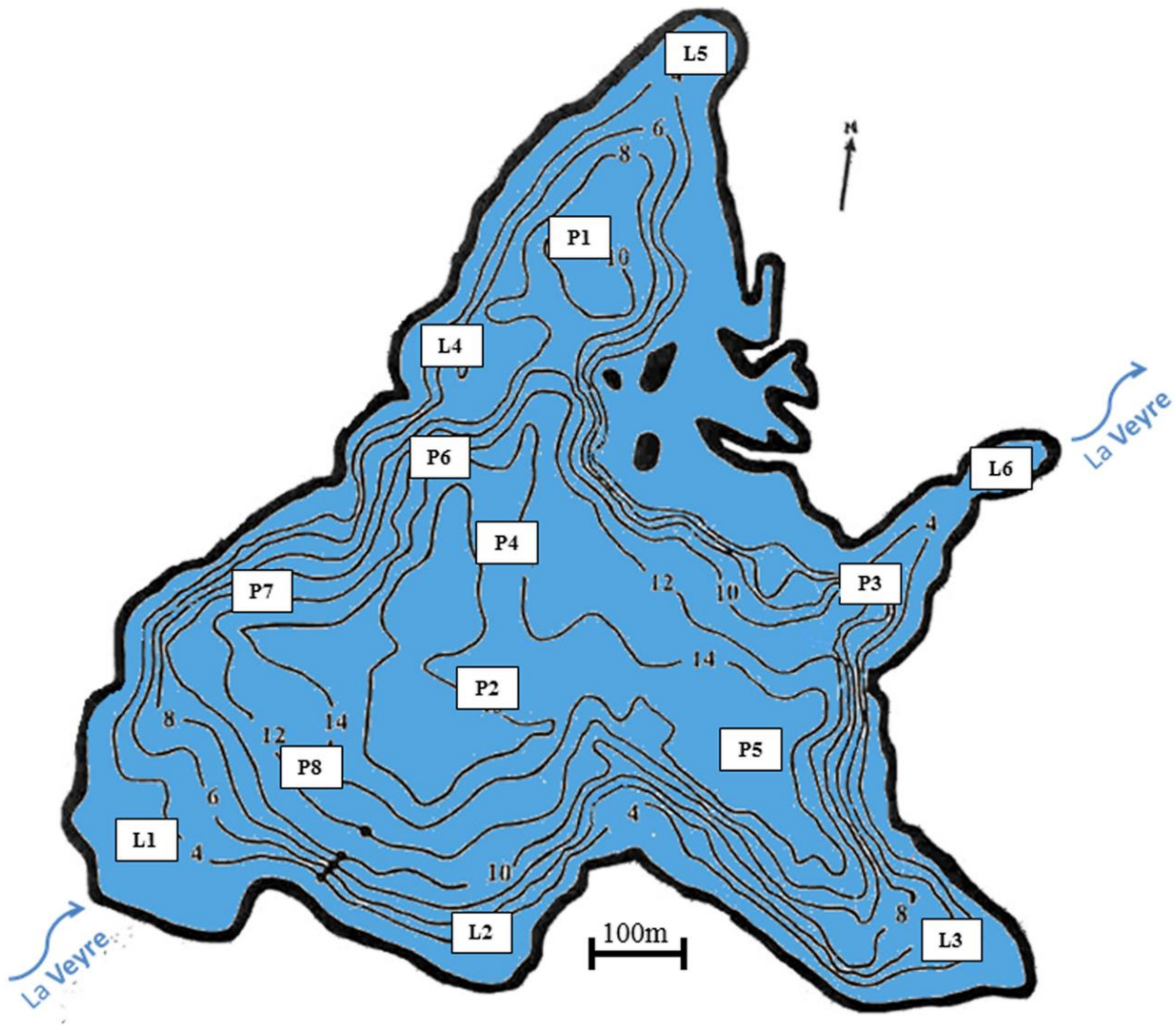


Figure 1: Bathymetric map of Lake Aydat, showing sampling station locations. The base bathymetric map was created using Surfer (version 7.02).

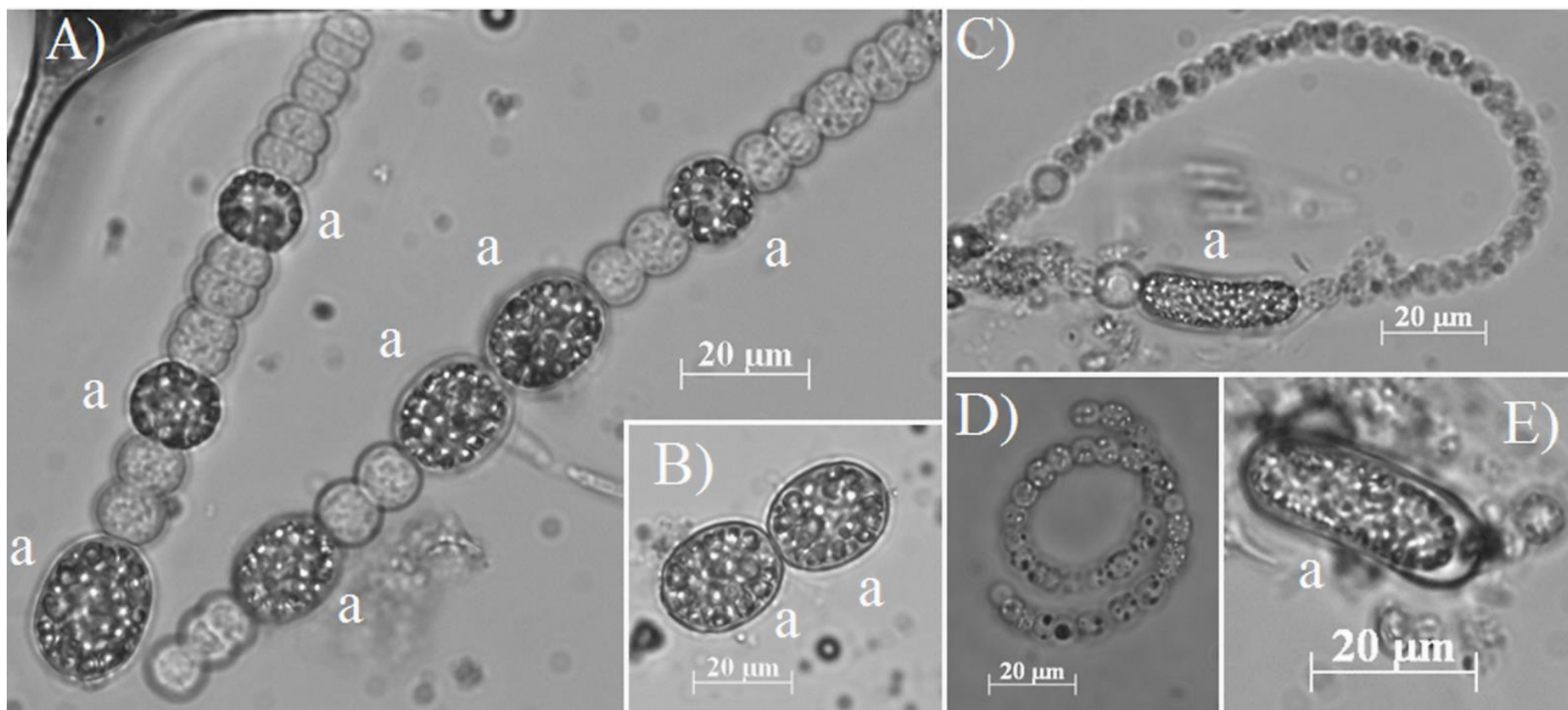


Figure 2: Photomicrographs, in natural light, of both vegetative cells and akinetes (a) of *D. macrosporum* (A and B) and *D. flos-aquae* (C to E).

## Results

### *Vegetative cells and akinete dynamics.*

*Dolichospermum macrosporum* was the dominant cyanobacterial species observed (Fig. 2), whereas *D. flos-aquae* was occasionally observed in small quantities during the 2-year study period (data not shown).

In 2014, at the three locations studied, the abundance of *D. macrosporum* vegetative cells started to increase at the beginning of September, showed a maximum in mid-October, and then declined progressively until November (Fig. 3A). During this period, the maximum abundances were similar for the P1 and P2 stations, where values reached  $1.96 \times 10^6$  and  $1.56 \times 10^6$  vegetative cells.liter<sup>-1</sup>, respectively, and higher for the P3 station, with a value of  $4.06 \times 10^6$  vegetative cells.liter<sup>-1</sup>. The akinetes abundance followed the same dynamics, slightly offset in time, with a start at the end of September. The maximum abundance of akinetes at the three points was observed on the same date as the maximum abundance of vegetative cells. Maximum concentrations of akinetes reached  $5.19 \times 10^4$  and  $6.22 \times 10^4$  cells.liter<sup>-1</sup> for P1 and P2, respectively. Once again, the maximum value was observed at P3, i.e.,  $10.50 \times 10^4$  cells.liter<sup>-1</sup> (Fig. 3A). The total numbers of vegetative cells showed significant differences among the stations and appeared significantly smaller for P1 than for P2 and P3 (Fig. 4A). Interestingly, the total numbers of akinetes in the sediment showed the same trend, with P1 values being less than P2 values, which were less than those for P3. The proportions of akinetes versus vegetative cells in the water column were 1.8% to 2% during the bloom event (Fig. 4). In 2015, the total abundance of vegetative cells was very low and represented only 3% of the 2014 bloom. The kinetics of vegetative cells were also different, with two peaks, on 28 September 2015 and 30 October 2015 (Fig. 3B). The second peak was higher, with maximal densities between  $3.51 \times 10^4$  and  $5.09 \times 10^4$  cells.liter<sup>-1</sup>. In terms of akinete concentrations, the maximal abundances were reached on 30 October 2015 at all stations, with higher values being obtained for P1 ( $1.08 \times 10^4$  cells.liter<sup>-1</sup>) and P3 ( $1.07 \times 10^4$  cells.liter<sup>-1</sup>) and a lower value for P2 ( $3.51 \times 10^3$  cells.liter<sup>-1</sup>). The total numbers of both akinete and vegetative cells followed the same trend, with higher values being observed at P3 than at P2 (Fig. 4B). The proportions of akinetes versus vegetative cells in the water column in 2015 stayed relatively low and were in the same range as observed in 2014, with values of 5.6%, 9.6%, and 11.1% for P2, P3, and P1, respectively.

Chapitre 3 : Relation entre akinètes dans le sédiment récent et cellules végétatives dans la colonne d'eau

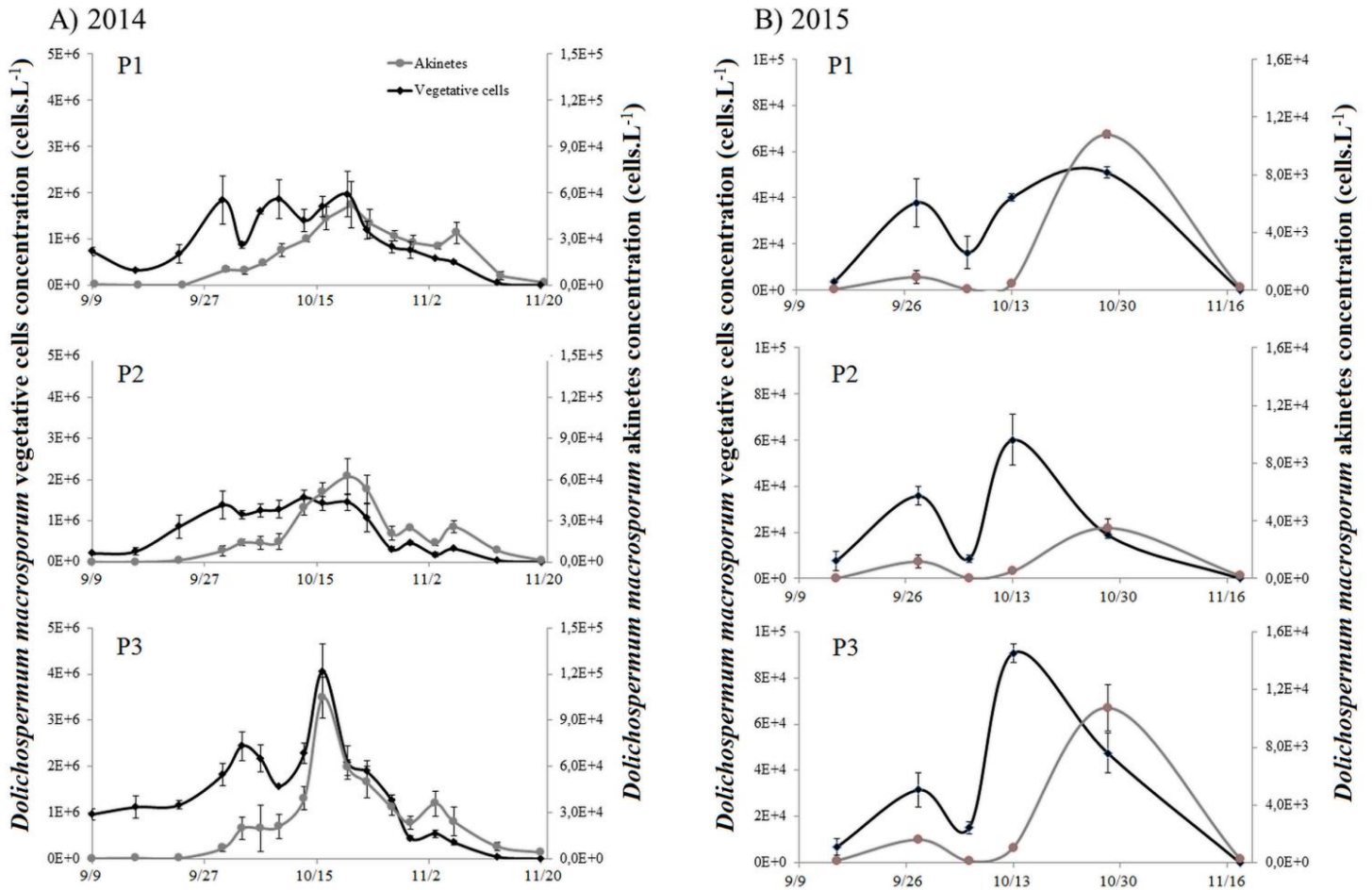


Figure 3: Temporal variations in *D. macrosporum* vegetative cells and akinetes from the 2014 (A) and 2015 (B) blooms for each studied location.

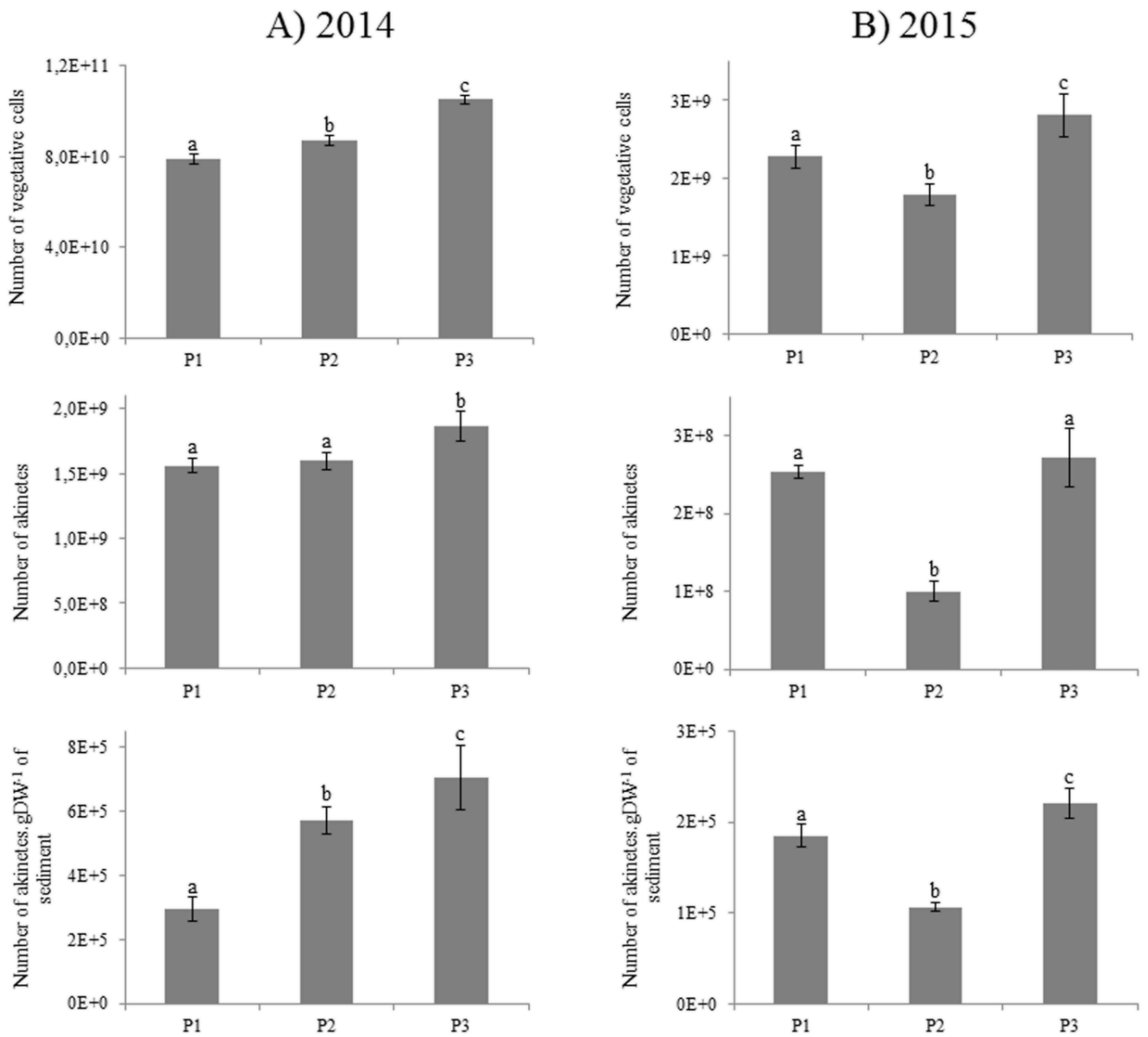


Figure 4: Estimated numbers of *Dolichospermum macrosporum* vegetative cells and akinetes in the water column and akinetes in sediment in 2014 (A) and 2015 (B).



*Spatiotemporal distributions of akinetes in sediment.*

The two species (*D. macrosporum* and *D. flos-aquae*) that were present in the water column were also present in sediment (Fig. 5). It was found that akinete abundances in sediment for the three studied dates were markedly different for the two species, with *D. macrosporum* being more abundant, as was also the case for the water column. Moreover, relative akinetes abundances showed the same trends as for the water column; *D. macrosporum* was more abundant in 2014 than in 2015, with values of 40,000 to 705,000 and 2,600 to 221,000 akinetes.g<sup>-1</sup> (dried weight) of sediment, respectively (Fig. 5A). Thus, the overall akinete abundance of *D. macrosporum* in sediment in 2015 represented only 36% of that in 2014. This trend was even more marked for *D. flos-aquae*, with an abundance of akinetes present in sediment in 2014 (150 to 36,400 akinetes.gDW<sup>-1</sup> of sediment) 4 times higher than that in 2015 (0 to 4,150 akinetes.g<sup>-1</sup> of sediment) (Fig. 5B).

The akinete distribution also varied with the season when sampling took place. For both *Dolichospermum* species, the numbers of benthic akinetes in deep areas were higher in spring than in winter (Student's t test,  $P \leq 0.003$ ) (see Table S1 in the supplemental material). In contrast, the numbers of akinetes present at littoral sites were always smaller in spring than in winter (Student's t test,  $P \leq 0.03$ ) (Table S1).

Furthermore, akinete concentrations were always significantly higher in deep areas than in littoral areas, for all studied species and every sampling date (Student's t test,  $P < 0.001$ ) (Fig. 5; also see Table S1). For example, the numbers of *D. flos-aquae* akinetes in December 2014 were approximatively 4 times higher in deep areas than in littoral ones.

Chapitre 3 : Relation entre akinètes dans le sédiment récent et cellules végétaives dans la colonne d'eau

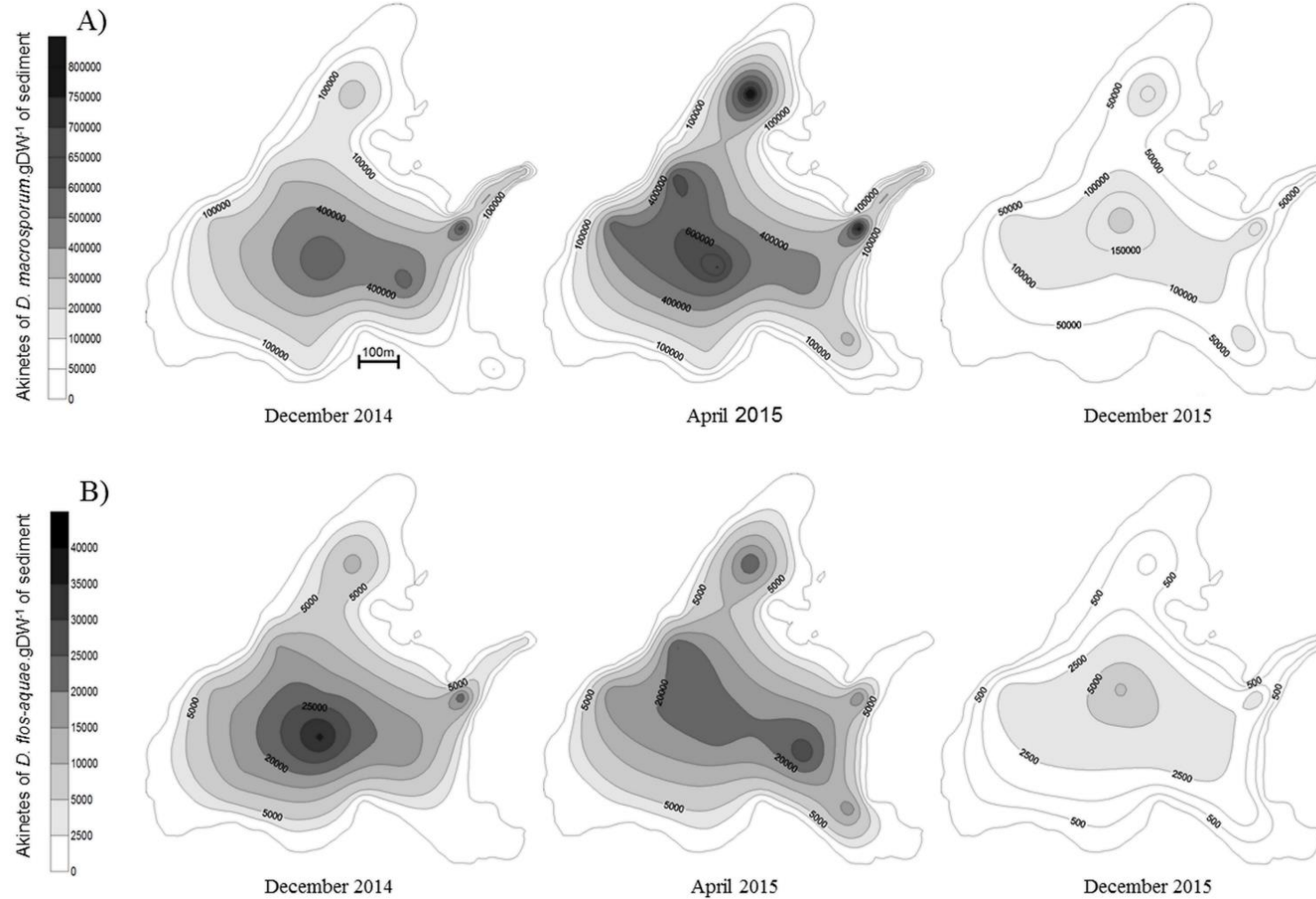
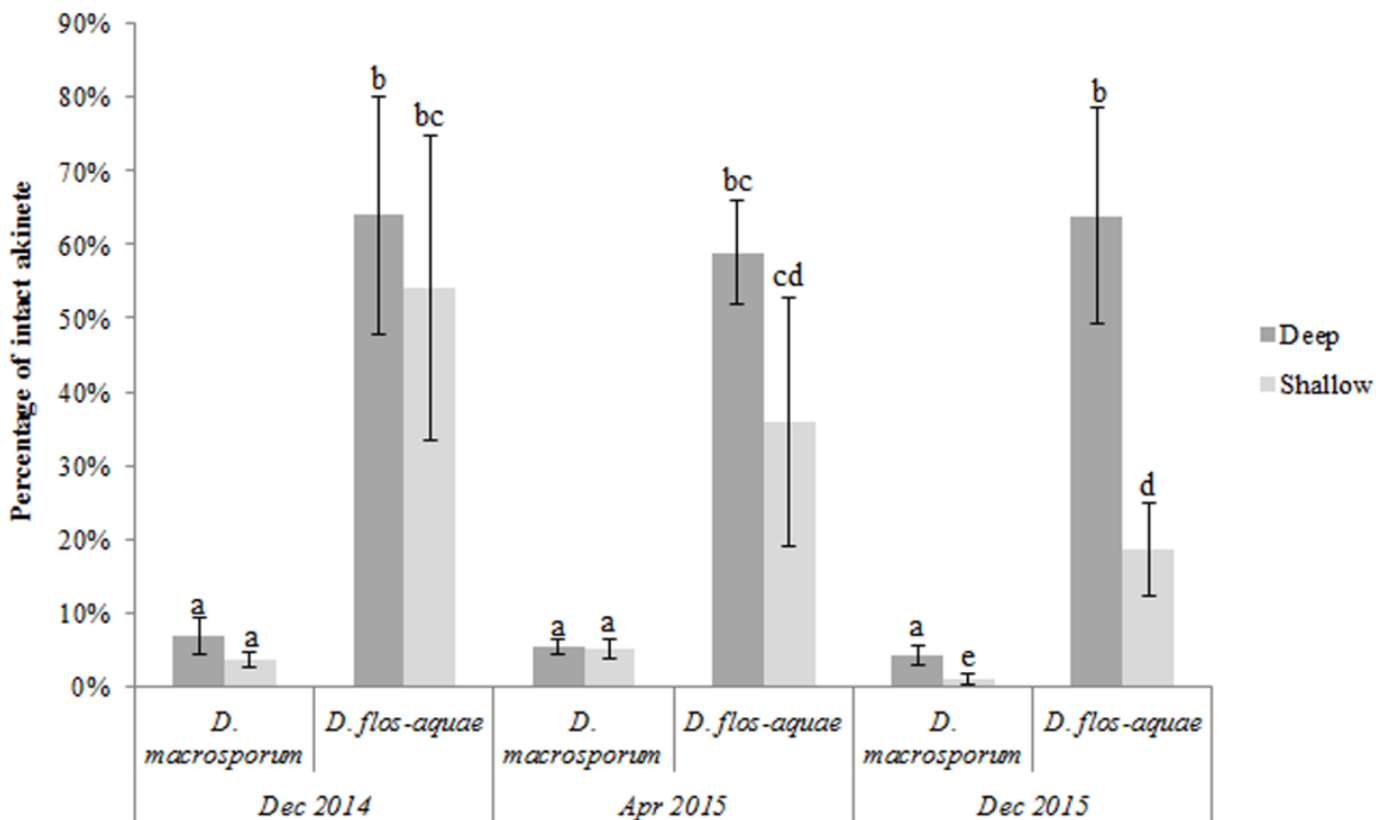


Figure 5: Spatial distributions of akinetes in Lake Aydat sediment in December 2014, April 2015, and December 2015 for *D. macrosporum* (A) and *D. flos-aquae* (B).

*Akinete physiological states in sediment.*

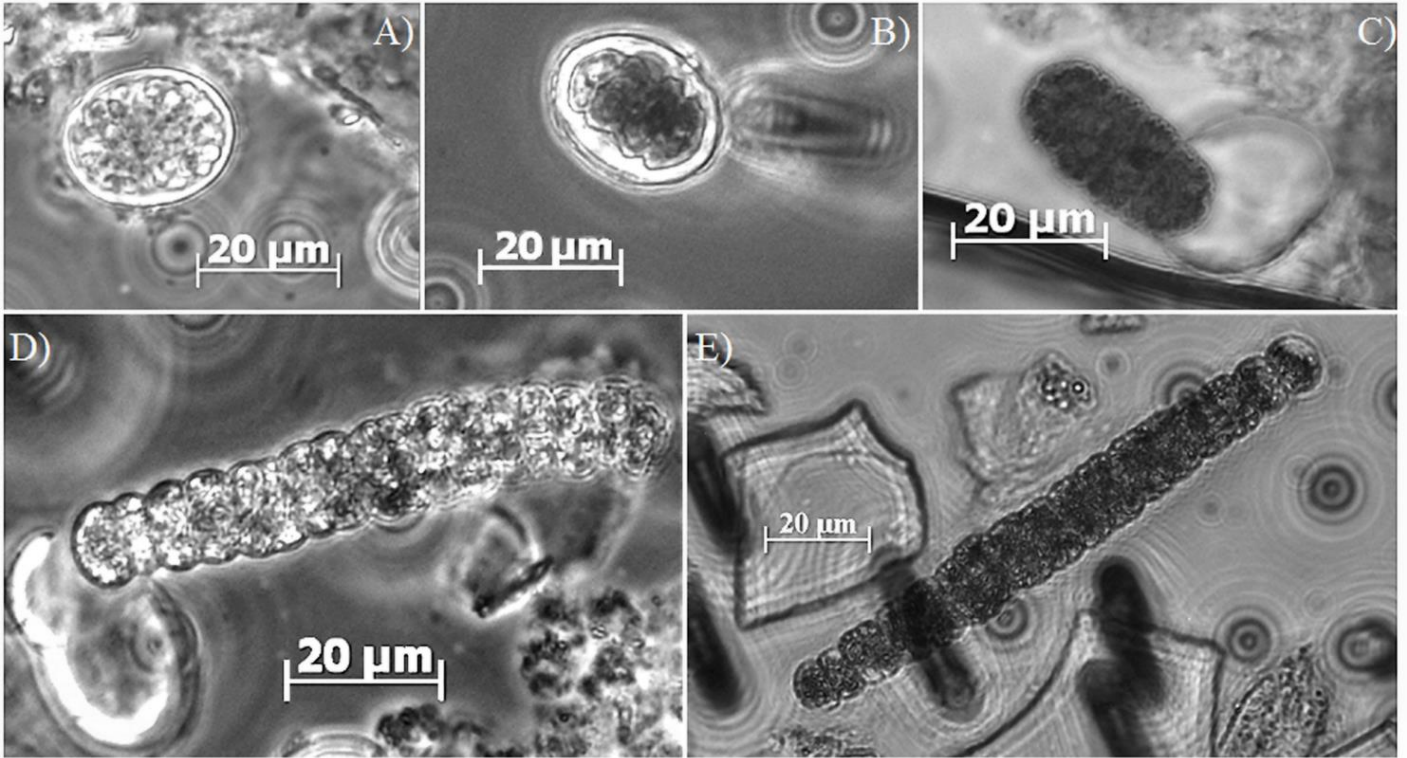
The percentage of intact akinetes in Lake Aydat sediments may depend on the *Dolichospermum* species (multivariate analysis of variance [MANOVA],  $P \leq 1.74 \times 10^{-9}$ ) (Fig. 6). Indeed, the percentages of intact akinetes for *D. macrosporum* were between  $1\% \pm 1\%$  and  $6.8\% \pm 2.4\%$ , whereas the percentages for *D. flos-aquae* were significantly higher, fluctuating between  $18.6\% \pm 6.3\%$  and  $63.9\% \pm 14.6\%$ . For each species, there were no significant differences in the percentages of intact akinetes based on area and sampling date (Tukey's test,  $P > 0.05$ ) except for December 2015, when the values for littoral areas were statistically lower than the others.



**Figure 6: Percentages of intact akinetes in Lake Aydat sediment according to the species, the area (pelagic versus littoral zones), and the sampling period.**

*Akinete germination.*

Different states of akinetes were observed and considered (Fig. 7), including (i) intact akinetes (Fig. 7A), (ii) germinating akinetes, which appeared to be divided into several cells (Fig. 7B and C), and (iii) young filaments (hormogonia) (Fig. 7D and E), where the number of cells exceeded 8 cells.



**Figure 7: Photomicrographs, in natural light, of *D. macrosporum* akinete germination, from intact akinete (top left) to hormogonia (young filament) (bottom right).**

(i) *In situ* akinete germination.

The percentages of germinating akinetes were dependent on the species and the sampling location (two-way analysis of variance [ANOVA],  $P < 0.001$ ). Indeed, the percentages of germinating akinetes in Lake Aydat sediment were  $5\% \pm 3\%$  in deep areas and  $30\% \pm 7.5\%$  in littoral areas for *D. macrosporum* (Fig. 8). For *D. flos-aquae*, results were more homogeneous, with 8.9% germinated akinetes in deep zones and 7.5% in littoral areas. *D. macrosporum* had a significantly higher rate of germinating akinetes in littoral areas than under other conditions ( $P < 0.00017$ ).

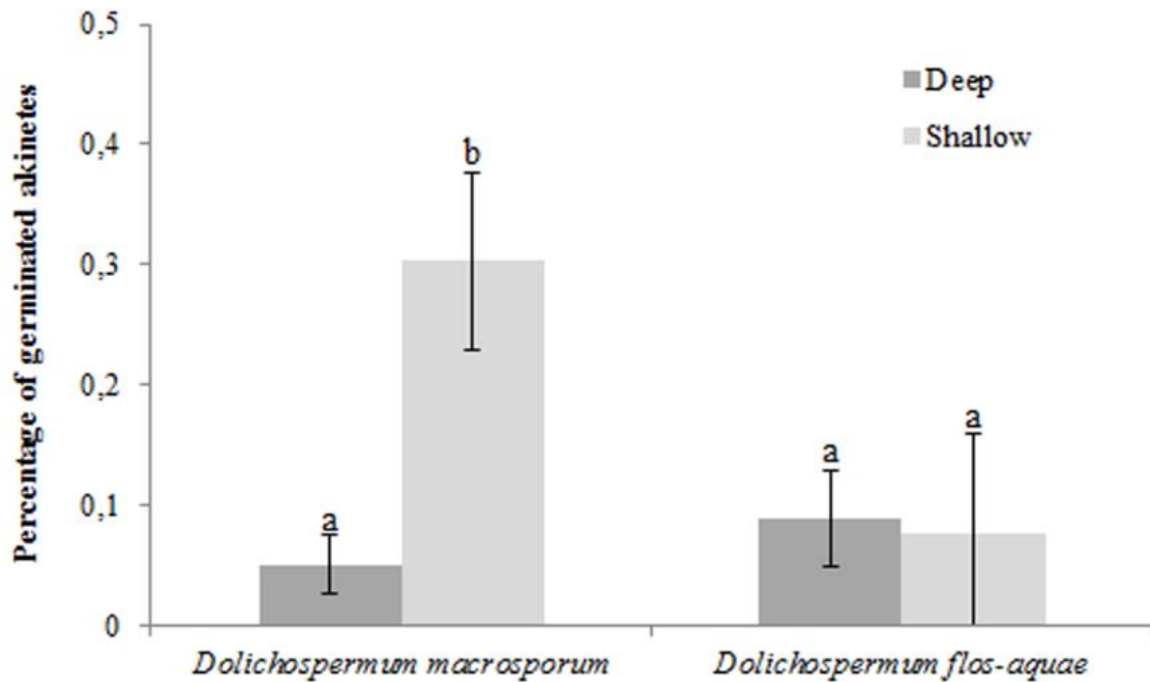


Figure 8: Percentages of germinated akinetes in Lake Aydat sediment in April 2015 according to the species and the lake zone (pelagic versus littoral zones).

(ii) *Akinete germination experiments.*

The experimental patterns were similar overall for the two species; at the beginning, the percentages of intact akinetes were high, between 80% and 92% for *D. macrosporum* (Fig. 9A) and between 82% and 100% for *D. flos-aquae* (Fig. 9B), and then they decreased to reach values close to 0% at 144 h for *D. macrosporum* and at 72 h for *D. flos-aquae*. In contrast, the percentages of filaments formed were almost 0 at the beginning of the experiments and more than 80% at the end of the experiments, except for *D. flos-aquae* akinetes from P2 (60%). At 48 h, the percentages of young filaments of *D. macrosporum* varied from 17% to 27%, depending on the sample location, whereas those for *D. flos-aquae* were 60% to 94%. Temporal differences were also observed for germinating akinetes. A peak was clearly visible at 48 h for *D. macrosporum*, with values ranging from 46% to 71%, whereas the percentages of germinating akinetes for *D. flos-aquae* were only 7% to 23% at the same time. The higher percentages of germinating akinetes for *D. flos-aquae* occurred earlier, between 12 and 36 h, with values of 17% to 58%.

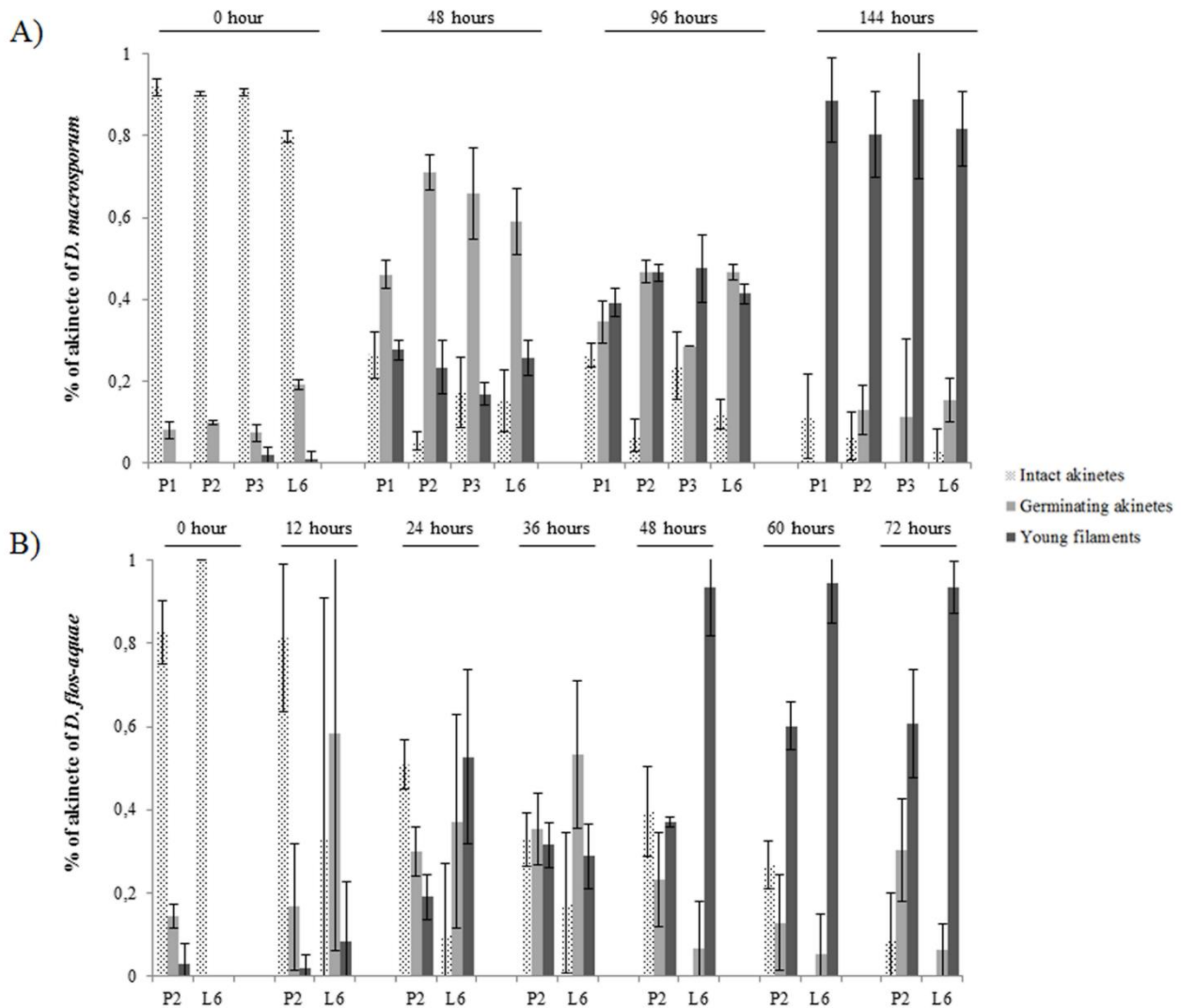


Figure 9: Percentages of akinete germination for *D. macrosporum* (A) and *D. flos-aquae* (B).

## Discussion

*Are akinetes retrieved from the sediment good representatives of past blooms?*

Akinete formation occurs in the water column and is triggered by conditions that are unfavorable for the growth of vegetative cells (Baker, 1999; Everson et al., 2011; Cirés et al., 2013b; Mehnert et al., 2014). Despite the diversity of factors known to potentially drive akinete production (temperature, light intensity, and nutrient concentrations), our results showed stable proportions of planktonic akinetes versus vegetative cells in the water column, with low mean values of 2% to 8.75%, depending on the year. This difference in akinete production between the 2 years is considered to be negligible, compared to the variation in total cyanobacterial biomass between these 2 years. Because stress conditions were extremely

*Chapitre 3 : Relation entre akinètes dans le sédiment récent et cellules  
végétatives dans la colonne d'eau*

different between the bloom-forming year and the non-bloom-forming year (lower temperature, less daylight, and earlier mixing conditions in 2015), we can assume that the abundance of akinetes formed in the water column is proportional to the abundance of vegetative cells, regardless of the environmental conditions. Based on this assumption, the abundance of akinetes formed during a proliferation can facilitate estimation of the total abundance of cyanobacterial cells in a past bloom event. Although akinetes are cells known to be resistant to a wide range of stress factors (e.g., lack of light (Sutherland et al., 1979), temperature variations (Hori et al., 2003), and desiccation (Legrand et al., 2016a) and to be well conserved through time in sediment (Livingstone et Jaworski, 1980; Wood et al., 2009), the question of whether the abundance of akinetes found in the sediment can be used as a good indicator of past proliferation remains (Van Geel et al., 1994; Eilers et al., 2004). At a qualitative level, akinetes in sediment can be used to reveal the Nostocales diversity of the water column. In Lake Aydat, the two cyanobacterial species found in the water column, *D. macrosporum* and *D. flos-aquae*, were also observed in the sediment, despite a very low planktonic abundance of *D. flos-aquae*. At a quantitative level, our results showed identical patterns for the numbers of vegetative cells in the water column and the akinete distributions in the sediment for the 2 years of this study. Therefore, as expected, a bloom-forming year corresponds to a greater abundance of akinetes in the surface sediment. However, we did not obtain similar proportions from year to year for vegetative cells versus benthic akinetes, and thus the past abundance of vegetative cells cannot be exactly calculated by using the number of benthic akinetes present in the sediment. Nevertheless, benthic akinetes can indicate global trends regarding bloom-forming versus non-bloom-forming years. This interannual variability is the result of the balance between the number of akinetes reaching the sediment at the end of the summer season and those leaving the sediment after germination and the inoculation process (Rücker et al., 2009). Therefore, even if the production of akinetes (according to nostoclean biomass) in a water column is quite constant, the loss of akinetes through the sedimentation and inoculation processes may be very different, depending on the year and the biotic and abiotic stresses (such as temperature, light intensity, and parasitism).

The benthic spatial distribution of akinetes and the sampling season must also be taken into account to explain the variability of the benthic akinete and planktonic vegetative cell proportions. Our results highlight a heterogeneous benthic distribution of akinetes, showing great seasonal differences. This benthic distribution may be the result of both planktonic distribution and benthic transport. It is commonly acknowledged that wind can influence



*Chapitre 3 : Relation entre akinètes dans le sédiment récent et cellules végétales dans la colonne d'eau*

planktonic cyanobacterial distribution, creating areas of accumulation (Kanoshina et al., 2003), and the same applies to akinetes in surface sediments in Spanish lakes (Cirés et al., 2013a); the authors showed that sediment close to a dam accumulated 11 times more akinetes than did that in shallower upstream areas, due to the influence of river currents. In Lake Aydat, akinete counts have shown greater concentrations in the deeper parts of the lake, as well as at the lake outlet, in both deep and littoral zones. The lake outlet hot spot in the sediment is probably due to the combination of two phenomena induced by dominant winds and the Veyre river current, i.e., high levels of accumulation of cyanobacteria in the water column and horizontal transport of benthic akinetes from the littoral zone to the deep zone during the winter period. The natural redistribution of fine particles (including cyanobacterial cells) from shallow areas to deep areas has already been observed in other lakes (Evans, 1944; Verspagen et al., 2005). This secondary sedimentation can also be influenced by numerous parameters, such as wind, river flow, sedimentary composition, and lake geomorphology (Pourriot and Maybeck, 1995; Kravchuk et al., 2011; Cirés et al., 2013a). This phenomenon may be amplified by the basaltic lava flow present along the northeastern edge of Lake Aydat (Gallos and Glangeaud, 1910), where there is no persistent sedimentation. Thus, sampling from the deepest part of the lake at the end of winter seems the best strategy to evaluate the benthic stock of akinetes.

*Benthic akinete viability.*

Few studies have highlighted that akinetes in sediment can be divided into two categories, intact and non-intact (Rücker et al., 2009; Legrand et al., 2016a). The percentage of intact *Cylindrospermopsis raciborskii* akinetes in sediments from the pelagic area of Lake Melangsee (Germany) in winter was estimated to be 20% to 30% (Rücker et al., 2009). In this study, intact akinetes from the sediment of Lake Aydat were approximately 7% and 65% for *D. macrosporum* and *D. flos-aquae*, respectively. This high level of species-dependent variability may be explained by species-specific sensitivity to abiotic factors in both the water column and the sediment. Indeed, with the same abiotic factors, *D. macrosporum* akinetes present a significantly lower survival rate than *D. flos-aquae* akinetes (Legrand et al., 2016a). Furthermore, the impact of biotic factors can also be species specific. For example, *Bdellovibrio*-like bacteria can affect *Microcystis aeruginosa* but leave *Microcystis wesenbergii* unaffected, suggesting strict host specificity (Gerphagnon et al., 2015). Viral lysis may also be linked to host specificity. It was shown that an isolated cyanophage (Ma-LMM01) caused lysis of only 1 of the 16 *Microcystis aeruginosa* genotypes tested (Yoshida



### Chapitre 3 : Relation entre akinètes dans le sédiment récent et cellules végétatives dans la colonne d'eau

et al., 2006). In Lake Aydat, *D. macrosporum* akinetes were specifically affected by the chytrid *Rhizosiphon akinetum* (Gerphagnon et al., 2013a, 2013b). The high prevalence of species-specific infection of *D. macrosporum* akinetes observed in the water column in 2014 and 2015 (Gerphagnon et al., 2017) may partly explain why the number of intact akinetes was particularly low for this species.

The viability of akinetes can also be affected during overwintering, for example, through bioturbation by invertebrates, which can reduce the pool of intact akinetes (Kearns et al., 1996; Karlson et al., 2012). To a lesser extent, parasitism is also a factor in the sediment compartment (Hargreaves et al., 2013). However, the akinete integrity did not change between December 2014 and April 2015, suggesting a 1-year scale on which the integrity of benthic akinetes was not affected during overwintering. Therefore, we can assume that the proportion of intact akinetes counted in the surface sediment during the winter is a valid reflection of what happened in the water column and during the sedimentation process.

#### *Akinete germination.*

Most studies of akinete germination focused on laboratory strains that exhibit rates of germination close to 100% when culture conditions are optimal (Rai and Pandey, 1981; Sili et al., 1944; Van Dok and Hart, 1997). Some studies were also interested in the germination process of akinetes from natural sediment, but apparently the rate of germination was rarely calculated. A germination rate of approximately 70% for *Anabaena ucrainica* akinetes isolated from Daimon-Ike (Japan) was highlighted previously (Tsujimura and Okubo, 2003). In our case, the rate of *D. flos-aquae* akinete germination is of the same order of magnitude. In contrast, this rate was very low for *D. macrosporum*, due to the presence of a large percentage of akinetes lysed by species-specific parasitism; this seriously affects the size of akinetes inocula for the next few years. Considering only the fraction of intact akinetes, we obtained very high rates of germination (up to 90%) for both species. This finding indicates that the pool of intact akinetes corresponds to the pool of viable akinetes. Even if almost all of the intact akinetes are able to germinate in the next few years, this step in the life cycle also seems to follow a species-specific process. *D. flos-aquae* has a response that is twice as fast as that of *D. macrosporum* under the same controlled conditions. This finding suggests that akinete germination in the lake is not synchronous for every species, allowing a shift in the time of water colonization. This may indicate different strategies for water column colonization, to avoid competition between *D. flos-aquae* and *D. macrosporum*. The most

### Chapitre 3 : Relation entre akinètes dans le sédiment récent et cellules végétatives dans la colonne d'eau

important environmental parameters, independent of the cyanobacterial species, triggering akinete germination are the internal nitrogen quota (Hense and Beckmann, 2006), sediment mixing (Karlsson-Elfgren et al., 2004), and increases in temperature (Tsujimura and Okubo, 2003; Rucker et al., 2009) and light intensity (Yamamoto, 1976; Huber, 195; Fay, 1998; Barbiero and Kann, 1994; Baker and Bellifemine, 2000). These favorable environmental parameters for germination lead to the definition of more favorable areas for akinete germination. For example, a study proposed the hypothesis that shallow sediments are more important than pelagic sediments for the recruitment of *Gloeotrichia echinulata* in Lake Erken (Sweden) (Karlsson-Elfgren et al., 2004). This idea was confirmed with *Anabaena* (i.e., *Dolichospermum* (Komàrek, 2015) and with the *Aphanizomenon* genus in Lake Limmaren (Sweden) (Karlsson-Elfgren and Brunberg, 2004.). The higher rates of germinating akinetes, at least for *D. macrosporum*, in littoral sediments than in pelagic sediments may confirm the importance of shallow areas in Lake Aydat. However, germinating akinetes of *D. macrosporum* and *D. flos-aquae* were also observed in deep sediments (depths of > 9 m) below the euphotic zone all year round (data not shown). Thus, akinetes located in deep zones have to be integrated in the potential inoculum. However, because favorable conditions for germination, especially temperature, are not uniform throughout the lake, akinete germination probably does not occur at the same time, as governed by the lake bathymetry. We can infer that akinete germination in lakes occurs first in littoral areas, where light is not a limiting factor and the water temperature increases earlier in the year. The warm water then spreads progressively to the deeper areas, inducing akinete germination. Akinetes located in deeper areas can access light during sediment-mixing phases (Hense and Beckmann, 2006). These processes may extend the germination window in time and space and thus optimize the colonization of the water column.

#### Conclusions.

This study provided an overview to determine whether akinetes in sediments are representative of previous blooms and to improve the characterization of germination potential. As shown for past microbial diversity (Domaizon et al., 2013; Capo et al., 2015), sediments represent an archive of past cyanobacterial blooms in the lake water column. Despite all of the parameters involved in the annual dynamics of akinetes (sedimentation and inoculation processes and benthic transport), we conclude that studying benthic akinetes allows determination of past planktonic diversity and illustrates clear trends regarding cyanobacterial abundances from the bloom event in the water column of the previous year.

We also showed that the potential inoculum for subsequent years is composed of all intact akinetes whatever their location (i.e., deep versus littoral sediments). Species-specific abilities regarding akinete integrity and germination suggest different ecological strategies, leading to a complex process of water colonization. Further studies need to be undertaken to characterize the long-term persistence of akinetes in sediments, incorporating the notion of akinete integrity.

## **Materials and Methods**

### *Lake description and sampling strategy.*

Lake Aydat (45°39'48''N, 002°59'04 E) is located in the French Massif Central region, 838 m above sea level. This dimictic natural dam lake was created by the damming of the river Veyre by a basaltic flow about 7,500 years ago (Sabart et al., 2015). It is a small eutrophic lake with a maximum depth of 15 m, a surface area of 60 ha, and a large catchment area of 30,000 ha. It has recurrent *Dolichospermum* blooms at the end of summer and the beginning of autumn (Gerphagnon et al., 2013b).

Lake Aydat was sampled at least 1 time per week, depending on the cyanobacterial concentration, from September to November during the 2014 and 2015 cyanobacterial blooms. Sampling was carried out on the whole water column, with a phytoplankton net with 20 µm pores (Hydro-Bios, Altenholz, Germany). Samples were collected from 0.5 m above the sediment to the surface water column, corresponding to depths of 9.5, 15, and 10 m for the sampling points P1, P2, and P3, respectively (Fig. 1). Concentrated water for each sample was normalized to a final volume of 2 liters, and 160 ml of these 2 liters was then fixed with 10 ml of Lugol's iodine solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Fixed samples were kept in the dark at 4°C until further analysis.

After each cyanobacterial proliferation (December 2014 and December 2015) and before the cyanobacterial recruitment of 2015 (April), surface sediment sampling was carried out using a sediment corer (UWITEC, Mondsee, Austria). A total of 14 points were sampled, i.e., 8 in the pelagic area (P1, P2, and P3 [which have already been sampled, in the water column] and P4, P5, P6, P7, and P8) and 6 in the littoral area (L1, L2, L3, L4, L5, and L6) (Fig. 1). Points in the pelagic area corresponded to depths of 9 to 15 m, whereas the maximum depth for the littoral sediment was 3 m. Then, supernatant water from each core was discarded, and the mobile surface sediment containing recent akinetes was pipetted and kept at 4°C in the

### *Chapitre 3 : Relation entre akinètes dans le sédiment récent et cellules végétatives dans la colonne d'eau*

dark until analysis (Legrand et al., 2016a). This mobile surface sediment corresponds to the first 0.5 cm of sediment, in accordance with the annual rate of sedimentation in Lake Aydat (Sarazin et al., 1992; Lavrieux et al., 2013). Therefore, in this study, deep sediment corresponds to surface sediment from pelagic areas and shallow sediment corresponds to surface sediment from littoral areas.

#### *Microscopic counts of cyanobacterial blooms.*

Cyanobacterial cell abundance was estimated using 0.25-10 ml (depending on the biomass) subsamples from the samples fixed with Lugol's iodine, settled for 24 h in counting chambers. Vegetative cells and akinetes were counted in at least 30 randomly selected optical fields at a magnification of x200 with an inverted microscope (Axiovert 200 M; Zeiss, Oberkochen, Germany), following the method of Utermöhl (Utermöhl, 1958). Each sample was counted at least three times. Species determination was performed by microscopic examination, based on morphological criteria described in taxonomic keys known from reference books (Geitler, 1932; Bourrelly, 1966; Komàrek, 2013). The two species were distinguished on the basis of the morphology of their trichomes and the form and size of their akinetes (Fig. 2). *D. macrosporum* exhibits straight single trichomes and rounded akinetes, while *D. flos-aquae* has coiled trichomes that form solitary or, more usually, entangled twisted masses, with cylindrical or slightly ellipsoid and often slightly bent akinetes. The recurrence of *D. macrosporum* and *D. flos-aquae* in Lake Aydat has been highlighted in numerous studies for decades (Amblard et al., 1988; Rasconi et al., 2012; Gerphagnon et al., 2013a, 2013b; Legrand et al., 2016a).

#### *Extraction of akinetes from sediment.*

Akinetes were extracted from sediments using a density gradient protocol with Ludox, as described previously (Legrand et al., 2016a). Briefly, 3 ml of fresh sediment was diluted with 7 ml of distilled water and 4 ml of Ludox TM-50 (Sigma-Aldrich). The solutions were sonicated for 30 s (frequency, 50%; power, 80 W; Sonopuls; Bandelin, Berlin, Germany) and centrifuged at 10,000 x g for 30 min. The first 6 ml was pipetted and kept in the dark at 4°C for further analysis.

*Chapitre 3 : Relation entre akinètes dans le sédiment récent et cellules  
végétatives dans la colonne d'eau*

*Estimation of sediment akinete abundance.*

Species determination for akinetes was based on morphological criteria (Cirés et al., 2013a). This determination was completed by analyzing the morphology of young filaments issued from germinating akinetes (see Fig. S1 in the supplemental material), using taxonomic keys known from reference books (Geitler, 1932; Bourrelly, 1966; Komárek, 2013.). Akinete abundance was estimated for the 14 studied points, i.e., 8 points in pelagic areas and 6 points in littoral areas. Six replicates per sample were analyzed in this study. Before counting, binding with SYTOX green (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was carried out by adding 1  $\mu$ l of 50 mM SYTOX green to 1 ml of the akinete-containing solution and incubating the solution for at least 30 min in the dark (Gerphagnon et al., 2013a); 2 ml of this solution was then filtered through an 8  $\mu$ m mesh (TETP filter; Merck Millipore, Tullagreen, Ireland). Akinetes were counted at a magnification of x 160 with an epifluorescence microscope (Laborlux S; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), and 40 fields were counted for each filter. Two series of counts were performed for each filter (Legrand et al., 201a), one at 546 nm to distinguish intact akinetes still containing chlorophyll pigments and one at 488 nm to discriminate damaged akinetes with SYTOX green staining.

*Akinete germination experiments.*

The *in situ* akinete germination corresponds to the germinating akinetes observed in the surface sediments sampled in April 2015. Extracted akinetes from Lake Aydat sediment (at P1, P2, P3, and L6) were kept under controlled conditions and observed every 48 h for *D. macrosporum* and every 12 h for *D. flos-aquae* (Fig. 9). Two experiments were performed in order to follow the germination of the akinetes. The first experiment, over a period of 6 days, was carried out with four different samples (P1, P2, P3, and L6), sampled at 0, 48, 96, and 144 h. The second experiment was shorter (72 h), with more closely spaced sampling (0, 12, 24, 36, 48, 60, and 72 h), and was performed with 2 samples (P2 and L6). In order to collect a sufficient number of akinetes for germination experiments, these resistant cells were concentrated after extraction, with the Ludox protocol described above, from 36 ml of sediment per sample. Then, supernatants containing akinetes were filtered through a 10  $\mu$ m filter under a pressure of 400 Mpi. The filter was rinsed with distilled water in order to detach the akinetes. The solution obtained was filtered on first 100  $\mu$ m and then 50  $\mu$ m nylon filters, in order to remove particles such as larger organic and mineral particles and Chroococcales colonies. Finally, the akinetes were concentrated again during a last filtration with a 10  $\mu$ m

*Chapitre 3 : Relation entre akinètes dans le sédiment récent et cellules  
végétatives dans la colonne d'eau*

filter, under pressure. Akinetes were collected from the filter using 2.8 ml of BG11 medium (Sigma-Aldrich). The germination experiments were performed in triplicate for each analyzed sample. Each replicate of 800  $\mu\text{l}$  of BG11 medium with akinetes was split into cellular culture wells (48-well plate for cellular tissue; VWR, Radnor, PA, USA) and placed in continuous white light ( $6 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) at  $20^{\circ}\text{C}$ . For each sampling time, 80  $\mu\text{l}$  of homogenized solution of each replicate was analyzed. These solutions were bound with SYTOX green under the same conditions as described above. Then, the 80  $\mu\text{l}$  of solution was filtered through a 47 mm TETP filter and placed on a slide under a cover, and cells were counted by performing transects of the whole sample (magnification of  $\times 200$ ), using an epifluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200 M).

*Statistical analyses.*

The normality of all data and the variance homoscedasticity were evaluated using Shapiro-Wilk and Levene tests, with PAST (version 3.04) and XLSTAT (version 2015.3.01.19199) software. If samples did not follow a normal distribution, then they were normalized with a  $\log_{10}$  function (Warton et al., 2006) and the first two tests were performed again. Estimations of the numbers of *D. macrosporum* cells present during the whole blooms were performed by calculating the integrals of cellular kinetics (Fig. 3), using OriginPro software (version 8.0725). In this way, the total numbers of cells were estimated for each studied point, for both vegetative cells and akinetes in the water column (Fig. 4). Then, one-way ANOVA, coupled with the post hoc Tukey's test with a 5% confidence interval, was performed in order to determine differences in the numbers of vegetative cells or akinetes, depending on the sampling station (P1, P2, and P3), for the 2 years covered by the survey (Fig. 4). Student's t tests were performed for each studied species in order to highlight differences based on the sampling area and the year of sampling for akinete distributions in sediments (Table S1).

In order to detect the differences in intact akinete distributions in Lake Aydat sediments, MANOVA was carried out with R Commander (version 1.6-1). A post hoc Tukey's test with a 5% confidence interval was also performed (Fig. 4). Two-way ANOVA with a post hoc Tukey's test with a 5% confidence interval was also performed with the PAST software, to highlight the significant differences in in situ akinete germination in April 2015, depending on the species studied and the site location (littoral versus pelagic areas) (Fig. 8). Maps

representing the spatial distribution of akinetes in surface sediment were produced using Surfer software (version 7.02), using kriging as the gridding method.

### Supplemental material

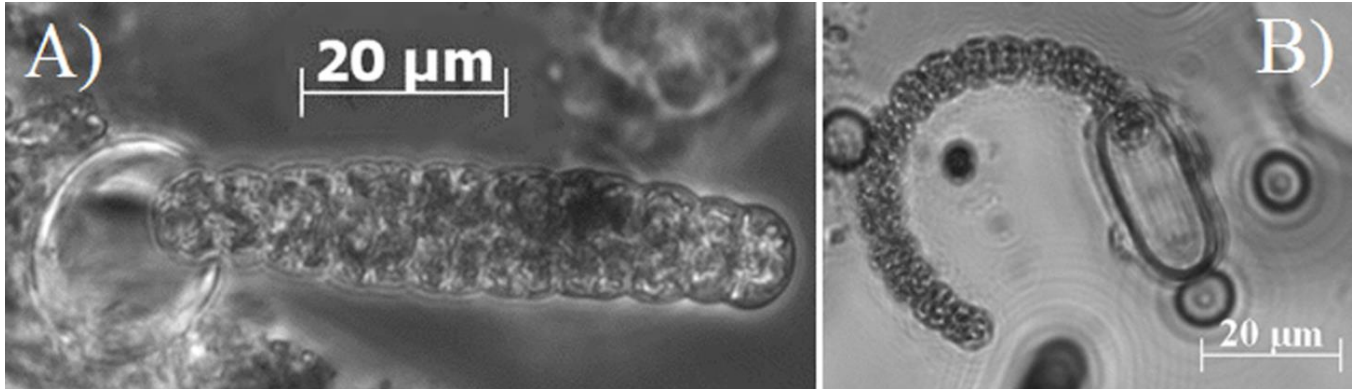


Figure S1: Photomicrographs of (A) *D. macrosporum* and (B) *D. flos-aquae* hormogonia.

Table S1: Student tests highlighting the spatial and temporal differences of akinete distributions in sediment (\*\*\*) represents a  $p$  value  $\leq 0.001$ , \*\* represents  $0.01 \leq p$  value  $< 0.001$  and \* represents  $0.05 \leq p$  value  $< 0.01$ .

	<i>Dolichospermum macrosporum</i>	<i>Dolichospermum flos-aquae</i>
December 2014 (pelagic) versus December 2014 (littoral)	<u>Pelagic&gt;Litoral</u> ***	<u>Pelagic&gt;Litoral</u> ***
December 2015 (pelagic) versus December 2015 (littoral)	<u>Pelagic&gt;Litoral</u> ***	<u>Pelagic&gt;Litoral</u> ***
April 2015 (pelagic) versus April 2015 (littoral)	<u>Pelagic&gt;Litoral</u> ***	<u>Pelagic&gt;Litoral</u> ***
December 2014 (pelagic) versus April 2015 (pelagic)	<u>December 2014&lt;April 2015</u> ***	<u>December 2014&lt;April 2015</u> **
December 2014 (littoral) versus April 2015 (littoral)	<u>December&gt;April 2015</u> *	<u>December&gt;April 2015</u> ***
December 2014 (pelagic) versus December 2015 (pelagic)	<u>December 2014&gt;December 2015</u> ***	<u>December 2014&gt;December 2015</u> *
April 2015 (pelagic) versus December 2015 (pelagic)	<u>April 2015&gt;December 2015</u> ***	<u>April 2015&gt;December 2015</u> *
December 2014 (littoral) versus December 2015 (littoral)	<u>December 2014&gt;December 2015</u> ***	<u>December 2014&gt;December 2015</u> ***
April 2015 (littoral) versus December 2015 (littoral)	<u>April 2015&gt;December 2015</u> ***	<u>April 2015&gt;December 2015</u> ***

### Acknowledgments

We thank Kristell Crenn, Léa Chartrain, and Fanny Perrière for their help during samplings. We also thank Marianne Coulon and Fran Van Wyk de Vries for helping to improve the English text. Finally, we thank the reviewers and the editor for improving the manuscript and for their helpful comments. B.L. was supported by a CIFRE Ph.D. fellowship from the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie in collaboration with Athos Environnement in the context of Conventions Industrielles de Formation par la Recherche. This work was also funded by l'Agence de l'Eau Loire-Bretagne.

---

**Chapitre 4 :**  
**La persistance des akinètes à moyen et  
à long termes dans le sédiment**

---





## **I) Introduction**

---

La compréhension des mécanismes impliqués dans la mise en place et la récurrence des blooms cyanobactériens passe inévitablement par l'intégration de données sur de grandes séquences temporelles. Comme l'analyse bibliographique le détaille, de nombreuses études ciblées sur le compartiment benthique ont déjà été conduites pour caractériser l'historique de systèmes lacustres (Domaizon et al., 2017). Bien que les études portant spécifiquement sur les cyanobactéries ne soient pas nombreuses, le panel méthodologique pour caractériser les populations cyanobactériennes passées reste varié, allant de la détection de molécules aux recherches de micro-restes. Ainsi, les akinètes ont déjà été utilisés comme marqueurs des proliférations nostocaléennes passées (Huber, 1984) y compris sur des périodes de plusieurs milliers d'années (Eilers et al., 2004; Miras et al., 2015; Van Geel et al., 1994). Cependant, plusieurs points doivent encore être éclaircis pour pouvoir valider l'utilisation des akinètes comme paléo-indicateur. En effet, le protocole utilisé dans les précédentes études est le même que celui pour extraire le pollen (Miras et al., 2015; Van Geel et al., 1994) et est très destructeur (utilisation de divers acides) donc s'avère peu adapté à la structure des akinètes. La validation d'un paléo-indicateur passe aussi par la question de sa résistance dans le temps lors d'un enfouissement prolongé. En effet, le temps, l'augmentation progressive de la pression et la composition sédimentaire pourraient être à l'origine de dégradations des akinètes dans le sédiment (Eilers et al., 2004) sans qu'aucun effet direct n'ait été démontré.

Par ailleurs, le génome cyanobactérien étant démultiplié dans les akinètes (Sukenik et al., 2015), ces cellules sont porteuses d'informations génétiques importantes, notamment concernant le potentiel toxique des proliférations passées. Cependant, il semble que ce potentiel ne soit pas encore pleinement exploité.

Enfin, la caractérisation du potentiel de germination des akinètes enfouis dans le sédiment a été étudiée seulement sur des périodes allant de quelques dizaines d'années à 180 ans d'enfouissement (Livingstone and Jaworski, 1980; Wood et al., 2009). Par conséquent, le potentiel de germination des akinètes anciens, puis la mise en culture de cyanobactéries anciennes de plusieurs milliers d'années, ayant vécues dans des conditions environnementales mal définies, nous renseigneraient sur leur capacité de résistance et d'adaptation. L'obtention d'une biomasse conséquente permettrait aussi de caractériser plus précisément, en termes de morphologie, d'écologie et de génétique ces cyanobactéries vivant il y a des centaines ou milliers d'années.

Ainsi, l'objectif de ce chapitre est de proposer une approche globale permettant de caractériser l'historique des successions nostocaléennes sur le lac d'Aydat. Ce chapitre s'appuiera sur l'étude de deux carottes sédimentaires, l'une intégrant une séquence temporelle à court terme et l'autre à long terme. La première carotte (Article 4) intègre les derniers 220 ans d'histoire du lac. Ce laps de temps correspond à une période charnière pour le lac, puisque c'est au cours de la seconde moitié du XX<sup>e</sup> siècle que le degré d'anthropisation du bassin versant a atteint son paroxysme (Lavrieux et al., 2013). Cette anthropisation aurait favorisé la récurrence des proliférations cyanobactériennes, en particulier de *D. macrosporum*, dès le début des années 1980 (Lafforgue et al., 1990). La caractérisation physico-chimique (isotopes radioactifs, susceptibilité magnétique) de la carotte a permis de mettre en évidence l'empreinte d'évènements marquants de 1790 à 1986 (Des crues majeures de la Veyre à la tragédie de Tchernobyl). Ainsi, il a été possible d'associer les distributions d'akinètes à des périodes connues. Dans ce contexte historique documenté, il était plus aisé de valider l'utilisation des akinètes en tant que paléo-indicateur en comparant historique récent et connu du lac avec nos analyses sédimentaires. De plus, le choix d'une résolution d'analyse fine (quelques années) a permis de déterminer l'échelle des variations temporelles des différents paramètres étudiés. Finalement, l'importante quantité de matière sédimentaire à disposition a été utilisée pour affiner la mise au point des protocoles afin qu'ils soient optimaux lors de l'analyse de la seconde carotte où la quantité de sédiment à disposition était beaucoup plus limitée.

La seconde carotte (Article 5) prend en compte toute l'épaisseur sédimentaire du lac soit plus de 6700 ans d'histoire du lac d'Aydat. Cette partie du projet fut réalisée en collaboration avec le laboratoire de Géographie Physique et Environnementale (Geolab, UMR 6042). Cette séquence fut caractérisée (i.e isotopes radioactifs, susceptibilité magnétique, analyses d'éléments chimique, etc...) (Lavrieux et al., 2013) et a conduit à l'élaboration d'un modèle d'âge (maximum d'erreur  $\pm 100$  ans). Ici, 72 échantillons, de 1 à 2 cm d'épaisseur, distribués sur l'ensemble de la carotte ont été sélectionnés. Ces échantillons ont également fait l'objet d'analyses de bio-indicateurs de paléo-écologie tels que les diatomées, les pollens mais aussi les akinètes extraits avec des protocoles spécifiques aux méthodes palynologiques (Miras et al., 2015). Ainsi, il a été possible de comparer les résultats et l'efficacité des différents protocoles employés. Ces analyses permettront, sur une large échelle temporelle, d'associer la distribution des akinètes aux facteurs anthropiques et climatiques de l'historique du lac

d'Aydat. L'objectif de cette approche est la mise au point et la validation potentielle d'un bio-indicateur paléo-écologique basé sur les akinètes.

Les outils microscopiques développés dans les précédents chapitres permettront de mettre en évidence les variations de diversité, d'abondance et d'intégrité des akinètes présents dans le sédiment de ce lac. L'analyse de l'intégrité des akinètes n'a jamais été abordée dans les sédiments anciens et renseignera notamment sur les capacités de résistance et les stratégies écologiques de ces cellules en conditions extrêmes. En complément de cette caractérisation microscopique des akinètes, la recherche des gènes impliqués dans la biosynthèse de la microcystine (*mcyA* et *mcyB*) et de l'anatoxine-a (*anaC*) permettra de révéler la présence de génotypes toxiques au cours du temps. La détection de ces gènes dans le sédiment brut sera utilisée comme marqueur de la présence passée de génotypes toxiques dans la colonne d'eau. Ces gènes seront aussi recherchés dans des akinètes intègres afin de déterminer le potentiel toxique propre aux populations anciennes de Nostocales.

Pour finir, la caractérisation du potentiel de germination des akinètes anciennes constitue l'un des derniers objectifs de ce chapitre et finalise l'analyse globale des sédiments anciens. Ce point se focalisera principalement sur des échantillons riches en akinètes intègres. Pour maximiser les chances de réussite, plusieurs approches combinant milieux liquides et milieux solides ont été entreprises.

## **II) Article 4**

---

### **Benthic Archives Reveal Recurrence and Dominance of Toxigenic Cyanobacteria in a Eutrophic Lake over the Last 220 Years**

Benjamin Legrand <sup>1,2,\*</sup>, Amélie Lamarque <sup>1</sup>, Marion Sabart <sup>1</sup> and Delphine Latour <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Microorganismes Génome et Environnement (LMGE), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Clermont Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France; amelie.lamarque@uca.fr (A.L.); marion.sabart@uca.fr (M.S.); delphine.latour@uca.fr (D.L.)

<sup>2</sup> ATHOS Environnement, 112 Avenue du Brézet, F-63100 Clermont-Ferrand, France

\* Correspondence: benjaminlegrand02000@yahoo.fr or benjamin.legrand@athos-environnement.fr;  
Tel.: +33-4-73-40-77-12; Fax: +33-4-73-40-76-70

**Article publié dans**

**Toxins, 9(9), 271 (2017)**

Academic Editor: Miquel Lürling

Received: 3 August 2017; Accepted: 1 September 2017; Published: 4 September 2017



## Abstract

Akinetes are resistant cells which have the ability to persist in sediment for several decades. We have investigated the temporal distribution of akinetes of two species, *Dolichospermum macrosporum* and *Dolichospermum flos-aquae*, in a sediment core sampled in Lake Aydat (France), which covers 220 years. The upper part, from 1907 to 2016, the number of akinetes fluctuated but stayed at high concentrations, especially for *D. macrosporum* in surface sediment (with the maximal value close to  $6.10^5$  akinetes  $\text{g DW}^{-1}$  of sediment), suggesting a recurrence of blooms of this species which was probably closely related to anthropic eutrophication since the 1960s. Before 1907, the abundance of akinetes of both species was very low, suggesting only a modest presence of these cyanobacteria. In addition, the percentage of intact akinetes was different for each species, suggesting different ecological processes in the water column. This percentage also decreased with depth, revealing a reduction in germination potential over time. In addition, biosynthetic genes of anatoxin-a (*anaC*) and microcystin (*mcyA*) were detected. First results show a high occurrence of *mcyA* all down the core. In contrast, *anaC* gene was mostly detected in the surface sediment (since the 1980s), revealing a potentially more recent occurrence of this cyanotoxin in Lake Aydat which may be associated with the recurrence of blooms of *D. macrosporum* and thus with anthropic activities.

**Keywords:** sediment; Nostocales; akinetes; past blooms; *anaC* gene; anatoxin-a; *mcyA* gene; microcystin

## 1. Introduction

Cyanobacterial blooms and the environmental nuisances they cause have increased continually over the last few decades due to anthropization of aquatic systems (Merel et al., 2013). However, cyanobacteria are known to be one of the first photosynthetic organisms on earth (Schopf, 1996) and their proliferations have occurred naturally for a very long time (De Candolle, 1985). Thus, the real assessment of long-term cyanobacteria dynamics remains difficult. The sediment compartment, by stocking resting cells and macro-rests, represents a means of reconstituting the lake's history; benthic archives are already known to store evidence of past aquatic ecosystems, including microbial diversity (Domaizon et al., 2013; Martinez De la Escalera et al., 2014). Concerning nostocalean cyanobacteria, their resistant cells, termed akinetes, have the ability to resist a huge panel of abiotic constraints, both in the water and in sediment, such as anoxia, desiccation and lack of light (Kaplan-Levy et al., 2010). In this way, sediments contain real evidence of past nostocalean recurrences, and long-term data analysis make it possible to highlight the dynamics of past planktonic nostocalean diversity on a decennial time scale (Capo et al., 2015). A few studies have already investigated past cyanobacterial recurrences in lacustrine ecosystems using fossil akinetes coupled with other markers (Van Geel et al., 1994; Eilers et al. 2004) and have described nostocalean dynamics over 1950 years calibrated Before Present (cal. BP). However, no studies have considered the long-term viability of akinetes in sediment, which is used to assess the resistance of these cells. Only Wood et al., (2009) tested the potential of the capacity of cells preserved in sediment to come back to life, and successfully detected akinete-forming nostocaleans in sediments dating back to 120 BP. The analysis of the 16S rRNA gene also helps to investigate the past distribution of cyanobacteria in sediment and cyanobacteria genes were detected over the last 150 years (Wood et al., 2009; Pal et al., 2015). Parallel studies revealed the presence of potentially toxic cyanobacterial taxa, based on detection of the *mcyA* gene, throughout the last century in Lake Zurich (Monchamp et al., 2016). The presence of *mcyB* mRNA in benthic populations of *Microcystis* buried in the sediment for the last few years has also been found in the Grangent reservoir (France) (Misson et al., 201a). Nevertheless, most of these studies focus on the most ubiquitous hepatoxin, microcystin, even though a host of other cyanotoxins exist. Among them, anatoxin-a was one of the first cyanotoxin to be identified and characterized (Delvin et al., 1977). This toxin was particularly studied in lotic environments after dog poisoning (Cadel-Six et al., 2007). Several studies from the last few years have also highlighted the presence of



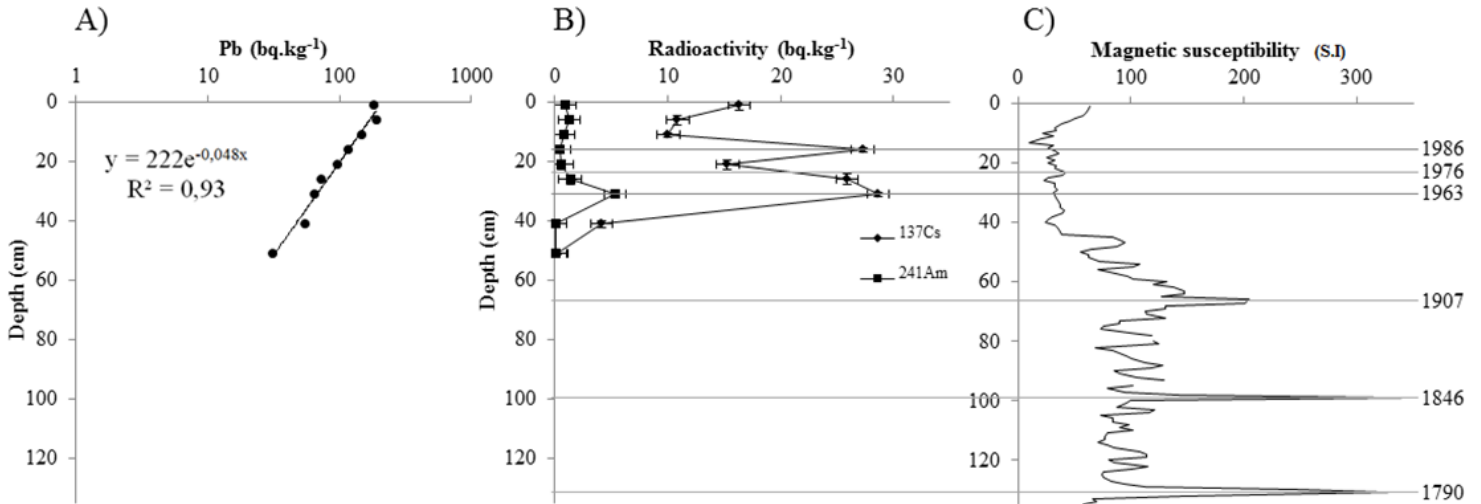
anatoxin-a in lacustrine environments, suggesting an unexpected occurrence (Ballot et al., 2010a; Rantala-Ylinen et al., 2011; Sabart et al., 2015). Recent advances in molecular biology have allowed biosynthetic gene clusters to be characterized, and primers have been designed to highlight potential producers of anatoxin-a, including those present in the sediment (Legrand et al., 2016b).

To better understand patterns in species diversity and toxicity through time, it is essential to simultaneously integrate a quantitative characterization of past cyanobacterial proliferations, their past toxic potential and their capacity to survive long term in sediment. For this purpose, we used both microscopic and molecular approaches in order to reconstruct past nostocalean recurrences in terms of abundance, viability and toxic potential in a eutrophic lake (Lake Aydat, France). We identified the akinete distribution through a sediment core covering the last 220 years, and went on to characterize the physiologic state of akinetes in sediment, including the pool of intact akinetes. In parallel, we detected the presence of biosynthetic genes of two cyanotoxins, anatoxin-a and microcystin, first in total sediment and then focusing only on intact akinetes. Finally, we compared these patterns with other parameters such as watershed anthropization to examine the potential factors driving the long-term recurrence of Nostocales in Lake Aydat.

## **2. Results**

### *2.1. Sedimentary Cored Chronology*

Measurements of  $^{210}\text{Pb}$  provide an estimate of  $0.65 \text{ cm year}^{-1}$  for the mean sedimentation rate in Lake Aydat (Figure 1A) which is in accordance with the results of Lavrieux et al. (2013) ( $0.6 \text{ cm year}^{-1}$ ). The first peak of  $^{137}\text{Cs}$  ( $27.3 \text{ Bq kg}^{-1}$ ) at 17.5 cm corresponds to the nuclear disaster of Tchernobyl in 1986 (Figure 1B). A second peak of  $^{137}\text{Cs}$  ( $28.6 \text{ Bq kg}^{-1}$ ), combined with a peak of  $^{241}\text{Am}$  ( $5.37 \text{ Bq kg}^{-1}$ ), is also observed at 32.5 cm. These correspond to the French nuclear assays performed in the Sahara desert in 1963. Measurements of magnetic susceptibility through the core can be divided into two major parts. The first (0–45 cm) possesses low values, including 0 and 45 S.I (Figure 1C), while values in the second part are higher at around 60–150 S.I. We have compared our profile with those of Lavrieux et al., (2013), and the three major peaks that appear at 67, 99 and 131 cm correspond to major floods. These floods occurred in 1907, 1846 and 1790, respectively, according to Lavrieux et al., (2013).



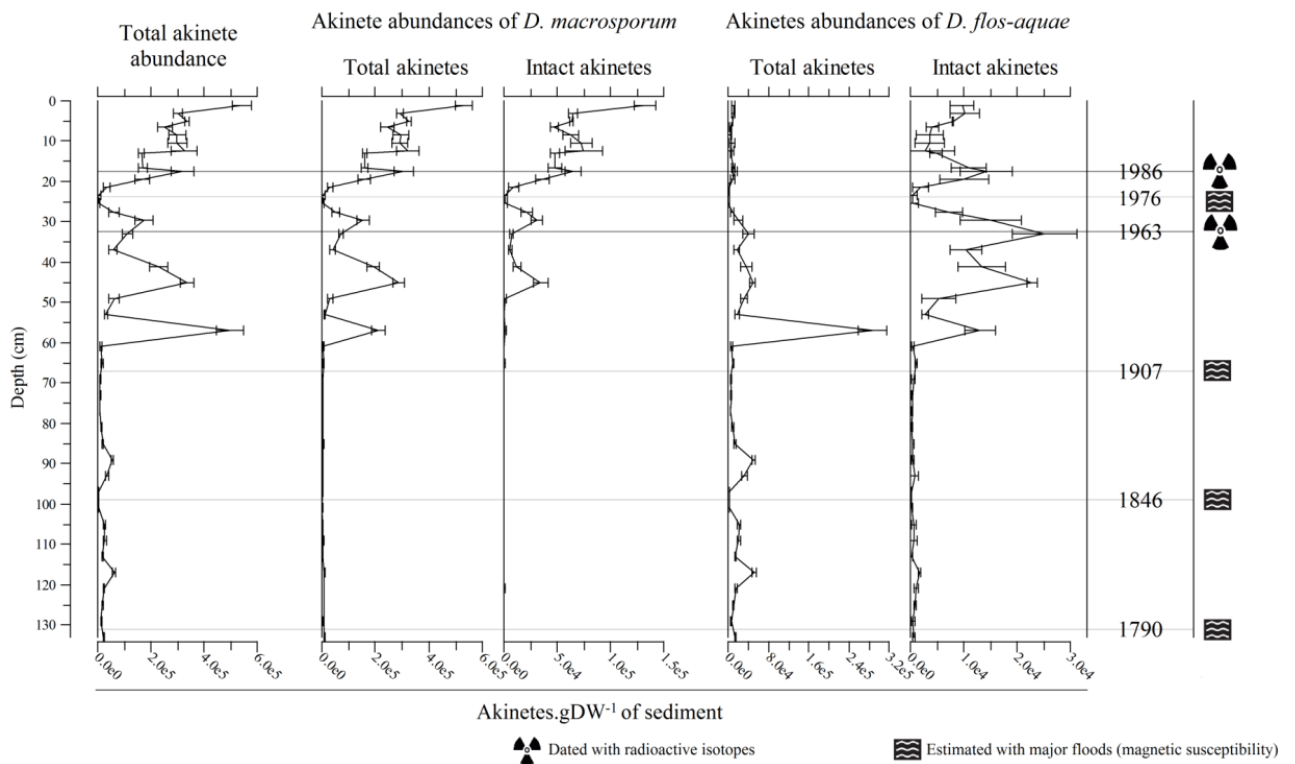
**Figure 1: Chronology of the sediment core: (A) decrease of <sup>210</sup>Pb; (B) peaks of <sup>137</sup>Cs and <sup>241</sup>Am; and (C) magnetic susceptibility.**

## 2.2. Vertical Akinete Distribution in Sediment

### 2.2.1. Akinete Abundance along the Core

Globally, the akinete distribution was negatively correlated with depth and magnetic susceptibility (Spearman correlation (SC) =  $-0.64$  and  $-0.65$  respectively,  $p < 0.001$ ). Total akinete distribution along the core can be divided into three major parts (Figure 2): (1) the lowermost part, from 135 to 60 cm, was characterized by low akinete abundance, with between 3330 and 62,700 cells g of dried sediment<sup>-1</sup> (g DW<sup>-1</sup>) of total akinetes with a mean value of 21,000 akinetes g DW<sup>-1</sup> sediment; (2) the middle part, from 60 cm to 20 cm, was characterized by higher and very variable akinete abundance, with the number of total akinete between 490 and 498,000 cells akinetes g DW<sup>-1</sup> sediment; and (3) the uppermost 20 cm were characterized by constant higher abundances of more than 150,000 akinetes g DW<sup>-1</sup> sediment, which shoots up to 542,000 cells g DW<sup>-1</sup> sediment at 1 cm. Two akinete morphotypes were found and counted along the core: ovoid and stick (corresponding, respectively, to *Dolichospermum macrosporum* and *Dolichospermum flos-aquae*). The vertical distribution of these two species was very different. *D. macrosporum* was more abundant and contributes mainly to the total akinete distribution, which shows a similar trend. For example, the correlation with depth was more acute with *D. macrosporum* (SC =  $-0.73$ ,  $p = 4.16 \times 10^{-8}$ ) than *D. flos-aquae* (SC =  $0.28$ ,  $p = 0.07$ ). Total akinete abundance of *D. macrosporum* reached a maximum of 531,000 akinetes g DW<sup>-1</sup> sediment in the surface sediment and then

rapidly fluctuated up to 60 cm, with values close to 0 at 25.5 and 53 cm, and reaching 286,000 akinetes g DW<sup>-1</sup> sediment at 45 cm. On the contrary, total akinete abundance of *D. flos-aquae* remained low and constant all along the core, with values of between 419 and 48,700 akinetes g DW<sup>-1</sup> of sediment. The only anomalously high value came at a depth of 57 cm, with value of 288,000 akinetes g DW<sup>-1</sup> of sediment. The akinete dominance between the two observed species evolved overall along the core (Figure S1). First, from the bottom up to 81 cm, *D. flos-aquae* was almost always the dominant species with more than 60% akinetes present in the sediment. This increased to 91% and 94% at 93 cm and 89 cm, respectively. Only twice during this sequence was *D. macrosporum* the dominant species, at 97 and 101 cm. Then, from 81 to 49 cm, the akinete distribution more or less equilibrated, with a slight dominance of *D. flos-aquae* at around 60% of total akinetes. Finally, the uppermost part (45–0 cm) was defined by the dominance of *D. macrosporum*, which was extremely marked in the top 25 cm where it exceeds 90%.

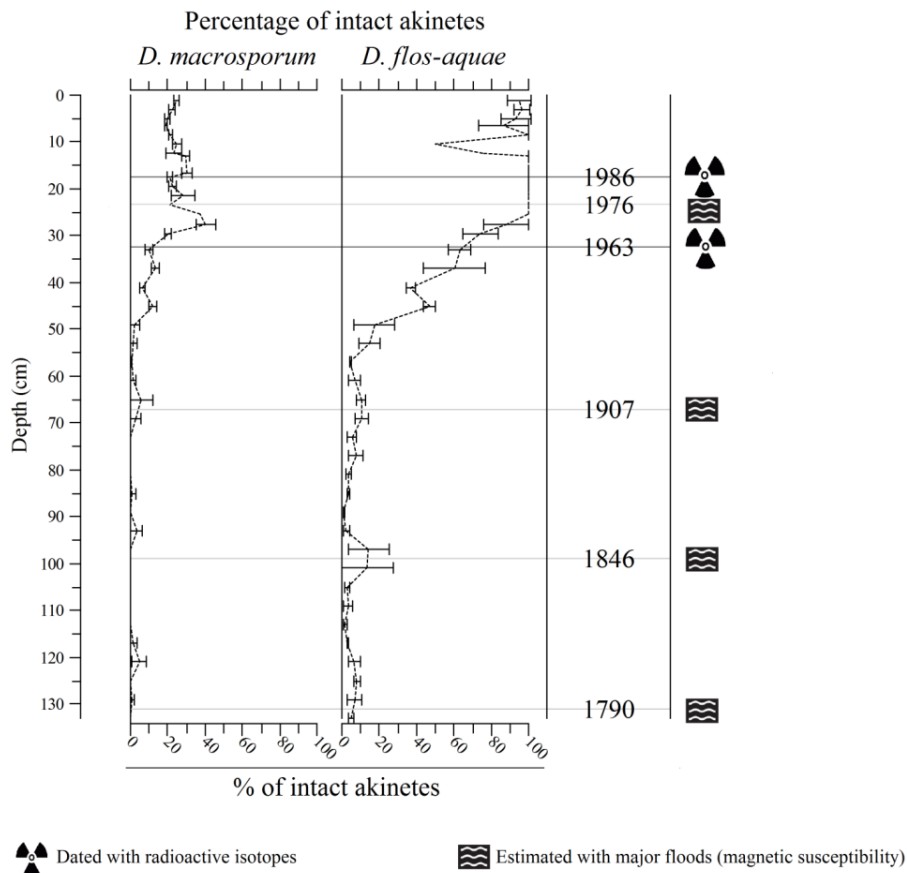


**Figure 2: Distributions of total, *D. macrosporum* and *D. flos-aquae* akinetes through the sediment core.**

### 2.2.2. Akinete Integrity along the Core

The percentage of intact akinetes fluctuates along the core (Figure 3) and was dependent on the species, especially in the upper part. From 29.5 to 0 cm, the percentage of intact

akinetes was between 19% and 40% for *D. macrosporum*, whereas it was between 50% and 100% for *D. flos-aquae*, with mean values of 25% and 91%, respectively. Independent of this difference in percentage, the two kinetics along the core followed the same pattern ( $SC = 0.85, p = 7.3 \times 10^{-13}$ ). This pattern is strongly negatively correlated with depth ( $SC = -0.84, p < 2 \times 10^{-12}$ ), characterized by higher values and viability in the upper part. From 30 to 60 cm, the integrity progressively decreased to values of less than 10%. From this depth down to the bottom of the core, the integrity remained low, with values of between 0% and 5% and 1% and 14% for *D. macrosporum* and *D. flos-aquae*, respectively.

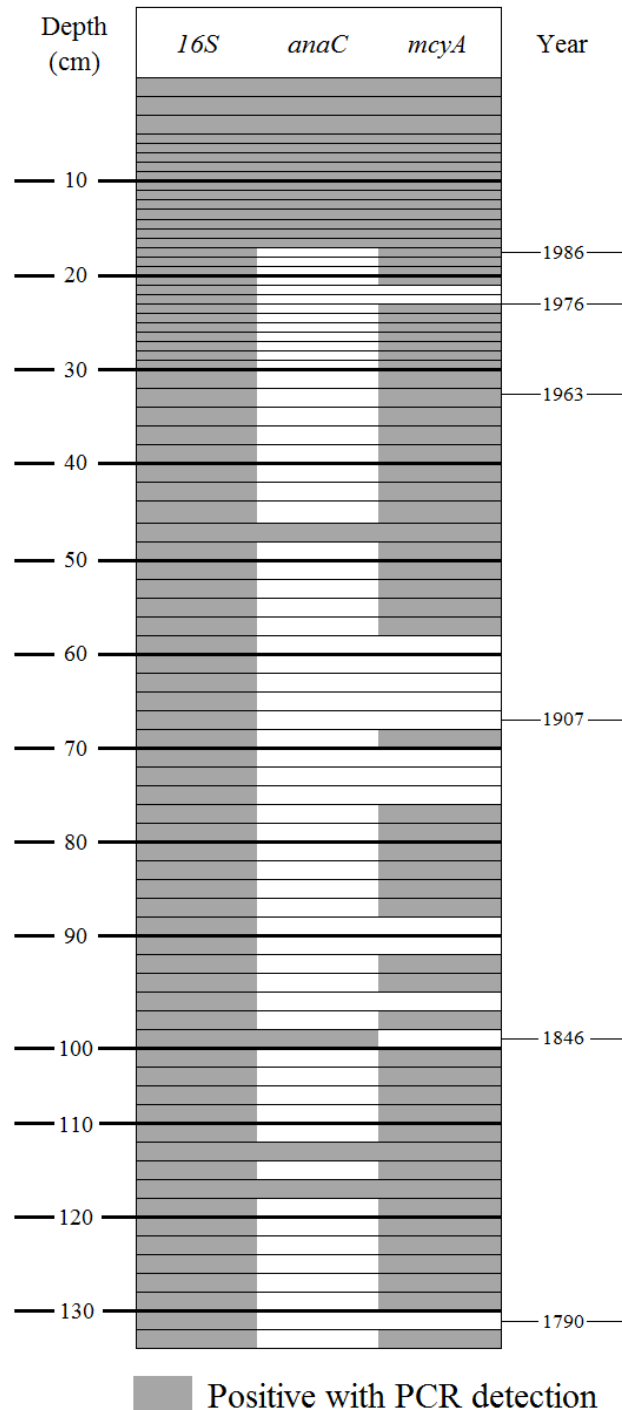


**Figure 3: Percentage of intact akinetes of *D. macrosporum* and *D. flos-aquae* through the sediment core.**

### 2.3. Target Gene Detection in Total Sediment

In total sediment, 16S rRNA gene was detected in all the studied samples (Figure 4). The *mcyA* gene, detected with classic PCR, is well represented and was detected in 64 samples. It was only absent from three major zones: zones 21–23 cm, 58–72 cm and 88–90 cm. In addition, this gene was also not detected in a few isolated samples (74–76, 98–100, 102–104 and 130–132 cm). *anaC* gene, detected using nested PCR, was found in the uppermost

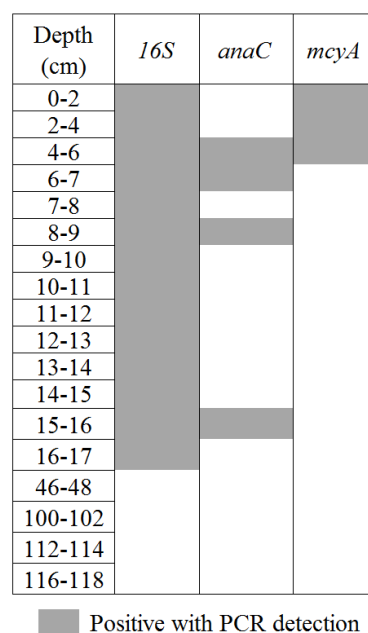
fourteen samples, corresponding to depths of 0–17 cm, which therefore included the same two samples detected with classic PCR (14–16 cm, data not shown). Nested PCR was also able to detect *anaC* genes in four other samples located at greater depth (46–48, 100–102, 112–114, and 116–118 cm).



**Figure 4: Detection of the targeted genes in total sediment. Layers represent the sampling performed along the sediment core (79 samples).**

#### 2.4. Target Gene Detection in Extracted Intact Akinetes

The eighteen samples that have positive results in total sediment with both *mcyA* and *anaC* were chosen to look for these genes in the akinete cells. These samples correspond to the uppermost 14, from 0 to 17 cm, as well as segments at 46–48, 100–102, 112–114, and 116–118 cm (Figure 5). DNA extracted from intact akinete fractions revealed the presence of the 16S rRNA gene in all but the last four selected samples above 46 cm due to a low concentration of intact akinetes. The *mcyA* gene was detected in the three surface layers (0–2, 2–4, and 4–6 cm) and the *anaC* gene was detected in four samples (4–6, 6–7, 8–9, and 15–16 cm) exclusively with nested PCR.



**Figure 5: Detection of the targeted genes in intact akinetes.**

#### 2.5. Multiple Factor Analysis

Multiple factor analysis including akinete abundances, akinete integrity and presence/absence of toxin genes allows samples to be divided into different groups (Figure 6). The first group is composed of surface samples (from 3 to 17.5 cm) characterized by *D.macrosporum* akinete abundance, high akinete integrity and the presence of *mcyA* and *anaC* genes (Surface sediment group). A second group is composed of all the samples from the bottom of the core and is characterized by low akinete abundance, low integrity and the absence of *anaC* genes (Deep sediment group). This group can be divided into two smaller

groups depending on the presence or absence of *mcvA* gene. There is a progressive change between the surface sediment and the bottom sediment groups creating a transition group.

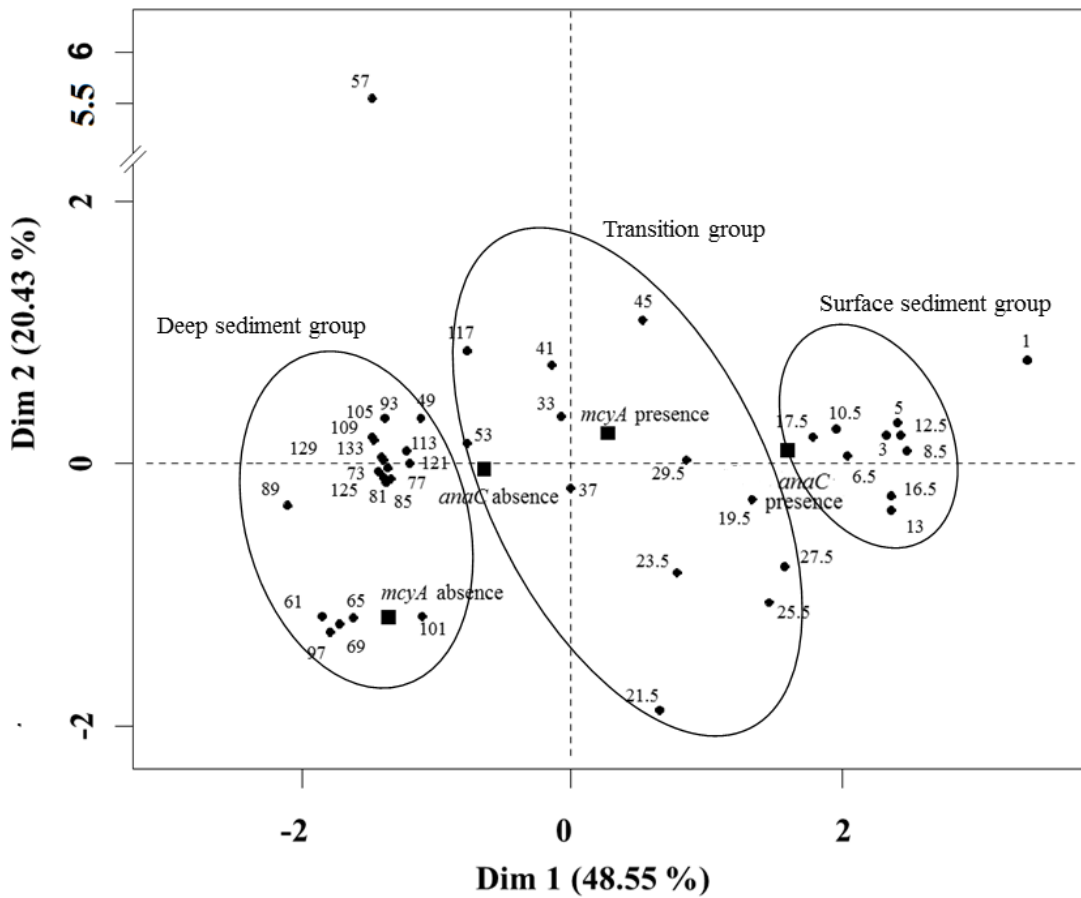


Figure 6: Individual factor map from the multiple factor analysis (MFA).

### 3. Discussion

We investigated the distribution of akinetes in a 220-year-old sediment core to reconstruct past nostocalean recurrences in Lake Aydat. This study highlights the presence of two species, *Dolichospermum macrosporum* and *D. flos-aquae*, which have already been detected in surface sediment of this lake (Legrand et al., 2016a). Although akinetes of these two species were observed all along the core, drastic vertical changes are apparent, with high concentration in the recent part of the core, followed by low abundance in the oldest part. Two main hypotheses can explain this dynamic: (i) the disappearance of akinetes related to length of time spent in the sediment; and (ii) a past period, before 1907, with low nostocalean blooms. Lake Aydat is considered as having been eutrophic since approximately ca. 150 cal BP (around 1800 AD) (Lavrieux et al., 2013). Nevertheless, the 1800–1920 period was characterized as a period with strong erosion of the watershed (Michelin, 1996). This erosion,

linked to the evolution of human practices within the watershed, and past climatic conditions (i.e., high rainfall inducing major floods but also the important detrital input from the Veyre River during this period) may have an effect on the water column stability and constitute unfavorable growth conditions for Cyanobacteria (Mitrovic et al., 2003; Paerl et al., 2011; Paerl et Otten; 2013). The negative correlation between total akinetes and magnetic susceptibility along the core ( $CS = -0.65$  ( $p = 3 \times 10^{-6}$ )), supports this idea. Thus, the low abundance of akinetes in the deepest part of the core may be due to a period when there were no, or low blooms of Nostocales. On the other hand, the decrease of akinete integrity of both species in the deepest part of the core also suggests that akinetes may undergo deterioration with time. For example, akinetes in sediment may be damaged by physico-chemical processes such as pressure or sediment composition (Eilers et al., 2004). Unfortunately, there is no information, to our knowledge, about akinete survival rate in sediment. The only available information is related to the survival time in sediment: Livingstone and Jaworski, (1980) and Wood et al., (2009) have highlighted that some akinetes may stay viable after 64 years and after 170 years, respectively. Furthermore, in our study, akinetes from around 110 years were also able to germinate (data not shown) despite a low percentage of intact akinetes. This indicates that even if the integrity of akinetes seems to rapidly decrease after a one hundred year duration in the sediment, some of them were still able to resist and re-germinate. This akinete resistance is probably driven at a species or genotype level, as the core evolved not only with time but also with species. In the uppermost 30 cm, *D. macropsorum* akinetes were characterized by a low integrity whereas a high one was measured for *D. flos-aquae*. The same applies in the surface sediment of Lake Aydat, where the percentage of intact akinetes varied from 7 to 60% for *D. macroporum* and *D. flos-aquae* respectively (Legrand et al., 2017b). This high species-dependent variability may be explained by a species-specific sensitivity to ecological factors both in the water column and in sediment (Legrand et al., 2016a, 2017b). For example, it has already been highlighted that intact *D. macrosporium* akinetes were less resistant than intact *D. flos-aquae* akinetes for several abiotic factors such as desiccation (Legrand et al., 2016a). Furthermore, this difference between species may be linked to parasitic interaction in the water column. *D. macrosporium* akinetes are known to be the specific host for the chytrid *Rhizosiphon akinetum* (Gerphagnon et al., 2013b). For example, Gerphagnon et al., (2017) have reported that 45.6% of the 92.3% *D. macrosporium* lysed akinetes present in surface sediment of Lake Aydat in 2014 were due to *R. akinetum* parasitism. Chytrid infection acts at a species or chemotype/genotype level, so akinete integrity can be affected at the same level and this could explain in part the observed



difference in integrity between the two *Dolichospermum* species. Thus, in the core the akinete integrity dynamics may be the result of both the effect of time but also a fingerprint of the state of the akinetes in the water column. Even if an akinete had undergone cellular lysis, the empty wall may persist in sediment in the same way as diatom frustules. For example, high abundances of *Aphanizomenon* fossil akinetes from 3900 years ago were detected in sediment from Lake Gosciadz (Poland) (Van Geel et al., 1994). Akinetes are surrounded by a thickened cell wall and a multilayered extracellular envelope (Nichols et al., 1982; Herdman, 1987a, 1987b) composed of glucose-rich carbohydrate and amino compounds (Cardemil et Wolk, 1976; Cardemil et Wolk, 1979) which are able to persist in sediment. Thus, we suggest that, for our case, under a few hundred years, the total abundance of akinetes can give reliable information about past nostocalean blooms as already described in other studies.

After a period of low cyanobacterial abundance in Lake Aydat, the 1920–1960 period may be characterized as a transitional period between the lowermost and the recent sediment. This part is characterized by a succession of akinete peaks reflecting that the system was only weakly stable. Moreover, the only peak of *D. flos-aquae* in the entire core is in this section, which may confirm rapid fluctuations in the environmental conditions. This transitional period may also be linked to evolution of the ground cover in the watershed, as forest progressively recolonized the land, thus reducing erosion (Michelin, 1996).

Finally, in the more recent part of the core, corresponding to the 1976–2016 period, the higher and stable akinete distributions highlighted a recurrence of nostocalean blooms. This is confirmed by the frequent observations of nostocalean blooms in the water column of Lake Aydat since at least the 1980s (Orcet, 1992). For example, Lafforgue et al., (1995) reported a *Dolichospermum* bloom in autumn 1984. The marked dominance of *D. macrosporum* in the uppermost centimeters of the core seems to confirm the trend of monospecific blooms. During the 1960s anthropic development led to the progressive destruction of the wetland located just upstream of Lake Aydat and reduced the length of the Veyre River by almost 1 km (Syndicat Mixte de la Vallée de la Veyre et de l'Auzon. 2017. Available online: <http://www.smvva.fr/actions/lacs-et-zones-humides>). This destruction of natural buffer areas, combined with agricultural practices, caused high nutrient concentrations in the Veyre River and then as input into the lake (Aleya, 1987; Lafforgue, 1990). For example, total annual phosphorus input in the lake reached 640 kg P year<sup>-1</sup> in the second half of the 1980s (Lafforgue et al., 1995). In the 1990s, this situation remained unchanged, with measurements of total phosphorus content carried out on the Veyre River upstream of Lake Aydat revealing high values of over 0.5 mg L<sup>-1</sup> in June 1991 (Orcet, 1992). At the same time, the number of

people living in the village of Aydat and in the lake's watershed since 1975 has rocketed (French Database from: L'École Des Hautes Etudes en Sciences Sociales (Ehess). 2016. Available online: [http://cassini.ehess.fr/cassini/fr/html/fiche.php?select\\_resultat=2247#](http://cassini.ehess.fr/cassini/fr/html/fiche.php?select_resultat=2247#) (accessed on 6 July 2017) probably creating a new input of nutrients into the lake. It is also now well known that an increase in temperature can be favorable to cyanobacterial blooms (Paerl and Otten, 2013; Mantzouki et al., 2016). The 20th century has undergone two major phases of temperature increase: 1920–1945 and 1980–present (Hansen et al., 2010). Although it is very complicated to establish any direct link between global warming and blooms in Aydat, the increase in temperature during these periods may have enhanced the development of cyanobacteria.

This study also highlighted a past recurrence of the *anaC* gene in older sediment between the two oldest flood events of 1790 and 1846. To our knowledge, this is the first study that has detected this gene in deep sediment which has previously only been detected in the water column (Rantala-Ylinen et al., 2011; Sabart et al., 2015) or in surface sediment in lacustrine systems (Legrand et al., 2016a). Nevertheless, it is surprising to find the *anaC* gene in only a few older samples, and then find a larger recurrence at the top of the core. This recent recurrence of the *anaC* gene may be associated with the recent dominance and omnipresence of *D. macrosporum* in Lake Aydat since the middle of the 1980s. Moreover, this gene was also detected in intact akinetes extracted from the sediment. We can therefore assume that *D. macrosporum* possesses this gene and that the large increase in this species over the last 30 years has promoted the recurrence of *anaC* gene. This is the first time that a combination of microscopic and molecular techniques has been used to show up a long scale recurrence of a toxigenic cyanobacterium. On the other hand, the low number of positive samples of intact akinetes extracted from the sediment compared to positive samples of total sediment indicates that the target genes were mainly present as free-DNA in sediment particles, as suggested for surface sediments from ten French sites (Legrand et al., 2016b). Furthermore, this weak percentage of toxic genotypes in intact akinetes suggests that a proportion of akinetes possessed biosynthetic genes and another part did not. This heterogeneity has already been highlighted in the water column for numerous toxigenic species (Graham et al., 2006; Briand et al., 2009; Sabart et al., 2015), as well as in akinetes from surface sediment (Legrand et al., 2016). Thus, these genes may derive from *Dolichospermum* vegetative cells or lysed akinetes but can also come from other cyanobacterial genera from other orders.

The vertical distribution of the two studied genes of cyanotoxins is very different throughout the core. Concerning microcystin and the *mcyA* gene, the major recurrence of

*mcyA* along the entire core indicates a significant occurrence of this toxic genotype over the last 220 years. The same pattern was also observed in Lake Zurich, linked to the presence of *Planktothrix rubescens* (Monchamp et al., 2016). Even though this species has never been detected in Lake Aydat, numerous microcystin-producing genera have been found: *Microcystis*, *Woronichinia*, *Pseudanabaena* (Lafforgue et al., 1995; Sabart et al., 2015). As some samples of the intact akinetes have positive detections of the *mcyA* gene, we can infer that at least one of the two studied species of *Dolichospermum* also possessed this gene. This is in accordance with the literature; some *Dolichospermum* are known to produce microcystin (Rapala et al., 1997). Thus, a mix of microcystin producers through time may be possible. In addition, detection of *anaC* and *mcyA* genes in some of the same samples suggests a past co-occurrence or at least of close succession of genotype producers of anatoxin-a and microcystin in the water column at Lake Aydat. The co-occurrence between microcystin and anatoxin-a has already been highlighted in the water column at different sites (Park et al., 1993, 1998; Ballot et al., 2003; Pirszel et al., 2004) well as at Lake Aydat in 2011 (Sabart et al., 2015). Contrary to these earlier studies, our results reveal that this co-occurrence is not recent but has been present since the middle of the 19th century, becoming recurrent from around 1986. However, even though the appearance and/or disappearance of toxic genotypes is clearly highlighted throughout the core, providing interesting information in terms of lake management (Dadeech et al., 2009), the possible mechanisms which triggered these phenomenon, such as those implied by annual variations in the water column (Graham et al., 2006; Briand et al., 2009; Sabart et al., 2015) remain unexplained.

#### 4. Conclusions

We have used a combination of microscopic and molecular tools to determine the past distribution of *D. macrosporum* and *D. flos-aquae* in Lake Aydat over the last 220 years. They showed that, after a period of low cyanobacterial abundance, probably linked to strong erosion within the watershed, a marked recurrence of *D. macrosporum* occurred from at least the 1980s, probably closely related to human interference. From the latter period to the present day, *anaC* gene became omnipresent, inducing a major co-occurrence of *mcyA*. These cellular and molecular patterns may suggest that anthropic pressures, in addition to promoting the increase of the *D. macrosporum* biomass, can also lead to the recurrence of a toxic genotype. New integrated studies, including akinete distribution and detection of cyanotoxin genes, need to be performed over long time scales (several thousands of years) to have a

better understanding of the mechanisms (i.e., climatic changes or human intervention) that trigger cyanobacterial proliferations.

## 5. Materials and Methods

### 5.1. Study Site and Sampling

Lake Aydat is located in the French Massif Central (45°39'48.9" N; 2°59'07.8" E) and is 837 m above sea level. It is a natural lake which was formed when the Veyre River was dammed by a basaltic lava flow 7500 years ago (Lavrieux et al., 2013). It is a small dimictic lake with a total area of 60 hectares, a large catchment area of 30,000 hectares and a maximal depth of 15 m. It is a eutrophic lake with recurrent cyanobacterial proliferations, especially of *Dolichospermum macrosporum* in autumn. These cyanobacterial proliferations led to a ban on nautical activities (including swimming, sailing and fish consumption) in September 2009 and again in August 2017. A sediment core of 1.35 m was obtained at the deepest point (Figure 7) with a sediment corer (UWITEC devices, Mondsee, Austria). The core was stored in dark conditions at 4 °C prior to analysis.



Figure 7: Bathymetric map of Lake Aydat. Star represents the point where the core has sampled.

### *5.2. Core Characterization, Sampling and Dating*

The core was sliced into 79 sample slices of 1 to 2 cm thick depending on the stratification. To obtain a dry weight, 1 g of fresh sediment of each sample was dried at 60 °C for five days. Dating of the sediment was carried out using three radioactive isotopes naturally present in this environment:  $^{137}\text{Cs}$ , and  $^{241}\text{Am}$  and  $^{210}\text{Pb}$ . The use of  $^{210}\text{Pb}$  originating from the decay of atmospheric  $^{222}\text{Rn}$  is a well-established method to estimate sedimentation rate (Kirchner, 2011).  $^{137}\text{Cs}$  and  $^{241}\text{Am}$  are artificial radioisotopes with respective half-lives of 30 and 432 years. The radioisotope  $^{241}\text{Am}$  is observed only in weapons testing fallout up to 1963, when the Partial Test Ban Treaty was signed; however,  $^{137}\text{Cs}$  is present in fallout prior to 1963, as well as in later events such as the Chernobyl disaster in 1986. It is thus possible, by simultaneously measuring these two radionuclides, to date the peak of  $^{137}\text{Cs}$  in a core: 1963 corresponds to peaks of  $^{137}\text{Cs}$  and  $^{241}\text{Am}$ , whereas 1986 corresponds to a  $^{137}\text{Cs}$  increase alone (Bonnett et Appleby, 1991). The sediment was first dried at 110 °C for 24 h. High-efficiency gamma-spectrometry was measured at the “Laboratoire Souterrain de Modane” as described in Reyss et al., (1995). The results are expressed in units of  $\text{Bq kg}^{-1}$ . In addition, magnetic susceptibility was measured following a step of 1 cm using a Bartington MS2E point sensor on a Multi-Sensor Core Logger System. Moreover, magnetic susceptibility measurements can be used as markers of detrital input from the Veyre. This method can thus highlight brief events such as floods and other much longer-term changes such as variations in the erosion flux due to global climatic conditions or human watershed occupation (Lavrieux et al., 2013).

### *5.3. Akinete Extraction from Sediment and Microscopic Counts*

The akinetes were separated from the other organic and mineral particles using a density gradient already described in Legrand et al., (2016a). Briefly, 0.5 g of fresh sediment was diluted with 9.5 mL of distilled water and 4 mL of ludox TM 50 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Then, samples underwent sonication (30 s, frequency: 50%, power: 80 W, Sonoplus Bandelin®) and centrifuging (10,000 G for 30 min at 4 °C) steps. Finally, 4 mL of ludox supernatant containing akinetes was pipetted, homogenized, and then aliquoted with a final volume of 2 mL. For each sample, two extractions were performed, thus four replicates were counted. Akinetes were enumerated and discriminated with morphological criteria (Cirés et al., 2013a; Legrand et al., 2016a, 2016b; Ramm et al., 2017). Moreover, this determination was completed by analyzing the morphology of young filaments on germinating akinetes

(data not shown) using taxonomic keys in reference books (Geitler, 1932; Bourelly, 1966 Komárek, 2013).

To discriminate intact akinetes from empty ones, 2  $\mu\text{L}$  of SYTOX GREEN<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (50  $\mu\text{M}$ ) was added in each aliquot following Legrand et al., (2016a) and Gerphagnon et al., (2013a). Solutions were incubated for 30 min at 4 °C in the dark. These were then filtered on 8  $\mu\text{M}$  filter (TEPT filters, Merck Milipore, Tullagreen, Ireland) under pressure (around 53 kPa). For each replicate, forty fields were counted with an epifluorescence microscope with a biomagnification of 160 $\times$  (Zeiss Axiovert 200 M). For each field, two counts were performed: the first at 546 nm to enumerate all akinetes using the autofluorescence of chlorophyll pigments; and the second at a light emission of 488 nm to discriminate damaged akinetes Legrand et al., (2016a).

#### *5.4. Akinete Purifications*

Akinetes from the sediment were purified in order to extract DNA only from intact akinetes with a protocol modified from Legrand et al., (2016a). Akinetes from 1 g of fresh sediment were extracted following the ludox protocol described above. The akinete-containing solution was first cleaned through a 100  $\mu\text{m}$  and then a 50  $\mu\text{m}$  nylon tissue in order to eliminate larger particles and phytoplankton/cyanobacteria colonies. Then the supernatant was filtered through a 10  $\mu\text{m}$  nylon tissue which was cleaned with a minimal volume of distilled water. Filtrates were pelleted by centrifuging at 10,000 G for 10 min at 4 °C. Supernatants were thrown away and each pellet was suspended in 600  $\mu\text{L}$  of molecular water. Then, samples were treated with DNase (DNA-free kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) following manufacturer instructions. A cleaning step was performed by centrifuging (10,000 G for 10 min at 4 °C). Pellets were suspended in 600  $\mu\text{L}$  of molecular water. This step was repeated three times and the three supernatants for each sample were kept and analyzed in the same PCR conditions as the akinetes samples in order to check there was no residue of free-DNA present. Finally, 100  $\mu\text{L}$  of this solution was used to check for the absence of cyanobacterial colonies or vegetative cells and 500  $\mu\text{L}$  was used for extraction of DNA from akinetes.

#### *5.5. DNA Extractions from Total Sediment and Purified Akinetes and Cyanobacterial 16S rRNA Gene Amplification*

DNA from total sediment and from purified akinetes was extracted using a FastDNA<sup>®</sup> Spin kit for soil (MP biomedical<sup>®</sup>), following the manufacturer's instructions.

Approximately 0.5 g of sediment and 500 µL of purified akinete solution were used to perform each extraction. To test for the presence of cyanobacterial DNA and the absence of PCR inhibitions, 16S cyanobacterial gene was targeted for each sample with primers from Nubel et al., (1997). The PCR mixture was composed of 5 µL of colorless Go Taq® felxi 5X Buffer, 2.5 mM of MgCl<sub>2</sub> solution, 0.2 mM of dNTPs, 0.4 µM of cya359F and cya781R primers (Table 1), 1 mg mL<sup>-1</sup> of Bovine Serum Albumin (BSA), and 1.5 U of GoTaq® G3 Hot Start Polymerase in a final volume of 25 µL. The PCR program was the same as in Legrand et al., (2016a, 2016b).

**Table 1. Primers used to detect targeted genes. [17], [19], [60] and [61] represent Rantala-Ylinen et al., (2011); (Legrand et al., 2016b); Nubel et al., (1997) and Hisbergues et al., (2003) respectively.**

Type of PCR	Primer Name	Sequence (5'-3')	Target Gene	Gene Amplicon Size (bp)	References
Classic PCR	cya359F	GGGGAATYTTCCGCAATGGG	Cyanobacterial 16S rRNA gene	403	[60]
	cya781R	GACTACTGGGGTATCTAATCCCAT			
Nested PCR 1	anxgen-F2	ATGGTCAGAGGTTTTACAAG	<i>anaC</i>	861	[19] modified from [17]
	anxgen-R	CGACTCTTAATCATGCGATC			
Nested PCR 2	anaCgen-F2	TCTGGTATTCAGTMCCCTCYAT	<i>anaC</i>	519	[19] modified from [17]
	anxgen-R	CGACTCTTAATCATGCGATC			
Classic PCR	mcyA-Cd 1F	AAAATTAAGCCGTATCAAA	<i>mcyA</i>	291	[61]
	mcyA-Cd 1R	AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT			

### 5.6. Cyanotoxin Gene Amplification

One biosynthetic gene of anatoxin-a (*anaC*) and one of microcystin (*mcyA*) gene were investigated in this study. *mcyA* detection was performed with classic PCR, whereas nested PCR was also used to detect *anaC* gene. *anaC* was targeted with anxgen-F2 and anxgen-R and anaCgen-F2-anxgen-R for nested PCR. *mcyA* genes were detected with mcy A-Cd 1F and mcy A-Cd 1R respectively (Table 1). PCR mixtures were the same as in Legrand et al., (2016b) for anxgen-F2 and anxgen-R and anaCgen-F2-anxgen-R. PCR programs used were referenced in Legrand et al. (2016a, 2016b) for *anaC* and in Hisbergues et al. (2003) for *mcyA*. For *mcyA* the mix was composed of 5 µL of colorless Go Taq® felxi 5X Buffer, 4.5 mM of MgCl<sub>2</sub> solution, 0.2 mM of dNTPs, 0.4 µM each primer (Table 1), 1 mg mL<sup>-1</sup> of Bovine Serum Albumin (BSA), and 1.5 U of GoTaq® G3 Hot Start Polymerase in a final volume of 25 µL. All PCR products were revealed with 0.5% agarose gel with 0.3 mg L<sup>-1</sup> ethidium bromide and migrated in a TAE buffer 1× at 100 V for 30 min.

### 5.7. Statistical Analysis

Spearman correlations were performed on all studied parameters using the software version 3.04 (Øyvind Hammer, Natural History Museum, University of Oslo).

Multiple factor analysis (MFA) was performed with the R software, package Rcmdr, version 1.6-1. Two quantitative groups were chosen for this analysis: akinete abundance with two variables, *D. macrosporum* and *D. flos-aquae* akinete abundance; and akinete integrity with two variables, *D. macrosporum* and *D. flos-aque* integrity. The qualitative group was defined by the absence or presence of *mcyA* gene and *anaC* gene.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/2072-6651/9/9/271/s1](http://www.mdpi.com/2072-6651/9/9/271/s1), Figure S1: Relative percentage along the sediment core between total akinetes of *D. macrosporum* and *D. flos-aquae*.

**Acknowledgments:** B.L. was supported by a Ph.D. fellowship from the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie in collaboration with the society ATHOS environment in the context of Conventions Industrielles de Formation par la REcherche. This work was also funded by l'Agence de l'Eau Loire-Bretagne. We thank Giles Derail for his help during the core sampling. We also thank Fran Van Wyk de Vries for helping with improving the English. We finally thank the reviewers and the editorial team.

**Author Contributions:** Benjamin Legrand and Delphine Latour thought up and designed the experiments; Amélie Lamarque performed the experiments; Amélie Lamarque and Benjamin Legrand analyzed the data; Marion Sabart contributed reagents/materials tools; and Benjamin Legrand and Delphine Latour co-wrote the paper.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Supplementary Material**



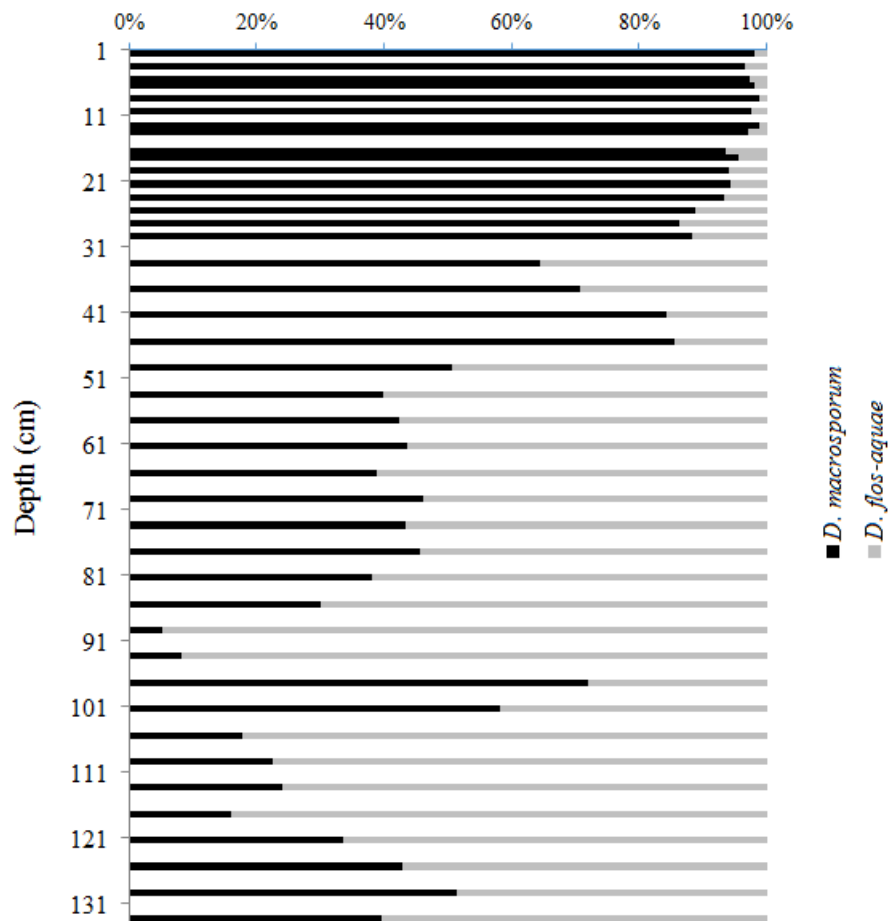


Figure S1: Relative percentage along the sediment core between total akinetes of *D. macrosporum* and *D. flos-aquae*

### **III) Article 5**

---

## **Investigating the long-term recurrence of nostocalean cyanobacteria through a 6 700 years core in a eutrophic Lake.**

Benjamin Legrand<sup>1,2</sup>, Yannick Miras<sup>3</sup>, Jérôme Lesobre<sup>1</sup>, Matthieu Dussauze<sup>1</sup>, Delphine Latour<sup>1</sup>

1 Université Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, F-63178 Aubière Cedex, France

2 Athos-environnement, 112 avenue du Brézet 63 100 Clermont-Ferrand

3 Université Clermont Auvergne, CNRS, GEOLAB, 4 rue Ledru, 63057 Clermont-Ferrand Cedex 1, France

Article in preparation

**Methods :**

*Sampling and studied site*

Lake Aydat (maximum depth: 15m; area: 6.105 m<sup>2</sup>; N45°39.809'/E 2°59.106'/837masl) is a eutrophic natural dam lake located in the French Massif Central where recurrent blooms of cyanobacteria occur in late summer and autumn since several decades (Gerphagnon et al., 2013a). This lake was originated from the damming of the Veyre river occurred 8551 ± 400 cal. yr BP ago by a basaltic flow (Miras et al., 2015). A detailed description of the Lake features (i.e geological and geomorphological settings) is described in Lavrieux et al., (2013). Coring was performed in the central and deepest part of the lake (Figure 1 A). On the basis of sedimentological features, the record is divided into 2 main units separated by a mass wasting deposit: i) the lower one (1076-1974 cm depth which corresponds to 777-1600 cm in the master core) and ii) the upper unit (0-829 cm depth which corresponds to 0-775 cm in the master core) (Lavrieux et al., 2013). Akinetes and molecular analysis were carried out only on the lower and the upper units (Figure 1 B).

*Chronology and accumulation rate*

Chronology and accumulating rate are detailed in Lavrieux et al., (2013). Briefly, the age-depth model was firstly constructed from <sup>17</sup>AMS radiocarbon dates, with leaf and wood fragment analyses, distributed through the core. The radiocarbon dating was performed at the Laboratoire de Mesure du <sup>14</sup>Carbone (Gif-sur-Yvette, France) and calibrated (2σ) using CalPal Online. <sup>137</sup>Cs; <sup>241</sup>Am, <sup>210</sup>Pb and <sup>7</sup>Be measurements and correlation with historical major floods were also used for the chronology of the top of the core. The sequences covered approximately the last 6 730 years. In the lower unit and for the basal part of the upper unit, the sedimentation rate was of 0.20 cm.year<sup>-1</sup>. It suddenly increased until 0.52 cm.year<sup>-1</sup> from 660 cm depth up to the top, which is in accordance with the rate of 0.46 cm.year<sup>-1</sup> estimated by Sarazin et al., (1992) for the 50 last years. When flood events are considered in the calculation the sedimentation rate reached 0.6 cm.year<sup>-1</sup> (Lavrieux et al., 2013; Miras et al., 2015).

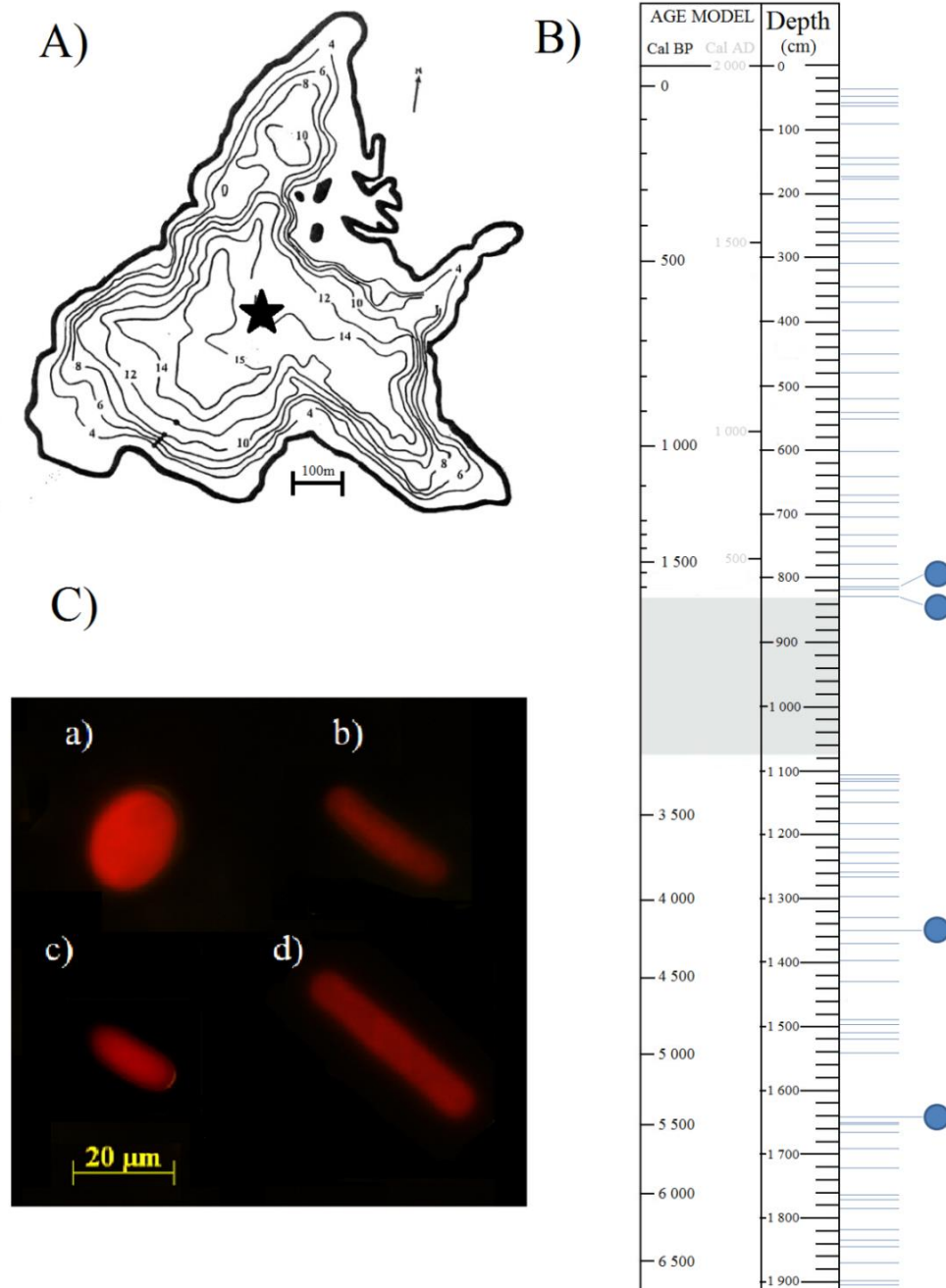


Figure 1 : Bathymetric map of Lake Aydat(A) (the star represent the sampling point of the core), age model of the core from (Lavrieux et al., 2013) (B) (blue lines represent analyzed samples and blue circles analyses samples for the germ ination experiment) and different akinete morphotypes encountered (C) (a) *Dolichospermum macrosporum*, b) *D. flos-aquae* c) *Dolichospermum* sp. d) *Aphanizomenon* sp.)

*Akinetes extraction and enumeration*

Akinetes were extracted from 72 samples (Figure 1C) of sediment along the core using protocols from Legrand et al., (2016a). Briefly, 0.5g of fresh sediment was diluted with 4 mL of ludox and 9.5mL of distilled water. Solutions were sonicated and centrifuged. Then, the first 4 mL of ludox supernatant were pipetted and homogenized and divided in 2 replicates. For each samples, 4 replicates and so, 2 extractions were performed. For 1 mL of solutions 1  $\mu$ L of Sytox Green® (50mM) were added (Gerphagnon et al., 2013b). Each replicates was filtered through a 8  $\mu$ m (TEPT filters Merck, Milipore, Tullagreen, Ireland). Akinetes were enumerated counting 40 fields per replicate with an epifluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200M; 200x magnification, Oberkochen, Germany). For each field, 2 counts were performed i) at 546 nm for highlighting chlorophyll autofluorescence in akinetes. ii) at 488 nm to discriminate damaged akinetes with Sytox Green® binding. Akinetes were enumerated and discriminated with morphological criteria (Cirés et al., 2013a; Legrand et al., 2017a.; Ramm et al., 2017) using taxonomic keys in reference books (Geitler, 1932; Komárek, 2013).

*Reviviscence of preserved cells*

Akinete germination experiments were performed on 4 samples, chosen for their high intact akinetes concentrations, the diversity of akinetes morphotypes and dated of 1633, 1769, 4274 and 5510 cal.BP. For akinetes germination experiment, cells were extracted following the same ludox protocol explained above but using 4.5 g of sediment. Supernatants were filtered through a 10  $\mu$ m nylon filtration tissue. This was then washed with a minimal volume of distilled water. The solution was cleaned through a 100 and then a 50  $\mu$ m nylon filtration tissue for removing a maximum of residual sediment particles. Finally, cells were put in a final volume of 4 mL of BG11 medium with cycloheximid (50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>).

Five replicates of 800  $\mu$ L of solution of intact akinetes in BG11 medium were placed in 48 wells plate. At Days 0, 1 and every 2 days until day 18, 400  $\mu$ L of homogenized solution were put sterilely in Uthermöhl column. Intact and germinated akinetes were enumerated with an inversed epifluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200M; 200x magnification, Oberkochen, Germany). Here, counts were performed with an exciting light at 546 nm. After count, akinetes solution was removed from the Uthermöhl column and place on its respective well. Samples were incubated at 20°C, 6 $\mu$ mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> with white light and a photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of dark.

#### *DNA extraction*

The same 72 sediment samples than above were chosen for DNA analysis. Genomic DNA from these samples was extracted with the FastDNA<sup>®</sup> Spin kit for soil (MP biomedical<sup>®</sup>) following the manufacturer's instructions. Precautions preconized in Domaizon et al., (2017) about the ancient DNA were applied: A control extraction was performed and checked with all samples in order to check if there were no contaminations of modern DNA.

DNA concentration in each sample was estimated using a UV spectrophotometer (Nanodrop<sup>®</sup> ND 2000), and samples were kept at -20°C until further analysis.

#### *Target gene amplification*

Four genes were targeted by classic or nested PCR during this study. The cyanobacterial 16S rRNA gene was amplified in sediment samples using cya359F and cya781R set of primers (Nubel et al., 1997) (Table 1). Then, one gene implied in the biosynthesis of anatoxina, *anaC* and two of microcystin, *mcyA* and *mcyB* genes, were also investigated in this study. The first was detected with the sets of primers anxgen-F2/R and anaC 80F/706R for nested 1 and 2 PCR respectively. About *mcyA*, *mcyA*-Cd 1F/1R was used for classic and MCY F1/R1 then MCY F1/R2 for *mcyB* nested PCR. PCR mixtures were the same than Legrand et al., (2016b) for the two *anaC* nested PCR and than Legrand et al., (2017a) for *mcyA*. Concerning *mcyB*, mix for both PCR were composed of 5 µL of colorless Go Taq<sup>®</sup> felxi 5X Buffer, 2.5 mM of MgCl<sub>2</sub> solution, 0.2 mM of dNTPs, 0.5 µM each primers (Table 1), 1 mg.mL<sup>-1</sup> of Bovine Serum Albumin (BSA), and 1.5 U of GoTaq<sup>®</sup> G3 Hot Start Polymerase in a final volume of 25 µL. Used PCR programs were referenced in Legrand et al., (2016a, 2016b) for *anaC* and in Hisbergues et al., (2003) for *mcyA* whereas for *mcyB* PCR programs were composed by an initial hybridation step of 94°C for 5 min , 35 cycles of 94°C for 30 sec, 50°C for 1 min, 72°C for 30 sec, and a final extension of 72°C for 5 min and initial hybridation step of 94°C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 30 sec, 54°C for 1 min, 72°C for 20 sec, and a final extension of 72°C for 5 min for PCR 1 and 2 respectively. All PCR products were revealed with 0.5% agarose gel with 0.3 mg L<sup>-1</sup> ethidium bromide and migrated in a TAE buffer 0.5 X at 100 V for 30 minutes.

**Table1: Primers used to amplify targeted genes.**

	Primer name	Sequence (5'-3')	Target gene	Gene Amplicon size (bp)	References
Classic PCR	cya359F cya781R	GGGGAATYTTCCGCAATGGG GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT	Cyanobacterial 16S rRNA gene	403	Nubel et al., (1997)
Classic PCR	anaC-gen-F2 anaC-gen-R2	TCTGGTATTCAGTMCCCTCYAT CCCAATARCCTGTCATCAA	<i>anaC</i>	366	Sabart et al., (2015) modified from Rantala- Ylinen et al., (2011)
Nested PCR 1	anxgen-F2 anxgen-R	ATGGTCAGAGGTTTTACAAG CGACTCTTAATCATGCGATC	<i>anaC</i>	861	Modified from Rantala- Ylinen et al., (2011)
Nested PCR 2	anaC 80F anaC 706R	CCAATAGCCTGTCATCAACC TATACATCTGGCTCAACAGG	<i>anaC</i>	626	This study
Classic PCR	mcyA-Cd 1F mcyA-Cd 1R	AAAATTAAGCCGTATCAAA AAAAGTGTTTATTAGCGGCTCAT	<i>mcyA</i>	291	Hisbergues et al. 2003
Nested PCR 1	MCY F1 MCY R1	TGGGAAGATGTTCTTCAGGTATCCAA AGAGTGGAAACAATATGATAAGCTAC	<i>mcyB</i>	319	Nonneman et al., (2002)
Nested PCR 2	MCY F1 MCY R2	TGGGAAGATGTTCTTCAGGTATCCAA GAGATCCATCTGTTGCAAGACATAG	<i>mcyB</i>	287	Nonneman et al., (2002)

## Results

### *Total akinetes abundance along the core*

The total akinetes distribution was heterogeneous along the core and can be divided into two parts depending on the two major units (Figure 2): i) the lower unit (6727-3238 years calibrated Before Present (cal.BP) was characterized by low akinetes abundance, with between 197 and 97 900 akinetes per grams of dried sediment (g.DW<sup>-1</sup>) with a mean value of 12 300 akinetes.gDW<sup>-1</sup> of sediment, ii) the upper unit (1769-10 cal.BP) is characterized by a significant higher mean value of akinetes corresponding to 52 600 akinetes.gDW<sup>-1</sup> of sediment. Nevertheless, this upper part has also undergone the most important fluctuations, comprised between 22 000 akinetes.gDW<sup>-1</sup> (-1391/-670 cal.BP) and around 200 000 cells.gDW<sup>-1</sup> of sediments in 1769-1507 and in 107-10 cal.BP parts. Four akinetes morphotypes were counted along the core corresponding respectively to *Dolichospermum macrosporum*, *Dolichospermum flos-aquae*, *Dolichospermum sp.* and *Aphinozomenon sp.* (Figures 1B).The vertical distribution of these four morphotypes was different. *D. macrosporum* was present especially in the upper unit and was the dominant morphotype which composed sometimes 100% of present akinetes (Figure S1).

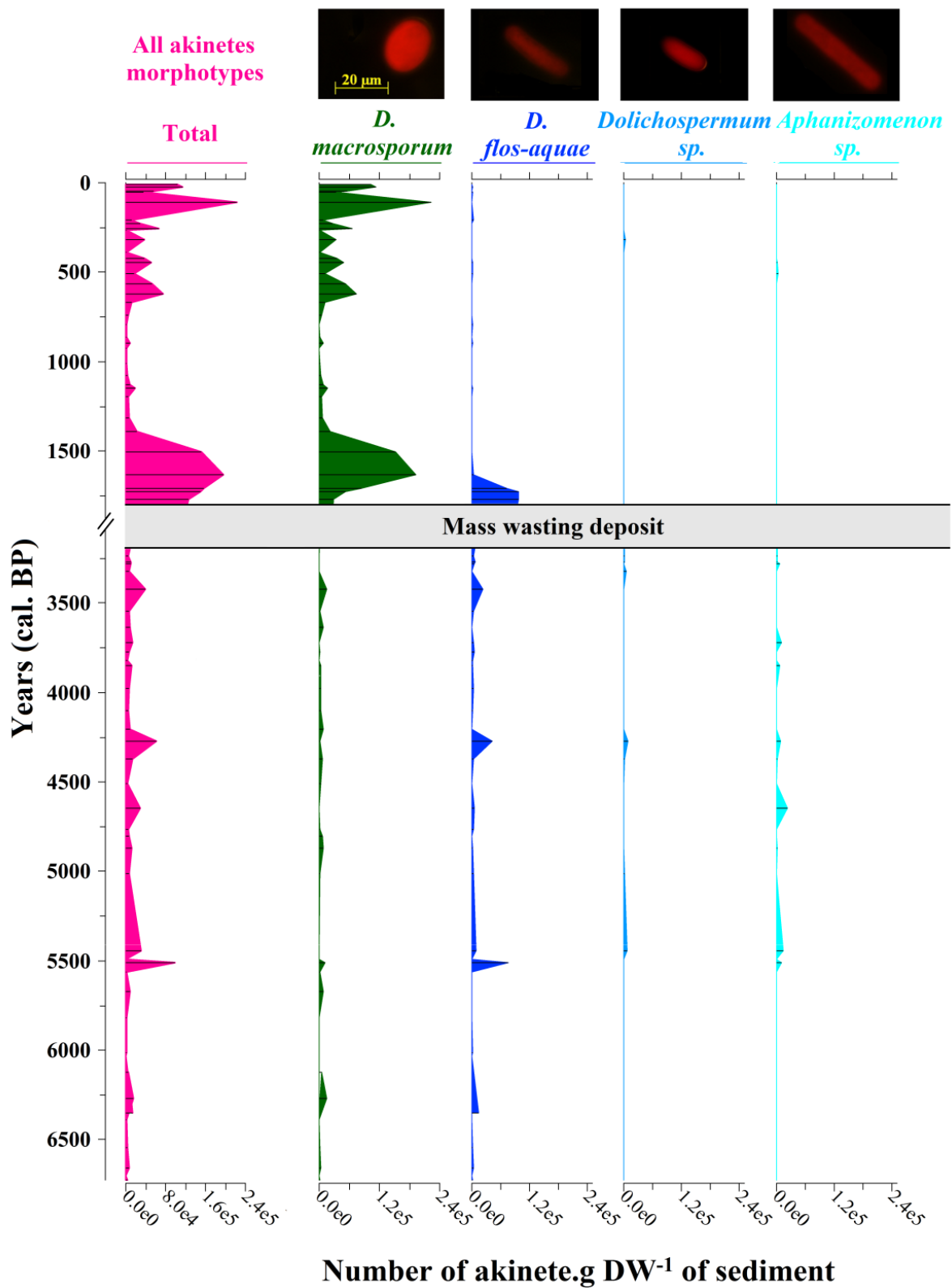


Figure 2: Distributions of total, *D. macrosporum* and *D. flos-aquae*, *Dolichospermum sp.* and *Aphanizomenon sp.* akinetes through the sediment core.



In this way, total akinetes abundances and *D. macrosporum* akinetes abundances were almost similar (SC= 0.92,  $p < 0.001$ ). In the lower unit, *D. macrosporum* akinetes were often absent with values no further than 15 500 akinetes.gDW<sup>-1</sup> of sediment. *D. flos-aquae* was almost always present along the core. But its akinete abundance was generally low, included between several hundred and few thousand cells.gDW<sup>-1</sup> of sediment. However, *D. flos-aquae* akinetes abundance reached punctual important values in the four main dates of 5510, 4274, 3421 and in 1728 cal.BP with respectively 76 400, 42 300, 23 600 and 97 400 cells.gDW<sup>-1</sup> of sediment. Finally, *Dolichospermum sp.* and *Aphanizomenon sp.* stay at low concentrations and presented a similar pattern: akinetes presences of these two species were higher in the lower part, where they are found in 10 and 18 samples respectively. Akinetes abundances of these two species were also generally low included between several hundred or several thousand with a slight peak of 23 300 akinetes.gDW<sup>-1</sup> for *Aphanizomenon sp.* at 4648 cal.BP.

#### *Akinete integrity along the core*

In the lower unit, intact akinetes number globally followed the same patter than total akinetes where *D. macrosporum* was not dominant (SC= 0.70  $p < 0.0001$ ) (Figure 2). Furthermore, the number of intact akinetes seemed to be higher in the lower part than the upper part with a mean number of 8 620 and 3 300 cells.gDW<sup>-1</sup> of sediment respectively. But no statistical difference has been highlighted due to high variations (from 0 to 86 200 akinetes.gDW<sup>-1</sup> of sediment) especially in the lower unit (Figure 3). These high variations are the results of numerous intact akinetes peaks especially for *D. flos-aquae*. For example, the number of intact cells for this specie reached 41 500 and 76 400 akinetes.gDW<sup>-1</sup> at 4274 and 5510 cal.BP respectively. These variations seems to reflect a significant difference of integrity depending on the akinetes morphotype (Kruskal-Wallis test  $p < 0.0001$ ) (Figure 4). Indeed, the mean percentage of intact akinetes through the core for *D. macrosporum*, *D. flos-aquae*, *Dolichospermum sp.* and *Aphanizomenon sp.* is of 5.1, 54.1, 90.1, 83.7 respectively. In addition, high temporal variations of the percentage of intact akinetes were observed, especially for *D. macrosporum* and *D. flos-aquae* (Figure 4). Indeed for *D. flos-aquae*, these variations are mostly dispatched depending on the two units (with a mean of 35 and 72% of intact akinetes in the upper and lower unit respectively (Mann-Whitney test,  $p = 0.002$ ). About *D. macrosporum* in the upper unit, percentage of intact akinetes stayed low between 0 and 13%. In the lower unit, there were an alternation between absence of this morphotype and a percentage of intact akinetes mostly comprised between 10 and 63.

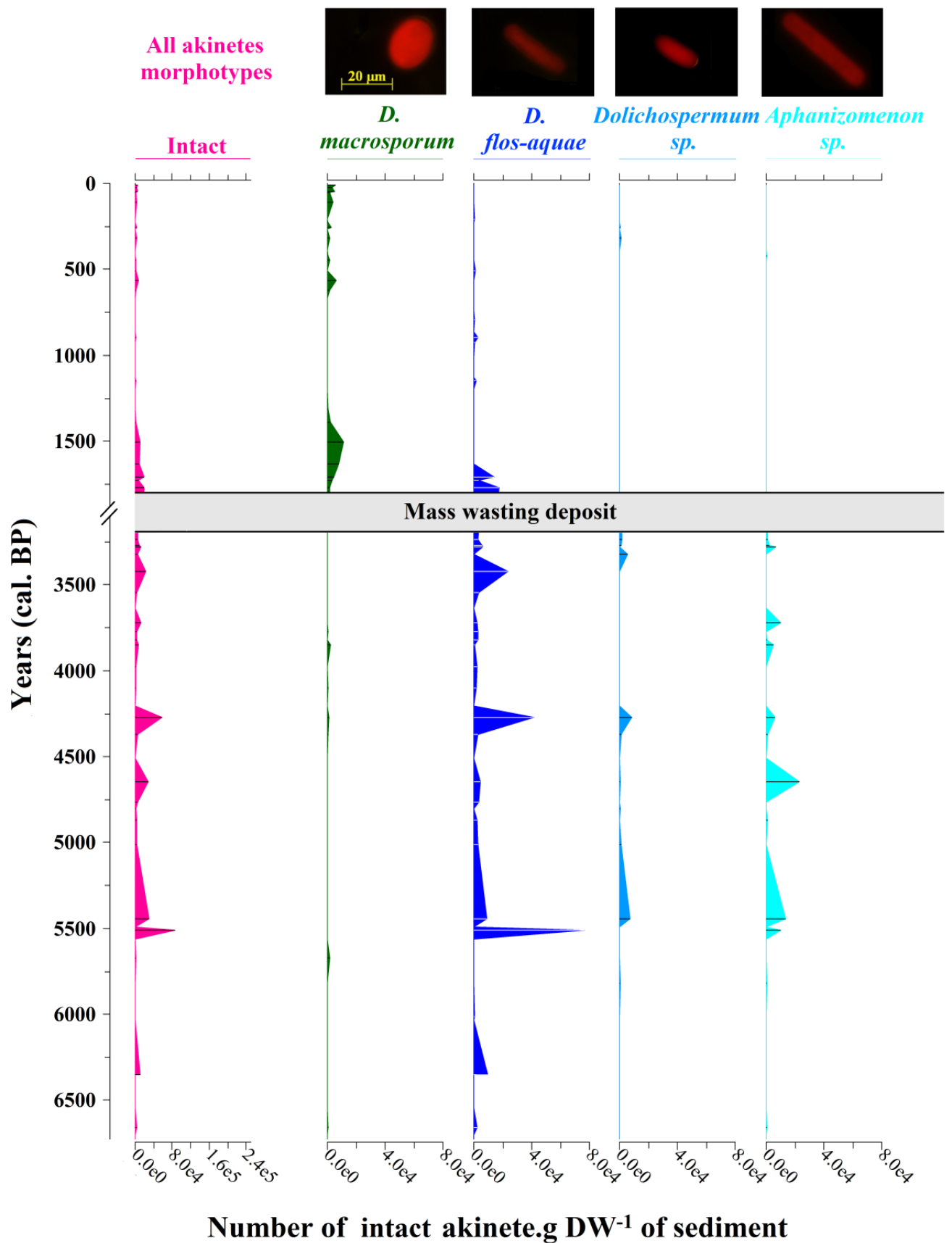


Figure 3: Number of intact akinetes of each studied species present along the core.

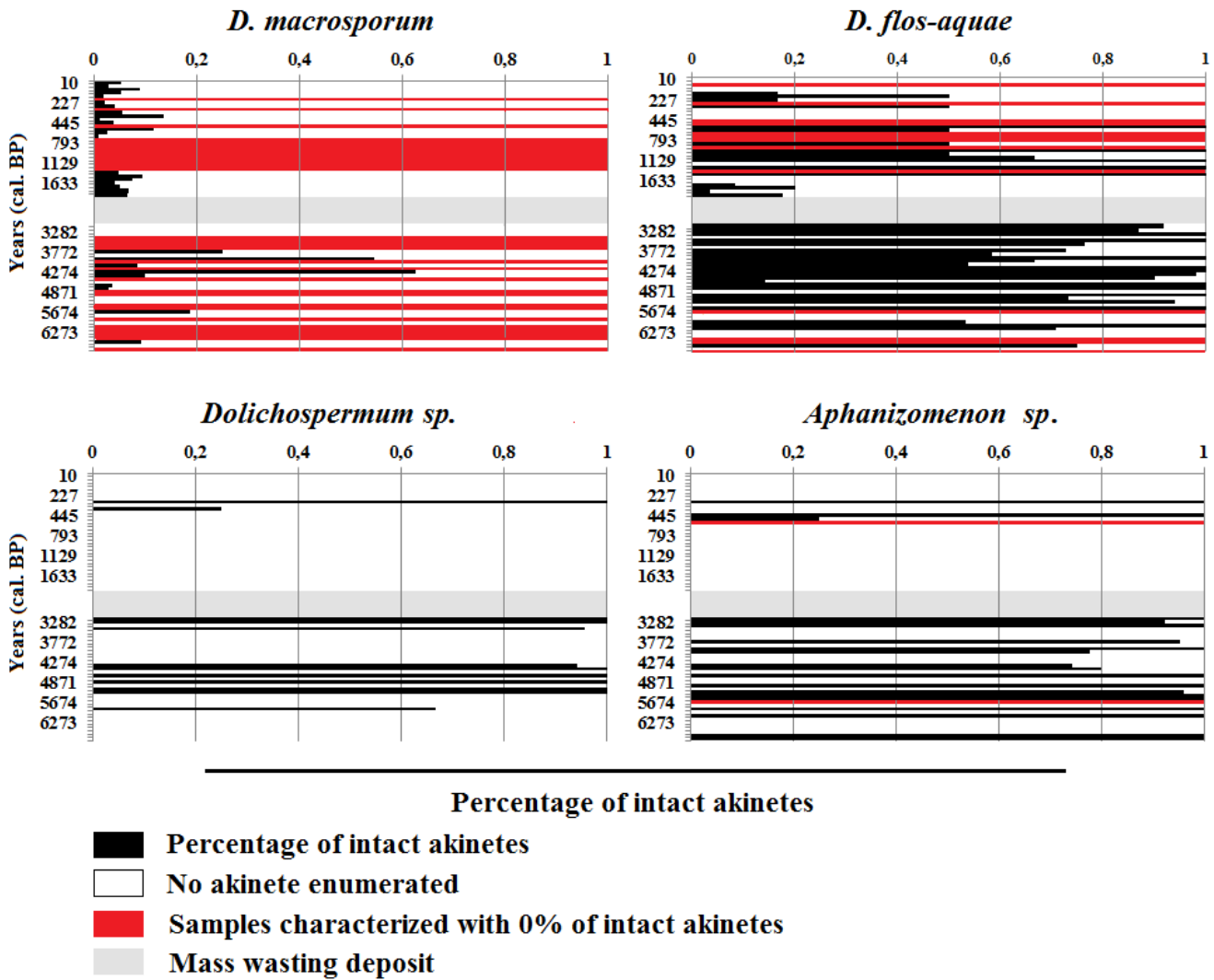
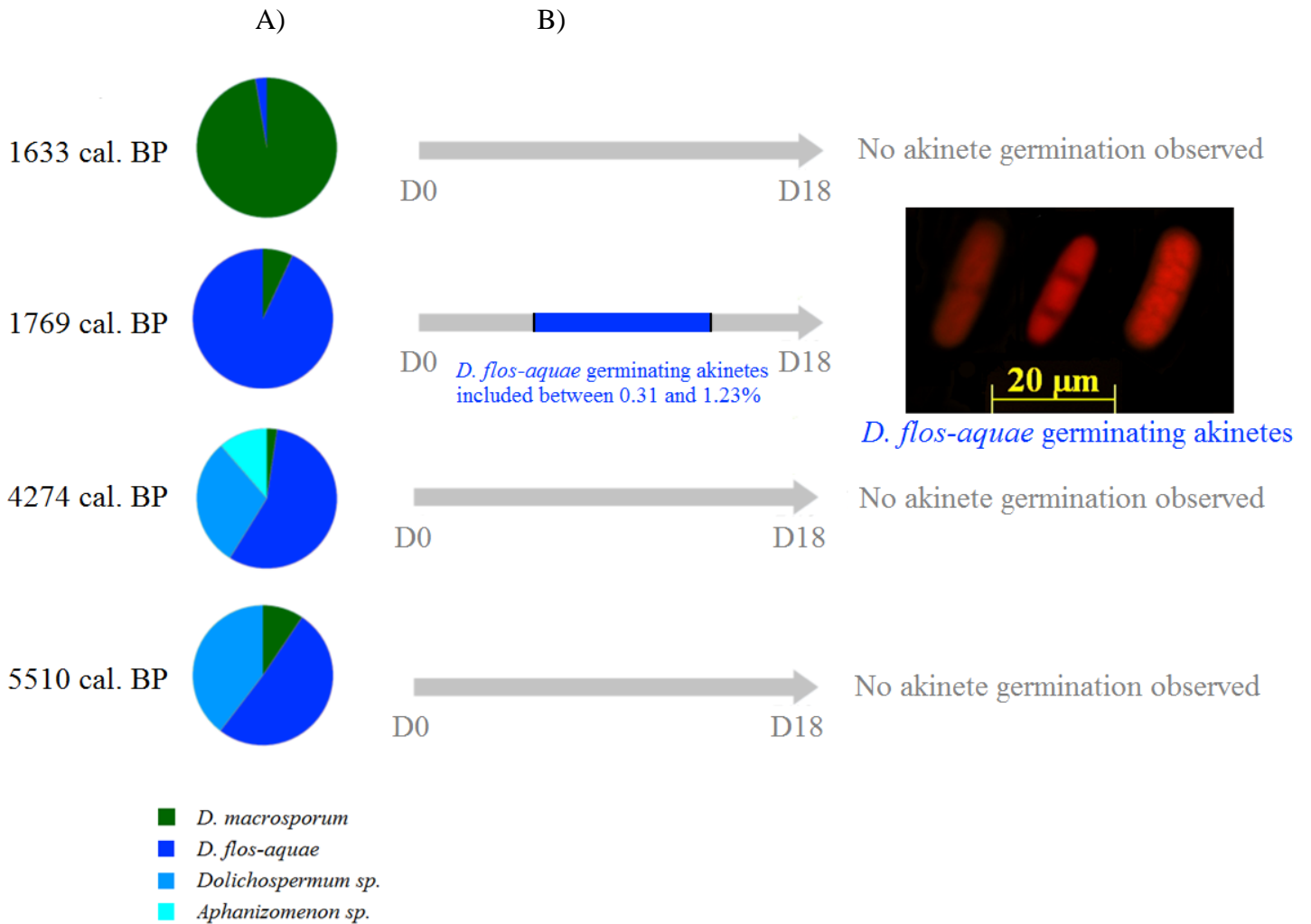


Figure 4: Evolution of percentages of intact akinetes for each studied species along the core

*Potential of reviviscence of past cyanobacteria*

*D. flos-aquae* and *D. macroporum* were present in the four selected samples used for germination experiment whereas *Aphanizomenon sp.* was present only in the 4274 cal B.P sample. Three of the four studied samples did not show any evidence of germination of akinetes after 18 days of incubations (Figure 5B). In the 1769 cal. BP sample, some germinating akinetes were observed between 5 and 13 days after the beginning of the experiment. All the germinating akinetes corresponded to *Dolichospermum flos-aquae*. These germinating akinetes were observed with a 2 or 4 cells present inside the envelope (Figure 5) but no young filaments were observed. The ratio of germinating akinetes on total intact akinetes was very weak and varied between 0.31 and 1.23%.



**Figure 5: Proportions of the different morphotypes extracted for each analyzed samples (A) for the germination experiment (B)**

*Target gene detection in sediment*

Along the core, 16 rRNA gene was detected in all studied samples (Figure 6). The *mcyA* gene was detected with classic PCR in 12 samples almost exclusively in the upper unit (670, 422-318, 227-10 cal BP) and 3848 cal BP in the lower unit. *mcyB* (detected with nested PCR) has been found in the same samples than *mcyA*. Moreover, it has also detected in several samples of the lower unit (from 6702 cal BP to 3269 cal BP) and also in the upper unit at 1316 cal BP. Finally, *anaC* gene was found in 11 samples located in both part of the core from 6702 cal BP to 25 cal BP.

Chapitre 4 : La persistance des akinètes à moyen et à long termes dans le sédiment

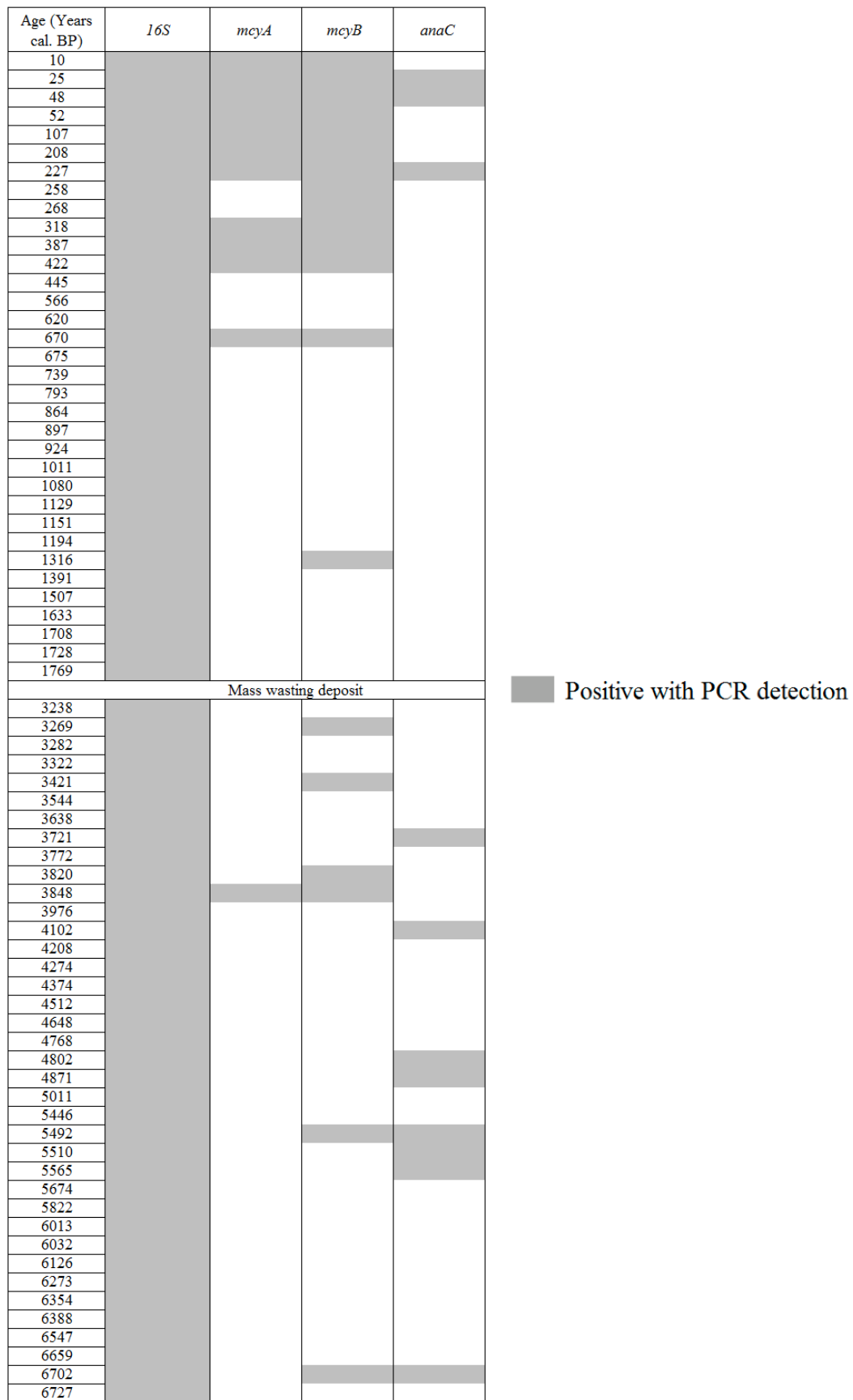


Figure 6: Detection of the targeted genes in total sediment along the core.

## Discussion

### *Toward the reconstruction of long scale nostocalean recurrence on lake Aydat*

One of the main aims of this study was to characterize past recurrence of toxigenic nostocalean cyanobacteria in a 6 700 years old sediment core from Lake Aydat (France). To our knowledge, it's the first report of a so long recurrence of four morphotypes of akinetes belonging to *D. macrosporum*, *D. flos-aquae*, *Dolichospermum sp.* and *Aphanizomenon sp.* The oldest evidence of akinete persistence was highlighted in lake Gosciadz (Poland) with aged akinetes of approximately 4 000 years (Van Geel et al., 1994). All these morphotypes have already been observed in the water column (Lafforgue et al., 1995, Sabart et al., 2015) of Lake Aydat. Akinetes from *Dolichospermum* were already observed in surface sediment (Legrand et al., 2016a), in a 220-years core scale (Legrand et al., 2017a) and in the same core using palynological approaches (Miras et al., 2015). Total akinetes profiles between Miras et al., (2015) and our results are very similar in the upper unit and confirm the past nostocalean blooms recurrence. However, these authors did not observed akinetes in the lower unit, suggesting a better resolution of extraction and akinetes observations with ludox and Sytox-Green protocols than the current palynological method. Indeed, palynological akinetes extraction method is known as destructive (Miras et al., 2015; Van Geel et al., 1994) and induces a loss of material. Moreover, this method do not allow to access to the percentage of integrity of akinetes present in sediment. Nevertheless, the comparison of paleo-ecological proxies studied in parallel of our results brings new insight of the recurrence of nostocalean blooms for so long time in Lake Aydat. The oldest significant presence of akinetes, dating from 6 000 to 5 500 cal. BP, match with the first evidence of local middle Neolithic human activities (Miras et al., 2015). This human contribution is suggested by the decrease of *Pinus* and woodland pollens that probably caused large detrital inputs and increased the trophic state of the lake. This is confirmed by high percentage of eutrophic diatoms. So, this period is probably the first evidence of relationship between human activities and cyanobacterial bloom (Lavrieux et al., 2013; Miras et al., 2015).

The upper part of the core revealed higher abundances of akinetes corresponding the proliferations occurring from gallo-roman period to the modern one. Human impact was the main driver of these periods: different key phases of deforestations were confirmed with the decrease of trees pollen abundance, following by diverse land use systems as grazing and crop planting (Miras et al. 2015). Anthropic impact on local vegetation and land use always induce

detrital inputs with negative impact on water quality. So, this long period with recurrent cyanobacterial blooms may be closely related to the higher phosphorus concentrations estimated in this part of the core in comparison with the lower unit (Miras et al., 2015). The dominance of *D. macrosporum* in this upper unit seems to attest of monospecific blooms. However, estimated phosphorus concentrations did not seem the only factor triggering nostocalean distributions: phosphorus concentrations stayed high and stable in this part of the core whereas akinetes concentrations showed important variations. Indeed, cyanobacterial growth may be affected by others environmental parameters such as water column instability, light intensity or water temperature, which are known to limit their proliferation. So, the period of 1200-150 cal. BP shows numerous evidences of floods (positive correlation between magnetic susceptibility and Distribution of total akinetes), combined with a marked decrease in solar activity (Lavrieux et al., 2013), that constitutes less favorable ecological conditions for the growth of cyanobacteria (Paerl and Otten, 2013) and can explain the punctual low concentrations of akinetes observed in this period. Indeed, floods and raining climates may have an effect on the water column stability which constitutes unfavorable conditions for development of cyanobacterial biomass (Mitrovic et al., 2003; Lewis et al., 2011; Paerl and Otten, 2013). Nevertheless, the persistence of long-term eutrophic conditions allows to sustain the growth of cyanobacteria as soon as conditions become favorable again as it is observed during modern period.

#### *Long term akinetes integrity: persistence and germination potential*

To our knowledges, only Legrand et al., (2017b) have characterized akinetes integrity in sediment. Rucker et al., (2009) and Ramm et al., (2012, 2017), have also focused on akinetes integrity but not allow to discriminate intact akinetes from the others lysed ones. Interestingly, the percentage of intact akinetes of *D. macrosporum* stay in the same range between sediment surface of Lake Aydat (around 7%) (Legrand et al., 2017b) and the upper unit of the core (in mean 5%). This suggests that akinetes degradation is limited through time spent in sediment. The percentage of intact akinetes seems to be rather link to processes occurred in the water column and can provide a fingerprint of the state of akinetes in the water column. This hypothesis may also be confirmed by the higher percentage of integrity of akinetes in the lower units, especially due to *D. flos-aquae*, *Dolichospermum sp.* and *Aphanizomenon sp* presence. Indeed, these species presented a percentage of integrity included between 60 and 100 % whereas *D. macrosporum* (dominant in the upper part) have a mean percentage of 6. This suggests different resistance capacities link to several ecological strategies of these

studied species. However, the number of intact akinetes able to germinate stays extremely low in ancient sediment (1% maximum) in comparison to surface sediment (up to 70% in surface sediment) (Tsujimura and Okubo, 2003; Legrand et al., 2017b). Even if old akinetes did not present lysed envelope, they probably lost their ability to reviviscence with time. Indeed, current germination records occurred after a storage time of 64 years (Livingstone and Jaworski, 1980) and 120 cal. BP (i.e around 180 years)(Wood et al., 2009) but no more. In our study, some intact akinetes from *D. flos-aquae* has still the ability to perform cell divisions after 1830 years of landfill (1769 cal. BP) which is 10 times more than observed in Wood et al., (2009). Even if cultural conditions and/or cellular machinery have not allowed to produce hormogonia (i.e young filament (Hense and Beckmann, 2006)), our results show that akinetes can be still alive 1 800 years after their formation.

*Cyanotoxins genes detection as a marker of past toxic genotypes.*

This study also highlighted the past recurrences of the *anaC*, *mcyA* and *mcyB* genes which are implied in the anatoxin-a and microcystin biosynthesis respectively. Our results revealed the presence of these genes all along the core, excepted for *mcyA* which was detected with classic PCR whereas the two others with nested PCR. In consequences, *anaC* and *mcyB* have a better resolution of detection (Nonneman and Zimba, 2002; Parvathi et al., 2007; Legrand et al., 2016b). Distributions of these genes provided long term dynamics of toxic genotypes. Interestingly, *anaC* and *mcyB* genes are detecting in one of the most aged sample, 6 702 cal. BP, revealing an unexpected co-occurrence or at least a close succession of genotypes carrying these genes. Indeed, numerous studies have already highlighted co-occurrence between these two cyanotoxins in the water column (Park et al., 1997, 1993; Pirszel and Adamczyk, 2004) including Lake Aydat (Sabart et al., 2015). But, evidences of co-occurrence of these toxic genes in sediment were only few documented. To our knowledges, this was only reports in Lake Aydat but only since the beginning of the 19th century (Legrand et al. (2017a).

Except the short periods of co-occurrence, *anaC* and *mcy* genes can also be found individually. Indeed, *anaC* gene was mainly observed in deep sediment (from 5674-4802 cal. BP) then in surface sediment whereas *mcyA* and *mcyB* were recurrent since at least 500 years. Moreover, studies investigating the detection of gene of microcystin or anatoxin-a biosynthesis in deep sediment are not numerous. Monchamp et al., (2016) have already detected *mcyA* since 1912 and 2006 in sediment core from Lake Zurich and Lake Greifensee



(Switzerland) respectively. The authors associated the presence of this gene to the presence of *Planktothrix rubescens*. The same applies for *Microcystis* with the detection of *mcyA* in a 30 years sediment core from Lake Erie (Rinta-Kanto et al., 2009) (USA). *Aphanizomenon* and *Dolichospermum* genus are able to produce these cyanotoxins (Rapala et al., 1997, 1993; Ballot et al., 2010a; Bernard, 2014). Furthermore, *mcyA* gene and *anaC* have already associated with the recurrence of *D. macrosporum* and *D. flos-aquae* in Lake Aydat. So, we can assume that Nostoclean species were partly responsible of these toxic patterns along the studied core. Nevertheless, we did not look at and have no evidence of the presence of non-Nostoclean groups in our sediment core. *Microcystis*, *Woronichinia* and *Pseudanabaena* were already observed in the Lake Aydat water column (Lafforgue et al., 1995; Sabart et al., 2015) and are potentially producers of the studied cyanotoxins (Bernard, 2014). So, it is also possible that these cyanobacteria are partly responsible of the toxic genes detected along the core. More investigations are required to perform a formal link between past nostoclean biomass and the presence of toxic genes. Moreover, it is now well known that a temporal succession of toxic and non-toxic genotypes occurs at a bloom scale. To our day, the ecological drivers conditioning these distributions at small temporal scale are still unknown so it is difficult to give precise explanations about the long scale dominance of toxic genotypes.

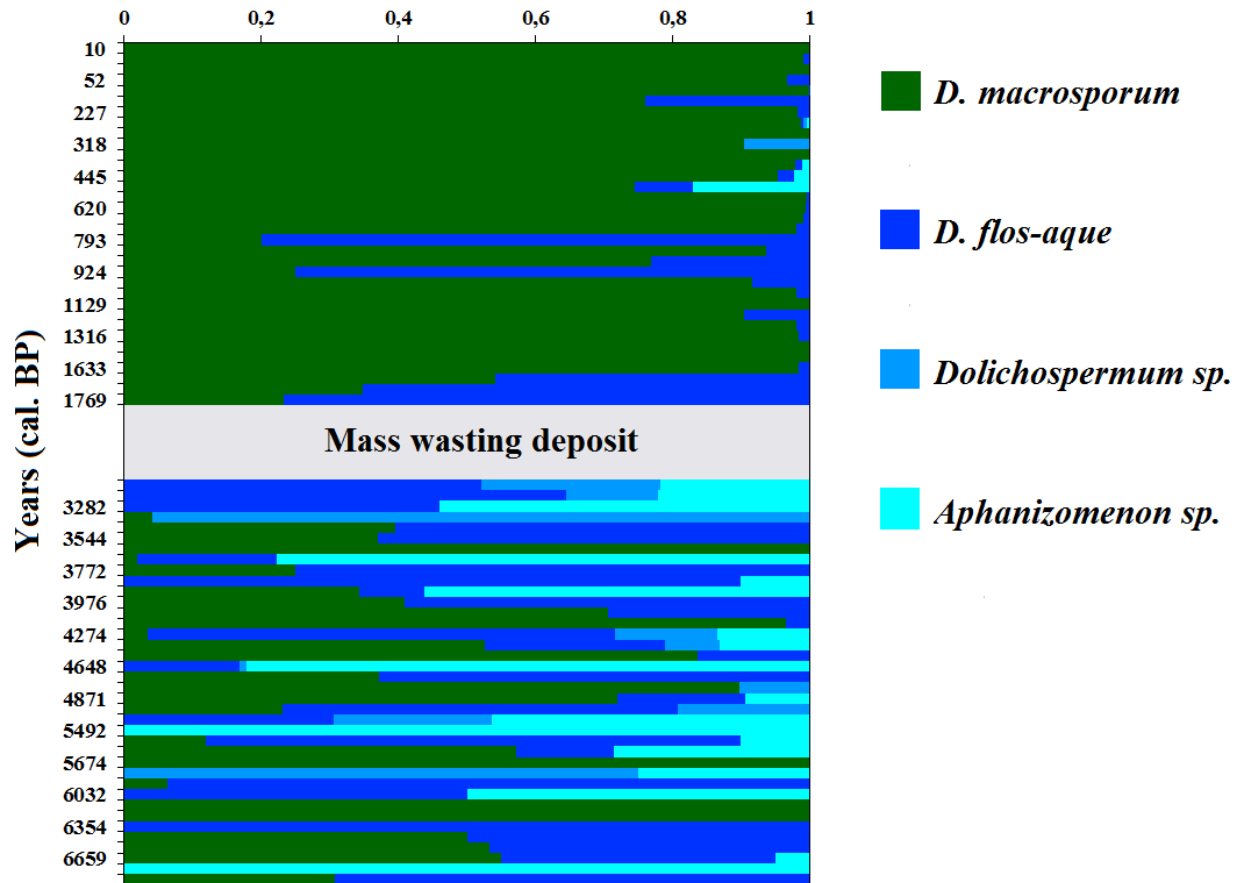


Figure S1: Evolution of the akinetes morphotype proportions through the sediment core



---

## **Chapitre 5 :**

# **Discussion générale**

---



## I) Rappel des objectifs de la thèse

---

Dans un contexte général de recherche sur le déterminisme des proliférations cyanobactériennes et leur toxicité, les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse CIFRE ont permis d'apporter de nouveaux éléments relatifs au cycle de vie des Nostocales et à la caractérisation des proliférations passées. Ainsi, l'objectif général de ces travaux de thèse était de connaître dans quelle mesure les akinètes présents dans les sédiments peuvent servir d'outils à la compréhension des blooms nostocaléens à la fois passés et futures; ces cellules constituant, en zone tempérée (Mehnert et al., 2014), un véritable pivot entre la prolifération passée et celle à venir (Hense and Beckmann, 2006; Mehnert et al., 2010).

Ainsi, ce travail de thèse s'est organisé autour des questions majeures suivantes :

- Dans quelle mesure les akinètes présents dans le sédiment sont-ils représentatifs des populations pélagiques nostocaléennes passées ?
- Quelle est la persistance à court, moyen et long termes des akinètes dans le sédiment ?
- Quel est le pool d'akinètes benthiques encore capable de germer ? Comment ce pool évolue à long terme ?
- Quelle est l'importance des akinètes dans la mise en place des futures populations pélagiques ?
- Est-il possible d'estimer le potentiel toxique des efflorescences nostocaléennes *via* les akinètes présents dans les sédiments ? Plus largement, comment évolue la distribution des géotypes toxiques sur de larges échelles temporelles ?

## II) Les akinètes dans les sédiments : marqueurs des proliférations passées ?

---

Savoir si les akinètes présents dans les sédiments peuvent être utilisés comme un outil de caractérisation des populations nostocaléennes passées est l'un des points fondamentaux de ces travaux de recherche. Pour apporter des éléments de réponses, une caractérisation de la relation entre akinètes présents dans le sédiment et populations pélagiques passées a été réalisée. Elle peut être résumée en trois points majeurs : i) La diversité des espèces observées dans la colonne d'eau se retrouve-t-elle dans le sédiment ? iii) La quantité d'akinètes benthiques est-elle proportionnelle à la population pélagique précédente ? ii) Comment évolue la persistance à long terme des akinètes dans le sédiment ? Pour répondre à ces questions, la mise au point de divers outils méthodologiques s'est avérée nécessaire afin de caractériser les akinètes présents dans les sédiments en termes d'abondance, de diversité morphologique, d'intégrité cellulaire et de potentiel toxique.

### 1. Mise en évidence des akinètes présents dans le sédiment

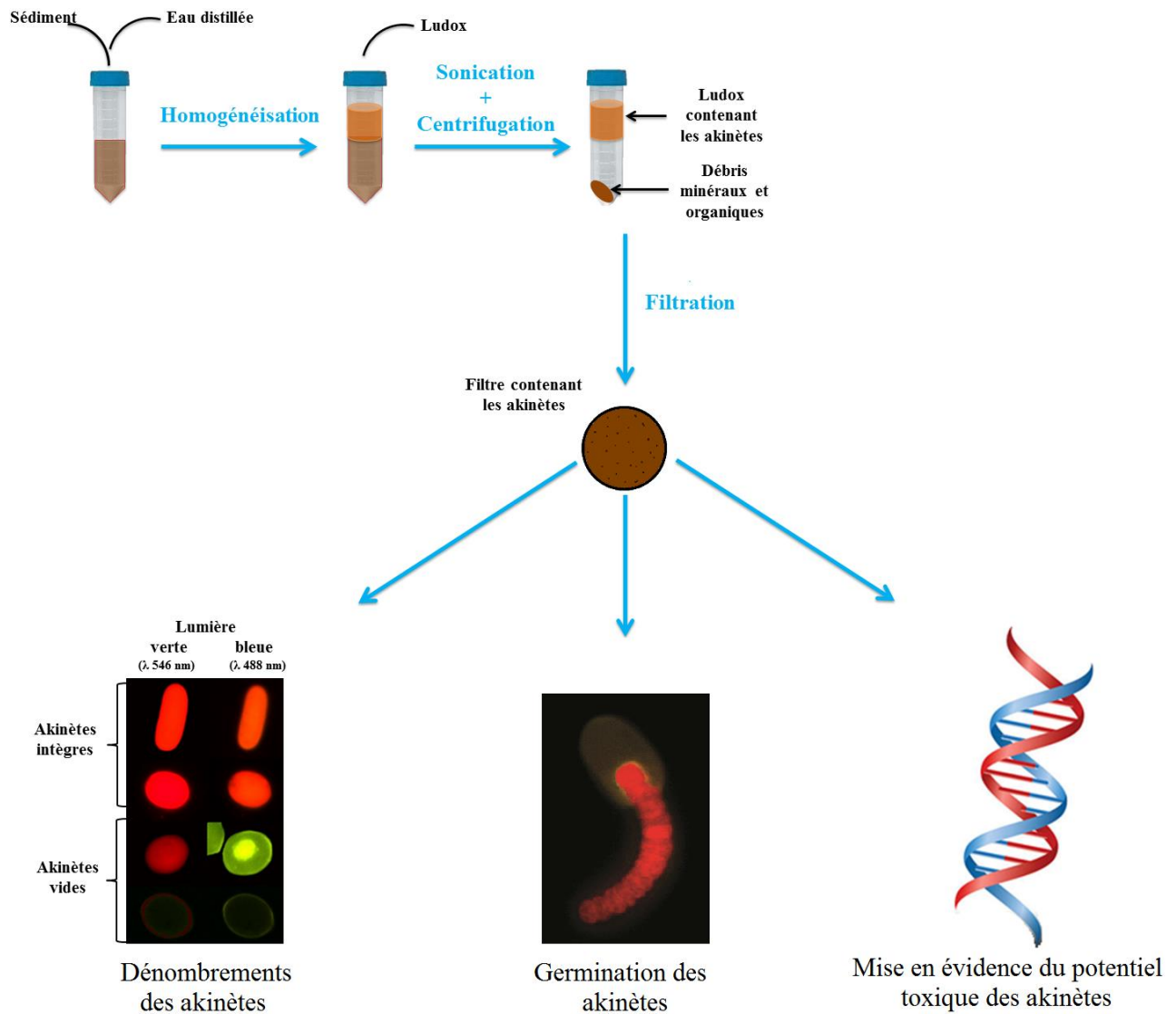
Différents protocoles focalisés sur le dénombrement des akinètes sont disponibles dans la littérature. Cependant, tous présentent des limites (Tableau 1) que nous avons souhaité améliorer afin d'optimiser d'une part l'extraction des akinètes du sédiment et d'autre part, l'estimation de leur abondance en différenciant les divers morphotypes et leur état cellulaire. Ainsi, il a été préféré de coupler deux protocoles : l'extraction au ludox des particules organiques dont les cyanobactéries (Verspagen et al., 2004; Misson et al., 2012), associé à un marquage au Sytox Green en épifluorescence (Gerphagnon, 2013).

**Tableau 1 : Comparaison du protocole Ludox-Sytox Green avec d'autres protocoles d'extraction-observation des akinètes utilisés dans la littérature.**

	Utermöhl (Rücker et al., 2009)	Card FISH (Ramm et al., 2012)	Palynologie (Van Geel et al., 1994) (Miras et al., 2015)	Ludox-Sytox Green (Legrand et al., 2016a)
Protocole destructif	Non	Oui	Oui	Non
Observation de l'intégrité des akinètes	Non optimale	Non optimale	Non	Oui
Élimination des particules sédimentaires	Par dilution	Par dilution	Chimique	Gradient de densité
Dilution de l'échantillon	Très importante	Importante	Modérée	Faible à modérée
Bruit de fond (persistance de particules)	Important	Raisonnable	Absent	Raisonnable
Spécificité du protocole	Généraliste	Limité par la dépendance des sondes utilisées	Généraliste	Généraliste

L'extraction au ludox consiste à réaliser un gradient de densité pour séparer par centrifugation les particules de densités différentes. Ainsi, les particules sédimentaires grossières sont séparées des akinètes (et autres particules fines de même densité) tout en limitant au maximum la dilution de l'échantillon par rapport à d'autres protocoles et donc la sous-estimation des cellules d'intérêt. De plus, ce protocole est le point de départ des principales analyses entreprises sur le sédiment (Figure 1). Étant non destructif, il permet une meilleure représentativité des akinètes dénombrés. Il a également permis la mise en place des expériences de germination et de mise en évidence du potentiel toxique des akinètes dans le sédiment.





**Figure 1 : Schéma détaillant les principes de l'extraction des akinètes avec le ludox et les possibles applications.**

Suite à l'extraction du sédiment, la combinaison de l'autofluorescence des akinètes et du marquage au Sytox green via la microscopie en épifluorescence offre la possibilité de distinguer un akinète intègre et un akinète partiellement ou totalement lysé (Figure 1), ce qui n'est pas proposé jusqu'à présent dans la littérature. Un akinète intègre apparaîtra rouge aussi bien sous excitation de lumière verte ( $\lambda$  546nm) que de lumière bleue ( $\lambda$  488nm). Un akinète partiellement ou totalement lysé apparaîtra rouge sous lumière verte mais jaune sous lumière bleue à cause la fluorescence du Sytox-green fixé sur les résidus d'ADN dans la cellule endommagée. La fluorescence des cellules totalement vides est plus faible surtout avec une lumière verte d'excitation.

Ainsi, la combinaison des protocoles de Ludox et de Sytox-Green permet de préserver de manière maximale les akinètes et d'avoir une meilleure représentativité de l'échantillon étudié. L'exemple le plus concret se traduit lors de la comparaison des protocoles de palynologie (Miras et al., 2015) et de Ludox-Sytox Green sur des mêmes échantillons de la séquence sédimentaire du lac d'Aydat. Les résultats obtenus avec le protocole développé dans ce travail démontrent la présence de quatre morphotypes d'akinètes contre seulement un avec la méthode palynologique. De plus, avec cette dernière, il a été observé des akinètes jusqu'à 1700 ans alors que nous avons retrouvé des akinètes sur l'intégralité de la séquence sédimentaire, soit 6700 ans. Pour finir, la mise en évidence d'akinètes encore intègres sur plusieurs milliers d'années a apporté une réelle plus-value par rapport à la méthode palynologique où ne sont dénombrées que les enveloppes d'akinètes résistants aux traitements (Van Geel et al., 1994; Miras et al., 2015).

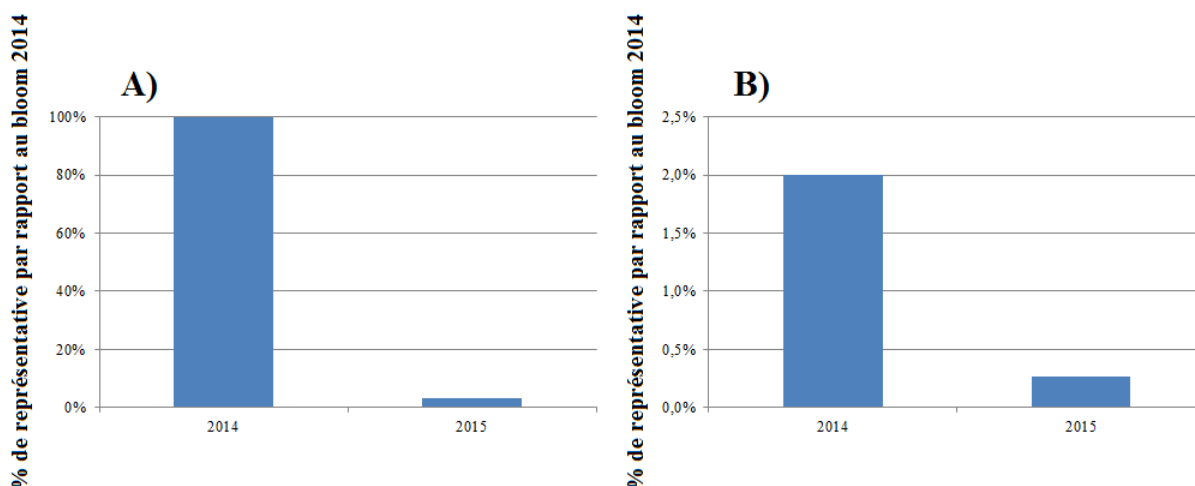
## 2. La diversité nostocaléenne planctonique correspond-elle à celle des akinètes présents dans le sédiment ?

Durant ces travaux de recherche, l'analyse conjointe de la colonne d'eau et du sédiment du lac d'Aydat a permis de montrer que la diversité des akinètes présents en surface du sédiment est représentative de celle de la colonne d'eau, avec une dominance de *D. macrosporum* par rapport à *D. flos-aquae* pendant les deux années de suivi. Si cette relation semble bien établie pour les espèces dominantes, elle apparaît moins évidente concernant les espèces minoritaires. En effet, quelques centaines de cellules.mL<sup>-1</sup> d'*Aphanizomenon* ont été retrouvées dans la colonne d'eau en 2015 alors qu'aucun akinète appartenant à ce genre n'a été observé dans les sédiments de surface (données non montrées dans les articles car focalisées sur les espèces dominantes). L'écologie particulière observée chez certaines nostocales pourrait expliquer cette absence de relation. Il existe, en zone tempérée, des Nostocales qui ont un cycle de vie holoplanctonique c'est-à-dire qu'il privilégie le maintien de petites populations pélagiques pendant l'hiver plutôt que de former des akinètes qui persisteront dans les sédiments (Head et al., 1999; Suikkanen et al., 2010). Ainsi, il est possible qu'*Aphanizomenon* observée dans la colonne d'eau du lac d'Aydat ne possède pas de véritable phase benthique au cours de son cycle de vie, expliquant l'absence de ces cellules dans nos échantillons. Les faibles abondances et la faible récurrence de cette cyanobactérie dans le lac confirmerait cette stratégie. En effet, Sabart et al., (2015) observent

*Aphanizomenon* en faible quantité (quelques milliers de cellules.mL<sup>-1</sup>) uniquement en 2011 sur trois années de suivis (2011, 2012, 2013). De plus, des suivis annuels réalisés dans les années 1980 ne mentionnent pas la présence de ce genre dans la colonne d'eau du lac d'Aydat (Aleya, 1987; Lafforgue, 1990; Lafforgue et al., 1995).

### 3. L'abondance des akinètes benthiques est-elle proportionnelle à celle des populations pélagiques précédentes ?

Des études précédentes se sont déjà focalisées sur cette question avec des éléments de réponses assez divergents. Tout d'abord, Livingstone, (1984) et Räsänen et al., (2006) émettent l'hypothèse que les akinètes du genre *Anabaena* ne peuvent pas être représentatifs des populations pélagiques passées car ces espèces ne présentent pas de sporulation régulière en fonction des années. Aucune autre étude n'est venue confirmer ou contredire cette production variable d'akinètes pour une espèce donnée. Ces travaux de thèse ont permis d'apporter des éléments de réponse *via* les deux années de suivis contrastées de la colonne d'eau du lac d'Aydat (2014, un des plus importants blooms de *D. macrosporum* de ces dernières années; 2015 pas de prolifération). En effet, le pourcentage moyen d'akinètes présents par rapport au nombre de cellules végétatives pour *D. macrosporum* était de 2% en 2014 et de 8,75% en 2015. Par conséquent, un écart entre deux années contrastées existe et reflète probablement une différence de stratégie écologique en particulier en produisant plus d'akinètes pour persister dans des conditions environnementales défavorables en 2015. Cependant, même s'il existe une différence de production d'akinètes en fonction des années, elle reste pour le moins limitée par rapport à la différence de biomasse observée entre ces deux années (Figure 2) et serait considérée comme négligeable.



**Figure 2 : Comparaison des populations pélagiques de *D. macrosporum* entre 2014 et 2015, A) Cellules végétatives, B) Akinètes. Tous ces pourcentages sont exprimés par rapport à la population pélagique de *D. macrosporum* de 2014 (100%).**

Pour aller plus loin, Räsänen et al., (2006) ont confronté des dénombrements d'akinètes issus d'une carotte sédimentaire à un suivi de 20 ans de la colonne d'eau du Lake Pyhäjärvi (Finlande). Les auteurs en concluent qu'il n'y a pas de relations directes entre le nombre de filaments de nostocales présents dans la colonne d'eau et la quantité d'akinètes dénombrés dans les différentes tranches sédimentaires. Cependant, il a déjà été reporté que les filaments peuvent se fragmenter au cours d'une prolifération sous l'influence de paramètres biotiques et abiotiques (Cirés et al., 2013b; Gerphagnon et al., 2013a; Šulčius et al., 2015). Par conséquent leur abondance, sans considération de leur taille, ne constitue pas un bon indicateur de la biomasse cyanobactérienne et ne peut conduire à l'établissement d'une relation avec le nombre d'akinètes. Au contraire, Rucker et al., (2009) mentionnent que la quantité d'akinètes de *C. raciborskii* retrouvée à la surface du sédiment du lac Melangsee (Allemagne) est proportionnelle au nombre de cellules végétatives de la précédente population pélagique de cette même espèce.

Ici la comparaison entre le suivi de populations pélagiques et les dénombrements benthiques des trois points analysés du lac d'Aydat pendant deux ans ont permis d'apporter des éléments de réponse quant à la représentativité des akinètes par rapport aux populations pélagiques. Les comptages d'akinètes des deux espèces d'intérêt (*D. macrosporum* et *D. flos-aquae*) à la surface des sédiments indiquent une quantité plus importante en 2014 qu'en 2015, ce qui est en accord avec les données observées dans la colonne d'eau. De plus, pour chaque année, la comparaison entre le nombre de cellules végétatives de *D. macrosporum* présentes

dans la colonne d'eau et celui des akinètes présents dans le sédiment de surface des trois points étudiés donne exactement la même dynamique. Cependant, le nombre d'akinètes benthiques de *D. macrosporum* en 2014 n'est que 3 fois supérieur à celui retrouvé en Décembre 2015 (ratio attendu de 33 si égal à celui de la colonne d'eau). Cette différence majeure entre le ratio attendu et mesuré ne peut s'expliquer uniquement par la différence de production des akinètes suivant les années et d'autres facteurs peuvent jouer un rôle conséquent. Par exemple, le nombre plus important d'akinètes dans les sédiments de surface en Avril 2015 comparativement à Décembre 2014 peut correspondre à des mouvements gravitaires induisant un enrichissement en particules sédimentaires, dont les akinètes, vers les fosses d'accumulation. Cette sédimentation secondaire hivernale a déjà été observée pour des colonies de *Microcystis* et pour des akinètes sur des zones profondes en retenues de barrage (Verspagen et al., 2005; Cirés et al., 2013a; Ramm et al., 2017). Ces remaniements fréquents des strates de surface induiraient également un mélange des particules sédimentaires. Cela conduirait notamment à un lissage des concentrations en akinètes et réduirait les écarts annuels observés dans la colonne d'eau. Le dénombrement des akinètes dans cette fraction mobile des sédiments ne permettrait donc pas d'obtenir une estimation fine de l'abondance pélagique à l'échelle annuelle mais révélerait des tendances fiables à l'échelle pluri-annuelle.

La comparaison de nos comptages d'akinètes avec d'anciennes données de populations pélagiques a permis de confirmer ce constat. Ainsi, sur les 30 dernières années, d'abondantes proliférations de *D. macrosporum* ont été observées (Aleya, 1987; Lafforgue et al., 1995; Sabart et al., 2015) ce qui correspond aux fortes concentrations en akinètes dénombrés dans les strates sédimentaires correspondantes (entre 200 000 et 600 000 akinètes.gDW<sup>-1</sup> de sédiments). Ainsi, même si la production d'akinètes, puis leur distribution spatiale, peut connaître des variations, nous pouvons affirmer qu'un grand nombre d'akinètes retrouvés dans le sédiment révèle une population pélagique importante. La persistance des akinètes dans les sédiments, y compris profonds, et leur bonne représentativité des populations pélagiques passées permet de proposer l'utilisation des akinètes en tant que bio-indicateurs des blooms nostocaléens passés.

## 1. Persistance des akinètes de la colonne d'eau aux sédiments profonds

L'utilisation des akinètes comme outil d'évaluation des proliférations anciens passe par la question de leur persistance dans le temps, depuis leur formation dans la colonne d'eau jusqu'à l'enfouissement dans le sédiment de plusieurs milliers d'années.

Dans la colonne d'eau les principaux facteurs liés à la lyse des akinètes sont biotiques et se résument au parasitisme fongique (Gerphagnon et al., 2013a), à la lyse virale (Gerphagnon et al., 2015) et bactérienne (Yamamoto and Suzuki, 1977) et au broutage par le zooplancton (Fay, 1988). Ces facteurs biotiques peuvent affecter considérablement le pool d'akinètes présent dans la colonne d'eau (Gerphagnon et al., 2013b, 2015). Cela aurait pour conséquence d'altérer fortement la représentativité des akinètes. Cependant, lors d'atteintes biotiques, les enveloppes des akinètes ne disparaissent pas complètement et sont capables de persister dans les sédiments même après une lyse (Figure 3). Concernant le broutage des akinètes, aucune analyse précise ne quantifie la persistance des enveloppes d'akinètes après ingestion et digestion par les prédateurs. Cependant, (Fay, 1988) et (Huber, 1984) retrouvent des enveloppes vides dans des pelotes fécales issues d'organismes zooplanctoniques. La même observation a été réalisée sur quelques échantillons des carottes sédimentaires provenant du lac d'Aydat et de la retenue de Puyvalador (Stage Master 1, Benoit Gire). Ces résultats semblent indiquer qu'en dépit d'une forte pression des facteurs biotiques, la représentativité des akinètes ne serait que très peu altérée par ces facteurs grâce à la persistance des enveloppes d'akinètes vides qui sédimentent et sont donc dénombrées lors de nos analyses.

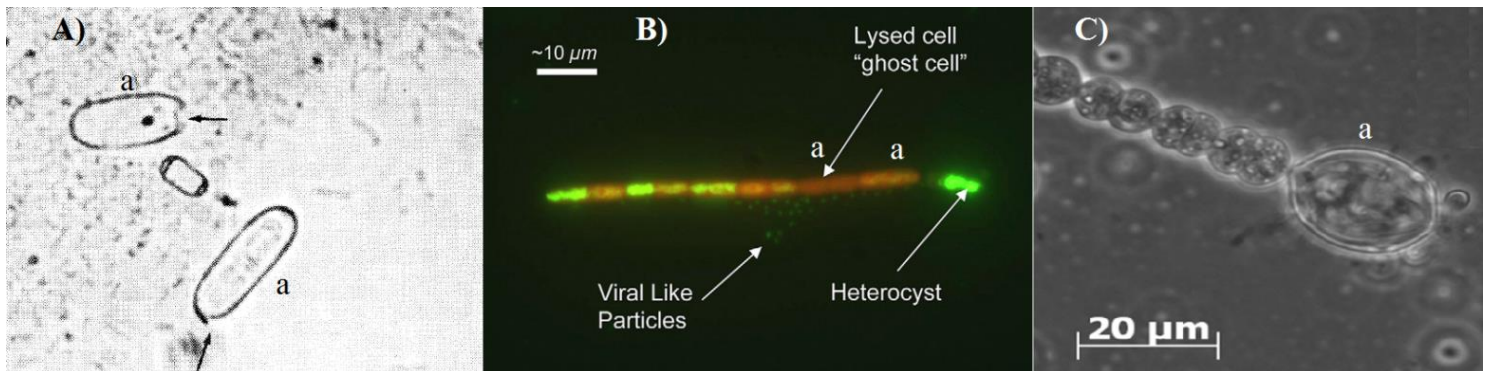


Figure 3 : Enveloppes d'akinètes (a) après une lyse bactérienne A), virale B) et fongique C). Akinètes d'*Anabaena cylindrica* A), de *Cylindrospermopsis raciborskii* B), et de *Dolichospermum macrosporum* C). Photographies d'après Yamamoto and Suzuki, (1977) A), (Pollard and Young, (2010) B), et de B. Legrand C).

Pour constituer un paléo-indicateur, les akinètes doivent aussi persister sur de longues périodes dans les sédiments. Avec la profondeur, l'activité microbienne diminue très rapidement (Miskin et al., 1997; Rothfuss et al., 1997) limitant les interactions dans les sédiments. Les facteurs pouvant affecter la persistance des akinètes deviennent alors de nature physico-chimique. Comme l'évoque Eilers et al., (2004), le temps d'enfouissement, les conditions de conservation (anoxie, pression) et la composition du sédiment pourrait avoir un effet néfaste sur la préservation des akinètes enfouis dans le sédiment. Cependant, aucune étude ne décrit précisément une cinétique de dégradation des akinètes en fonction de ces paramètres.

L'analyse de la carotte sédimentaire sur 220 ans du lac d'Aydat montre une corrélation négative entre la profondeur et l'abondance des akinètes totaux de *D. macrosporum*. Ceci suggère une dégradation des akinètes, y compris des enveloppes vides au cours du temps. Néanmoins, en intégrant une période de temps plus conséquente avec l'étude des 6700 ans d'histoire du lac d'Aydat, cette tendance n'est plus retrouvée et aucune distribution d'akinètes ne montre une corrélation négative avec le temps d'enfouissement dans le sédiment. Au contraire, des concentrations importantes d'akinètes sont retrouvées ponctuellement après plusieurs centaines d'années d'enfouissement et les akinètes de *Dolichospermum* et d'*Aphanizomenon* se trouvent même en plus forte abondance dans les sédiments profonds. En milieu sédimentaire, les akinètes ne seraient donc pas soumis à un taux de dégradation progressif et rapide à l'échelle de quelques dizaines d'années mais s'avèrent capables de persister des milliers d'années dans les sédiments. Des enveloppes vides d'akinètes d'*Aphanizomenon* datant de plus de 4000 ans et retrouvées en quantité dans le sédiment du lac Gosciadz (Pologne) confirment aussi cette persistance sur le long terme. Cette capacité de résistance sur de longues échelles de temps validerait ainsi leur utilisation en paléo-écologie.

Les corrélations négatives entre susceptibilité magnétique et abondances totales des akinètes dans les deux carottes du lac d'Aydat étudiées pourraient refléter une altération des akinètes en fonction de la composition du sédiment. Cependant, ces changements de compositions sédimentaires mesurés *via* la susceptibilité magnétique correspondent également à des événements d'érosion liées aux conditions climatiques ou à l'activité anthropique sur le bassin versant (Lavrieux et al., 2013). Ainsi, il a été mis en évidence que la période 1200-150 cal B.P (Lavrieux et al., 2013; Miras et al., 2015), séquence dans laquelle les akinètes sont très peu présents, était caractérisés par des événements érosifs importants avec des conditions climatiques conduisant à de nombreuses crues. Ces conditions particulières sont connues pour



être défavorables au développement de la biomasse cyanobactérienne notamment en induisant des températures plus fraîches et une instabilité de la colonne d'eau (Paerl et al., 2011; Paerl and Otten, 2013). De plus, la récurrence de proliférations de diatomées mise en évidence durant cette période (Lavrieux et al., 2013; Miras et al., 2015), confirmerait des conditions climatiques possiblement plus froides et surtout pluvieuses créant des conditions écologiques favorables à ce groupe et défavorables aux cyanobactéries. Par conséquent, il est plus probable que la relation entre susceptibilité magnétique et abondances d'akinètes soit le reflet de conditions environnementales défavorables au développement des Nostocales plutôt que l'altération physique des akinètes *via* la composition sédimentaire. Ainsi, les enveloppes vides d'akinètes, à l'image des frustules des diatomées, pourraient donc servir d'indicateurs des populations nostocaléennes pélagiques passées, y compris sur de larges échelles temporelles (plusieurs milliers d'années).

### III) Intérêt d'évaluer l'intégrité des akinètes

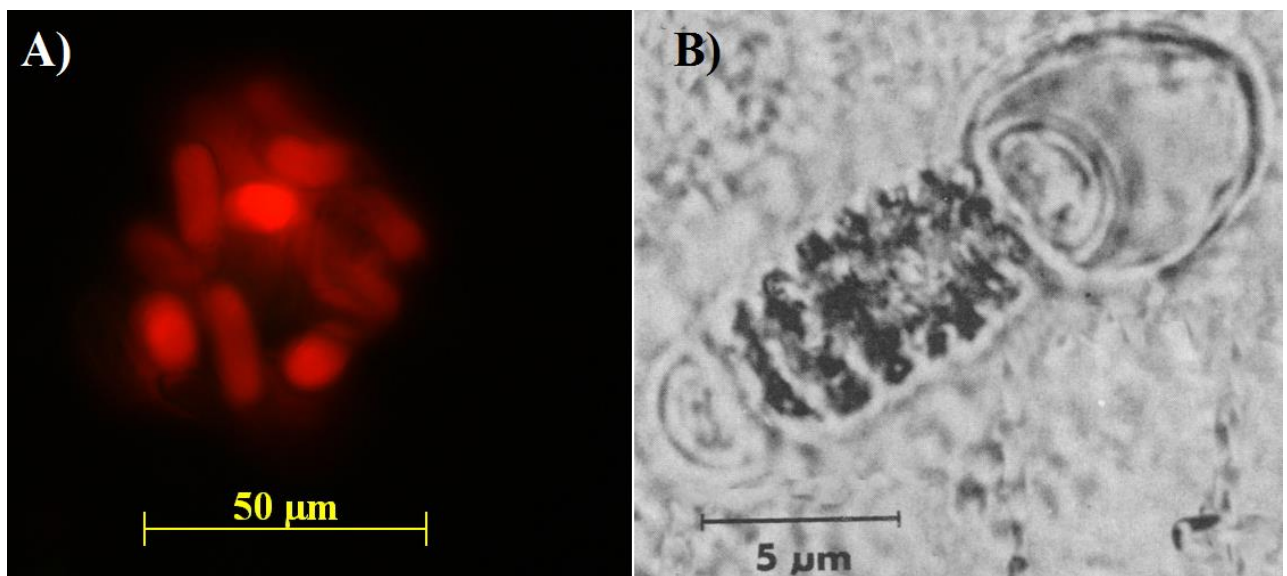
---

#### 1. L'intégrité des akinètes, un critère espèces-spécifiques

L'intégrité des akinètes, c'est-à-dire la distinction d'une paroi non perméabilisée et d'un contenu cellulaire intact, a tout d'abord été caractérisée au niveau d'akinètes issus de cultures cyanobactériennes avant d'être transposée au niveau environnemental sur des sédiments de surface et profonds. Le travail réalisé sur quatre souches cyanobactériennes a démontré une sensibilité aux stress physiques propre à chaque espèce étudiée. Ainsi, il a été observé que l'ensemble des akinètes de *D. circinalis* souche 86 conserve leur intégrité cellulaire suite au protocole d'isolement utilisé contre seulement 7% des akinètes de *D. mendotae* souche 130. Cette tolérance espèces-spécifiques est retrouvée aussi en milieu naturel où il apparaît clairement que les akinètes de *D. macrosporum* sont moins résistants aux stress abiotiques tels un choc osmotique ou une température élevée que les akinètes de *D. flos-aquae*. Tous ces éléments suggèrent que le maintien de l'intégrité des akinètes dans les sédiments suit une sélection espèces-spécifiques. Des différences entre souches d'une même espèce ont déjà été observées. Par exemple, certaines souches d'*Anabaena cylindrica* sont capables de résister à la dessiccation (Hori et al., 2003) alors que d'autres non (Baker and Bellifemine, 2000). Ces différences de sensibilité pourraient expliquer au moins en partie les différences d'intégrité retrouvées entre *D. macrosporum* et *D. flos-aquae* dans le sédiment de surface du lac d'Aydat.



De plus, l'observation d'un nombre important d'akinètes intègres de *D. flos-aquae* et d'enveloppes vides de *D. macrosporum* dans des pelotes fécales zooplanctoniques d'échantillons issus des carottes d'Aydat (Figure 4) et de Puyvalador (données non montrées) confirmerait cette différence spécifique de résistance. Par ailleurs, la présence d'akinètes intègres de *D. flos-aquae* dans les pelotes fécales zooplanctoniques fécales à la surface du sédiment leur conférerait un avantage écologique vis-à-vis de la disponibilité en nutriments (processus de pelletization) (Kremp et al., 2003) (Figure 4B)). En effet, des éléments comme le phosphore sont indispensables à la germination de ces cellules et sont présents en quantité importantes dans les pelotes fécales (Thompson et al., 2009; Kaplan-levy et al., 2010).



**Figure 4 : A) Akinètes intègres de *D. flos-aquae* issus d'une pelote fécale retrouvée dans le sédiment du lac d'Aydat, B) Akinète germant de *Nodularia sp.* issu d'une pelote fécale retrouvée dans le sédiment de l'estuaire de Peel-Harvey d'après (Huber, 1984).**

La différence d'intégrité entre les akinètes de *D. macrosporum* et *D. flos-aquae* peut aussi s'expliquer par des facteurs biotiques spécifiques tels que le parasitisme. En effet, il a déjà été démontré que dans le lac d'Aydat, les akinètes de *D. macrosporum* sont l'hôte spécifique du chytride *Rhizosiphon akinetum* (Gerphagnon, 2013a, 2013b). Ainsi, l'analyse des sédiments a permis d'observer que 48% des akinètes lysés de *D. macrosporum* présents à la surface du sédiment étaient liés au parasitisme de *R. akinetum* dans la colonne d'eau (Gerphagnon et al., 2017). Cela est confirmé par de nombreuses observations microscopiques d'akinètes lysés dans la colonne d'eau durant l'analyse des proliférations de 2014 et 2015 suggérant que ce parasitisme est essentiellement pélagique (données non montrées). De plus, comme pour la préservation des enveloppes vides dans le sédiment profond, aucun élément ne vient

corroborer le fait qu'il y aurait une perte d'intégrité au fil du temps ou en fonction de la composition des sédiments (Figure 5).

La similitude des pourcentages d'akinètes intègres dans les sédiments profonds (3 à 7% d'akinètes intègres) et en surface (compris en 4 et 7%) suggère que la perte d'intégrité liée à l'enfouissement serait très limitée concernant *D. macrosporum*. Ainsi, le pourcentage d'akinètes intègres, même après plusieurs milliers d'années d'enfouissement, serait le reflet d'interactions écologiques passées (Figure 5). De manière intéressante, ce pourcentage reste toujours globalement bas pour *D. macrosporum* et très élevé pour *Dolichospermum sp.* et *Aphanizomenon sp.* Ces fortes différences interspécifiques suggèrent des différences en termes de stratégies écologiques et d'adaptation au milieu. Ainsi, en dépit d'une faible résistance de ses akinètes, *D. macrosporum* domine actuellement le peuplement du lac d'Aydat. De plus, sa présence sur l'ensemble de l'historique du lac d'Aydat démontre de son adaptation long-terme à ce site. Pour finir, *D. flos-aquae* est aussi retrouvée sur l'ensemble des séquences sédimentaires analysées. Cependant, l'intégrité des akinètes de cette espèce est significativement plus faible dans l'unité supérieure que dans l'unité inférieure de la séquence profonde. Cette diminution de l'intégrité est associée à une diminution d'akinètes retrouvés dans l'unité supérieure. Ainsi, il est possible que les conditions environnementales ne soient plus optimales dans l'unité supérieure pour cette espèce.

## 2. Le maintien de l'intégrité des akinètes est-il le reflet de leur viabilité ?

Caractériser l'aptitude des akinètes à germer permet d'identifier l'implication des akinètes dans la mise en place des futures populations pélagiques. Sur un plan plus fondamental, il s'avère également intéressant d'estimer la viabilité des akinètes sur le long terme pour estimer leur longévité dans les sédiments. Cependant, rares sont les études mettant en évidence ce potentiel surtout sur de grandes séquences temporelles. Par exemple, Sili et al., (1994) observent un pourcentage de germination supérieure à 90% des akinètes *Cyanospira rippkae* et *Cyanospira capsulata* après 7 ans de stockage à sec. A ma connaissance, seuls Livingstone and Jaworski, (1980) et Wood et al., (2009) s'intéressent à la germination d'akinètes issus du sédiment ancien, allant de périodes d'enfouissement de 64 à 180 ans. Dans ces études, aucune mention n'est faite sur le pool d'akinètes encore capables de germer, les auteurs se contentent d'observer la présence d'hormogonies.

## Chapitre 5 : Discussion générale

La caractérisation du potentiel de germination des différents morphotypes d'akinètes étudiés a permis d'affirmer que, dans le sédiment de surface, un akinète considéré intègre a la capacité de germer. En effet, une efficacité de germination supérieure à 90% pour *D. macrosporum* et *D. flos-aquae* a été observé dans toutes les expérimentations de germination réalisées sur le sédiment de surface. Les expérimentations de germination sur la carotte de 220 ans montrent que la quasi-totalité des akinètes intègres sont encore capables de germer après plus de 100 ans d'enfouissement (données non montrées). Cependant, il semblerait que la viabilité des akinètes diminue après plusieurs centaines, voire milliers d'années d'enfouissement. En effet, sur les quatre échantillons testés couvrant une période de 5500 à 1600 ans cal.BP, seul un échantillon datant de 1769 ans cal.BP, a présenté des akinètes germant appartenant à *D. flos-aque*. Seulement 1,5% des akinètes intègres sont arrivés à ce stade mais aucune hormogonie n'a été observée. Ce faible pourcentage et l'absence d'hormogonie semblent être le reflet d'une perte progressive de la viabilité des akinètes via une altération progressive du contenu cellulaire au fil du temps. Cependant, le fait que certains akinètes soient capables de rester viables pendant plus de 1500 ans dans les sédiments met en évidence leur exceptionnelle aptitude à être conservées dans des conditions environnementales extrêmes.

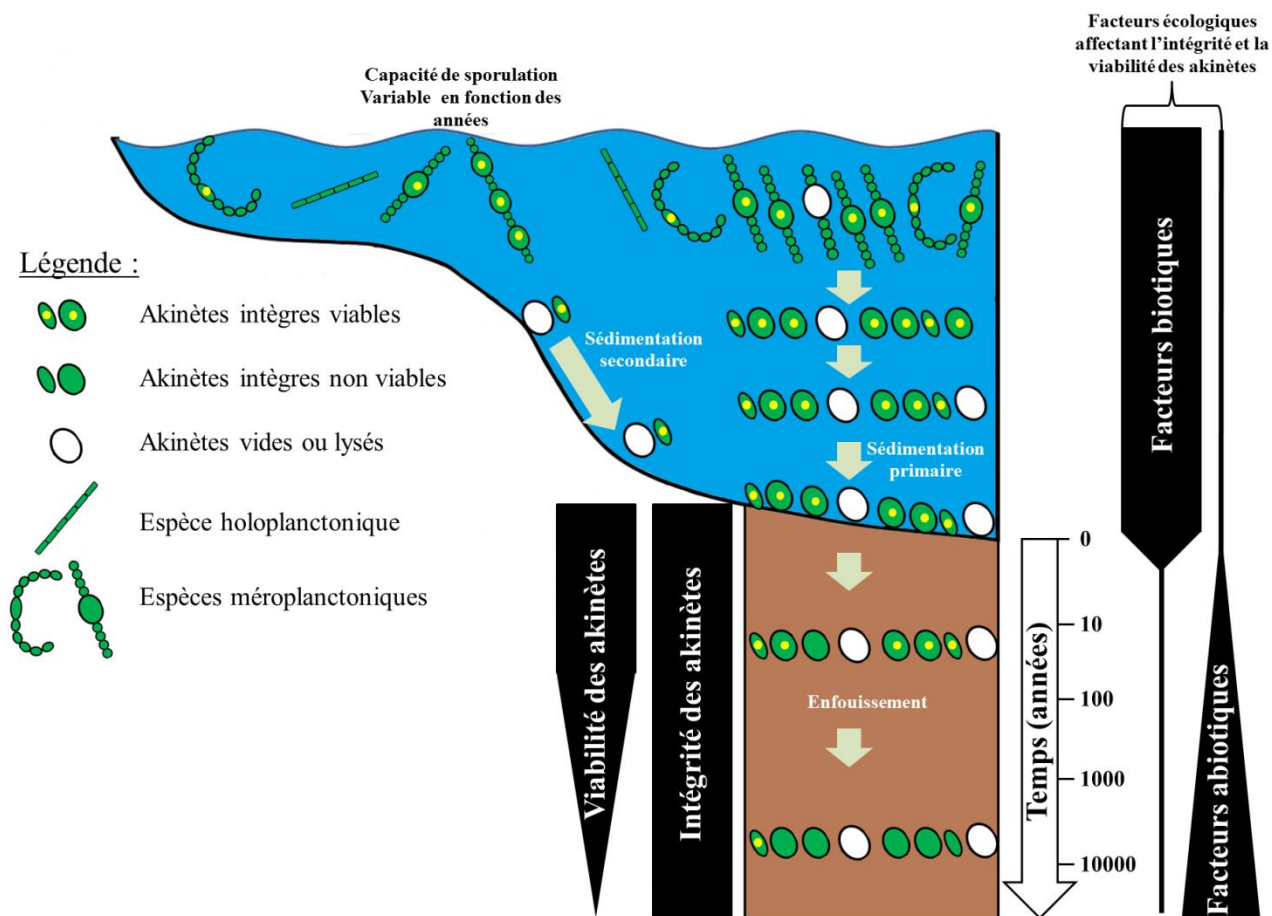


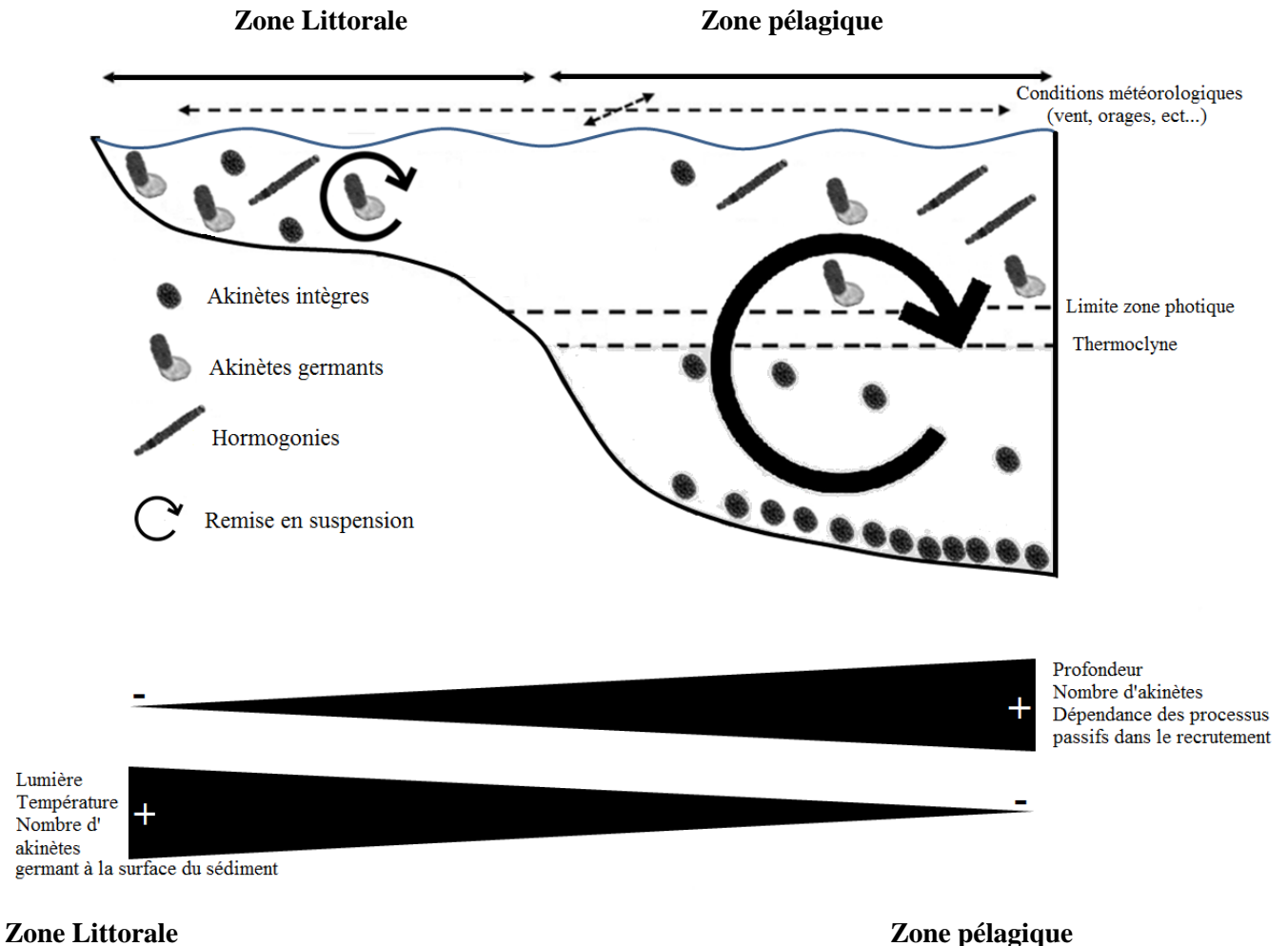
Figure 5: Schéma résumant les principaux facteurs écologiques rencontrés depuis la formation des akinètes dans la colonne d'eau jusqu'à leur enfouissement dans le sédiment profond.

### 3. Implication de la germination des akinètes dans la mise en place de la future population pélagique

Les premières caractérisations de la germination des akinètes sont anciennes et dès le milieu des années 1970, (Yamamoto, 1976) observe une période d'inertie (« lag period ») dans la germination des akinètes issus de cultures d'*Anabaena cylindrica*. Cette période de lag est également observée à partir d'akinètes de culture (Rai and Pandey, 1981; Reddy, 1983; Huber, 1985), d'akinètes ayant été prélevés en hiver (Kovács et al., 2012) ou ayant subi un stockage prolongé (i.e faible température à l'obscurité ou dessiccation) (Baker and Bellifemine, 2000; Hori et al., 2003). Baker and Bellifemine, (2000), préconisent même de faire une pré-incubation de 48 heures à la lumière avant de commencer une cinétique de germination. La comparaison de la germination entre akinètes de sédiment de surface prélevés sur le lac d'Aydat en Décembre et Avril démontre des différences de temps de réponse. La période de latence est beaucoup plus longue pour les akinètes prélevés en Décembre comparativement à ceux d'Avril. Ces éléments suggèrent qu'il y aurait un changement d'états physiologique et métabolique des akinètes au début de la période printanière. Ce changement interviendrait avec l'apparition de conditions environnementales plus favorables (i.e augmentation de la température) mais ne permettant pas encore la germination des akinètes. La plus faible résistance des akinètes prélevés en Avril par rapport à ceux de Décembre confirme un changement physiologique rendant l'enveloppe des akinètes printaniers plus fragile et pouvant favoriser la libération des hormogonies.

Cet état de pré-germination confèrerait un avantage écologique non négligeable. En effet, les akinètes peuvent rapidement (en quelques heures voire moins) répondre à des conditions environnementales favorables, même si la fenêtre de germination est limitée dans le temps. Cela est particulièrement intéressant pour les akinètes des zones profondes qui n'ont pas accès à la lumière. Ainsi, un court épisode lumineux, suite à une remise en suspension du sédiment par exemple, pourrait suffire à induire une germination rapide d'akinètes. En effet, il est communément admis qu'une faible intensité lumineuse est suffisante voire optimale pour induire la germination d'akinètes (Kaplan-levy et al., 2010; Sarma, 2012). De plus, il a déjà été montré que le recrutement de *Microcystis* pouvait résulter d'un processus passif (Verspagen et al., 2004) y compris dans les zones profondes (Misson and Latour, 2012), notamment sous l'effet de la remise en suspension des cellules liée au vent et/ou au brassage. Certaines études évoquent également la possibilité d'un recrutement passif des akinètes (Karlsson-Elfgrén et al., 2004; Hense and Beckmann, 2006). Ainsi, les akinètes localisés dans

les zones profondes sans lumière participeraient tout de même au processus de recrutement, contrairement aux hypothèses anciennement formulées (Ramm et al., 2017). Ainsi, même si les conditions environnementales en zone littorale sont plus propices à la germination, les akinètes issus des zones profondes peuvent contribuer à l'établissement de futures populations pélagiques (Figure 6).



**Figure 6: Colonisation de la colonne d'eau par les akinètes en fonction de la zone considérée (représentation basée sur le lac dimictique tel le lac d'Aydat).**

A cette variabilité spatiale de germination s'ajoute une aptitude de germination variable en fonction des espèces. Par exemple, lors de la germination des akinètes en conditions contrôlées, il apparaît que les akinètes de *D. flos-aquae* germent deux fois plus vite que ceux de *D. macrosporum*. Cette différence est aussi observée directement sur le lac avec un plus grand nombre d'akinètes germant de *D. macrosporum* en zone littorale. La germination des akinètes semble donc suivre également un processus espèces-spécifiques assez prononcé.

Cette variabilité dans le recrutement et la germination des akinètes contribue probablement à une meilleure colonisation de la colonne d'eau. En effet, ces différents processus permettent d'étendre dans le temps et dans l'espace la fenêtre de germination des akinètes et contribuent par conséquent au succès écologique des Nostocales en zone tempérée.

## IV) Mise en évidence du potentiel toxique des akinètes

---

Détecter l'un des gènes impliqués dans la biosynthèse d'une cyanotoxine dans les akinètes intègres permet de mettre en évidence le potentiel toxique passé des communautés nostocaléennes. En effet, ces cellules sont porteuses d'informations génétiques démultipliées (Sukenik et al., 2012b) et leur aptitude de conservation dans les sédiments faciliterait la préservation de cette information.

### 1. Mise en œuvre méthodologique

Le choix des cyanotoxines d'intérêt s'est naturellement porté vers la microcystine et l'anatoxine-a. En effet, ces deux cyanotoxines ont déjà été détectées dans le lac d'Aydat (Sabart et al., 2015) et sont potentiellement produites par des Nostocales (Rapala et al., 1997; Méjean et al., 2014). Plusieurs outils moléculaires étaient à notre disposition pour pouvoir mettre en évidence le potentiel toxique des akinètes. La PCR quantitative (qPCR) semblait un outil de choix permettant d'estimer un nombre de gènes cibles par cellule. Cependant, pour l'anatoxine-a, il n'existe pas dans la littérature d'amorces spécifiques disponibles (Wang et al., 2015). Le design d'amorces qPCR dédiées à l'anatoxine-a entrepris en début de thèse n'a pas apporté de résultats satisfaisants dans la matrice sédimentaire. Ainsi, souhaitant détecter de faibles quantités d'ADN dans une matrice riche en inhibiteurs, notre choix s'est porté sur le développement d'une méthode de nested PCR (PCR nichée) possédant une meilleure résolution de détection qu'une PCR classique (Figure 7). Cette tendance a été confirmée tout au long de ces travaux de recherche aussi bien sur du sédiment récent qu'ancien et sur les gènes cibles de l'anatoxine-a et de la microcystine. Par exemple, grâce au développement de la nested PCR sur le gène *anaC*, nous avons mis en évidence la présence de ce gène dans le sédiment de nombreux sites d'étude (9 sur 10 étudiés) suggérant une occurrence insoupçonnée des génotypes potentiellement producteurs d'anatoxine-a en milieu lacustre.



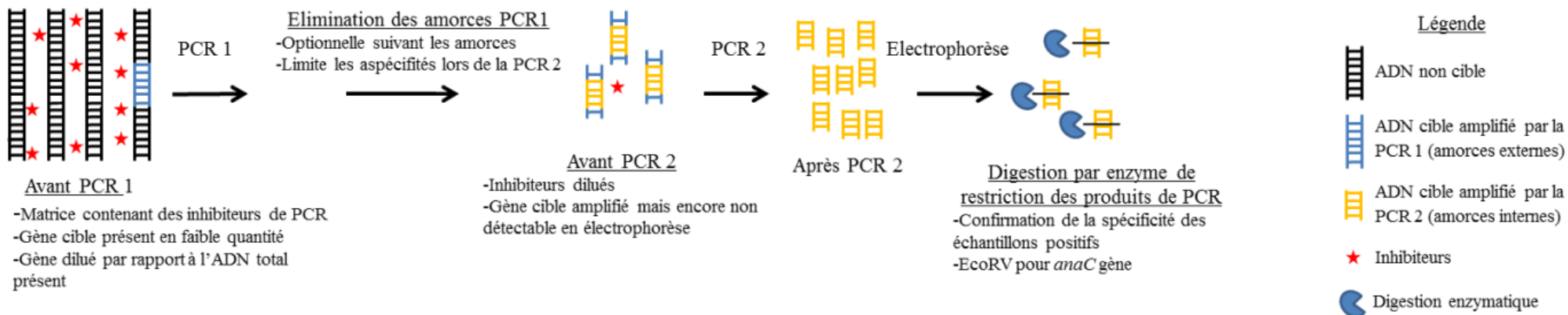


Figure 7 : Schéma expliquant les intérêts de l'utilisation de la nested PCR

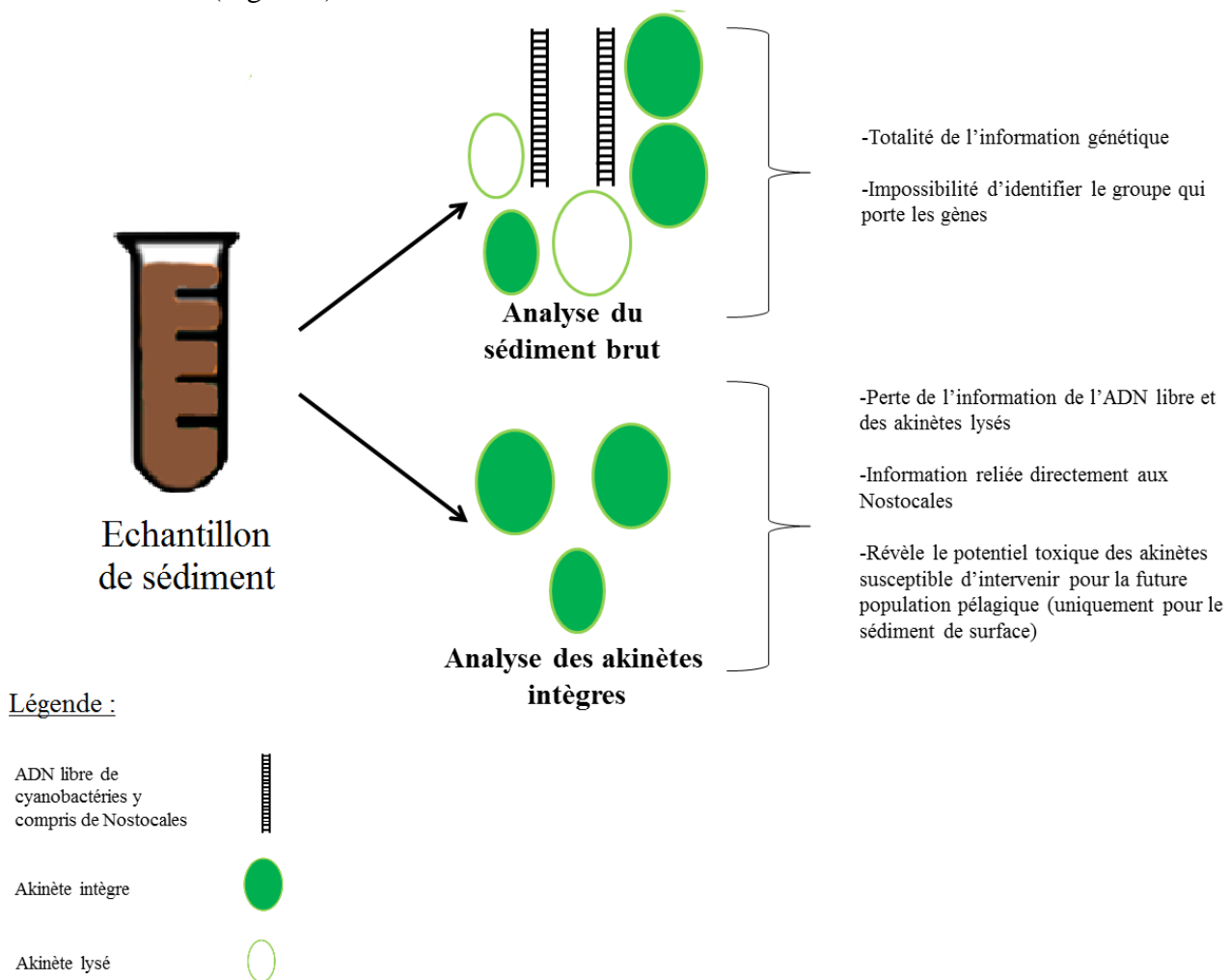


## 2. Mise en évidence et caractérisation du potentiel toxique des akinètes

La détection du gène *anaC* dans des akinètes issus de souches monoclonales productrices d'anatoxine-a, nous a permis de mettre en évidence le potentiel toxique de ces cellules de résistance, chose qui n'avait jamais vérifié auparavant. Appliqué à des échantillons environnementaux, ce principe a permis de valider qu'au moins une des deux espèces de *Dolichospermum* présente sur le lac d'Aydat (*D. macrosporum* et *D. flos-aquae*) a potentiellement la capacité de produire de l'anatoxine-a. La détection du gène *anaC* dans les akinètes intègres de seulement deux stations sur les cinq analysées suggère aussi une variabilité géographique dans la distribution des géotypes toxiques. La variabilité spatio-temporelle entre géotypes toxiques et non toxiques a déjà été couramment observé chez les producteurs de microcystines (Bernard, 2014; Briand et al., 2009; Sabart et al., 2010). Même si la variabilité temporelle saisonnière est difficilement observable par l'analyse des sédiments (Kim et al., 2010), ces résultats suggèreraient donc, qu'au même titre que la microcystine, il existerait une variabilité spatio-temporelle des géotypes ayant potentiellement la capacité de synthétiser l'anatoxine-a. La faible détection du gène *anaC* dans les échantillons d'eau de la prolifération de l'automne 2014 (1 échantillon positif sur 17 dates, données non montrées) et la détection de l'anatoxine-a seulement une année sur trois de suivies (Sabart et al., 2015) confirmeraient cette hypothèse.

### 3. Applications, limites et intérêts d'une analyse multiparamètres

La détection des gènes d'intérêt (*anaC* et *mcyA*) sur les akinètes intègres issus de carottes sédimentaires a permis de mettre en évidence que les communautés nostocaléennes passées (surtout ces dernières 30 années) étaient potentiellement productrices d'anatoxine-a et de microcystines. Cependant, la pertinence de cette analyse est limitée par le nombre d'akinètes intègres présents dans l'échantillon. En effet, un faible pourcentage de détection des gènes d'intérêt a été montré dans les akinètes intègres comparativement à l'analyse réalisée sur du sédiment brut. En effet, seuls 21% à 28% des échantillons (respectivement pour *mcyA* et *anaC*) sont positifs simultanément dans le sédiment brut et les akinètes intègres. Ces faibles pourcentages conduisent à conclure que la majorité de l'information génétique concernant le potentiel toxique passé des cyanobactéries est contenu sous forme d'ADN libre dans le sédiment (Figure 8).



**Figure 8: Schéma expliquant l'intérêt d'analyser le potentiel toxique des sédiments bruts et des akinètes intègres.**

Cependant, la recherche conjointe des gènes de cyanotoxines dans les akinètes intègres et le sédiment brut permet d'obtenir des informations complémentaires en lien avec les populations nostocaléennes passées. Ainsi, la détection d'*anaC* dans le sédiment brut et les akinètes intègres a permis d'expliquer que la récurrence d'*anaC* depuis plus de 30 ans sur le lac d'Aydat était probablement liée à la récurrence des blooms de *D. macrosporum*.

Cependant, l'analyse de l'ADN issus des akinètes intègres est relativement couteuse en matériel sédimentaire. Par conséquent, cet aspect n'a pas pu être mis en pratique lors de l'analyse de la séquence sédimentaire de 6700 ans. Ainsi, la récurrence à long terme de *mcyA* depuis plus de 500 ans ne peut être directement associée à une espèce et devra nécessiter une analyse de la diversité pour apporter des éléments de réponse.

## V) Conclusion et Perspectives

---

Ces travaux de thèse ont eu pour objet d'examiner la pertinence de l'utilisation des akinètes comme marqueurs des proliférations nostocaléennes passées sur le lac d'Aydat. La persistance déjà connue de ces cellules spécialisées s'est avérée pertinente et a permis de mettre en évidence des périodes de blooms ayant eu lieu il y a plusieurs centaines et milliers d'années. La récurrence des blooms cyanobactériens n'est donc pas uniquement imputée à la période moderne mais trouve ces origines très précocement dans l'histoire de vie du lac. Si les causes semblent tout de même être liées aux activités humaines (défrichage, cultures autour du lac...), des analyses plus fines devront être menées afin d'estimer la contribution des différents facteurs sur l'évolution du statut trophique de ce lac. L'utilisation de marqueurs représentatifs des paléotempératures, des paléoconcentrations en phosphore et des paléo-bioindicateurs (pollens, diatomées, œufs de rotifères, macro-restes) devront être intégrés dans un modèle mathématique adéquate. De plus, une caractérisation plus fine des communautés cyanobactériennes passées pourrait être entreprise. L'emploi de techniques telles que le séquençage haut débit du gène de l'ARNr 16S cyanobactérien permettrait d'élargir le travail à l'ensemble des communautés cyanobactériennes présentes depuis la formation du lac d'Aydat. Les informations ainsi obtenues permettraient de comprendre l'évolution de la diversité de l'ensemble des communautés cyanobactériennes présentes sur le lac et d'en rechercher les origines sur le long terme. Les outils moléculaires optimisés au cours de ces travaux, notamment l'utilisation de la nested PCR, ont permis de détecter les gènes cibles impliqués dans la biosynthèse de la microcystine et de l'anatoxine-a dans des sédiments âgés

de plus de 6700 ans. La récurrence de ces gènes à long terme ne pourra être expliquée qu'en caractérisant la diversité des génotypes toxiques et leur succession au cours du temps.

La prise en compte de l'intégrité des akinètes présents dans le sédiment du lac d'Aydat constitue un élément nouveau comparativement aux études existantes. Cette caractérisation a permis de mettre en évidence des différences de stratégies écologiques en fonction des espèces étudiées et des relations trophiques telles que le parasitisme des akinètes de *D. macrosporum* par le chytride *R. akinetum*. La caractérisation du potentiel de germination des akinètes a également montré l'exceptionnelle longévité des akinètes dans les sédiments, supérieure à 1800 ans soit dix fois plus ancienne que les données existantes actuellement dans la littérature. Ce travail de remise en culture des sédiments anciens a par ailleurs permis l'isolement de souches cyanobactériennes âgées de 3269 et de 4274 ans cal. BP. Ces souches seraient affiliées à des Oscillatoriales telles *Pseudophormidium* ou *Leptolybya* (Annexe 1). Les analyses génétiques préliminaires effectuées indiqueraient même une forte similitude avec des souches isolées de milieux extrêmes tels des sols de déserts Népalais ou des biofilms de rivières située en Antarctique. Des investigations plus poussées seront nécessaires afin de mieux comprendre cette diversité passée et aller au-delà de l'ordre des Nostocales. Les perspectives quant à l'isolement de ces souches sont nombreuses, tant au niveau de la caractérisation morphologique, génétique et écologique mais aussi de leur capacité de résistance dans les sédiments. Cependant, l'isolement de souches très anciennes n'en est qu'à ses prémises. L'objectif était dans un premier temps de tester la capacité de germination d'akinètes très anciens. Certains échantillons ayant répondu positivement, il s'agit maintenant d'améliorer la méthodologie afin d'optimiser les conditions de germination (conditions de température et lumière, milieu de culture...). La reviviscence et la culture de souches anciennes offrirait de multiples approches afin de comprendre comment les différentes espèces cyanobactériennes ont évolué pour s'adapter aux changements environnementaux sur le long terme (changements globaux mais aussi évolution du statut trophique) (i.e écologie de la résurrection (Kerfoot et al., 2004; Angeler, 2007)).

La caractérisation des akinètes intègres a également conduit à révéler le potentiel toxique de ces cellules de résistance. Ainsi, nous avons montré la récurrence du gène *anaC* depuis plus de 30 ans conjointement à celle de blooms de *D. macrosporum*. De plus, la recherche de ces gènes dans les akinètes intègres offre la possibilité d'estimer le pool d'akinètes potentiellement toxiques capables d'intervenir dans la mise en place des futures populations pélagiques. En effet, tous les akinètes considérés ici comme intègres (paroi et contenu

cellulaire intacts) dans le sédiment de surface sont susceptibles de germer et donc de contribuer au recrutement. Cependant, ce processus met en jeu différents mécanismes suivant la zone où ces cellules sont localisées. Les akinètes situés en zone littorale (i.e zone photique) seront susceptibles de germer directement à la surface des sédiments alors que ceux situés dans les zones profondes non éclairées seraient dépendants de leur remise en suspension dans la colonne d'eau. L'implication d'une multitude de facteurs (facteurs abiotiques, biotiques et caractéristiques de chaque espèce étudiée) intervenant dans la colonisation de la colonne d'eau et la formation de fleurs d'eau rend cependant impossible la prédiction des blooms uniquement à travers la considération de l'inoculum benthique. Une caractérisation plus fine de la relation entre inoculum benthique et recrutement avec un suivi spatio-temporel focalisé sur le printemps permettrait d'améliorer les connaissances sur cette phase du cycle de vie et de mieux caractériser les différentes stratégies écologiques mises en place par les espèces nostocaléennes.

Dans l'optique de valider l'utilisation des akinètes en tant que paléo-indicateurs d'autres systèmes et d'autres espèces devront faire l'objet d'études approfondies. De plus, la caractérisation long terme de nouveaux sites *via* l'étude des sédiments profonds permettrait d'avoir une réponse globale concernant les facteurs impliqués dans la régulation des proliférations cyanobactériennes et de leur diversité.

Depuis quelques années il existe une réelle recrudescence de l'intérêt d'étudier le compartiment benthique. Cependant, le sédiment révèle à l'heure actuelle qu'une infime partie des informations concernant les systèmes passés. Ainsi, je voudrais conclure ces travaux de thèse par deux citations, toutes deux tirées de l'antiquité, laissant libre cours à la réflexion de chacun :

« Le passé doit conseiller l'avenir. » Sénèque; Lettres à Lucilius, LXXXIII environ 64 après. J.-C.

« Quand vous délibérez, prenez dans le passé des exemples pour l'avenir : ce qui est déjà connu vous fera juger de ce que vous ne connaissez pas encore. » Isocrate; Discours de morale IVe siècle. avant. J.-C

---

# Références bibliographiques

---

## *Références bibliographiques*

## Références bibliographiques

- Adams, D.G., Duggan, P.S., 1999.** Tansley Review No. 107 Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytol.* 144, 3–33.
- Agrawal, S. C., & Singh, V., 2000.** Vegetative survival, akinete formation and germination in three blue-green algae and one green alga in relation to light intensity, temperature, heat shock and UV exposure. *Folia microbiologica*, 45(5), 439-446.
- Ahlgren, G., Lundstedt, L., Brett, M., Forsberg, C., 1990.** Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for cladoceran zooplankters. *J. Plankton Res.* 12, 809–818.
- Alexova, R., Fujii, M., Birch, D., Cheng, J., Waite, T.D., Ferrari, B.C., Neilan, B.A., 2011.** Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation 13, 1064–1077. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02412.x
- Aleya, L., 1987.** Dyanmique des Populations Phytoplantoniques du Lac D'aydat (Puy-De-Dôme, France): Biomasse et Activité métabolique de Diverses Fractions de Taille. Ph.D. Thesis, Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, Aubière, France.
- Alric, B., Jenny, J.P., Berthon, V., Arnaud, F., Pignol, C., Reyss, J.L., Sabatier, P., Perga, M.E., 2013.** Local forcings affect lake zooplankton vulnerability and response to climate warming. *Ecology* 94, 2767–2780. doi:10.1890/12-1903.1
- Amblard C. 1988.** Seasonal succession and strategies of phytoplankton development in two lakes of different trophic states. *J Plankton Res*10:1189–1208. <https://doi.org/10.1093/plankt/10.6.1189>.
- Angeler, D.G., 2007.** Resurrection ecology and global climate change research in freshwater ecosystems. *J. North Am. Benthol. Soc.* 26, 12–22. doi:10.1899/0887-3593(2007)26[12:REAGCC]2.0.CO;2
- Argueta, C., Yuksek, K., Patel, R., Summers, M.L., 2006.** Identification of *Nostoc punctiforme* akinete-expressed genes using differential display. *Mol. Microbiol.*61, 748–757.
- Babica, P., Blàha, L., Marsalek, B., 2006.** Review exploring the natural role of microcystins: a review of effects on photoautotrophic organisms. *J. Phycol.* 20, 9–20. doi:10.1111/j.1529-8817.2006.00176.x
- Baker, P., 1999.** Role of akinetes in the development of cyanobacterial populations in the lower Murray River, Australia. *Mar. frehwater Res.* 50, 265–79.
- Baker, P.D., Bellifemine, D., 2000.** Environmental influences on akinete germination of *Anabaena circinalis* and implications for management of cyanobacterial blooms. *Hydrobiologia* 427, 65–73. doi:10.1023/A:1003988426561



- Ballot, A., Fastner, J., Lentz, M., Wiedner, C., 2010a.** First report of anatoxin-a-producing cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* in Northeastern Germany. *Toxicon* 56, 964–971. doi:10.1016/j.toxicon.2010.06.021
- Ballot, A., Fastner, J., Wiedner, C., 2010b.** Paralytic shellfish poisoning toxin-producing cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in Northeast Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1173–1180. doi:10.1128/AEM.02285-09
- Ballot, A.; Pflugmacher, S.; Wiegand, C.; Kotut, K.; Krienitz, L., 2005.** Cyanobacterial toxins in Lake Baringo, Kenya. *Limnologica* 2003, 33, 2–9.
- Barbiero RP, Kann J. 1994.** The importance of benthic recruitment to the population development of *Aphanizomenon flos-aquae* and internal loading in a shallow lake. *J Plankton Res* 16:1581–1588. [https://doi.org/ 10.1093/plankt/16.11.1581](https://doi.org/10.1093/plankt/16.11.1581).
- Barica, J., 1975.** Summerkill risk in prairie ponds and possibilities of its prediction. *J. Fish. Res. Board Canada* 32, 1283–1288. doi:10.1139/f75-149
- Berkhout, R.J., Tieben, L.M., Smits, H.L., Bavinck, J.N., Vermeer, B.J., ter Schegget, J., 1995.** Nested PCR approach for detection and typing of *epidermodysplasia verruciformis*-associated human papillomavirus types in cutaneous cancers from renal transplant recipients. Nested PCR Approach for Detection and Typing of Epidermodysplasia Verruciformis-A. *J. Clin. Microbiol.* 33, 690–695.
- Bernard, C., 2005.** First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* 45, 919–928.
- Bernard, C., 2014.** Les cyanobactéries et leurs toxines. *RFL Rev. Francoph. des Lab.* 2014, 53–68. doi:10.1016/S1773-035X(14)72405-0.
- Bernard, C., Harvey, M., Briand, J.F., Bire', R., Krys, S., Fontaine, J.J., 2003.** Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: Evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environ. Toxicol.* 18, 176–186.
- Berthon, V., Alric, B., Rimet, F., Perga, M.-E., 2014.** Sensitivity and responses of diatoms to climate warming in lakes heavily influenced by humans. *Freshw. Biol.* 1–13. doi:10.1111/fwb.12380
- Bire, R., Duflos, G., Fessard, V., Mattei, C., Arncih, N., 2016.** Etat des connaissances concernant la contamination des poissons d'eau douce par les cyanotoxines. 2015-SA-0206, 2016, pp.1-262. <anses-01419666> 1–262.
- Blin, A., 2009.** L'historique et le présent des efflorescences de cyanobactéries au lac Brome (Québec) en relation avec les perturbations du bassin versant : Paléopigments, Akinètes et phytoplancton.

- Bonnett, P.J.P.; Appleby, P.G., 1991.** Deposition and transport of radionuclides within an upland drainage basin in mid-Wales. In *Environmental History and Palaeolimnology*; Springer: Dordrecht, The Netherlands,; pp. 71–76.
- Borrel, G., Lehours, A.-C., Crouzet, O., Jézéquel, D., Rockne, K., Kulczack, A., Duffaud, E., Joblin, K., Fonty, G., 2012.** Stratification of Archaea in the Deep Sediments of a Freshwater Meromictic Lake: Vertical Shift from Methanogenic to Uncultured Archaeal Lineages. *PLoS One* 7, 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0043346
- Bourelly P. 1966.** Les algues d'eau douce: les algues vertes. Editions N. Boubée & Cie, Paris, France.
- Brendonck, L., De Meester, L., 2003.** Egg banks in freshwater zooplankton: Evolutionary and ecological archives in the sediment. *Hydrobiologia* 491, 65–84. doi:10.1023/A:1024454905119
- Briand, E., Escoffier, N., Straub, C., Sabart, M., Quiblier, C., Humbert, J.-F., 2009.** Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a bloom-forming *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) population. *ISME J.* 3, 419–429. doi:10.1038/ismej.2008.121
- Briand, E., Gugger, M., Francois, J., Bernard, C., Humbert, Jean Francois Quiblier, C., 2008.** Temporal Variations in the Dynamics of Potentially Microcystin-Producing Strains in a Bloom-Forming *Planktothrix agardhii* (Cyanobacterium) Population □ † 74, 3839–3848. doi:10.1128/AEM.02343-07
- Briand, J.F., Jacquet, S., Bernard, C., Humbert, J.F., 2003.** Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vet. Res.* 34, 361–377.
- Briand, J.-F., Leboulanger, C., Humbert, J.-F., Bernard, C., Dufour, P., 2004.** *Cylindrospermopsis Raciborskii* (Cyanobacteria) Invasion At Mid-Latitudes: Selection, Wide Physiological Tolerance, Orglobalwarming?1. *J. Phycol.* 40, 231–238. doi:10.1111/j.1529-8817.2004.03118.x
- Brookes, J.D., Ganf, G.G., Green, D., Whittington, J., 1999.** The influence of light and nutrients on buoyancy, filament aggregation and flotation of *Anabaena circinalis*. *J. Plankton Res.* 21, 327–341.
- Burns, C.W., 1987.** Insights into zooplankton - cyanobacteria interactions derived from enclosure studies derived from enclosure studies. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 21, 477–482. doi:10.1080/00288330.1987.9516243
- Cadel-Six, S., Itean, I., Peyraud-Thomas, C., Mann, S., Ploux, O., Méjean, A., 2009.** Identification of a polyketide synthase coding sequence specific for anatoxin-a-producing *Oscillatoria* cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4909–4912.

- Cadel-Six, S., Peyraud-Thomas, C., Brient, L., De Marsac, N.T., Rippka, R., Méjean, A., 2007.** Different genotypes of anatoxin-producing cyanobacteria coexist in the Tarn River, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7605–7614. doi:10.1128/AEM.01225-07
- Canfield, D.E., 2005.** The early history of atmospheric oxygen: Homage to Robert M. Garrels. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 33, 1–36. doi:10.1146/annurev.earth.33.092203.122711
- Canter, B.Y.H.M., Heaney, S.I., Lund, J.W.G., 1990.** The ecological significance of grazing on planktonic populations of cyanobacteria by the ciliate *Nassula*. *New Phytol.* 114, 247–263.
- Canter, H. M., & Lund, J. W. G. 1951.** Fungal Parasites of the Phytoplankton. II:(Studies on British Chytrids. XII). *Annals of Botany*, 129-156.
- Capo E, Debroas D, Arnaud F, Domaizon I. 2015.** Is planktonic diversity well recorded in sedimentary DNA? Toward the reconstruction of past protistan diversity. *Microb Ecol* 70:865–875. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0627-2>.
- Capo, E., 2016.** Dynamique temporelle des communautés microbiennes eucaryotes en lien avec les forçages climatiques et anthropiques Approche paléolimnologique basée sur le séquençage massif d’ADN sédimentaire 1.
- Capo, E., Debroas, D., Arnaud, F., Domaizon, I., 2015.** Is Planktonic Diversity Well Recorded in Sedimentary DNA ? Toward the Reconstruction of Past Protistan Diversity 865–875. doi:10.1007/s00248-015-0627-2
- Capo, E., Debroas, D., Arnaud, F., Perga, M.-E., Chardon, C., Domaizon, I., 2017.** Tracking a century of changes in microbial eukaryotic diversity in lakes driven by nutrient enrichment and climate warming *Eric. Environ. Microbiol.* 0, 1–41. doi:10.1111/1462-2920.
- Cardemil, L.; Wolk, C.P., 1976.** The polysaccharides from heterocyst and spore envelopes of a blue-green alga. Methylation analysis and structure of the backbones. *J. Biol. Chem.*, 251, 2967–2975.
- Cardemil, L.; Wolk, C.P., **1979.** The polysaccharides from heterocyst and spore envelopes of a blue-green alga. Structure of the basic repeating unit. *J. Biol. Chem.*, 254, 736–741.
- Carmichael, W.W., 1992.** Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 445–459. doi:10.1111/j.1365-2672.1992.tb01858.x
- Carmichael, W.W., 1992.** Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 445–459.
- Carney, H.J., Sandgren, C.D., 1983.** Chrysophycean cysts: indicators of eutrophication in the recent sediments of Frains Lake, Michigan, U.S.A. *Hydrobiologia* 101, 195–202. doi:10.1007/BF00009875

- Carpenter, S.R., Caraco, N.F., Correll, D.L., Howarth, R.W., Sharpley, A.N., Smith, V.H., 1998.** Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecol. Appl.* 8, 559–568. doi:10.1890/1051-0761(1998)008[0559:NPOSWW]2.0.CO;2
- Cavalier-Smith, T., 2010.** Deep phylogeny, ancestral groups and the four ages of life. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 111–132. doi:10.1098/rstb.2009.0161
- Chauvat, F., Corre, B., Herdman, M., & Joset-Espardellier, F. 1982.** Energetic and metabolic requirements for the germination of akinetes of the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7524. *Archives of Microbiology*, 133(1), 44-49.
- Charles Kerfoot, W., Ma, X., Lorence, C.S., Weider, L.J., 2004.** Toward Resurrection Ecology: *Daphnia mendotae* and *D. retrocurva* in the Coastal Region of Lake Superior, among the First Successful Outside Invaders? *J. Great Lakes Res.* 30, 285–299. doi:10.1016/S0380-1330(04)70392-5
- Chen, J., Yan, T., Xu, J., He, S., Zhao, P., Yan, X., 2012.** Simultaneous determination of toxins in algae and water samples by high-performance liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 35, 1094–1101. doi:10.1002/jssc.201101069
- Chorus, I., Bartram, J., 1999.** Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. E & FN Spon, London/NewYork.
- Christiansen, G., Fastner, J., Erhard, M., Bo, T., Dittmann, E., 2003.** Microcystin Biosynthesis in *Planktothrix* : Genes , Evolution , and Manipulation. *J. Bacteriol.* 185, 564–572. doi:10.1128/JB.185.2.564
- Cirés S, Wörmer L, Agha R, Quesada A. 2013a.** Overwintering populations of *Anabaena*, *Aphanizomenon* and *Microcystis* as potential inocula for summer blooms. *J Plankton Res* 35:1254–1266. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbt081>.
- Cirés S, Wörmer L, Wiedner C, Quesada A. 2013b.** Temperature-dependent dispersal strategies of *Aphanizomenon ovalisporum* (Nostocales, Cyanobacteria): implications for the annual life cycle. *Microb Ecol* 65:12–21. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0109-8>.
- Codd, G.A., Bell, S.G., Kaya, K., Ward, C.J., Beattie, K.A., Metcalf, J.S., 1999.** Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *Eur. J. Phycol.* 34, 405–415.
- Dadheech, P.K., Krienitz, L., Kotut, K., Ballot, A., Casper, P., 2009.** Molecular detection of uncultured cyanobacteria and aminotransferase domains for cyanotoxin production in sediments of different Kenyan lakes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 340–350. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00678.x
- Dai, Z., Liu, J.T., 2013.** Impacts of large dams on downstream fluvial sedimentation : An example of the Three Gorges Dam ( TGD ) on the Changjiang ( Yangtze River ). *J. Hydrol.* 480, 10–18. doi:10.1016/j.jhydrol.2012.12.003

- Dall, W., & Moriarty, D. J. W. (1983).** Functional aspects of nutrition and digestion. The biology of Crustacea, 5, 215-261.
- Davis, P., Dent, M., Parker, J., Reynolds, C., Walsby, A., 2003.** The annual cycle of growth rate and biomass change in *Planktothrix spp.* in Blelham Tarn , English Lake District. Freshw. Biol. 48, 852–867.
- Davis, T.W., Berry, D.L., Boyer, G.L., Gobler, C.J., 2009.** The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. Harmful Algae 8, 715–725. doi:10.1016/j.hal.2009.02.004
- De Candolle, A.P., 1985.** Notice sur la matière qui a coloré le lac de Morat. Mém. Soc. Phys. Hist. Nat., 3, 129–146.
- Delvin, J., Edwards, O., Gorham, P., Hunter, N., Pike, R.K., Stavric, B., 1977.** Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena. flos-aquae* NRC-44h1. Can. J. Chem. 55, 1367–1371.
- Demott, W.R., Gulati, R., Van Donk, E., 2001.** Daphnia food limitation in three hypereutrophic Dutch lakes: Evidence for exclusion of large-bodied species by interfering filaments of cyanobacteria. Limnol. Oceanogr. 46, 2054–2060.
- DeMott, W.R., Zhang, Q.-X., Carmichael, W.W., 1991.** Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. Limnol. Oceanogr. 36, 1346–1357. doi:10.4319/lo.1991.36.7.1346
- Dittmann, E., Fewer, D.P., Neilan, B.A., 2013.** Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. FEMS 37, 23–43. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.12000.x
- Dittmann, E., Neilan, B.A., Erhard, M., Borner, T., 1997.** Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Mol. Microbiol. 26, 779–787.
- Dodds, W.K., Bouska, W.W., Eitzmann, J.L., Pilger, T.J., Pitts, K.L., Riley, A.J., Schloesser, J.T., Thornbrugh, D.J., 2009.** Eutrophication of U.S. Freshwaters: Analysis of Potential Economic Damages. Environ. Sci. Technol. 43, 12–19. doi:10.1021/es801217q
- Domaizon, I., Savichtcheva, O., Debros, D., Arnaud, F., Villar, C., Pignol, C., Alric, B., Perga, M.E., 2013.** DNA from lake sediments reveals the long-term dynamics and diversity of *Synechococcus* assemblages. Biogeosciences Discuss. 10, 2515–2564. doi:10.5194/bgd-10-2515-2013
- Domaizon, I., Winegardner, A., Capo, E., Gauthier, J., Gregory-Eaves, I., 2017.** DNA-based methods in paleolimnology: new opportunities for investigating long-term dynamics of lacustrine biodiversity. J. Paleolimnol. 58. doi:10.1007/s10933-017-9958-y

- Downing, T.G., Meyer, C., Gehringer, M.M., Venter, M. Van De, 2005.** Microcystin Content of *Microcystis aeruginosa* Is Modulated by Nitrogen Uptake Rate Relative to Specific Growth Rate or Carbon Fixation Rate 257–262. doi:10.1002/tox.20106
- Duarte, Canfield, 1992.** Patterns in phytoplankton community structure in Florida lakes. Limnol. Oceanogr. 283–288.
- Ducobu, H., Huisman, J., Jonker, R.R., Mur, L.R., 1998.** Competition between a prochlorophyte and a cyanobacterium under various phosphorus regimes: comparaison with the droop model. J. Phycol. 476, 467–476.
- Eilers JM, Kann J, Cornett J, Moser K, St Amand A. 2004.** Paleolimnological evidence of change in a shallow, hypereutrophic lake: Upper KlamathLake, Oregon, USA. Hydrobiologia 520:7–18. <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000027718.95901.ae>.
- Eriksson, J.E., Grönberg, L., Nygard, S., Slootte, J.P., Meriluoto, J. a. O., 1990.** Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR , a cyclic peptide toxin. Biochim. Biophys. Acta 1025, 60–66.
- Evans RD. 1994.** Empirical evidence of the importance of sediment resuspension in lakes. Hydrobiologia 284:5–12. <https://doi.org/10.1007/BF00005727>.
- Everson S, Fabbro L, Kinnear S, Wright P. 2011.** Extreme differences in akinete, heterocyte and cylindrospermopsin concentrations with depth in a successive bloom involving *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) and *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju. Harmful Algae 10:265–276. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2010.10.006>.
- Faassen, E.J., Harkema, L., Begeman, L., Lurling, M., 2012.** First report of ( homo ) anatoxin- a and dog neurotoxicosis after ingestion of benthic cyanobacteria in The Netherlands. Toxicon 60, 378–384. doi:10.1016/j.toxicon.2012.04.335
- Falconer, I.R., 2005.** Is there a Human Health Hazard from Microcystins in the Drinking Water Supply? Acta Hydrochim. znf Hydrobiol. 33, 64–71. doi:10.1002/ahch.200300551
- Fay P. 1988.** Viability of akinetes of the planktonic cyanobacterium *Anabaena circinalis*. Proc R Soc Lond B Biol Sci 234:283–301. <https://doi.org/10.1098/rspb.1988.0049>.
- Fay P, Van Baalen C., 1987.** Eds. The cyanobacteria. Elsevier, Amsterdam;534pp.
- Fewer, D.P., Rouhiainen, L., Jokela, J., Wahlsten, M., Laakso, K., Wang, H., Sivonen, K., 2007.** Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. BMC Evol. Biol. 11, 1–11. doi:10.1186/1471-2148-7-183
- Fox, D. L., Updegraff, D. M., & Novelli, G. D. (1944).** Carotenoid pigments in the ocean floor. Arch. Biochem., 5, 1-23.

- Gajewski, K., Bouchard, G., Wilson, S.E., Kurek, J., Cwynar, L.C., 2005.** Distribution of *Chironomidae* (Insecta: Diptera) head capsules in recent sediments of Canadian Arctic lakes. *Hydrobiologia* 549, 131–143. doi:10.1007/s10750-005-5444-z
- Gallois L, Glangeaud P. 1910.** Les régions volcaniques du Puy-de-Dôme. *Ann Geogr* 19:169–173. <https://doi.org/10.3406/geo.1910.7892>.
- Gan, N., Xiao, Y., Zhu, L., Wu, Z., Liu, J., Hu, C., Song, L., 2012.** The role of microcystins in maintaining colonies of bloom-forming *Microcystis spp.* *Environ. Microbiol.* 14, 730–742. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02624.x
- Geitler L. 1932.** Cyanophyceae. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, Germany.
- Gerphagnon, M. (2013).** Ecologie des chytrides parasites de la cyanobactérie *Anabaena macrospora* (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).
- Gerphagnon M, Colombet J, Latour D, Sime-Ngando T. 2017.** Spatial and temporal changes of parasitic chytrids of cyanobacteria. *Sci Rep* 7:6056. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06273-1>.
- Gerphagnon M, Macarthur DJ, Latour D, Gachon CMM, Van Ogtrop F, Gleason FH, Sime-Ngando T. 2015.** Microbial players involved in the decline of filamentous and colonial cyanobacterial blooms with a focus on fungal parasitism. *Environ Microbiol* 17:2573–2587. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12860>.
- Gerphagnon, M., Latour, D., Colombet, J., Sime-Ngando, T., 2013a.** Fungal parasitism: life cycle, dynamics and impact on cyanobacterial blooms. *PLoS One* 8, e60894. doi:10.1371/journal.pone.0060894
- Gerphagnon, M., Latour, D., Colombet, J., Sime-Ngando, T., 2013b.** A Double Staining Method Using SYTOX Green and Calcofluor White for Studying Fungal Parasites of Phytoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3943–3951. doi:10.1128/AEM.00696-13
- Gleason, F.H., Kagami, M., Lefevre, E., Sime-ngando, T., 2008.** The ecology of chytrids in aquatic ecosystems: roles in food web dynamics. *Fungal Biol. Rev.* 22, 17–25. doi:10.1016/j.fbr.2008.02.001
- Gobler, C.J., Davis, T.W., Coyne, K.J., Boyer, G.L., 2007.** Interactive influences of nutrient loading, zooplankton grazing, and microcystin synthetase gene expression on cyanobacterial bloom dynamics in a eutrophic New York lake. *Harmful Algae* 6, 119–133.
- Gorham, P., McLachlan, J., Hammer, U. T., & Kim, W. K. (1964).** Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (LYNGB.) DE BREB.
- Graham, J.L.; Loftin, K.A.; Meyer, M.T.; Ziegler, A.C., 2006.** Co-occurrence of Toxins and Taste-and-Odor Compounds in Cyanobacterial Blooms from the Midwestern United States. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7361–7368.

## Références bibliographiques

- Gugger, M., Sivonen, 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, 7271–7278.
- Gugger, M., Lenoir, S., Berger, C., Ledreux, A., Druart, J.C., Humbert, J.F., Guette, C., Bernard, C., 2005.** First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* 45, 919–928. doi:10.1016/j.toxicon.2005.02.031
- Guo, N., Xie, P., 2006.** Development of tolerance against toxic *Microcystis aeruginosa* in three cladocerans and the ecological implications. *Environ. Pollut.* 143, 513–518. doi:10.1016/j.envpol.2005.11.044
- Hadas, O., Pinkas, R., Delphine, E., Vardi, A., Kaplan, A., & Sukenik, A. 1999. Limnological and ecophysiological aspects of *Aphanizomenon ovalisporum* bloom in Lake Kinneret, Israel. *Journal of Plankton Research*, 21(8).
- Haller, L., Tonolla, M., Zopfi, J., Peduzzi, R., Wildi, W., Pot, J., 2011.** Composition of bacterial and archaeal communities in freshwater sediments with different contamination levels (Lake Geneva, Switzerland). *Water Res.* 45, 1213–1228.
- Hansen, J.; Ruedy, R.; Sato, M.; Lo, K., 2010.** Global surface temperature change. *Rev. Geophys.* 48, 1–29.
- Harada, K., Nagai, H., Kimura, Y., Suzuki, M., Park, H.-D., Watanabe, M.F., Luukkainen, R., Sivonen, K., Carmichael, W.W., 1993.** Liquid chromatography/mass spectrometric detection of anatoxin-a, a neurotoxin from cyanobacteria. *Tetrahedron* 49, 9251–9260. doi:10.1016/0040-4020(93)80011-H
- Hargreaves KR, Anderson NJ, Clokie MRJ. 2013.** Recovery of viable cyanophages from the sediments of a eutrophic lake at decadal time- scales. *FEMS Microbiol Ecol* 83:450–456. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12005>.
- Harland, F., Wood, S., Molchanova, E., Williamson, W., Gaw, S., 2013.** *Phormidium autumnale* Growth and Anatoxin-a Production under Iron and Copper Stress. *Toxicon* 5, 2504–2521. doi:10.3390/toxins5122504
- Head, R.M., Jones, R.I., Bailey-Watts, A.E., 1999.** An assessment of the influence of recruitment from the sediment on the development of planktonic populations of cyanobacteria in a temperate mesotrophic lake. *Freshw. Biol.* 41, 759–769. doi:10.1046/j.1365-2427.1999.00421.x
- Heath, M.W., Wood, S.A., Barbieri, R.F., Young, R.G., Ryan, K.G., 2014.** *Toxicon* Effects of nitrogen and phosphorus on anatoxin-a , dihydrohomoanatoxin-a production by *Phormidium autumnale*. *Toxicon* 92, 179–185. doi:10.1016/j.toxicon.2014.10.014
- Heisler, J., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., Anderson, D.M., Cochlan, W., Dennison, W.C., Dortch, Q., Gobler, C.J., Heil, C.a., Humphries, E., Lewitus, a., Magnien, R.,**



- Marshall, H.G., Sellner, K., Stockwell, D.a., Stoecker, D.K., Suddleson, M., 2008.** Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus. *Harmful Algae* 8, 3–13.
- Hense I, Beckmann A. 2006.** Towards a model of cyanobacteria life cycle: effects of growing and resting stages on bloom formation of N<sub>2</sub>-fixing species. *Ecol Model* 195:205–218. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.11.018>.
- Herdman, M., 1987.** Akinetes: structure and function. *Cyanobacteria*/editors, P. Fay and C. Van Baalen., Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1987; pp. 227–250.
- Herdman, M., 1988.** Cellular differentiation: Akinetes. *Methods in enzymology*, 167, 222-232.
- Herzschuh, U., Birks, H.J.B., Mischke, S., Zhang, C., Böhner, J., 2010.** A modern pollen-climate calibration set based on lake sediments from the tibetan plateau and its application to a late quaternary pollen record from the qilian mountains. *J. Biogeogr.* 37, 752–766. doi:10.1111/j.1365-2699.2009.02245.x
- 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. doi:10.1007/s00203-003-0605-9
- Hoffmann, L., Komárek, J., Kaštovský, J., 2005.** System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) – state in 2004. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.* 117, 95–115. doi:10.1127/1864-1318/2005/0117-0095
- Hoiczky, E., 2000.** Gliding motility in cyanobacteria : observations and possible explanations. *Arch Microbiol* 174, 11–17.
- Hori, K., Ishii, S., Ikeda, G., Okamoto, J., Tanji, Y., Weeraphasphong, C., Unno, H., 2002.** Behavior of filamentous cyanobacterium *Anabaena spp.* in water column and its cellular characteristics. *Biochem. Eng. J.* 10, 217–225.
- Hori, K., Ishii, S., Ikeda, G., Okamoto, J., Tanji, Y., Weeraphasphong, C., Unno, H., 2002.** Behavior of filamentous cyanobacterium *Anabaena spp.* in water column and its cellular characteristics. *Biochem. Eng. J.* 10, 217–225. doi:10.1016/S1369-703X(01)00185-1
- Hori, K., Okamoto, J., Tanji, Y., Unno, H., 2003.** Formation, sedimentation and germination properties of *Anabaena* akinetes. *Biochem. Eng. J.* 14, 67–73. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00136-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00136-5)
- Horst, G.P., Sarnelle, O., White, J.D., Hamilton, S.K., Kaul, R.B., Bressie, J.D., 2014.** ScienceDirect Nitrogen availability increases the toxin quota of a harmful cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Water Res.* 54, 188–198. doi:10.1016/j.watres.2014.01.063

- Howarth, R.W., Marino, R., Cole, J.J., 1988.** Nitrogen fixation in freshwater , estuarine , and marine ecosystems. 2. Biogeochemical controls. *Limnol. Oceanogr.* 33, 688–701.
- Huber AL. 1985.** Factors affecting the germination of akinetes of *Nodularia spumigena* (Cyanobacteriaceae). *Appl Environ Microbiol* 49:73–78.
- Huber, A.N.N.L., 1984.** *Nodularia* (Cyanobacteriaceae) Akinetes in the Sediments of the Peel-Harvey Estuary , Western Australia : Potential Inoculum Source for *Nodularia* Blooms 47, 234–238.
- Huber, A.N.N.L., 1985.** Factors Affecting the Germination of Akinetes of *Nodularia spumigena* (Cyanobacteriaceae) U )/ 49, 73–78.
- Huber, C.S., 1972.** The crystal structure and absolute configuration of 2,9-diacetyl-9-azabicyclo(4,2,1)non-2,3-ene. *Acta Crystallogr. Sect. B* 28, 2577–2582.
- Huisman, J., Matthijs, H.C.P., Visser, P.M., 2005.** Harmful Cyanobacteria, Springer. ed.
- Ibelings, B.W., Bruning, K., De Jonge, J., Wolfstein, K., Dionisio Pires, L.M., Postma, J., Burger, T., 2005.** Distribution of microcystins in a lake foodweb: No evidence for biomagnification. *Microb. Ecol.* 49, 487–500. doi:10.1007/s00248-004-0014-x
- Ibelings, B.W., Chorus, I., 2007.** Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: A review. *Environ. Pollut.* 150, 177–192. doi:10.1016/j.envpol.2007.04.012
- Ihle, T., Jähnichen, S., Benndorf, J., 2005.** Wax and wane of *Microcystis* (Cyanophyceae) and microcystins in lake sediments : a case study in Quitzdorf reservoir (Germany). *J. Phycol.* 488, 479–488. doi:10.1111/j.1529-8817.2005.00071.x
- Isvànovics, V., Présing, M., Juhos, S., 2000.** Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium , *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in through flow cultures. *Freshw. Biol.* 43, 257–275.
- Jackson, C.R., Harper, J.P., Willoughby, D., Roden, E.E., Churchill, P.F., 1997.** A simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4993–4995.
- 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.
- Jeppesen, E., Jensen, J.P., Amsinck, S., Landkildehus, F., Lauridsen, T., Mitchell, S.F., 2002.** Reconstructing the historical changes in *Daphnia* mean size and planktivorous fish abundance in lakes from the size of *Daphnia ephippia* in the sediment. *J. Paleolimnol.* 27, 133–143. doi:10.1023/A:1013561208488
- Jiang, Y., Song, G., Pan, Q., Yang, Y., Li, R., 2015.** Identification of genes for anatoxin-a biosynthesis in *Cuspidothrix issatschenkoi*. *Harmful Algae* 46, 43–48. doi:10.1016/j.hal.2015.05.005

- Jochimsem, E.L.M., Carmichael, W., Cardo D.M., Cookson, S.T., Holmes, C.E.M., Antunes, B.D.C., De Melo, D.A., Lyra, T.M., Spinelli, Barreto, S.A., William, R. Jarvis, A., 1998.** Liver Failure and Death After Exposure To Microcystins 873–878.
- Jöhnk, K.D., Huisman, J., Sharples, J., Sommeijer, B., Visser, P., Stroom, J.M., 2008.** Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Glob. Chang. Biol.* 14, 495–512. doi:10.1111/j.1365-2486.2007.01510.x
- Julius, M.L., Theriot, E.C., 2010.** The diatoms: a primer, in: *The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences*. pp. 8–22. doi:10.1017/CBO9780511763175.003
- Kâ, S., Mendoza-vera, J.M., Bouvy, M., Champalbert, G., Gom-ka, R.N., Pagano, M., 2012.** Can tropical freshwater zooplankton graze efficiently on cyanobacteria? *Hydrobiologia* 619, 119–138. doi:10.1007/s10750-011-0860-8
- Kaebnick, M., Neilan, B.A., 2001.** Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 1–9.
- Kaebnick, M., Neilan, B.A., Börner, T., Dittmann, E., 2000.** Light and the Transcriptional Response of the Microcystin Biosynthesis Gene Cluster Light and the Transcriptional Response of the Microcystin Biosynthesis Gene Cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3387–3392. doi:10.1128/AEM.66.8.3387-3392.2000.Updated
- Kagami, M., de Bruin, A., Ibelings, B.W., Von Donk, E., 2007.** Parasitic chytrids: their effects on phytoplankton communities and food-web dynamics. *Hydrobiologia* 578, 113–129. doi:10.1007/s10750-006-0438-z
- Kagami, M., Miki, T., Takimoto, G., 2014.** Mycoloop: chytrids in aquatic food webs. *Front. Microbiol.* 5, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2014.00166
- Kanoshina I, Lips U, Leppänen J. 2003.** The influence of weather conditions (temperature and wind) on cyanobacterial bloom development in the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Harmful Algae* 2:29–41.
- Kaplan-levy, R.N., Hadas, O., Summers, M.L., Rücker, J., Sukenik, A., 2010.** Akinetes: Dormant Cells of Cyanobacteria. *Dormancy Resist. harsh Environ.* Springer B, 5–27. doi:10.1007/978-3-642-12422-8
- Kardinaal, W.E.A., Tonk, L., Janse, I., Hol, S., Slot, P., Huisman, J., Visser, P.M., 2007.** Competition for Light between Toxic and Nontoxic Strains of the Harmful Cyanobacterium *Microcystis* *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2939–2946. doi:10.1128/AEM.02892-06
- Karlson AML, Nascimento FJA, Suikkanen S, Elmgren R. 2012.** Benthic fauna affects recruitment from sediments of the harmful cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Harmful Algae* 20:126–131. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.09.001>.

- Karlsson, I. 1999.** On the germination of the akinete-forming cyanobacterium *Gloeotrichia echinulata*, in Lake Erken, Sweden. *Algol. Stud.* 94:175–80.
- Karlsson-Elfgren, I., Brunberg, A.-K., 2004.** The Importance of Shallow Sediments in the Recruitment of *Anabaena* and *Aphanizomenon* (Cyanophyceae). *J. Phycol.* 40, 831–836. doi:10.1111/j.1529-8817.2004.04070.x
- Karlsson-Elfgren, I., Rengefors, K., Gustafsson, S., 2004.** Factors regulating recruitment from the sediment to the water column in the bloom-forming cyanobacterium *Gloeotrichia echinulata*. *Freshw. Biol.* 49, 265–273. doi:10.1111/j.1365-2427.2004.01182.x
- Kezhi, B., Guoliang, W., & Cheng, C. 1985.** Studies on the mechanism of light-dependent germination of akinetes of blue-green algae. *Hydrobiologia*, 123(1), 89-91.
- Pandey** The effect of light on growth and development of two nitrogen fixing blue-green algae. *Archiv für Mikrobiologie*, 74(1), 52-57.
- Kearns CM, Hairston NG, Kesler DH. 1996.** Particle transport by benthic invertebrates: its role in egg bank dynamics. *Hydrobiologia* 332:63–70. <https://doi.org/10.1007/BF00020780>.
- Kehr, J., Zilliges, Y., Disney, M.D., Ratner, D.D., Bouchier, C., Seeberger, P.H., Marsac, N.T. De, Dittmann, E., 2006.** A mannan binding lectin is involved in cell – cell attachment in a toxic strain of *Microcystis aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 59, 893–906. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.05001.x
- Kim, S.G., Joung, S.H., Ahn, C.Y., Ko, S.R., Boo, S.M., Oh, H.M., 2010.** Annual variation of *Microcystis* genotypes and their potential toxicity in water and sediment from a eutrophic reservoir. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 93–102. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00947.x
- Kim, B. H., Lee, W. S., Kim, Y. O., Lee, H. O., & Han, M. S. 2005.** Relationship between akinete germination and vegetative population of *Anabaena flos-aquae* (Nostocales, Cyanobacteria) in Seokchon reservoir (Seoul, Korea). *Archiv für Hydrobiologie*, 163(1), 49-64.
- Kirchner, G., 2011.** 210Pb as a tool for establishing sediment chronologies: Examples of potentials and limitations of conventional dating models. *J. Environ. Radioact.* 102, 490–494.
- Komárek, J., 2013.** Süßwasserflora von Mitteleuropa: Bd. 19/3. Cyanoprokaryota 3. Teil; Springer Spektrum: Berlin, Germany.
- Komárek, J., 2015.** Review of the cyanobacterial genera implying planktic species after recent taxonomic revisions according to polyphasic methods: state as of 2014. *Hydrobiologia* 259–270. doi:10.1007/s10750-015-2242-0

- Kovács, A.W., Tóth, V.R., Vörös, L., 2012.** Light-dependent germination and subsequent proliferation of N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria in a large shallow lake. *Ann. Limnol. - Int. J. Limnol.* 48, 177–185. doi:10.1051/limn/2012010
- Kozłowsky-Suzuki, B., Wilson, A.E., da Silva Ferrão-Filho, A., 2012.** Biomagnification or biodilution of microcystins in aquatic foodwebs? Meta-analyses of laboratory and field studies. *Harmful Algae* 18, 47–55. doi:10.1016/j.hal.2012.04.002
- Kravchuk ES, Ivanova EA, Gladyshev MI. 2011.** Spatial distribution of resting stages (akinetes) of the cyanobacteria *Anabaena flos-aquae* in sediments and its influence on pelagic populations. *Mar Freshw Res* 62:450–461. <https://doi.org/10.1071/MF10256>.
- Kravchuk, E.S., Anisimova, T. V, 2012.** Potential Effect of Macrophyte Beds on Number of Akinetes of Blue – Green Algae in Littoral of a Body of Water. *Contemp. Probl. Ecol.* 5, 430–433. doi:10.1134/S1995425512040087
- Kravchuk, E.S., Ivanova, E.A., 2009.** Spatial and Temporal Dynamics of *Anabaena flos-aquae* Akinetes in Bottom Sediments of a Small Siberian Reservoir 2, pp. 237–247.
- Kravchuk, E.S., Ivanova, E.A., Gladyshev, M.I., 2006.** Seasonal dynamics of akinetes of *Anabaena flos-aquae* in bottom sediments and water column of small Siberian reservoir. *Aquat. Ecol.* 40, 325–336. doi:10.1007/s10452-006-9031-9
- Kremp, A., Shull, D.H., Anderson, D.M., 2003.** Effects of deposit-feeder gut passage and fecal pellet encapsulation on germination of dinoflagellate resting cysts. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 263, 65–73.
- Kurmayer, R., Deng, L., Entfellner, E., 2016.** Role of toxic and bioactive secondary metabolites in colonization and bloom formation by filamentous cyanobacteria *Planktothrix*. *Harmful Algae* 54, 69–86. doi:10.1016/j.hal.2016.01.004
- Kutschera, U., Niklas, K.J., 2005.** Endosymbiosis, cell evolution, and speciation. *Theory Biosci.* 124, 1–24. doi:10.1016/j.thbio.2005.04.001
- Lacroix, G., Danger, M., 2008.** Écosystèmes lacustres : vers une intégration de l'hétérogénéité et de la la complexité. *Rev. des Sci. l'eau* 21.
- Lafforgue, M., 1990.** Modélisation du Fonctionnement D'un Écosystème Lacustre: Le Lac D'aydat. Ph.D. Thesis, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris, Paris, France.
- Lafforgue, M., Szeligewicz, W., Devaux, J., Poulin, M., 1995.** Selective mechanisms controlling algal succession in Aydat lake. *Water Sci. Technol.* 32, 117–127. doi:10.1016/0273-1223(95)00688-5.
- Lampert, W., 1987.** Laboratory studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 21, 483–490. doi:10.1080/00288330.1987.9516244
- Latifi, A., Ruiz, M., Zhang, C., 2009.** Oxidative stress in cyanobacteria 33, 258–278. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00134.x.

- Lau, E., Nash, C., Vogler, D., Cullings, K.W., 2005.** Molecular Diversity of Cyanobacteria Inhabiting Coniform Structures and Surrounding Mat in a Yellowstone Hot Spring. *Astrobiology* 5, 83–92.
- Lavrieux M, Disnar JR, Chapron E, Breheret JG, Jeremy J, Miras Y, Reyss JL, Andrieu-Ponel V, Arnaud F. 2013.** 6,700-year sedimentary record of climatic and anthropic signals in Lake Aydat (French Massif Central). *Holocene* 23:1317–1328. <https://doi.org/10.1177/0959683613484616>.
- Leavitt, P.R., Hodgson, D.A., 2001.** Sedimentary Pigments, in: *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments*. pp. 295–325.
- Ledreux, A., Thomazeau, S., Catherine, A., Duval, C., Yéprémian, C., Marie, A., Bernard, C., 2010.** Evidence for saxitoxins production by the cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in a French recreational water body. *Harmful Algae* 10, 88–97.
- Legrand, B., Lamarque, A., Sabart, M., Latour, D., 2016a.** Characterization of akinetes from cyanobacterial strains and lake sediment: A study of their resistance and toxic potential. *Harmful Algae* 59, 42–50. doi:10.1016/j.hal.2016.09.003
- Legrand, B., Lamarque, A., Sabart, M., Latour, D., 2017a.** Benthic archives reveal recurrence and dominance of toxigenic cyanobacteria in a eutrophic lake over the last 220 years. *Toxins* 2017, 9, 271; doi:10.3390/toxins9090271
- Legrand, B., Lesobre, J., Colombet, J., Latour, D., Sabart, M., 2016b.** Molecular tools to detect anatoxin-a genes in aquatic ecosystems: Toward a new nested PCR-based method. *Harmful Algae* 58, 16–22. doi:10.1016/j.hal.2016.07.002
- Legrand, B.; Le Jeune, A.H.; Colombet, J.; Thouvenot, A.; Latour, D., 2017b.** Are akinetes representative of past nostocalean blooms? A case study of their benthic spatio-temporal distribution and potential for germination in a eutrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 83:e01571-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01571-17>.
- Lehman, P., Boyer, G., Satchwell, M., Waller, S., 2008.** The influence of environmental conditions on the seasonal variation of *Microcystis* cell density and microcystins concentration in San Francisco Estuary. *Hydrobiologia* 600, 187–204. doi:10.1007/s10750-007-9231-x
- Lehman, P.W., Boyer, G., Hall, C., Waller, S., Gehrts, K., 2005.** Distribution and toxicity of a new colonial *Microcystis aeruginosa* bloom in the San Francisco Bay Estuary, California. *Hydrobiologia* 541, 87–99. doi:10.1007/s10750-004-4670-0
- Lei, L., Peng, L., Huang, X., Han, B.P., 2014.** Occurrence and dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* and dissolved cylindrospermopsin in urban reservoirs used for drinking water supply, South China. *Environ. Monit. Assess.* 1–12.
- Leitão, M., & Couté, A. (2005).** Guide pratique des cyanobactéries planctoniques du Grand Ouest de la France: manuel pour les prélèvements et la reconnaissance à l'usage des

## Références bibliographiques

- gestionnaires des eaux de surface: caractéristiques, échantillonnage, identification. Agence de l'eau Seine-Normandie.
- Lemaire, V., Brusciotti, S., van Gremberghe, I., Vyverman, W., Vanoverbeke, J., De Meester, L., 2012.** Genotype genotype interactions between the toxic cyanobacterium *Microcystis* and its grazer, the waterflea *Daphnia*. *Evol. Appl.* 5, 168–182.
- Lewis, W.M., Wurtsbaugh, W.A., Paerl, H.W., 2011.** Rationale for Control of Anthropogenic Nitrogen and Phosphorus to Reduce Eutrophication of Inland Waters. *Environ. Sci. Technol.* 45, 10300–10305.
- Li R, Watanabe M, Watanabe MM. 1997.** Akinete formation in planktonic *Anabaena spp.* (cyanobacteria) by treatment with low temperature. *JPhycol* 33:576–584. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1997.00576.x>.
- Litchman, E., Klausmeier, C., Schofield, O., Falkowski, P., 2007.** The Role of Functional Traits and Trade-Offs in Structuring Phytoplankton Communities: Scaling from Cellular to Ecosystem Level, pp. 1170–1181.
- Liu, L., Yang, J., Lv, H., Yu, Z., 2014.** Synchronous dynamics and correlations between bacteria and phytoplankton in a subtropical drinking water reservoir. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90, 126–138. doi:10.1111/1574-6941.12378
- Livingstone, D. 1984.** Preservation of algal remains in recent lake sediments. Lake sediments and environmental history: studies in palaeolimnology and palaeoecology in honour of Winifred Tutin/edited by EY Haworth and JWG Lund.
- Livingstone, D., Jaworski, G.H.M., 1980.** The viability of akinetes of blue-green algae recovered from the sediments of Rostherne Mere. *Br. Phycol. J.* 15, 357–364. doi:10.1080/00071618000650361.
- Luoto, T.P., Nevalainen, L., Kultti, S., Sarmaja-Korjonen, K., 2015.** Quantitative palaeotemperature estimates based on fossil chydorid ephippia: Calibration and validation of a novel method for northern lakes. *J. Quat. Sci.* 30, 736–742. doi:10.1002/jqs.2806
- Lyck, S., Gjolme, N., Utkilen, H., 1996.** Iron starvation increases toxicity of *Microcystis aeruginosa* CY A 228/1 (Chroococcales, Cyanophyceae). *Phy* 35, 120–124.
- Mackintoshl, C., Beattie, K., Klumpp, S., Cohen, P., Codd, 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.
- Mankiewicz-boczek, J., Malgorzata, T., Walter, Z., Zalewski, M., 2003.** Natural toxins from cyanobacteria FROM. *ACTA Biol. CRACOVENSIA* 45, 8–20.
- Mann, S., Cohen, M., Chapuis-Hugon, F., Pichon, V., Mazmouz, R., Me´jean, A., Ploux,O., 2012.** Synthesis, configuration assignment, and simultaneous quantification

by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, of dihydroa-natoxin-a and dihydrohomoanatoxin-a together with the parent toxins, in axenic cyanobacterial strains and in environmental samples. *Toxicon* 60, 1404–1414.

- Mantzouki, E.; Visser, P.M.; Bormans, M.; Ibelings, B.W., 2016.** Understanding the key ecological traits of cyanobacteria as a basis for their management and control in changing lakes. *Aquat. Ecol.* 50, 333–350.
- Martin-creuzburg, D., Elert, E. Von, Hoffmann, K.H., 2008.** Nutritional constraints at the cyanobacteria – *Daphnia magna* interface : The role of sterols 53, 456–468.
- Martinez De La Escalera, G., Antoniadis, D., Bonilla, S., Piccini, C., 2014.** Application of ancient DNA to the reconstruction of past microbial assemblages and for the detection of toxic cyanobacteria in subtropical freshwater ecosystems. *Mol. Ecol.* 23, 5791–5802.
- McFadden, G.I., 2001.** Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *J. Phycol.* 37, 951–959.
- Meeks, J.C., Campbell, E.L., Summers, M.L., Wong, F.C., 2002a.** Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Arch. Microbiol.* 178, 395–403. doi:10.1007/s00203-002-0476-5
- Meeks, J.C., Elhai, J., Meeks, J.C., Elhai, J., 2002b.** Regulation of Cellular Differentiation in Filamentous Cyanobacteria in Free-Living and Plant-Associated Symbiotic Growth States Regulation of Cellular Differentiation in Filamentous Cyanobacteria in Free-Living and Plant-Associated Symbiotic Growth States, 66. , pp. 94–121.
- Mehnert, G., Leunert, F., Cirés, S., Jöhnk, K.D., Rucker, 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, 1009–1021. doi:10.1093/plankt/fbq033
- Mehnert, G., Rucker, J., Wiedner, C., 2014.** Population dynamics and akinete formation of an invasive and a native cyanobacterium in temperate lakes. *J. Plankton Res.* 36, 378–387. doi:10.1093/plankt/fbt122
- Mejean, A., Mann, S., Maldiney, T., Vassiliadis, G., Lequin, O., Ploux, O., 2009.** Evidence that biosynthesis of the neurotoxic alkaloids anatoxin-a and homo-anatoxin-a in the cyanobacterium *Oscillatoria* PCC 6506 occurs on a modular polyketide synthase initiated by L-proline. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 7512–7513.
- Méjean, A., Paci, G., Gautier, V., Ploux, O., 2014.** Biosynthesis of anatoxin-a and analogues (anatoxins) in cyanobacteria. *Toxicon* 91, 1–8. doi:10.1016/j.toxicon.2014.07.016
- Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., Thomas, O., 2013.** State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environ. Int.* 59, 303–327. doi:10.1016/j.envint.2013.06.013



- Michelin, Y., 1996.** Les Jardins de Vulcain. Paysages D'hier, D'aujourd'hui et de Demain Dans la Chaîne Des Puys du Massif Central Français; de la Maison des Sciences de l'Homme: Paris, France.
- Millet, L., Arnaud, F., Heiri, O., Magny, M., Verneaux, V., Desmet, M., 2009.** Late-Holocene summer temperature reconstruction from chironomid assemblages of Lake Anterne, northern French Alps. *The Holocene* 19, 317–328. doi:10.1177/0959683608100576
- Miras, Y., Beauger, A., Berthon, V., Ledger, P.M., 2015.** Tracking long-term human impacts on landscape , vegetal biodiversity and water quality in the Lake Aydat catchment ( Auvergne , France ) using pollen , non-pollen palynomorphs and diatoms. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 424, 76–90. doi:10.1016/j.palaeo.2015.02.016
- Miskin, I., Rhodes, G., Lawlor, K., Saundred, J.R., Pickup, R.W., 1997.** Bacteria in post-glacial freshwater sediments 2427–2439.
- Misson, B., 2011.** Potentiel toxique et structure génétique de populations de *Microcystis* en lien avec les différentes phases de son cycle de vie. (Thèse, UBP).
- Misson, B., Donnadieu-bernard, F., Godon, J., Latour, D., 2011a.** Short and long-term dynamics of the toxic potential and genotypic structure in benthic populations of *Microcystis*. *Water Res.* 42, 1438–1446. doi:10.1016/j.watres.2011.11.011
- Misson, B., Sabart, M., Amblard, C., Latour, D., 2011b.** Involvement of microcystins and colony size in the benthic recruitment of the Cyanobacterium *Microcystis* (Cyanophyceae)1. *J. Phycol.* 47, 42–51.
- Misson, B., Sabart, M., Amblard, C., Latour, D., 2012.** Benthic survival of *Microcystis*: Long-term viability and ability to transcribe microcystin genes. *Harmful Algae* 13, 20–25. doi:10.1016/j.hal.2011.09.010
- Mitrovic, S.M., Allis, O., Furey, A., James, K.J., 2005.** Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chladophora fracta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 345–352. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.11.003
- Mitrovic, S.M., Oliver, R.L., Rees, C., Bowling, L.C., Buckney, R., 2003.** Critical flow velocities for the growth and dominance of *Anabaena circinalis* in some turbid freshwater rivers. *Freshw. Biol.* 48, 164–174.
- Monchamp, M., Walsler, J., Pomati, F., 2016.** Sedimentary DNA Reveals Cyanobacterial Community Diversity over 200 Years in Two Perialpine Lakes 82, 6472–6482. doi:10.1128/AEM.02174-16.Editor
- Monchamp, M.-E., Enache1, I., Turko1, P., Pomati1, F., Rîșnoveanu, G., Spaak, P., 2017.** Sedimentary and egg-bank DNA from 3 European lakes reveal concurrent

- changes in the composition and diversity of cyanobacterial and *Daphnia* communities. *Hydrobiologia* in press. doi:10.1007/s10750-017-3247-7
- Moore, D., Donohue, M.O., Garnett, C., Critchley, C., Shaw, G., 2005.** Factors affecting akinete differentiation in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria). *Freshw. Biol.* 50, 345–352. doi:10.1111/j.1365-2427.2004.01324.x
- Moore, D., Mcgregor, G.B., Shaw, G., 2004.** Morphological changes during akinetes germination in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) 1. *J. Phycol.* 40, 1098–1105. doi:10.1111/j.1529-8817.2004.04050.x
- Müller-Navarra, D., Brett, M., Liston, A., Goldman, C., 2000.** A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers. *Nature* 403, 4–7.
- Myers JH, Beardall J, Allinson G, Salzman S, Robertson S, Gunthorpe L., 2010.** Potential triggers of akinete differentiation in *Nodularia spumigena* (Cyanobacteriaceae) isolated from Australia. *Hydrobiologia* 671:165–180. <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0714-4>.
- Namikoshi, M., Murakami, T., Watanabe, M.F., Oda, T., Yamada, J., Tsujimura, S., Nagai, H., Oishi, S., 2003.** Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. *Toxicon* 42, 533–538.
- Neely-Fisher, D.L., White, W.B., Fisher, R.W., 1989.** Fructose-induced dark germination of *Anabaena* akinetes. *Curr. Microbiol.* 19, 139–142. doi:10.1007/BF01568931
- Neilan, B., Pearson, L., Muenchhoff, J., Moffitt, M., Dittmann, E., 2013.** Environmental conditions that influence toxin Cyanobacteria, biosynthesis in cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* 15, 1239–1253.
- Neilan, B.A., Saker, M.L., Fastner, J., Törökné, A., Burns, B., 2003.** Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Mol. Ecol.* 12, 133–140.
- Nevalainen, L., Lami, A., Luoto, T.P., Manca, M., 2014.** Fossil cladoceran record from Lake Píramide Inferiore (5067 m asl) in the Nepalese Himalayas: Biogeographical and paleoecological implications. *J. Limnol.* 73, 158–166. doi:10.4081/jlimnol.2014.864
- Nichols, J. M., & Adams, D. G., 1982.** Akinetes. *The biology of cyanobacteria*, 387-412. Blackwell: Oxford, UK, 1982; pp. 387–412.
- Nonneman, D., Zimba, P.V., 2002.** A PCR-based test to assess the potential for microcystin occurrence in channel catfish production ponds. *J. Phycol.* 38, 230–233.
- Nubel, U., Muyzer, G., Garcia-pichel, F., Muyzer, G., 1997.** PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria PCR Primers To Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. *Microbiology* 63, 3327–3332.

- Oliver, R.L., 1994.** Floating and sinking in gas-vacuole cyanobacteria. *J. Phycol.* 30, 161–173.
- Osswald, J., Rellán, S., Carvalho, A.P., Gago, A., Vasconcelos, V., 2007a.** Acute effects of an anatoxin-a producing cyanobacterium on juvenile fish-*Cyprinus carpio L.* *Toxicon* 49, 693–698. doi:10.1016/j.toxicon.2006.11.010
- Osswald, J., Rellán, S., Gago, A., Vasconcelos, V., 2007b.** Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria , anatoxin-a 33, 1070–1089. doi:10.1016/j.envint.2007.06.003
- Ou, D., Song, L., Gan, N., Chen, W., 2005.** Effects of Microcystins on and Toxin Degradation by *Poterioochromonas sp.* 373–380. doi:10.1002/tox.20114
- Padisák, J., 1997.** *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. FÜR Hydrobiol.* 107, 563–593.
- Padisák, J., 2003.** Estimation of minimum sedimentary inoculum (akinete) pool of *Cylindrospermopsis raciborskii*: A morphology and life-cycle based method. *Hydrobiologia* 502, 389–394. doi:10.1023/B:HYDR.0000004296.49074.0a
- Paerl, H.W., Hall, N.S., Calandrino, E.S., 2011.** Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Sci. Total Environ.* 409, 1739–1745. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.02.001
- Paerl, H.W., Otten, T.G., 2013.** Harmful Cyanobacterial Blooms : Causes, Consequences, and Controls. *Microb. Ecol.* 995–1010. doi:10.1007/s00248-012-0159-y
- Paerl, H.W., Paul, V.J., 2012.** Climate change : Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res.* 46, 1349–1363. doi:10.1016/j.watres.2011.08.002
- Pal, S., Pick, F.R., 2015.** Temporal trends in cyanobacteria revealed through DNA and pigment analyses of temperate lake sediment cores. *J. Paleolimnol.* 87–101. doi:10.1007/s10933-015-9839-1
- Pan, H., Song, L., Liu, Y., Borner, T., 2002.** Detection of hepatotoxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples. *Arch.Microbiol.* 178, 421–427.
- Park, H.; Kim, B.; Kim, E.; Okino, T., 1998.** Hepatotoxic Microcystins and Neurotoxic Anatoxin-a in Cyanobacterial Blooms from Korean Lakes. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13, 225–234.
- Park, H.; Watanabe, M.F.; Harada, K.; Nagai, H.; Suzuki, M., 1993.** Hepatotoxin (Microcystin) and Neurotoxin (Anatoxin-a) Contained in Natural Blooms and Strains of Cyanobacteria From Japanese Freshwaters. *Nat. Toxins.* 1, 353–360.

- Parvathi, A., Sanath Kumar, H., Kenchanna Prakasha, B., Lu, J., Xu, X., Hu, W., Feng, Z., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2007.** *Clonorchis sinensis*: development and evaluation of a nested polymerase chain reaction (PCR) assay. *Exp. Parasitol.* 115, 291–295. doi:10.1016/j.exppara.2006.09.010
- Pearson, L.A., Dittmann, E., Mazmouz, R., Ongley, S.E., Agostino, P.M.D., Neilan, B.A., 2016.** The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. *Harmful Algae* 54, 98–111. doi:10.1016/j.hal.2015.11.002
- Pearson, L.A., Hisbergues, M., Borner, T., Dittmann, E., Neilan, B.A., 2004.** Inactivation of an ABC Transporter Gene, *mcyH*, Results in Loss of Microcystin Production in the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6370–6378. doi:10.1128/AEM.70.11.6370
- Perez, R., Forchhammer, K., Salerno, G., Maldener, I., 2016.** Clear differences in metabolic and morphological adaptations of akinetes of two Nostocales living in different habitats. *Microbiology* 214–223. doi:10.1099/mic.0.000230
- Pettine, M., Patrolecco, L., Prina, M., Quatrin, B., Tartari, G., 2000.** Particle composition and sedimentation rates in two Italian subalpine lakes. *Annali di Chimica.* 90:307-322.
- Pirszel, J.; Adamczyk, A., (2014).** Relationship between cyanobacterial bloom composition and anatoxin-a and microcystin occurrence in the eutrophic dam reservoir (SE Poland). *Pol. J. Ecol.* 2004, 52, 479–490.
- Pollard, P.C., Young, L.M., 2010.** Lake viruses lyse cyanobacteria, *Cylindrospermopsis raciborskii*, enhances filamentous-host dispersal in Australia. *Acta Oecologica* 36, 114–119. doi:10.1016/j.actao.2009.10.007
- Pouria, S., De Andrade, a., Barbosa, J., Cavalcanti, R.L., Barreto, V.T.S., Ward, C.J., Preiser, W., Poon, G.K., Neild, G.H., Codd, G.a., 1998.** Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 352, 21–26.
- Pourriot R, Meybeck M. 1995.** *Limnologie générale.* Elsevier Masson, Paris, France.
- Poutanen, E., Nikkil, K., Environment, H., By, P., Academy, R.S., Doi, S., 2001.** Carotenoid Pigments as Tracers of Cyanobacterial Blooms in Recent and Post- glacial Sediments of the Baltic Sea 30, 179–183.
- Rabalais, N.N., Atilla, N., Normandeau, C., Turner, R.E., 2004.** Ecosystem history of Mississippi River-influenced continental shelf revealed through preserved phytoplankton pigments 49, 537–547. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.03.017
- Rabouille, S., Thébault, J., Salençon, M., 2003.** Simulation of carbon reserve dynamics in *Microcystis* and its influence on vertical migration with Yoyo model. *Biol. Model.* 326, 349–361. doi:10.1016/S1631-0691(03)00123-9

- Rai AK, Pandey GP. 1981.** Influence of environmental stress on the germination of *Anabaena vaginicola* akinetes. *Ann Bot* 48:361–370. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086134>.
- Rai, A.K., Pandey, G.P., 1981.** Influence of Environmental Stress on the Germination of *Anabaena vaginicola* Akinetes 361–370.
- Ramm, J., Lupu, A., Hadas, O., Ballot, A., Rücker, J., Wiedner, C., Sukenik, A., 2012.** A CARD-FISH protocol for the identification and enumeration of cyanobacterial akinetes in lake sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82, 23–36. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01401.x
- Ramm, J., Rücker, J., Knie, M., Nixdorf, B., 2017.** Lost in the dark : estimation of the akinete pool for the recruitment of Nostocales populations (cyanobacteria) in a temperate deep lake 0, 1–12. doi:10.1093/plankt/fbx010.
- Rantala, A., Fewer, D.P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Bo, T., Sivonen, K., 2004.** Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Pnas* 101, 568–573.
- Rantala-Ylinen, A., Kana, S., Wang, H., Rouhiainen, L., Wahlsten, M., Rizzi, E., Berg, K., Gugger, M., Sivonen, 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, 7271–7278.
- Rantala-Ylinen, A., Kana, S., Wang, H., Rouhiainen, L., Wahlsten, M., Rizzi, E., Berg, K., Gugger, M., Sivonen, 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, 7271–7278. doi:10.1128/AEM.06022-11
- Rapala, J., Sivonen, K., 1998.** Assessment of Environmental Conditions That Favor Hepatotoxic and Neurotoxic *Anabaena spp.* Strains Cultured under Light Limitation at Different Temperatures. *Microb. Ecol.* 36, 181–192.
- Rapala, J., Sivonen, K., Luukkainen, R., Niemela, S.I., 1993.** Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena*-strains - a laboratory study. *Appl. Phycol.* 5, 581–591. doi:10.1007/BF02184637
- Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C., Niemelä, S.I., 1997.** Variation of microcystins in *Anabaena spp.* as a function of growth stimuli. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2206–2212.
- Räsänen, J., Kauppi, T., Vuorio, K., 2006.** Sediment and phytoplankton records of the cyanobacterial genus *Anabaena jarvi* in boreal Lake Pyhä. *Hydrobiologia* 568, 455–465. doi:10.1007/s10750-006-0226-9

- Rasconi S, Niquil N, Sime-Ngando T. 2012.** Phytoplankton chytridiomycosis: community structure and infectivity of fungal parasites in aquatic ecosystems. *Environ Microbiol* 14:2151–2170. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02690.x>.
- Ravachol, D.O., Beorchia, F., 2011.** Principes structurants et construction de savoirs en sciences de la vie et de la Terre. *Éducation Didact.* 5, 7–28. doi:10.4000/educationdidactique.1016
- Reddy, P.M., 1983.** Effects of temperature pre-treatment , desiccation and aging on the viability of spores of halophilic blue-green algae. *Hydrobiologia* 106, 235–240.
- Reed, H.E., Martiny, J.B.H., 2012.** Microbial composition affects the functioning of estuarine sediments. *ISME J.* 7, 868–879. doi:10.1038/ismej.2012.154
- Rengefors, K., Gustafsson, S., 2004.** Factors regulating the recruitment of cyanobacterial and eukaryotic phytoplankton from littoral and profundal sediments 36, 213–226.
- Reynolds, C. S. (2006).** The ecology of phytoplankton. Cambridge University Press.
- Reynolds, C., 1981.** On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* Kutz. emend. Elenkin. *Philos. Trans. R. Soc. B* 293, 419–477.
- Reynolds, C.S., Rogers, D.A., 1976.** Seasonal variations in the vertical distribution and buoyancy of *Microcystis aeruginosa* Kutz emend. Elenkin in Rostherne Mere, England. *Hydrobiologia* 48, 17–23.
- Reyss, J.L.; Schmidt, S.; Legeleux, F.; Bonté, P. Large, 1995.** low background well-type detectors for measurements of environmental radioactivity. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrom. Detect. Assoc. Equip.* 357, 391–397.
- Rohrlack, T., Christiansen, G., Kurmayer, R., 2013.** Putative Antiparasite Defensive System Involving Ribosomal and Nonribosomal Oligopeptides in Cyanobacteria of the Genus. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2642–2647. doi:10.1128/AEM.03499-12
- Rohrlack, T., Dittmann, E., Bo, T., Christoffersen, K., 2001.** Effects of Cell-Bound Microcystins on Survival and Feeding of *Daphnia spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3523–3529. doi:10.1128/AEM.67.8.3523
- Rother JA, Fay P. 1977.** Sporulation and the development of planktonic blue-green algae in two Salopian meres. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 196:317–332. <https://doi.org/10.1098/rspb.1977.0043>.
- Rothfuss, F., Bender, M., Conrad, R., 1997.** Survival and Activity of Bacteria in a Deep , Aged Lake Sediment 69–77.
- Rouhiainen, L., Sivonen, K., Buikema, W.J., Haselkorn, R., 1995.** Characterization of toxin-producing cyanobacteria by using an oligonucleotide probe containing a tandemly repeated heptamer. *J. Bacteriol.* 177, 6021–6026.

- Rouhiainen, L., Vakkilainen, T., Siemer, B.L., Buikema, W., Haselkorn, R., Sivonen, K., 2004.** Genes Coding for Hepatotoxic Heptapeptides (Microcystins) in the Cyanobacterium *Anabaena* Strain 90. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 686–692. doi:10.1128/AEM.70.2.686
- Rücker, J., Tingwey, E.I., Wiedner, C., Anu, C.M., Nixdorf, B., 2009.** Impact of the inoculum size on the population of Nostocales cyanobacteria in a temperate lake. *J. Plankton Res.* 31, 1151–1159. doi:10.1093/plankt/fbp067
- Rühland, K.M., Paterson, A.M., Smol, J.P., 2015.** Lake diatom responses to warming: reviewing the evidence. *J. Paleolimnol.* 54. doi:10.1007/s10933-015-9837-3
- Ruiz, M., Galanti, L., Ruibal, A.L., Rodriguez, M.I., Wunderlin, D.A., Am, M.V., 2013.** First report of microcystins and anatoxin-a co-occurrence in San Roque reservoir (Cordoba, Argentina). *Water. Air. Soil Pollut.* 224 , <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-013-1593-2>.
- Rull, V., Lara, A., Rubio-Inglés, M.J., Giralt, S., Gonçalves, V., Raposeiro, P., Hernández, A., Sánchez-López, G., Vázquez-Loureiro, D., Bao, R., Masqué, P., Sáez, A., 2017.** Vegetation and landscape dynamics under natural and anthropogenic forcing on the Azores Islands: A 700-year pollen record from the São Miguel Island. *Quat. Sci. Rev.* 159, 155–168. doi:10.1016/j.quascirev.2017.01.021
- Sabart, M., Crenn, K., Perrière, F., Abila, A., Lereboure, M., Colombet, J., Jousse, C., Latour, D., 2015.** Co-occurrence of microcystin and anatoxin-a in the freshwater lake Aydat (France): Analytical and molecular approaches during a three-year survey. *Harmful Algae* 48, 12–20. doi:10.1016/j.hal.2015.06.007
- Sabart, M., Pobel, D., Briand, E., Combourieu, B., Salençon, M.J., Humbert, J.F., Latour, D., 2010.** Spatiotemporal variations in microcystin concentrations and in the proportions of microcystin-producing cells in several *Microcystis aeruginosa* populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4750–9. doi:10.1128/AEM.02531-09
- Sanchez, J.A., Otero, P., Alfonso, A., Ramos, V., Vasconcelos, V., Aráoz, R., Molgó, J., Vieytes, M.R., Botana, L.M., 2014.** Detection of Anatoxin-a and Three Analogs in *Anabaena* spp. Cultures: New Fluorescence Polarization Assay and Toxin Profile by LC-MS/MS. *Toxins (Basel)*. 6, 402–415. doi:10.3390/toxins6020402
- Sarazin G, Michard G, Al Gharib I, Bernat M. 1992.** Sedimentation rate and early diagenesis of particulate organic nitrogen and carbon in Lake Aydat (Puy-de-Dôme, France). *Chem Geol* 98:307–316. [https://doi.org/10.1016/0009-2541\(92\)90191-7](https://doi.org/10.1016/0009-2541(92)90191-7).
- Sarma, T., 2012.** Handbook of cyanobacteria.
- Sarmiento, J.L., Slater, R., Barber, R., Bopp, L., Doney, S.C., Hirst, A.C., Kleypas, J., Matear, R., Mikolajewicz, U., Monfray, P., Soldatov, V., Spall, S.A., Stouffer, R.,**

2004. Response of ocean ecosystems to climate warming 18. doi:10.1029/2003GB002134
- Savichtcheva, O., Debroas, D., Perga, M.E., Arnaud, F., Villar, C., Lyautey, E., Kirkham, A., Chardon, C., Alric, B., Domaizon, I., 2015.** Effects of nutrients and warming on *Planktothrix* dynamics and diversity: a palaeolimnological view based on sedimentary DNA and RNA. *Freshw. Biol.* 60, 31–49. doi:10.1111/fwb.12465
- Schatz, D., Keren, Y., Vardi, A., Sukenik, A., Carmeli, S., Börner, T., Dittmann, E., Kaplan, A., 2007.** Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environ. Int.* 9, 965–970. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01218.x
- Schindler, D.W., Kling, H., Schmidt, R. V., Prokopowich, J., Frost, V.E., Reid, R.A., Capel, M., 1973.** Eutrophication of Lake 227 by Addition of Phosphate and Nitrate: the Second, Third, and Fourth Years of Enrichment 1970, 1971, and 1972. *J. Fish. Board Canada* 30, 1415–1440.
- Schopf, J. W. (1996).** Cyanobacteria: pioneers of the early Earth. *NOVA HEDWIGIA BEIHEFT*, 112, 13-32.
- Schopf, J.W.** Cyanobacteria: Pioneers of the early Earth. *Nova Hedwig. Beih.* 1996, 112, 13–32.
- Sedmak, B., Elersek, T., 2006.** Microcystins Induce Morphological and Physiological Changes in Selected Representative Phytoplanktons. *Microb. Ecol.* 51, 508–515. doi:10.1007/s00248-006-9045-9
- Sedmak, B., Kosi, G., 1998.** The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation. *J. Plankton Res.* 20, 691–708.
- Seppä, H., Birks, H.J.B., Odland, A., Poska, A., Veski, S., 2004.** A modern pollen-climate calibration set from northern Europe: Developing and testing a tool for palaeoclimatological reconstructions. *J. Biogeogr.* 31, 251–267. doi:10.1111/j.1365-2699.2004.00923.x
- Shams, S., Capelli, C., Cerasino, L., Ballot, A., Dietrich, D.R., Sivonen, K., Salmaso, N., 2015.** Anatoxin-a producing *Tychonema* (cyanobacteria) in European water-bodies. *Water Res.* 69, 68–79.
- Shaw, G.R., Sukenik, A., Livne, A., Chiswell, R.K., Smith, M.J., Seawright, A.A., Norris, R.L., Eaglesham, G.K., Moore, M.R., 1999.** Blooms of the cylindrospermopsin containing cyanobacterium, *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti), in newly constructed lakes, Queensland, Australia. *Environ. Toxicol.* 14, 167–177.
- Shih, P.M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S.D., Fewer, D.P., Talla, E., Calteau, A., Cai, F., Tandeau de Marsac, N., Rippka, R., Herdman, M., Sivonen, K., Coursin, T., Laurent, T., Goodwin, L., Nolan, M., Davenport, K.W., Han, C.S., Rubin, E.M.,**



- Eisen, J.A., Woyke, T., Gugger, M., Kerfeld, C.A., 2013.** Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 1053–1058. doi:10.1073/pnas.1217107110
- Sili C, Ena A, Materassi R, Vincenzini M. 1994.** Germination of desiccated aged akinetes of alkaliphilic cyanobacteria. *Arch Microbiol* 162:20–25. <https://doi.org/10.1007/BF00264368>.
- Singh, D.P., Tyagi, M.B., Kumar, A., Thakur, J.K., Kumar, A., 2001.** Antialgal activity of a hepatotoxin-producing cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *World J. of Microbiol. Biotechnol.*
- Sivonen, K., 2009.** Cyanobacterial Toxins, in: *Encyclopedia of Microbiology*. pp. 290–307.
- Sivonen, K., Himberg, K., Luukkainen, R., Niemela, S.I., Poon, G.K., Codd, G.A., 1989.** Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacteria blooms and strains from Finland. *Toxic. Assess.* 4, 339–352. doi:10.1002/tox.2540040310
- Sivonen, K., Jones, J., 1999.** Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management, Retrieved March. doi:10.1046/j.1365-2427.2003.01107.x
- Smol JP (2010).** The power of the past: using sediments to track the effects of multiple stressors on lake ecosystems. *FreshwBiol* 55(Suppl. 1):43–59
- Smol, J. P. 1988.** Paleoclimate proxy data from freshwater arctic diatoms. *Verh. Int. Ver. Limnol*, 23, 837-844.
- Smol, J.P., 2014.** Lakes and Climate Change - a Paleoeological Perspective, in: *Gkobal Environmental Change*. pp. 231–241. doi:10.1007/978-94-007-5784-4
- Sommer, U., Adrian, R., Domis, L.D.S., Elser, J.J., Gaedke, U., Ibelings, B., Jeppesen, E., Molinero, J.C., Mooij, W.M., Donk, E. Van, Winder, M., 2012.** Beyond the Plankton Ecology Group (PEG) Model: Mechanisms Driving Plankton Succession. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 43, 429–448. doi:10.1146/annurev-ecolsys-110411-160251
- Sommer, U., Gliwicz, M., Lampert, W., Duncan, A., 1986.** The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Arch. fur Hydrobiol.* 106, 533–471.
- Stahl-Delbanco, A., Hansson, L.-A., 2002.** Effects of bioturbation on recruitment of algal cells from the “ seed bank ” of lake sediments. *Limnol. Oceanogr.* 47, 1836–1843.
- Suikkanen, S., Kaartokallio, H., Hällfors, S., Huttunen, M., Laamanen, M., 2010.** Life cycle strategies of bloom-forming, filamentous cyanobacteria in the Baltic Sea. *Deep. Resarch II* 57, 199–209.

- Sukenik, A., Hadas, O., Kaplan, A., Quesada, A., 2012a.** Invasion of Nostocales (cyanobacteria) to subtropical and temperate freshwater lakes: physiological, regional, and global driving forces. *Front. Microbiol.* 3, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2012.00086
- Sukenik, A., Kaplan-Levy, R.N., Viner-Mozzini, Y., Quesada, A., Hadas, O., 2013.** Potassium deficiency triggers the development of dormant cells (akinetes) in *Aphanizomenon ovalisporum* (Nostocales, Cyanoprokaryota). *J. Phycol.* 49, 580–587. doi:10.1111/jpy.12069
- Sukenik, A., Kaplan-Levy, R.N., Welch, J.M., Post, A.F., 2012b.** Massive multiplication of genome and ribosomes in dormant cells (akinetes) of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria). *ISME J.* 6, 670–679. doi:10.1038/ismej.2011.128
- Sukenik, A., Maldener, I., Delhaye, T., 2015.** Carbon assimilation and accumulation of cyanophycin during the development of dormant cells (akinetes) in the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. Carbon assimilation and accumulation of cyanophycin during the development of dormant cells (akinetes) 6, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2015.01067
- Šulčius, S., Šimoliunas, E., Staniulis, J., Koreivienė, J., Baltrušis, P., Mėškys, R., Paškauskas, R., 2015.** Characterization of a lytic cyanophage that infects the bloom-forming cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, 1–7. doi:10.1093/femsec/fiu012
- Sutherland JM, Herdman M, Stewart WDP. 1979.** Akinetes of the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7524: macromolecular composition, structure and control of differentiation. *J Gen Microbiol* 115:273–287. <https://doi.org/10.1099/00221287-115-2-273>.
- Suttle, C.A. (2000).** Ecological, evolutionary, and geochemical consequences of viral infection of Cyanobacteria and eukaryotic algae. In *Viral Ecology*. Hurst, C. (ed.). San Diego: Academic Press, pp. 247–296.
- Takano, K., Ishikawa, Y., Mikami, H., Igarashi, S., Hino, A.S., Yoshioka, A.T., 2008.** Fungal infection for cyanobacterium *Anabaena smithii* by two chytrids in eutrophic region of large reservoir. *Limnology* 9, 213–218. doi:10.1007/s10201-008-0247-3
- Thiel, T., Wolk, C.P., 1983.** Metabolic activities of isolated akinetes of the cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme*. *J. Bacteriol.* 156, 369–374.
- Thompson, P.A., Jameson, I., Blackburn, S.I., 2009.** The influence of light quality on akinete formation and germination in the toxic cyanobacterium *Anabaena circinalis* 8, 504–512. doi:10.1016/j.hal.2008.10.004
- Tippett, R., 1964.** An investigation into the nature of the layering of deep-water sediments in two eastern Ontario lakes. *Can. J. Bot.* 42, 1693–1709.
- Tonkov, S., & Possnert, G. (2016).** A new late Holocene pollen diagram from Vitosha mountain. Vegetation history and anthropogenic impact. *Comptes Rendus de*

- l'Académie Bulgare des Sciences/Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences, 69(3), 327-336.
- Tsujimura S, Okubo T. 2003.** Development of *Anabaena blooms* in a small reservoir with dense sediment akinete population, with special reference to temperature and irradiance. *J Plankton Res* 25:1059–1067. <https://doi.org/10.1093/plankt/25.9.1059>.
- Tsujimura, S., Tsukada, H., Nakahara, H., Nakajima, T., Nishino, M., 2000.** Seasonal variations of *Microcystis* populations in sediments of Lake Biwa, Japan. *Hydrobiologia* 183–192.
- Turner, C.R., Uy, K.L., Everhart, R.C., 2015.** Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biol. Conserv.* 183, 93–102. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.017
- Utermöhl H. 1958.** Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Int Ver Theor Angew Limnol* 9:1–38.
- Van de Waal, D.B., Verspagen, J.M., Lurling, M., Van Donk, E., Visser, P., Huisman, P., 2009.** The ecological stoichiometry of toxins produced by harmful cyanobacteria: an experimental test of the carbon-nutrient balance hypothesis. *Ecol. Lett.* 12, 1326–1335. doi:10.1111/j.1461-0248.2009.01383.x
- Van Dok W, Hart BT. 1997.** Akinete germination in *Anabaena circinalis* (cyanophyta). *J Phycol* 33:12–17. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1997.00012.x>.
- Van Geel B, Mur LR, Ralska-Jasiewiczowa M, Goslar T. 1994.** Fossil akinetes of *Aphanizomenon* and *Anabaena* as indicators for medieval phosphate-eutrophication of Lake Gosciadz (Central Poland). *Rev Palaeobot Palynol* 83:97–105. [https://doi.org/10.1016/0034-6667\(94\)90061-2](https://doi.org/10.1016/0034-6667(94)90061-2).
- VanLandingham, S.L., 2009.** Use of diatom biostratigraphy in determining a minimum (Sangamonian = 80,000-ca. 220,000 yr. BP) and a maximum (Illinoian = ca. 220,000-430,000 yr. BP) age for the Hueyatlaco artifacts, Puebla, Mexico 135, 15–36.
- Verspagen JMH, Snelder EOFM, Visser PM, Jöhnk KD, Ibelings BW, MurLR, Huisman J. 2005.** Benthic-pelagic coupling in the population dynamics of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. *Freshw Biol* 50:854–867. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01368.x>.
- Verspagen, J.M.H., Snelder, E.O.F.M., Visser, P.M., Huisman, J., Mur, L.R., Ibelings, B.W., 2004.** Recruitment of Benthic *Microcystis* (Cyanophyceae) To the Water Column: Internal Buoyancy Changes or Resuspension? *J. Phycol.* 40, 260–270. doi:10.1111/j.1529-8817.2004.03174.x
- Vezie, C., Rapala, J., Vaitomaa, J., Seitsonen, J., Sivonen, K., 2002.** Effect of Nitrogen and Phosphorus on Growth of Toxic and Nontoxic *Microcystis* Strains and on Intracellular

*Références bibliographiques*

- Microcystin Concentrations. *Microb. Ecol.* 43, 443–454. doi:10.1007/s00248-001-0041-9
- Vigues, B., Blanchard, M., Bouchard, P., 1999.** Centrin-Like Filaments in the Cytopharyngeal Apparatus of the *Ciliates Nassula* and *Furgasonia*: Evidence for a Relationship With Microtubular Structures. *Cytoskeleton* 81, 72–81.
- Viitasalo, M., Katajisto, T., 1994.** Mesozooplankton resting eggs in the Baltic Sea: identification and vertical distribution in laminated and mixed sediments. *Mar. Biol.* 120, 455–466. doi:10.1007/BF00680221.
- Vissers, E.W., Bodelier, P.L.E., Muyzer, G., Laanbroek, H.J., 2009.** A nested PCR approach for improved recovery of archaeal 16S rRNA gene fragments from freshwater samples. *FEMS Microbiol. Lett.* 298, 193–198.
- Visser, P. M., Ibelings, B. W. and Mur, L. R. (1995).** Autumnal sedimentation of *Microcystis spp.* as result of an increase in carbohydrate ballast at reduced temperature. *Journal of Plankton Research* 17:919-933
- W. W. CARMICHAEL and P. R. GORHAM.** *J. Phycol.* 10,238 (1974).
- Waal, D.B. Van De, Verspagen, J.M.H., Finke, J.F., Vournazou, V., Immers, A.K., Kardinaal, W.E.A., Tonk, L., Becker, S., Van Donk, E., Visser, P.M., Huisman, J., 2011.** Reversal in competitive dominance of a toxic versus non-toxic cyanobacterium in response to rising CO<sub>2</sub>. *ISME J.* 5, 1438–1450. doi:10.1038/ismej.2011.28
- Walsby, A.E., 1994.** Gas Vesicles. *Microbiol. Rev.* 58, 94–144.
- Wang, S., Zhu, L., Li, Q., Li, G., Li, L., Song, L., Gan, N., 2015.** Distribution and population dynamics of potential anatoxin-a-producing cyanobacteria in Lake Dianchi, China. *Harmful Algae* 48, 63–68.
- Wang, L., Li, J., Lu, H., Gu, Z., Rioual, P., Hao, Q., Mackay, A.W., Jiang, W., Cai, B., Xu, B., Han, J., Chu, G., 2012.** The East Asian winter monsoon over the last 15,000 years: Its links to high-latitudes and tropical climate systems and complex correlation to the summer monsoon. *Quat. Sci. Rev.* 32, 131–142. doi:10.1016/j.quascirev.2011.11.003
- Wang, S., Zhu, L., Li, Q., Li, G., Li, L., Song, L., Gan, N., 2015.** Distribution and population dynamics of potential anatoxin-a-producing cyanobacteria in Lake Dianchi, China. *Harmful Algae* 48, 63–68. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2015.07.005
- Ward, J-V., 1989.** The four-dimensional nature of lotic ecosystems. *J-N. Am. Benthol. Soc.* 8(1):2-8.
- Warton DI, Wright IJ, Falster DS, Westoby M. 2006.** Bivariate line-fitting methods for allometry. *Biol Rev* 81:259–291. <https://doi.org/10.1017/S1464793106007007>.

- Waters, M.N., 2016.** A 4700-Year History of Cyanobacteria Toxin Production in a Shallow Subtropical Lake. *Ecosystems* 19, 426–436. doi:10.1007/s10021-015-9943-0
- Welker, M., Von Dören, H., 2006.** Cyanobacterial peptides Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS* 30, 530–563. doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00022.x
- Wiedner, C., Rücker, J., Brüggemann, R., & Nixdorf, B. (2007).** Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. *Oecologia*, 152(3), 473-484.
- Williamson, J.L., Rocke, T.E., Aiken, J.M., 1999.** *In situ* detection of the *Clostridium botulinum* type C1 toxin gene in wetland sediments with a nested PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3240–3243.
- Wilson, A.E., Sarnelle, O., Tillmanns, A.R., 2006.** Effects of cyanobacterial toxicity and morphology on the population growth of freshwater zooplankton: Meta-analyses of laboratory experiments. *Limnol. Oceanogr.* 51, 1915–1924.
- Wolk CP, Ernst A & Elhai J (2004).** Heterocyst Metabolism and Development. *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, Vol. 1 (Bryant D), p. 769-823. Springer Netherlands.
- Wonnacott, S., Jackman, S., Swanson, L., Rapoport, H., Albuquerque, E., 1991.** Nicotinic Pharmacology of Anatoxin Analogs. Relationships at Neuronal Nicotinic Ligand Binding Sites I II. Side Chain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259, 387–391.
- Wonnacott, S., Swanson, K.L., Albuquerque, E., Huby, N.J., Thompson, P., Gallagher, T., 1992.** HOMOANATOXIN: A potent analogue of Anatoxin-a. *Biochem. Pharmacol.* 43, 419–423.
- Wood SA, Jentsch K, Rueckert A, Hamilton DP, Cary SC. 2009.** Hindcasting cyanobacterial communities in Lake Okaro with germination experiments and genetic analyses. *FEMS Microbiol Ecol* 67:252–260. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00630.x>.
- Wood, S. a., Selwood, A.I., Rueckert, A., Holland, P.T., Milne, J.R., Smith, K.F., Smits, B., Watts, L.F., Cary, C.S., 2007.** First report of homoanatoxin-a and associated dog neurotoxicosis in New Zealand. *Toxicon* 50, 292–301. doi:10.1016/j.toxicon.2007.03.025
- Wood, S.A., Atalah, J., Wagenhoff, A., Brown, L., Doehring, K., Young, R.G., Hawes, I., 2017.** Effect of river flow , temperature , and water chemistry on proliferations of the benthic anatoxin-producing cyanobacterium *Phormidium*. *Freshw. Sci.* 36. doi:10.1086/690114.
- Wood, S.a., Smith, F.M.J., Heath, M.W., Palfroy, T., Gaw, S., Young, R.G., Ryan, K.G., 2012.** Within-mat variability in anatoxin-a and homoanatoxin-a production among benthic *Phormidium* (cyanobacteria) strains. *Toxins* 4, 900–912.

- Xu, H., Paerl, H.W., Qin, B., Zhu, G., Gao, G., 2010.** Nitrogen and phosphorus inputs control phytoplankton growth in eutrophic Lake. *Limnology* 55, 420–432.
- Yadav, S., Sinha, R.P., Tyagi, M.B., Yadav, S., Kumar, A., 2011.** Cyanobacterial secondary metabolites. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 2, 144–167.
- Yamamoto Y. 1976.** Effect of some physical and chemical factors on the germination of akinetes of *Anabaena cylindrica*. *J Gen Appl Microbiol* 22:311–323. <https://doi.org/10.2323/jgam.22.311>.
- Yamamoto, Y., 2010.** Contribution of bioturbation by the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* to the recruitment of bloom-forming cyanobacteria from sediment. *J. Limnol.* 69, 102–111. doi:10.3274/JL10-69-1-09
- Yamamoto, Y., Niizuma, S., Kuroda, N., and Sakamoto, M.(1993).** Occurrence of heterotrophic bacteria causing lysis of cyanobacteria in a eutrophic lake. *Jpn J Phycol* 41:215–220.
- Yamamoto, Y., Suzuki, K., 1977.** Ultrastructural Studies on lysis of Blue-green Algae by a Bacterium. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 295, 285–295.
- Yéprémian, C., Gugger, M., Briand, E., Catherine, A., Berger, C., Quiblier, C., Bernard, C., 2007.** Microcystin ecotypes in a perennial *Planktothrix agardhii* bloom. *Water Res.* 41, 4446–4456. doi:10.1016/j.watres.2007.06.028
- Yilmaz, M., Philips, E.J., Tillett, D., 2009.** Improved methods for the isolation of cyanobacterial DNA from environmental samples. *J. Phycol.* 45, 517–521.
- Yoshida, T., Takashima, Y., Tomaru, Y., Takao, Y., Hiroishi, S., Yoshida, T., Takashima, Y., Tomaru, Y., Shirai, Y., Takao, Y., 2006.** Isolation and Characterization of a Cyanophage Infecting the Toxic Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. doi:10.1128/AEM.72.2.1239
- Zapata, M., Rodríguez, F., Garrido, J.L., 2000.** Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: A new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 195, 29–45. doi:10.3354/meps195029
- Zilliges, Y., Kehr, J., Meissner, S., Ishida, K., Mikkat, S., Dittmann, E., Kaplan, A., Bo, T., 2011.** The Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin Binds to Proteins and Increases the Fitness of *Microcystis* under Oxidative Stress Conditions 6. doi:10.1371/journal.pone.0017615
- Zimba, P. V., Khoo, L., Gaunt, P.S., Brittain, S., Carmichael, W.W., 2001.** Confirmation of catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality from *Microcystis* toxins. *J. Fish Dis.* 24, 41–47. doi:10.1046/j.1365-2761.2001.00273.x

## *Références bibliographiques*

**Zotou, A., Jefferies, T.M., Brough, P.A., Gallagher, T., 1993.** Determination of anatoxin-a and homoanatoxin in blue-green-algal extracts by high-performanceliquid-chromatography and gas-chromatography mass-spectrometry. *Analyst* 118, 753–758.

### *Sites internet et autres références :*

French Database from: L'École Des Hautes Etudes en Sciences Sociales (Ehess). 2016. Available online: [http://cassini.ehess.fr/cassini/fr/html/fiche.php?select\\_resultat=2247#](http://cassini.ehess.fr/cassini/fr/html/fiche.php?select_resultat=2247#) (accessed on 6 July 2017).

Syndicat Mixte de la Vallée de la Veyre et de l'Auzon. 2017. Available online: <http://www.smvva.fr/actions/lacs-et-zones-humides> (accessed on 22 August 2017)

Mémoire de Master 1 de Benoît Gire, 2016. Evaluation de la dynamique temporelle des akinètes de cyanobactéries dans le sédiment dans le cadre d'une étude du lac de Puyvalador (66). Encadrants : Alban Dumont, Benjamin Legrand. Responsable : Antoine Thouvenot, Delphine Latour.

Le lac d'Aydat (Puy de Dôme): Proposition de Restauration de la qualité des eaux. In *Proceedings of the French Water Monitoring Policies*, Orcet, France, 1992.

---

# Annexes

---

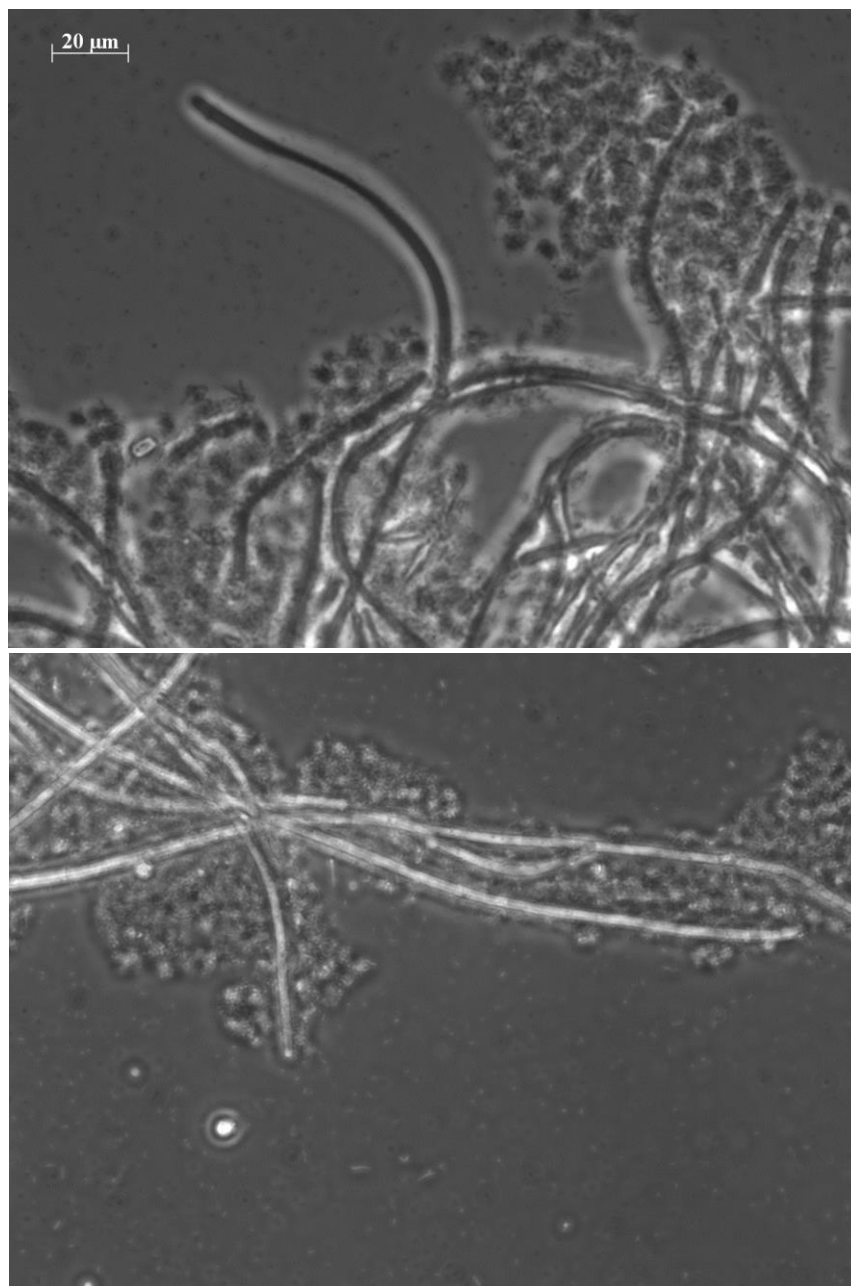


## I) Annexe 1 : Les souches anciennes isolées du sédiment du lac d'Aydat

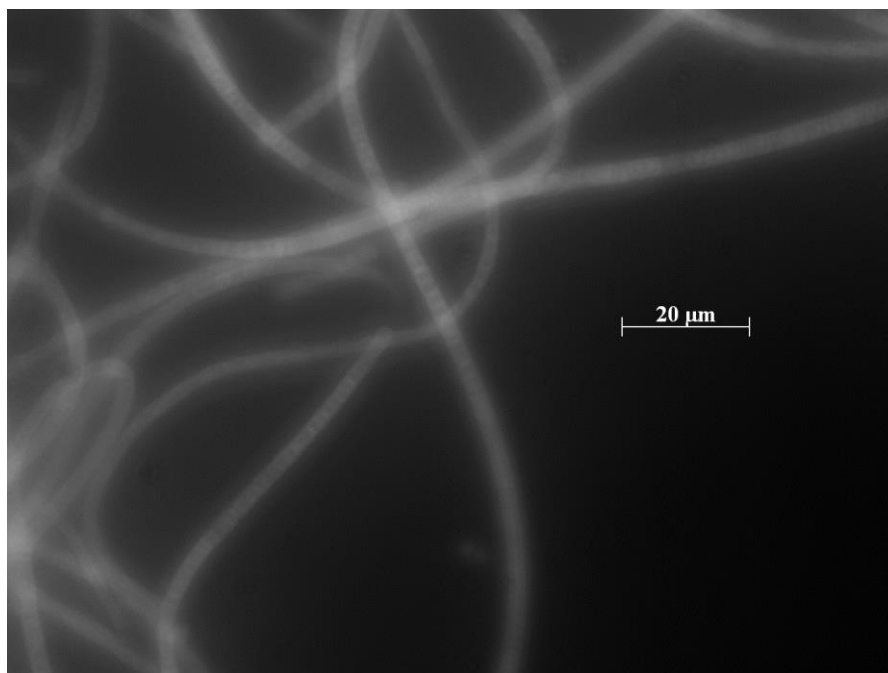
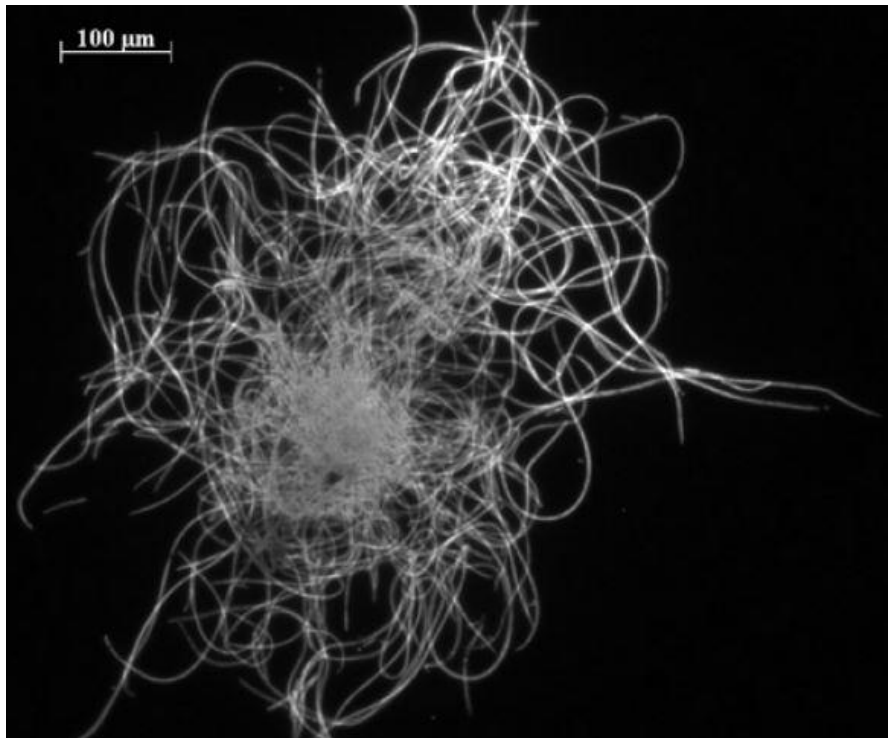
---

### 1. Souche 1 provenant de l'échantillon 3269 cal. BP

a. Photographies prises en microscopie optique (lumière naturelle)

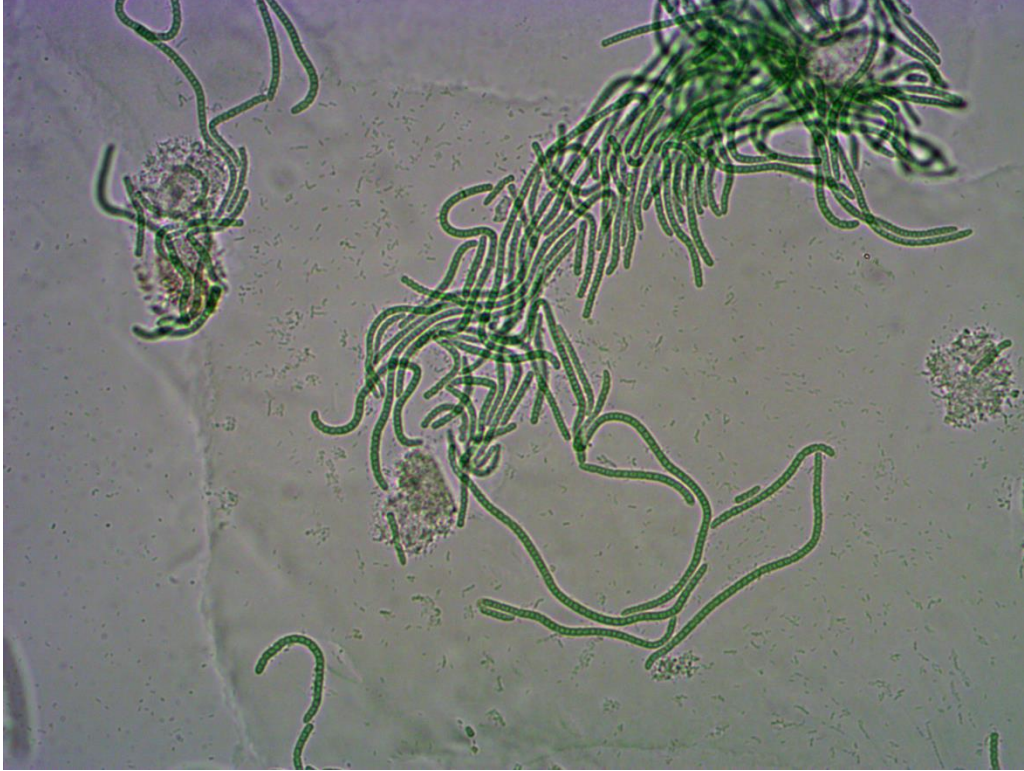


**b. Photographies prises en microscopie optique en épifluorescence**

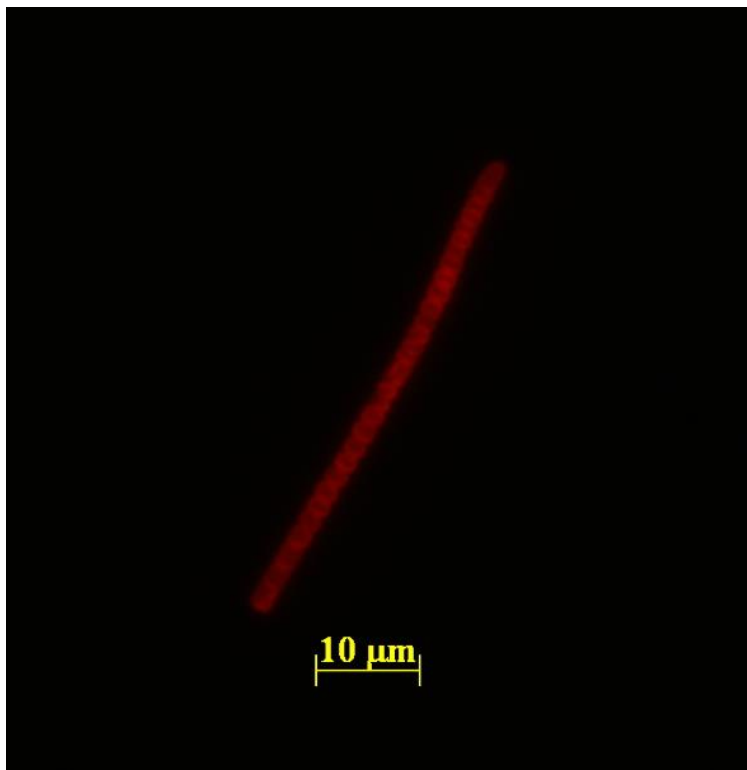
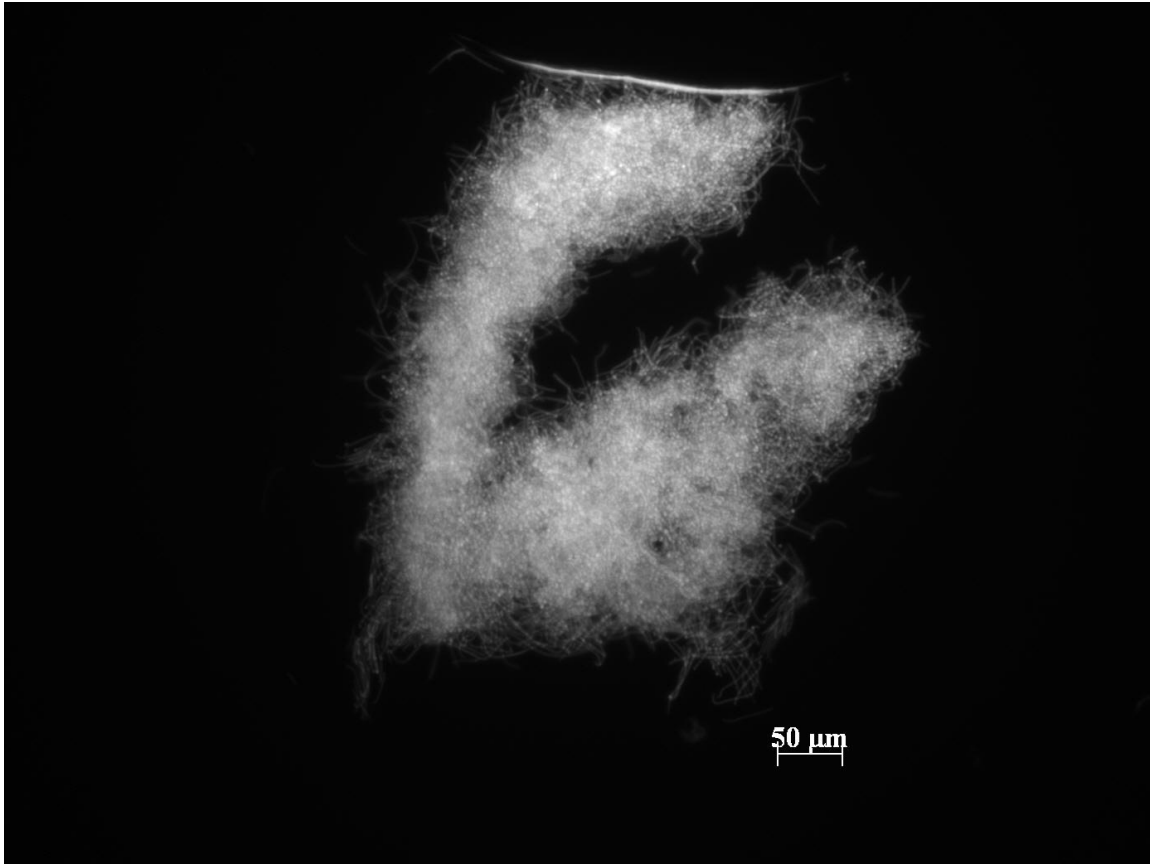


## 2. Souche 2 provenant de l'échantillon 4274 cal. BP

a. Photographies prises en microscopie optique (lumière naturelle)



**b. Photographies prises en microscopie optique en épifluorescence**





## II) Annexe 2 : Portfolio de compétences

### *Ecole Doctorale 65 Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement*

Nom, Prénoms	<b>Legrand, Benjamin</b>
Sujet de recherche doctorale :	<b>Caractérisation des proliférations cyanobactériennes anciennes et futures via les AKINETes présents dans les sédiments (Projet de recherche financé par l'Agence de l'Eau Loire-Bretagne).</b>
Date de début de la thèse :	<b>Octobre 2014</b>
Type de financement :	<b>CIFRE</b>
Direction de thèse : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Directrice</li> <li>• Co-Encadrant</li> </ul>	<b>Delphine Latour (MCF-HDR) Antoine Thouvenot (Gérant de la société ATHOS-environnement)</b>
Unité de recherche :	<b>Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement UMR 6023</b>

### 1. Formation doctorale

#### 1.1. Modules disciplinaires

Lister les 4 modules effectués (intitulé, descriptif succinct, date de validation)

-*Formation* : «*Phytoplancton lacustre et mise en œuvre de l'IPLAC*». 4 jours de formation du 5 au 9 Octobre 2015 (2 modules validés).  
L'objectif de cette formation est de former les stagiaires à la connaissance, aux prélèvements et à la systématique du phytoplancton, sur son utilisation comme bioindicateur et ses relations avec les autres compartiments biologiques d'un plan d'eau. Les aspects liés à l'utilisation du logiciel Phytobs et au calcul de l'IPLAC seront présentés en détail. Des cas concrets de résultats d'analyse seront présentés afin de forger l'analyse critique des opérateurs et de leur faciliter l'acquisition des compétences pour l'interprétation.

-Organisation et animation de Journée des Doctorants du Laboratoire Microorganismes : Génomes et Environnements. De novembre 2014 à Février 2015 (1 module validé). Recherche d'un conférencier invité (J-F Briand, MCF Université de Toulon), Organisation du programme de la journée, Communication sur la journée, Animation de la journée.

-Organisation et animation des Journées de l'Ecole Doctorants SVSAE. De novembre 2014 à Mai 2015 (1 module validé). Recherche d'un conférencier invité (Dr. Denis Guthleben, Attaché scientifique au Comité pour l'Histoire du CNRS), Organisation du programme de la journée, Recherche de Sponsors, Communication sur la journée, Animation de la journée.

## 1.2. Modules Socio-professionnels

<p>Lister les 4 modules effectués (intitulé, descriptif succinct, date de validation)</p> <p>-OSP 2-1 CREATION D'ENTREPRISES. Validé le premier semestre 2016</p> <p>-Echanges doctorants lycéens. Validé le premier semestre 2017</p> <p>-2 modules restants dispensés car bourse de thèse CIFRE</p>	
---	--

## 2. Enseignement

<p>Participation l'encadrement du module mini-projet scientifique : <i>Initiation à la recherche</i>. Dans le cadre du Master 1 Biologie et Environnement parcours FREMAC (40 heures en 2015 et 30 heures en 2017).</p>	
---	--

## 3. Diffusion de la culture scientifique ou transfert de technologie

<p>Participation à une journée de vulgarisation scientifique (Sciences en Marche, Puy de Dôme, Septembre 2014)</p> <p>Organisation des JDD 2015</p> <p>Participation au JDD 2015</p> <p>Organisation des JED 2015</p> <p>Participation au JED 2016</p> <p>Participation à deux demi-journées : échanges Doctorants-Lycéens (2017)</p>	
---	--

## 4. Compétences de recherche

### 4.1. Conception d'un projet de recherche

<p>Conceptualiser et bâtir un projet de recherche.</p> <p>Action de candidature sur une proposition de thèse</p> <p>Proposition d'un programme de travail</p>	
<p>Veille scientifique et méthodologique.</p> <p>Etudes bibliographiques réalisées dans le manuscrit de thèse et les articles scientifiques publiés</p>	
<p>Formation à l'éthique (Validation du module en première année).</p> <p>Formation non effectuée car n'existait pas encore lorsque j'étais en première année de thèse.</p>	
<p>Analyse critique de la production scientifique.</p> <p>-Présentations e résultats à des réunions d'équipe ou de laboratoires</p> <p>-Rédaction de quatre articles scientifiques à comité de relecture internationale et rédaction d'un cinquième pas encore soumis (détails ci-dessous)</p>	

Capacité à accepter la critique, à faire preuve d'humilité, de doute scientifique et d'éthique. -Présentations e résultats à des réunions d'équipe ou de laboratoires -Congrès scientifiques réalisés (détail plus bas dans le portfolio)	

#### 4.2. Réalisation d'un projet de recherche

Elaborer et mettre en œuvre un protocole de recherche dans des conditions maximales de sécurité et de maîtrise des aléas. Participation à la formation hygiène et sécurité du laboratoire ( <i>1<sup>er</sup> semestre 2013</i> ). Sauveteur secouriste au travail (SST) (mars 2017)	
Garantir des méthodes reproductibles et des résultats fiables. Outils statistiques utilisées approuvés par les comités de relecture lors des révisions pour la publications d'articles scientifique	
Rigueur, intégrité scientifique, traçabilité et validité des résultats. Tenue quotidienne d'un cahier de laboratoire avec sommaire avec résultats clairement détaillés et plan d'expérimentation reproductible.	
Présenter, discuter des résultats et les intégrer dans un protocole de recherche. Rédaction de rapports annuelles d'avancements des travaux de thèse à l'ANRT (organisme financeur des bourses CIFRE)	
Proposer des évolutions de son projet et rester à l'écoute des avis. Comités de suivi de thèse réalisés en mars 2015 et janvier 2017	
Participation à d'autres projets de recherche/aide ponctuelle. Association à un article en étant co-auteur « au milieu de la liste » ( <i>Sabart et al., in prep</i> ) ( <i>Misson et al., in prep</i> )	
Gérer ou prendre en compte les contraintes et moyens matériels, financiers, humains et juridiques relatifs à un projet, interagir et convaincre d'autres acteurs engagés dans le projet. Interaction avec partenaires industriels notamment EDF y compris à des réunions de restitution de projets	

#### 4.3. Valorisation et transfert des résultats de la recherche

Prendre du recul sur l'état d'avancement et la portée de son projet, identifier la valeur ajoutée par rapport aux travaux antérieurs. Legrand, B., Lesobre, J., Colombet, J., Latour, D., & Sabart, M. (2016). Molecular tools to detect anatoxin-a genes in aquatic ecosystems: Toward a new nested PCR-based method. <i>Harmful algae</i> , 58, 16-22.  Legrand, B., Lamarque, A., Sabart, M., & Latour, D. (2016). Characterization of akinetes from cyanobacterial strains and lake sediment: A study of their resistance and toxic potential. <i>Harmful algae</i> , 59, 42-50.  Legrand, B., Lamarque, A., Sabart, M., & Latour, D. (2017). Benthic Archives Reveal Recurrence and Dominance of Toxigenic Cyanobacteria in a Eutrophic Lake over the	
---	--

<p>Last 220 Years. <i>Toxins</i>, 9(9), 271.</p> <p>Legrand B, Le Jeune A-H, Colombet J, Thouvenot A, Latour D. 2017. Akinetes may be representative of past nostocalean blooms: a case study of their benthic spatiotemporal distribution and potential for germination in a eutrophic lake. <i>AEM</i> 83:e01571-17.</p>	
<p>Effectuer une communication scientifique orale adaptée à différents publics, en utilisant les moyens audiovisuels appropriés.</p> <p><i>Congrès locaux et nationaux :</i></p> <p>-<u>Legrand Benjamin</u>, Latour D., Thouvenot A., Sabart M. Seasonal life cycle repartition of a Nostocale Cyanobacteria (<i>Anabaena macrospora</i>) in an eutrophic lake (Aydat, France). <i>Gis Cyanobactéries-Gdr Phycotox</i> (Brest, 2015) (communication orale)</p> <p>-<u>Sabart M.</u>, Lesobre J., Legrand B., Crenn K., Sabatier P., Colombet J., Latour D. First evidence of anatoxin-a genes in several freshwater lakes in France: spatio-temporal diversity and phylogenetic affiliation of the sequences. <i>Gis Cyanobactéries-Gdr Phycotox</i> (Brest, 2015) (communication orale).</p> <p>-<u>B. Legrand</u>, A. Lamarque, M. Sabart, A. Thouvenot, D. Latour Isolement, résistance et détermination du potentiel toxique des akinètes. <i>Gis Cyanobactéries</i> (Biscarosse, 2016) (communication orale)</p> <p>-<u>Legrand Benjamin</u>, <u>Latour Delphine</u> and <u>Viguès Bernard</u> The cyrtophora ciliates as potential regulators of filamentous cyanobacteria dynamics and models to study relationships between grazers and toxin-producing species. <i>Gis Cyanobactéries-Gdr Phycotox</i> (Gif sur Yvette, 2017) (Poster)</p> <p>-<u>Benjamin Legrand</u>, Anne-Hélène Le Jeune, Jonathan Colombet, <u>Delphine Latour</u> Akinetes distributions and persistence trough the benthic phase in order to evaluate their potential of germination <i>Gis Cyanobactéries-Gdr Phycotox</i> (Gif sur Yvette, 2017) (Poster)</p> <p>-<u>Benjamin Legrand</u>, Yannick Miras, Marlène Lavrieux, Delphine Latour. La persistance des cyanobactéries à travers 6700 ans d'histoire du lac d'Aydat : abondance, intégrité et applications possibles en paleoécologie. <i>Journée des microbiologistes du pôle clermontois</i>. Clermont-Ferrand (2017)</p> <p><i>Congrès internationaux</i></p> <p>-<u>Latour D.</u>, Miras Y., Lavrieux M., Beauger A., Legrand B., Sabart M. Recurrence of cyanobacterial blooms since six thousand years in the french lake Aydat. (Aslo meeting, Granada, Spain, 2015) (communication orale).</p> <p>-<u>Sabart M.</u>, Lesobre J., Legrand B., Crenn K., Sabatier P., Colombet J., Latour D. First evidence of anatoxin-a genes in several freshwater lakes in France: spatio-temporal diversity and phylogenetic affiliation of the sequences. (Aslo meeting, Granada, Spain, 2015) (poster).</p> <p><u>Benjamin Legrand</u>, Amélie Lamarque, Marion Sabart, Delphine Latour Temporal distribution of past cyanobacterial proliferations through a sediment core over the 220 last years. (ICTC, Wuhan, China, 2016) (poster)</p> <p><u>Sabart M.</u>, Legrand B., Lesobre J., Sabatier P., Paris G., Colombet J., Le Jeune A-H., Latour D. Anatoxin-a in several freshwater lakes in France : Occurrence and phylogeny of biosynthesis genes. (ICTC, Wuhan, China, 2016) (communication orale)</p>	



<p>Transférer, vulgariser et valoriser ses résultats de recherche dans le respect de la propriété intellectuelle et d'une éventuelle confidentialité et en s'appuyant sur les services appropriés. Participation au JED 2016 Participation à deux demi-journées : échanges Doctorants-Lycéens (2017)</p>	
<p>Contribuer au dialogue entre Sciences et Société. <i>Exemples : Module Sciences et Société, La main à la pâte, Modules OSP (les citer),...</i> -Module OSP : Création d'entreprise -Echanges Doctorants-lycéens.</p>	
<p>Comprendre le processus d'exploitation commerciale de résultats de recherche pour être capable d'identifier les occasions de contribuer à la coopération entre recherche universitaire, recherche industrielle et l'ensemble des secteurs de production. Bourse de Thèse CIFRE...</p>	

## 5. Compétences techniques et méthodologiques

<p>Enrichir et compléter ses connaissances et compétences méthodologiques et techniques. Formation à la détermination phytoplanctonique et à l'IP Lac organisée par l'INRA de Thonon les Bains (Octobre 2015).</p>	
<p>Maîtriser tous les aspects de la gestion de projet. -Encadrements de stagiaires -Travail avec des membres du personnel technique (techniciens et ingénieurs d'études).</p>	
<p>Décomposer des problèmes complexes en questions plus simples, ordonner les diverses étapes du projet et planifier leur déroulement pas à pas. Mise au point expérimentales et méthodologiques (cf manuscrit de thèse)</p>	
<p>Développer des connaissances pointues dans son champ disciplinaire. <i>-Participation à des congrès nationaux et locaux :</i> Gis Cyanobactéries (Vic le comte, 2014), Gis Cyanobactéries-Gdr Phycotox (Brest, 2015), Gis Cyanobactéries (Biscarosse, 2016) (communication orale), Journée des microbiologistes du pôle clermontois (2015 et 2017). <i>-Participation à des congrès internationaux :</i> Cyanocoast symposium (Amsterdam, Pays-Bas, 2016) ICTC (Wuhan, Chine, 2016)</p>	
<p>Faire le point sur les moyens disponibles et suggérer leur évolution, mettre en œuvre les solutions proposées en respectant et en gérant le budget alloué. -Réunion personnels travaillant sur les cyanobactéries (15 effectuées) -Réunion d'équipe avec présentation des résultats (5 effectuées) -Comité de suivis de thèse effectués en mars 2015 et Janvier 2017</p>	
<p>Faire un bilan du projet. -Rédaction de bilan d'avancement annuel pour l'ANRT dans le cadre de la bourse</p>	

Annexes

<p>CIFRE -Deux comités de suivis de thèse</p>	
<p>Maîtriser sa communication écrite et orale -Modules OSP création d'entreprises -Présentation de posters -Présentation de communications orales (informations déjà détaillées)</p>	
<p>Reformuler et structurer les résultats pour les rendre convaincants et accessible à tous. Présentation à des congrès détaillées ci-dessus</p>	
<p>Utiliser des outils adaptés pour différents médias. Formations déjà réalisés dans le cadre du Master</p>	
<p>Mobiliser sa force de conviction dans un contexte de négociation. Participation à la rédaction et à des réunions afin d'obtenir des projets dans le cadre de la CIFRE</p>	
<p>Intervenir en tant que formateur, en s'adaptant au public. <i>Exemple : Mission d'enseignement (nombre d'heures TD, niveau, intitulé, public), Formation DU Enseignement,...</i> Participation l'encadrement du module mini-projet scientifiquez : <i>Initiation à la recherche</i>. Dans le cadre du Master 1 Biologie et Environnement parcours FREMAC (40 heures en 2015 et 30 heures en 2017). Intervention dans le module Ecologie des Eaux Douces (UE libre de L3). Présentation des différents métiers d'une entreprise spécialisée en ingénierie des milieux aquatiques (2 heures en 2016)</p>	
<p>Maîtriser les outils informatiques de gestion des données (bases de données, formats, ...). Formation déjà acquise durant la licence et le master.</p>	
<p>Identifier des outils informatiques et statistiques pertinents à l'analyse de données (tableurs, tests, outils de visualisation.) Formation déjà acquise durant la licence et le master.</p>	
<p>Structurer des informations pour leur donner de la valeur. Présentation à des congrès, Rédaction d'articles scientifiques, Présentation à des réunions scientifiques</p>	
<p>Tirer tous les bénéfices d'une compétence interdisciplinaire et confronter ses connaissances avec d'autres disciplines. -Participation aux JED 2016, Organisation des JED 2015, Modules OSP création d'entreprise et échanges doctorants lycéens. Au cours de ces modules j'ai pu échangé avec d'autres doctorants sur nos thèses et avoir des discussions scientifiques sur des sujets variés.</p>	

## 6. Autres compétences - savoir être

### 6.1. Mobiliser un esprit d'innovation au quotidien

Faire preuve de curiosité Participation aux JED et JDD du LMGE	
Gérer les risques liés à la confrontation avec l'inconnu. Se former à de nouvelles techniques : -Cyanobactéries : Déterminations spécifiques et cellulaires en microscopie droite ou inversée en lumière naturelle ou en épifluorescence. Cultures de cyanobactéries. Inductions de la formation d'akinètes. Prélèvements terrains (usage de la sonde BBE, phylet à phytoplancton, carottier ect...)	
Avoir le réflexe de valoriser de manière pertinente ses découvertes et réalisations avec prise de risques. Participation au module création d'entreprise.	
Dépasser les frontières de sa discipline. Participation à l'élaboration de projets	

### 6.2. Travailler en équipe

Collaborer avec des collègues et partenaires aux statuts et aux missions diverses en cherchant à valoriser au plus juste la contribution de chacun. Travail occasionnel avec le personnel technique notamment des ingénieurs d'études et des techniciens pour réaliser les prélèvements <i>in situ</i> .	
Faire preuve de respect, d'écoute, de confiance, d'ouverture à la diversité, d'encouragement et d'humilité face aux propositions de ses collègues et partenaires. <i>Participations à des réunions d'équipes et de projets (AKINET, PROFECY, DIVERSITOX)</i>	
Se mettre au service d'un collectif pour l'aboutissement d'un projet. Organisation des JED et JDD 2015	
Développer et entretenir un réseau scientifique et professionnel. Possession d'un compte sur linkedin et sur researchgate	

### 6.3. Coordonner

<p>Encadrer des stagiaires. Encadrement de trois stagiaires de Master 1 : 2015 : -Amélie Lamarque (4 mois) : « <i>Mise en évidence du potentiel toxique des akinètes</i> » -Charlie Perrier (2 mois) « <i>Caractérisation de la survie des akinètes au transit digestif du cladocère Daphnia magna</i> » 2016 : -Benoît Gire (2 mois) « <i>Evaluation de la dynamique temporelle des akinètes de cyanobactéries dans le sédiment de la retenue de Puyvalador (66).</i>»</p> <p>Encadrement d'une stagiaire de Master 2 : -Amélie Lamarque (6 mois) : <i>Caractérisation de la survie et de la toxicité des akinètes (cellules de résistance) de cyanobactéries au cours des deux derniers siècles d'histoire du lac d'Aydat.</i>»</p>	
<p>Piloter un projet. <i>Exemples : Projet doctoral, Rédaction d'une publication, Animation des JED,...</i> Rédaction de 5 publications scientifiques à comité de relecture. Participation à l'organisation et à l'animation des journées des doctorants du LMGE en 2015 et aux JED la même année</p>	

### 6.4. Travailler en autonomie

<p>Mobiliser sa polyvalence. Habilitation à travailler à proximité de sources électriques de haute ou basse tension (H0, B0), mars 2015 Formation « Risques aquatiques en eaux vives ». Septembre 2016. Sauveteur Secouriste au Travail (SST). Mars 2017.</p>	
<p>Rendre compte régulièrement de ses avancées et progrès. Thèse CIFRE avec des rencontres régulières entreprise-universitaires, Réunions d'équipe, d'unité. Rédaction de bilans annuels à l'ANRT organisme gérant les bourses de thèse CIFRE.</p>	
<p>Etablir un bilan complet de ses réalisations. Rédaction manuscrit thèse de doctorat.....</p>	

**6.5. S'adapter**

<p>Au contexte professionnel. Thèse CIFRE... Entretien de cultures de cyanobactéries</p>	
<p>Aux personnes, à leurs méthodes de travail et à leurs besoins ou demandes. Respect de la vie du laboratoire et de la vie en entreprise.</p>	
<p>Aux rythmes imposés par l'environnement professionnel. Suivi de la germination des akinètes, plage horaire allant de 6h du matin à 2h pendant la nuit, y compris les weekends et jours fériés. Autres travaux de recherche effectués aussi tard le soir incluant aussi des weekends et des jours fériés.</p>	

**6.6. Utiliser une langue étrangère**

<p>A l'écrit. Rédaction de 5 publications scientifiques à comité de relecture internationale.</p>	
<p>A l'oral. Présentation d'un poster à l'International Congress of Toxic Cyanobacteria (ICTC), Wuhan, Chine, Octobre 2016. Collaboration avec Lorena Lago Mejjide (Post-doctorante espagnole) sur une expérience de 6 semaines (langue parlée : anglais). (<a href="http://cyanocost.com/sites/default/files/attachments/cyanocost_stsm_poster_lorena_lago.pdf">http://cyanocost.com/sites/default/files/attachments/cyanocost_stsm_poster_lorena_lago.pdf</a>)</p>	
<p>Cours de langues. Pas de cours de langues effectués depuis le Master 2. Mais collaboration de 6 semaines avec Lorena Lago post-doctorante espagnole (Langue parlée : Anglais) Je suis corresponding Author sur les 4 papiers acceptés. Cela implique d'échanger par mail avec des interlocuteurs américains, anglais, suisses, chinois etc...</p>	

<p>Date et signature du doctorant :</p>	<p>Date et signature de la directrice de thèse :</p>	<p>Date et signature de la directrice de l'Ecole doctorale :</p>
---	--	--

### III) Annexe 3 : AEM cover (Décembre 2017)



## Annexes

zam02317/coverblurb	diasv	S=2	10/11/17	16:23	Art:
---------------------	-------	-----	----------	-------	------

---

*Cover photograph:* Germinating akinete of the filamentous cyanobacterium *Dolichospermum macrosporum* from a sample of Lake Aydat sediment (Massif Central, France). An akinete is a resistant cell which is able to overwinter in lake sediment during several months when environmental conditions are unfavorable to cyanobacterial growth. When conditions become favorable, akinetes undergo cellular division, leading to the formation of young filament (hormogonia). Combination of binding with SYTOX green and chlorophyll autofluorescence under 488 and 546 nm epifluorescence light ( $\times 400$  magnification) has permitted the highlighting of the hormogonia exiting the envelope. (Photograph by Benjamin Legrand and Delphine Latour, Laboratoire Microorganismes: Génome & Environnement [LMGE], Aubière, France.) (See related article at [e01571-17](#).) (Copyright © 2017, American Society for Microbiology. [All Rights Reserved](#).)





## Résumé :

Les akinètes sont des cellules de résistances produites par les cyanobactéries de l'ordre des Nostocales. Issues de la différenciation de cellules végétatives, les akinètes sont capables de persister en surface des sédiments pendant la période hivernale puis de germer au printemps pour recoloniser la colonne d'eau. Le suivi des populations pélagiques et benthiques effectué pendant deux années sur le lac d'Aydat a montré que les akinètes présents à la surface des sédiments sont représentatifs de la diversité et de l'abondance, des proliférations nostocaléennes passées. Leur capacité à persister dans les sédiments sur de longues échelles de temps a permis de mettre en évidence la présence de cyanobactéries il y a plusieurs milliers d'années. La présence récurrente d'akinètes dans les sédiments jusqu'à la période actuelle indique la persistance d'un niveau trophique élevé sur l'ensemble de l'histoire de ce lac. Parallèlement, le potentiel toxique des akinètes, étudié *via* la détection des gènes *anaC* et *mcyA*, a montré la co-occurrence de ces deux cyanotoxines dès les premiers blooms cyanobactériens, il y a plus de 6700 ans ainsi que la récurrence d'*anaC*, associé à *D. macrosporum*, au moins sur les 30 dernières années. Par ailleurs, d'importantes différences de pourcentage d'intégrité des akinètes ont été observées en fonction des espèces, variant en moyenne de 5 à 60% pour les deux espèces dominantes, *Dolichospermum macrosporum* et *D. flos-aquae* respectivement. Cette variabilité serait le reflet des interactions écologiques survenues dans la colonne d'eau et traduirait des stratégies écologiques différentes. De même, la capacité et le temps de germination semblent être espèce dépendante, ce qui permettrait un étalement de la période de recrutement en fonction des conditions environnementales. Malgré une perte globale de viabilité avec le temps, des akinètes enfouis depuis 1800 ans dans les sédiments ont révélé leur capacité à germer, confirmant l'importance de ces cellules de résistance dans la pérennisation à long terme des proliférations nostocaléennes.

Mots clés : Akinètes, paléo-indicateur, sédiments, potentiel toxique, intégrité, germination

## Abstract:

Akinetes are resistant cells produced by cyanobacteria of the Nostocales Order. Originating from the differentiation of vegetative cells, Akinetes are able to persist in surface sediment during winter and then germinate in spring to recolonize the water column. Monitoring on pelagic and benthic populations performed during two years in lake Aydat has shown that the akinetes present in surface sediments are representative of diversity and abundances of past nostoclean proliferations. Akinetes capacity to persist in sediment at large time scales has allowed to highlight cyanobacterial presence since several thousand years. Recurrences of akinetes in sediment from 6 700 years to present day presume that the trophic level stayed high through the history of this lake. In parallel, the toxic potential of akinetes, studied with the detection of *anaC* and *mcyA* genes, has shown the co-occurrence of anatoxin-a and microcystins the since first cyanobacterial blooms, 6 700 years ago and the recurrence of *anaC* associated to *D. macrosporum* since at least the last 30 years. On the other hand, high differences of intact akinete percentages have been observed depending on the species, with mean values of 5 and 60 % for *Dolichospermum macrosporum* and *D. flos-aquae* (the two dominant species) respectively. This variability may be the reflect of ecologic interactions which occurred in the water column and may be due to different ecological strategies. Moreover, ability and time of germination seem to be dependent, which may allow to extend the window of recruitment depending on environmental conditions. Despite a high loss of viability over time, some akinetes buried since 1 800 years in sediments have shown their ability to germinate, confirming the importance of these resistant cells in the long scale perpetuation of nostoclean blooms.

Keywords: Akinetes, paleoindicator, sediments, toxic potential, integrity, germination