

**MÉMOIRE DE MASTER 2
DE L'UNIVERSITÉ Pierre & Marie CURIE - PARIS 6**

**Master 2 *Sciences de l'Univers, Environnement, Ecologie*
Spécialité *Systématique, Evolution, Paléontologie*
Parcours *Expertise faune flore et Gestion durable du Patrimoine Naturel***

Présenté par :

Solène THOMAZEAU

Sujet du mémoire :

**DIVERSITÉ PHYLOGÉNÉTIQUE ET
TOXINIQUE DE CYANOBACTÉRIES
DU SÉNÉGAL ET DU BURKINA FASO**

Sous la direction de :

**Céline BERGER, Aude HOUDAN-FOURMONT⁽¹⁾
& Florence ROUSSEAU⁽²⁾**

(1) MNHN, Paris - USM 505 *Ecosystèmes et Interactions toxiques*

(2) MNHN & UPMC, Paris - UMR 7138 *Systématique, Adaptation, Evolution*

Soutenance le 26 juin 2006

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Dominique Richard, Régine Vignes-Lebbe et Bruno de Reviers pour m'avoir permis de soutenir ce mémoire en juin.

Je remercie également Cécile Bernard de m'avoir accueillie au sein de l'USM 505 « Ecosystèmes et interactions toxiques », Département Régulations, Développement et Diversité Moléculaire (RDDM) du MNHN. Les travaux présentés ont été réalisés dans le cadre des programmes de recherche « Cyanobactéries et Afrique de l'Ouest » réalisés en partenariat avec l'unité UR 167 « CYROCCO » de l'IRD et financés par la DGA (contrat N° 026065094).

Je tiens à remercier mes encadrantes, Céline Berger, Aude Houdan-Fourmont et Florence Rousseau pour leur aide technique et leur soutien lors de la rédaction de ce mémoire.

Je remercie également Arul Marie et Lionel Dubost, de la plateforme de spectrométrie de masse, USM 502 du MNHN.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire « Systématique et écotoxicologie des microalgues » :

- Enora Briand, pour les analyses moléculaires,
- Arnaud Catherine, pour ses fabuleuses cartes,
- Alain Couté, pour les identifications,
- Charlotte Duval, pour son aide technique et ses magnifiques photographies,
- Aurélie Ledreux, pour son aide technique sur le test PP2a,
- Claude Yepremian pour ses grandes connaissances sur les cyanobactéries...

... Et à tous les autres membres de l'équipe, pour les bons moments passés ensemble : Simone, Catherine, Hélène, Houda, Maryam, Karim, Marie-Claude...

A ma famille, mes amis et tous les étudiants de la spécialité EGPN, Anne-Laure, Cendrine, Jeanne, Jess, Patricia, Prune, Steph, David, Erwan, Nico M, Nico R, Quentin, Will & Yohann

SOMMAIRE

Liste des abréviations	4
Liste des tableaux	4
Liste des figures	5
Liste des annexes.....	5
1. INTRODUCTION.....	6
2. GÉNÉRALITÉS SUR LES CYANOBACTÉRIES.....	6
2.1. Organisation morphologique.....	6
2.2. Systématique	7
2.3. Écologie.....	7
2.4. Toxicologie.....	9
3. CONTEXTE ET OBJECTIFS	9
3.1. Contexte mondial	9
3.2. Contexte africain	9
3.3. Contexte de l'étude.....	10
3.4. Objectifs de l'étude	11
4. MATÉRIEL & MÉTHODES.....	11
4.1. Conservation en collection et cultures des souches étudiées	11
4.2. Analyses moléculaires.....	13
5. RÉSULTATS	16
5.1. Position phylogénétique des souches de la collection PMC	16
5.2. Étude de la diversité spécifique.....	20
5.3. Étude de la toxicité.....	21
6. DISCUSSION	23
6.1. Position phylogénétique des souches de la collection PMC	23
6.2. Étude de la diversité spécifique.....	27
6.3. Étude de la toxicité.....	27
7. CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	29
Références	30

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique	MC-LA : Microcystine-LA
ADNr : Acide désoxyribonucléique ribosomal	MC-LR : Microcystine-LR
Antx-a : Anatoxine-a	MC-RR : Microcystine-RR
Antx-a(S) : Anatoxine-a(S)	MC-YR : Microcystine-YR
ATXs : Anatoxines	ML : Maximum Likelihood ou Maximum de vraisemblance
BET : Bromure d'éthidium	MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle
BF : Burkina Faso	MP : Maximum Parcimony ou Maximum de parcimonie
CYN : Cylindrospermopsine	MS : Spectrométrie de masse
HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ICBN : International Code of Botanical Nomenclature	pADNr 16S : séquence partielle d'ADNr 16S
ICNB : International Code of Nomenclature of Bacteriology	pb : Paire de bases
INRA : Institut National de Recherches Appliquées	PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
IRD : Institut de Recherche pour le Développement	PMC : Paris Muséum Collection
ITS : Internal Transcribed Spacer	PP2a : Protéine Phosphatase 2a
ITS1 : Espaceur entre les gènes 16S et 23S de l'opéron ribosomal	PSP : Paralytic Shellfish Poisons
LPS : Lipopolysaccharides	S : Sénégal
MCYSTs : Microcystines	STXs : Saxitoxines
	Test PP2a : Test d'inhibition de la PP2a
	UV : Ultra violet

Liste des tableaux

- Tableau 1 :** Correspondance des deux systèmes de classification des cyanobactéries
- Tableau 2 :** Cyanotoxines et pathologies associées, d'après Chorus & Bartram (1999)
- Tableau 3 :** Cyanobactéries observées sur le terrain et mises en collection
- Tableau 4 :** Liste des souches burkinabées en collection et études réalisées (méthodes d'extraction d'ADN, séquences disponibles, études de toxicité)
- Tableau 5 :** Récapitulatif des 18 souches sénégalaises sélectionnées pour l'étude phylogénétique, ainsi que les séquences amplifiées et étudiées et la méthode d'extraction utilisée
- Tableau 6 :** Récapitulatif des masses m/z des ions monochargés $[M+H]^+$ attendues en mode MS et des ions fils obtenus en mode MS/MS pour les principales cyanotoxines recherchées
- Tableau 7 :** Résultats des études de toxicité effectuées (ESI-MS et test PP2a) sur les souches burkinabées

Liste des figures

Figure 1 : Phylogénie basée sur l'analyse de l'ADNr 16S de cyanobactéries, d'après Komárek & Kaštovský 2003

Figure 2 : Localisation des lacs contaminés par des cyanobactéries productrices de toxines en Afrique, d'après Berger (2005)

Figure 3 : Arbre phylogénétique consensus de 1000 arbres obtenus en maximum de vraisemblance réalisés à partir de 70 séquences pADNr 16S (433 pb) de cyanobactéries de la collection PMC et de séquences issues de GenBank.

Figure 4 : Arbre phylogénétique consensus de 1000 arbres obtenus en maximum de vraisemblance réalisés à partir de 43 séquences pADNr 16S (433 pb) de cyanobactéries appartenant aux Nostocales de la collection PMC et de séquences issues de GenBank.

Figure 5 : Arbres phylogénétiques consensus de 1000 arbres obtenus en maximum de vraisemblance (ML) et de 21628 arbres obtenus en maximum de parcimonie (MP) réalisés à partir de 25 séquences pADNr 16S (244 pb) de *Microcystis* de la collection PMC et de séquences issues de GenBank.

Figure 6 : Arbres phylogénétiques consensus de 1000 arbres obtenus en maximum de vraisemblance (ML) et de 159000 arbres obtenus en maximum de parcimonie (MP) réalisés à partir de 28 séquences partielles d'ITS1 16S-23S (379 pb) de *Microcystis* de la collection PMC et de séquences issues de GenBank.

Figure 7 : Spectres ESI-MS (a) et ESI-MS/MS (b) de la souche PMC 241.05 *Microcystis aeruginosa* montrant le pic correspondant à la MC-LA et l'ion fils obtenu

Figure 8 : Dessins représentant la structure générale « type » des genres *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Anabaenopsis* et *Cylindrospermopsis*, d'après les dessins de Berger et Couté

Figure 9 : Photographies des genres *Calothrix* (a) et *Gloeotrichia* (b)

Figure 10 : Photographies des différents morphotypes étudiés de *Microcystis*

Liste des annexes

Annexe 1 : Les prospections au Sénégal et au Burkina Faso

Annexe 2 : Détail des souches monoclonales de cyanobactéries sénégalaises en collection

Annexe 3 : Liste des séquences importées de GenBank pour les analyses phylogénétiques

Annexe 4 : Protocole d'extraction kit QuiaGen (Cat. N°69506)

Annexe 5 : Protocole d'extraction au phénol-chloroforme (selon U. Dorigo, INRA Thonon les Bains)

Annexe 6 : Structure chimique des principales cyanotoxines connues

Annexe 7 : Protocole d'extraction de cyanotoxines (selon M. Gugger, MNHN, Paris, 2005)

Annexe 8 : Protocole du test PP2a, d'après Rivasseau *et al* (1999) et Robillot & Hennion (2004)

Annexe 9 : Liste des espèces citées

1. INTRODUCTION

Les **cyanobactéries** ou **cyanophytes**, ou encore **algues bleues**, sont des organismes procaryotes photosynthétiques présents aussi bien dans les milieux aquatiques marins, saumâtres et dulçaquicoles, que dans les milieux terrestres. En milieu dulçaquicole et surtout dans les zones soumises à une forte **eutrophisation** (enrichissement en nutriments du milieu), elles sont capables de proliférer rapidement et de former des **efflorescences**. De plus, certaines espèces synthétisent des **toxines**, responsables d'intoxications animales et humaines, parfois mortelles. Les cyanobactéries sont présentes sur tous les continents et largement étudiées en écologie, en toxicologie, en taxinomie, ou encore en microbiologie.

En **Afrique**, ces organismes et leurs toxines ont fait l'objet de peu d'études. L'IRD a donc mené des campagnes de prospections au Sénégal et au Burkina Faso, où l'eau est une denrée rare et précieuse (www.com.univ-mrs.fr/IRD/cyrocco). Grâce à ses missions, le MNHN a pu établir, pour la première fois, une collection de souches africaines.

Afin d'appréhender l'originalité de cette collection, les diversités phylogénétique et toxinique de ces cyanobactéries ont été étudiées.

2. GÉNÉRALITÉS SUR LES CYANOBACTÉRIES

2.1. Organisation morphologique

Types cellulaires

L'organisation morphologique de ces organismes est très variée : unicellulaires libres ou en colonie, pluricellulaires filamenteux avec une gaine (appelés filaments) ou sans (appelés trichomes), avec ou sans ramification ou encore avec ou sans cellules différenciées.

Ces organismes présentent trois types cellulaires différents (Komàrek *et al.*, 2003) :

- les **cellules végétatives** de forme variées rondes, ovoïde, oblongues, quadratiques et avec un contenu cellulaire homogène ou non, avec ou sans vacuoles à gaz ;
- les **hétérocytes**, cellules spécialisées dans la fixation de l'azote atmosphérique, rencontrés uniquement chez les représentants des ordres des Nostocales et des Stigonematales ;
- les **akinètes**, cellules de résistance à la paroi épaisse et qui contiennent des réserves permettant aux espèces qui les possèdent (ordres des Nostocales et des Stigonematales) de survivre en conditions environnementales défavorables.

Multiplication

Les cyanobactéries se multiplient par voie asexuée, par division végétative suivant une ou plusieurs directions. Chez les formes unicellulaires, la division successive de la cellule mère libère des nanocytes (ordre des Chroococcales) ou des baeocytes (ordre des Pleurocapsales). Chez les formes filamenteuses, la fragmentation se fait au niveau des nécridies (cellules dégénérantes), puis les hormogonies (courts trichomes mobiles) sont libérées et peuvent se disperser.

2.2. Systématique

Classifications bactériologique et botanique

Les cyanobactéries sont reconnues à la fois par le Code International de Nomenclature Botanique (Greuter *et al.*, 2000) et par le Code International de Nomenclature Bactériologique (Lapage *et al.*, 1992). Le premier se base essentiellement sur le mode de reproduction et la morphologie tandis que le second est fondé sur les critères physiologiques et génotypiques de cultures pures. Ces deux classifications reconnaissent cependant les mêmes sections ou ordres (Tableau 1) et les divergences résident essentiellement au niveau des taxons inférieurs (espèces). Il existe ainsi cinq ordres divisés en vingt sept familles qui comportent cent soixante six genres de cyanobactéries

Classification bactériologique	Classification botanique	Description
section I	Chroococcales	formes unicellulaires ou coloniales, à multiplication par fission binaire et/ou formation d'exospores
section II	Pleurocapsales	formes coloniales à multiplication par fissions multiples formant des baeocytes
section III	Oscillatoriales	formes filamenteuses unisériées, non hétérocytées, sans ramification, à division cellulaire perpendiculaire à l'axe du trichome
section IV	Nostocales	formes filamenteuses à différenciation cellulaire (hétérocytes et akinètes), à division cellulaire dans un seul plan
section V	Stigonematales	formes filamenteuses à différenciation cellulaire (hétérocytes et akinètes), présentant des ramifications (vraies ou fausses), à division cellulaire dans plusieurs plans

Tableau 1 : Correspondance des deux systèmes de classification des cyanobactéries

Phylogénie

Les données moléculaires basées sur les gènes ribosomiaux indiquent, comme le suggère Hoffmann (2005), que des remaniements sont nécessaires afin d'affiner la classification actuelle. L'arbre phylogénétique réalisé à partir de l'ADNr 16S qu'il nous présente est tout de même concordant avec la classification botanique classique (Figure 1). Cependant, à un niveau générique, les données moléculaires (ADNr 16S) sont parfois contradictoires avec les données morphologiques : certains genres sont monophylétiques (*Microcystis*, *Planktothrix*, *Anagnostidis* et *Komàrek*, *Arthrospira* (Gomont) Stizenberger...) et d'autres nécessiteraient une révision taxinomique (*Anabaena* (Bornet & Flahault) Bory de Saint Vincent et *Aphanizomenon* (Bornet & Flahault) Morren (Gugger *et al.*, 2002). Quant au niveau spécifique, aucune relation claire n'a été obtenue entre les espèces (différenciées sur critères morphologiques) et les caractères moléculaires étudiés à ce jour (Hoffmann *et al.*, 2005).

2.3. Écologie

Eutrophisation et efflorescence

A l'heure actuelle, la pression anthropique croissante exercée sur les milieux dulçaquicoles augmente le phénomène d'**eutrophisation** de ces milieux, c'est à dire leur enrichissement en nutriments, notamment en azote et phosphore. Ces apports associés à des conditions favorables de développement, permettent à certaines espèces de cyanobactéries de croître très rapidement et de former des **efflorescences mono ou plurispécifiques** (Chorus & Bartram, 1999). Ce phénomène a, entre autres conséquences écologiques, celles de réduire la biodiversité phytoplanctonique du milieu et de créer une anoxie liée à la dégradation de la biomasse algale (Chorus & Bartram, 1999).

Nuisances

Par ailleurs, ces efflorescences engendrent des nuisances pour les utilisateurs de la ressource en eau (gestionnaires, sociétés de traitement de l'eau, pêcheurs, baigneurs...) tant visuelles, qu'olfactives, ou encore techniques (pour le traitement des eaux par exemple, avec la nécessité d'une filtration). D'autre part, des précautions doivent être prises en considération car certaines espèces formant des efflorescences sont potentiellement toxiques.

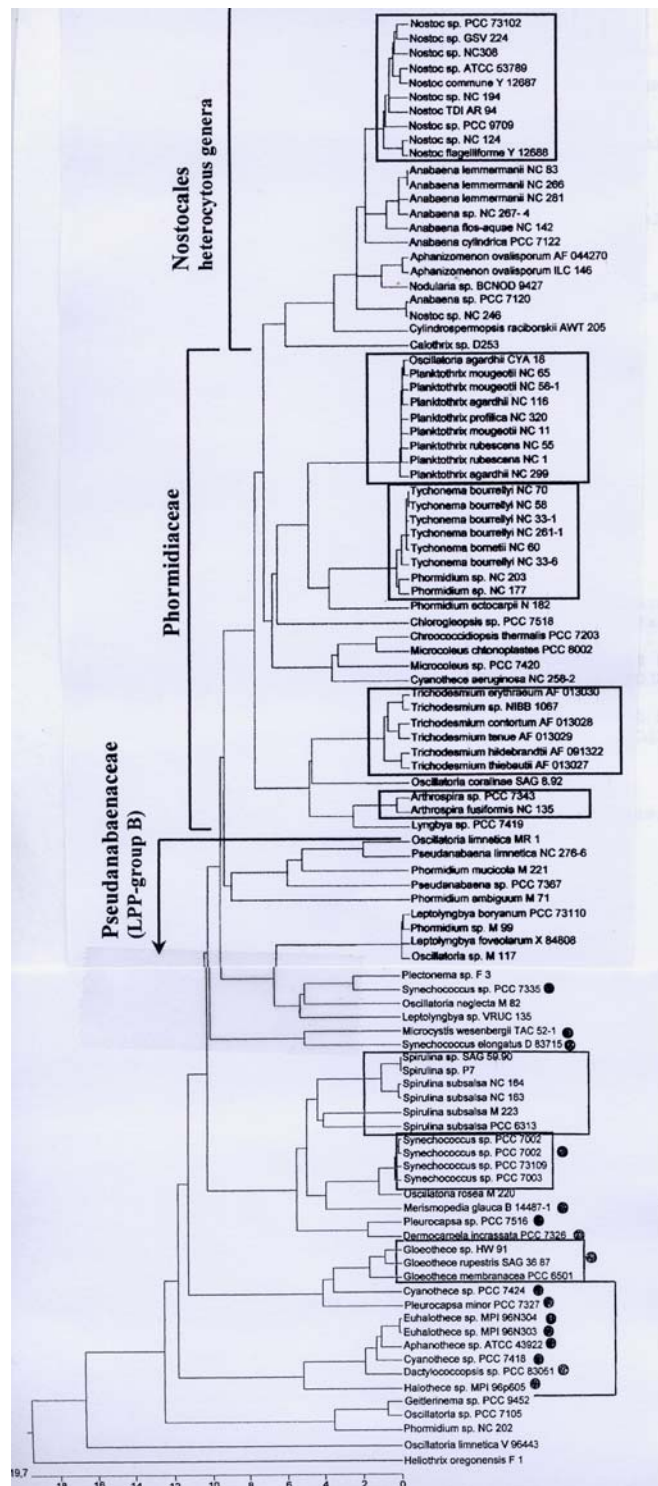


Figure 1 : Phylogénie basée sur l'analyse de l'ADNr 16S de cyanobactéries, d'après Komárek & Kaštovský, 2003

2.4. Toxicologie

Cyanotoxines et pathologies associées

Actuellement, vingt genres et plus de quarante espèces sont connus pour synthétiser des toxines (Berger, 2005). A ce jour, trois types de **cyanotoxines** classés en fonction des pathologies qu'elles engendrent, sont répertoriés à travers le monde (Tableau 2).

Noms	Type de toxine	Pathologies associées
Microcystines	hépatotoxines	troubles hépatiques, vomissements et diarrhées, pouvant entraîner la mort par lyse hépatique
Nodularines		
Cylindrospermopsine		
Anatoxine-a et homoanatoxine-a	neurotoxines	atteinte du système nerveux, induisant une paralysie flasque ou statique pouvant entraîner la mort par arrêt respiratoire
Anatoxine-a (S)		
Toxines paralysantes (PSP ou Paralytic Shellfish Poisons)		
Lyngbyatoxine-a	dermatotoxines	dermatoses et désordres gastriques
Lipopolysaccharides (LPS)		fièvre, frisson et hypertension

Tableau 2 : Cyanotoxines et pathologies associées, d'après Chorus & Bartram (1999)

Règlementation

Compte tenu de ces pathologies et de l'augmentation des efflorescences de cyanobactéries, l'**Organisation Mondiale de la Santé (OMS)** a été la première institution à recommander une réglementation sur la concentration de toxines de cyanobactéries dans l'eau de distribution. Le seuil de tolérance a été fixé à une équivalence de $1\mu\text{g eq MC-LR L}^{-1}$ (Microcystine-LR, hépatotoxine la plus couramment observée et la plus toxique) (Chorus & Bartram, 1999).

3. CONTEXTE ET OBJECTIFS

3.1. Contexte mondial

La surveillance de ces efflorescences est donc une nécessité. Or, très peu de gouvernements appliquent cette réglementation et seuls quelques réseaux de surveillance ont vu le jour, tels que le réseau européen « Cyanotoxic » (Allemagne, Angleterre, Danemark, Espagne, Finlande, Luxembourg, Pologne, Portugal et Suisse) ou le réseau de l'UNESCO « CyanoNet ». Cette volonté de gestion des risques n'apparaît toutefois que dans les pays ayant les moyens économiques d'assumer cette surveillance.

3.2. Contexte africain

Dans les pays émergents d'Afrique sub-saharienne, l'eau potable provient essentiellement de réservoirs de surface. Les systèmes de collecte et de traitement des eaux sont quasi inexistantes ou inefficaces. Or, les conditions environnementales (climat, eutrophisation etc...) sont propices aux développements massifs de cyanobactéries.

A ce jour, il n'existe que quinze travaux publiés mettant en évidence la présence de cyanotoxines sur ce continent (Figure 2).

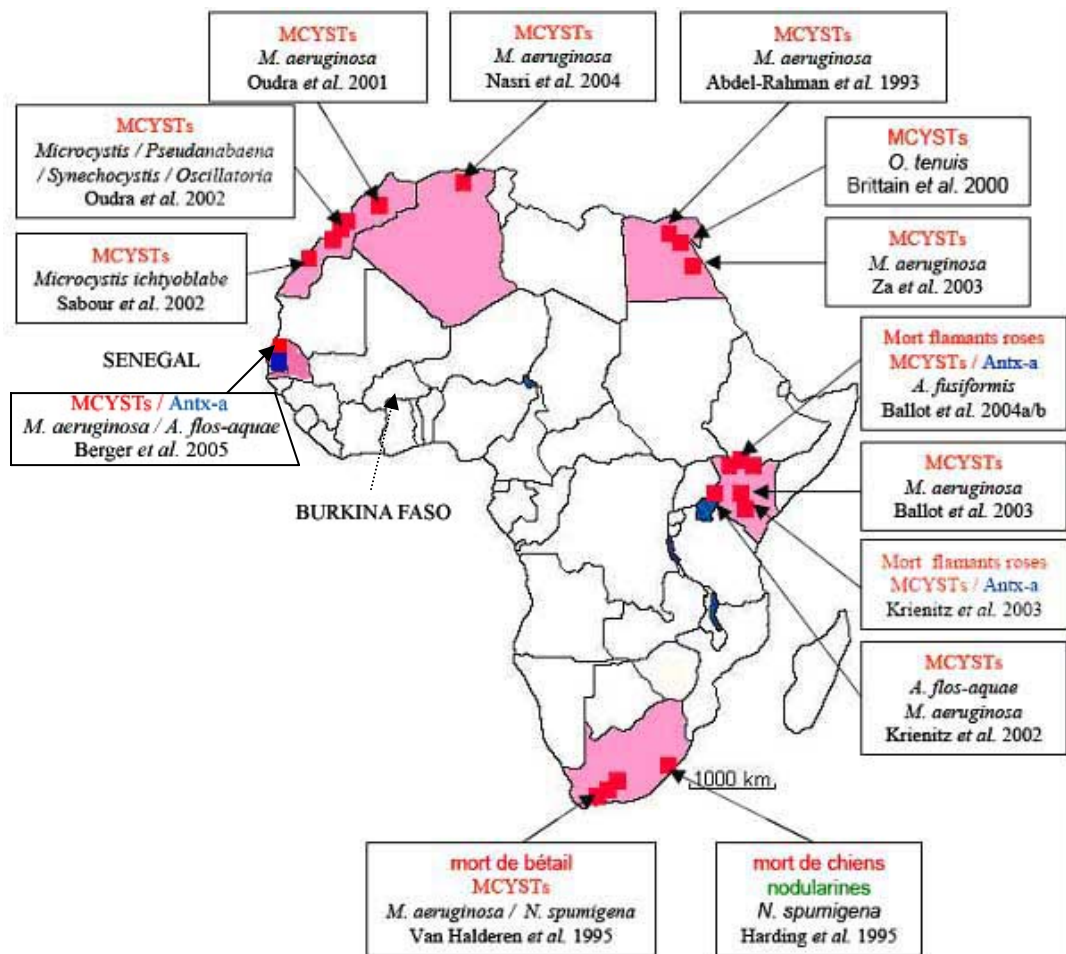


Figure 2 : Localisation des lacs contaminés par des cyanobactéries productrices de toxines en Afrique, d’après Berger (2005)

Toutefois, aucun travaux concernant les cyanobactéries toxiques n’avaient été publiés concernant l’Afrique de l’ouest avant la mise en place des Unité de Recherche 098 « Efflorescences algales » (FLAG), et 167 « CYROCO » de l’Institut de Recherche pour le Développement (IRD). Cet organisme a donc organisé des missions de prospection multidisciplinaires, notamment au Sénégal et au Burkina Faso auxquelles l’unité 505 du MNHN a participé (Annexe 1).

3.3. Contexte de l’étude

L’objectif de ces missions était double. Devant l’absence de données existantes sur la biodiversité dans cette partie du monde, une des priorités étaient d’évaluer la biodiversité phytoplanctonique des zones prospectées. Et ceci afin de pouvoir intégrer la biodiversité africaine dans un cadre plus global, en la comparant aux données existantes à une échelle mondiale. En parallèle, ont été étudiés les risques encourus en cas d’efflorescences à cyanobactéries toxiques lors des prospections, par le biais de l’estimation de la biodiversité et de leur potentiel toxinique. Ainsi, la collection PMC (Paris Muséum Collection) a été enrichie avec des souches africaines, grâce aux isollements de cyanobactéries effectués à partir des prélèvements de terrain (Tableau 3).

Ordres présents	Sénégal		Burkina Faso	
	Nombre de genres dans l'inventaire	Nombre de genres en collection	Nombre de genres dans l'inventaire	Nombre de genres en collection
Chroococcales	9	2	9	2
Oscillatoriales	14	2	10	6
Nostocales	6	5	4	3
TOTAL	29	9	23	11

Tableau 3 : Cyanobactéries observées sur le terrain et mises en collection

3.4. Objectifs de l'étude

L'étude suivante s'inscrit dans la lignée de ces travaux afin d'étudier la diversité phylogénétique et toxinique de souches de cyanobactéries isolées du Sénégal et du Burkina Faso en répondant aux questions suivantes :

- quelle est la position phylogénétique de cyanobactéries africaines ?
- quelle est la diversité infraspécifique du genre *Microcystis* ?
- quelle est la diversité toxinique des souches étudiées ?

4. MATÉRIEL & MÉTHODES

4.1. Conservation en collection et cultures des souches étudiées

Collection PMC

Actuellement, la collection PMC compte 70 souches isolées de 9 sites de prospection du Sénégal (Annexe 2) et 30 souches isolées de 11 sites de prospection du Burkina Faso (Tableau 4). Elles sont maintenues dans des flasques stériles dans deux types de milieu de culture Z8 et Z8X (sans azote pour les espèces pouvant assimiler l'azote atmosphérique) (Kotai, 1972). Les flasques sont conservées dans une enceinte thermostatée dans des conditions standards : 25 °C avec une photopériode de 16:8 heures (lumière : obscurité) et une intensité lumineuse d'environ 20 $\mu\text{E cm}^{-2}$.

Culture des souches étudiées

Pour l'étude de la diversité générique, vingt-six souches de la collection PMC, ont été sélectionnées. Les souches ont été choisies afin de privilégier celles provenant de sites très sollicités par les populations locales, tels que le lac de Guiers au Sénégal et les sites du bassin du Nakambé au Burkina Faso, tout en conservant, pour les deux pays, la diversité générique des souches en collection. Ainsi, nous avons sélectionné 22 souches burkinabées sur les 30 en collection (Tableau 4) et 19 souches sénégalaises sur les 70 en collection (Tableau 5).

Afin de limiter les risques de contamination de la collection, les souches étudiées ont été dupliquées dans des flasques de 25 cm² (NUNC, Danemark), contenant 1 mL de culture et 9mL de milieu pour le séquençage des gènes et dans des erlens stériles de 125mL, contenant 50 mL de culture pour la toxicité. Ces souches ont été cultivées pendant 3 à 4 semaines dans les conditions de culture standards citées précédemment, jusqu'à ce qu'elles atteignent une phase maximale de croissance. Elles ont ensuite été traitées directement (pour le séquençage) ou centrifugées, pour éliminer le milieu de culture, avant d'être lyophilisées, puis conservées au congélateur (pour l'analyse des toxines).

N° PMC	Espèce	Site de récolte	Bassin hydrographique	Extraction d'ADN	Séquence(s) amplifiée(s)	Détection de toxines
241.05	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Ouahigouya (BF7)	Nakambé	kit QuiaGen	p16S, ITS1	ESI-MS(2) & test PP2a
243.05	<i>Cylindrospermopsis curvispora</i>	Dem (BF2)	Nakambé			ESI-MS(2)
245.05	<i>Cylindrospermopsis curvispora</i>	Dem (BF2)	Nakambé	_	p16S	ESI-MS(2)
246.05	<i>Anabaena sphaerica</i>	Dem (BF2)	Nakambé			ESI-MS(1)
247.05	<i>Microcystis wesenbergii</i>	Ouahigouya (BF7)	Nakambé	kit QuiaGen	p16S, ITS1	ESI-MS(2) & test PP2a
248.05	<i>Microcystis flos-aquae/viridis ?</i>	Ouahigouya (BF7)	Nakambé	kit QuiaGen	ITS1	ESI-MS(2) & test PP2a
249.05	<i>Microcystis wesenbergii</i>	Ouahigouya (BF7)	Nakambé	kit QuiaGen	ITS1	ESI-MS(2) & test PP2a
250.05	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Sourou (BF8)	Mouhoun	_	ITS1	ESI-MS(1) & test PP2a
251.05	<i>Microcystis viridis</i>	Sourou (BF8)	Mouhoun	kit QuiaGen	p16S, ITS1	ESI-MS(2) & test PP2a
252.05	<i>Jaaginema homogeneous</i>	Kompienga (BF14)	Pendjari	_	p16S	ESI-MS(2)
253.05	<i>Planktothrix</i> sp.	Koupela Itenga (BF15)	Nakambé			ESI-MS(2) & test PP2a
254.05	<i>Planktothrix agardhii</i>	Toussiana (BF19)	Comoé	_	p16S	ESI-MS(1) & test PP2a
255.05	<i>Planktothrix agardhii</i>	Toussiana (BF19)	Comoé			ESI-MS(1) & test PP2a
256.05	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Toussiana (BF19)	Comoé	_	ITS1	ESI-MS(1) & test PP2a
257.05	<i>Microcystis wesenbergii</i>	Toussiana (BF19)	Comoé	kit QuiaGen	ITS1	ESI-MS(1) & test PP2a
258.05	<i>Planktothrix clathrata</i>	Nombamba (BF23)	Mouhoun			ESI-MS(1)
259.05	<i>Planktothrix clathrata</i>	Nombamba (BF23)	Mouhoun			ESI-MS(1)
260.06	<i>Merismopedia punctata</i>	Bam (BF1)	Nakambé	kit QuiaGen	p16S	ESI-MS(1)
262.06	<i>Cylindrospermopsis curvispora</i>	Dem (BF2)	Nakambé			ESI-MS(1)
263.06	<i>Anabaena sphaerica</i>	Dem (BF2)	Nakambé			ESI-MS(1)
266.06	<i>Anabaena sphaerica</i>	Sian (BF3)	Nakambé			ESI-MS(1)
267.06	<i>Anabaena sphaerica</i>	Sian (BF3)	Nakambé	_	p16S	ESI-MS(1)
268.06	<i>Pseudanabaena mucicola</i>	Sian (BF3)	Nakambé	_	p16S	ESI-MS(1)
269.06	<i>Pseudanabaena mucicola</i>	Sian (BF3)	Nakambé			ESI-MS(1)
271.06	<i>Planktolynghya limnetica</i>	Fada N'Gourma (BF13)	Niger	_	p16S	ESI-MS(1)
272.06	<i>Limnothrix redekei</i>	Kompienga (BF14)	Pendjari	_	p16S	ESI-MS(2)
273.06	<i>Planktothrix agardhii</i>	Koupela Itenga (BF15)	Nakambé			ESI-MS(1)
274.06	<i>Phormidium chlorinum</i>	Dissin (BF18)	Mouhoun	_	p16S	ESI-MS(2)
275.06	<i>Calothrix</i> sp.	Dissin (BF18)	Mouhoun	chloroforme	p16S	ESI-MS(2)
276.06	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Toussiana (BF19)	Comoé	kit QuiaGen	ITS1	ESI-MS(1) & test PP2a

(1) extraction du 25.04.06 ; (2) extraction du 04.05.06 ; PMC 248.05 l'identification entre *M. flos-aquae* et *M. viridis* n'a pu être confirmée.

Tableau 4 : Liste des souches burkinabées en collection et études réalisées (méthodes d'extraction d'ADN, séquences disponibles, études de toxicité)

N° PMC	Espèce	Site de récolte	Extraction d'ADN	Séquence(s) amplifiée(s)
151.02	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Ile de Tieng (S)	kit QuiaGen	ITS1
152.02	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Ile de Tieng (S)	kit QuiaGen	ITS1
155.02	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Djoudj (S)	–	p16S, ITS1
156.02	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Djoudj (S)	–	ITS1
158.02	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Djoudj (S)	–	ITS1
159.02	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Djoudj (S)	kit QuiaGen	ITS1
161.02	<i>Pseudanabaena</i> sp.	Dakar Bango (S)	–	p16S
184.03	<i>Cylindrospermopsis curvispora</i>	Lac de Guiers (S)	–	p16S
185.03	<i>Cylindrospermum</i> sp.	Lac de Guiers (S)	–	p16S
192.03	<i>Anabaenopsis circularis</i>	Djoudj (S)	–	p16S
202.03	<i>Anabaena solitaria</i>	Dakar Bango (S)	kit QuiaGen	p16S
207.03	<i>Anabaena flos-aquae</i>	Dakar Bango (S)	kit QuiaGen	p16S
210.03	<i>Aphanizomenon issatchenkoi</i>	Dakar Bango (S)	–	p16S
215.03	<i>Anabaena bergii</i>	Lac de Guiers (S)	kit QuiaGen	p16S
228.04	<i>Anabaena sphaerica</i>	Djoudj (S)	–	p16S
232.04	<i>Calothrix</i> sp.	Djeuss (S)	chloroforme	p16S
235.04	<i>Gloeotrichia</i> sp.	Lac de Guiers (S)	chloroforme	p16S
242.05	<i>Merismopedia punctata</i>	Lac de Guiers (S)	kit QuiaGen	p16S

Tableau 5 : Récapitulatif des 18 souches sénégalaises sélectionnées pour l'étude phylogénétique, ainsi que les séquences amplifiées et étudiées et la méthode d'extraction utilisée

4.2. Analyses moléculaires

4.2.1. Extraction d'ADN, amplification et séquençage

Deux approches différentes ont été menées conjointement afin d'estimer la diversité générique et infraspécifique. Dans les deux cas, l'extraction d'ADN, l'amplification et le séquençage ont été réalisés suivant le même protocole :

Extraction d'ADN

Certaines souches, sécrétant trop de mucilage pour amplifier la séquence à partir de la culture directement, une extraction d'ADN a été réalisée avec le kit QuiaGen (Cat. N°69506) (Annexe 3). Pour d'autres souches (Tableaux 5 & 6), sécrétant une gaine et beaucoup de mucilage et résistant à l'extraction via le kit, une extraction au phénol-chloroforme a été réalisée, selon le protocole présenté en Annexe 4.

Amplification et séquençage

L'amplification de l'ADN de chaque souche a été réalisée en triplicat pour un volume final de 50µl par tube, contenant 2µl d'extrait d'ADN (de concentration entre 10 et 20 ng µl⁻¹) ou 8µl de culture, 5µl de tampon « 10X PCR Buffer » (Fermentas, Canada), 5µl de MgCl₂ 25 mM, 4µl de dNTP Mix 10mM chacun, 2µl d'amorces à 10 pmol/µL, 1µl de Taq Polymerase recombinant à 5 u/µL (Fermentas, Canada) et 23 ou 29µl d'eau milliQ. Avant d'ajouter la Taq Polymerase, les préparations sont dénaturées à 95°C pendant 8min, afin de libérer l'ADN des cellules en culture. Puis, une PCR est réalisée en quatre étapes : une étape de dénaturation à 94°C pendant 5min, suivie d'une étape de 30 cycles comprenant une dénaturation à 94°C pendant 30s, une ligation à 57°C pendant 30s et une extension à 72°C pendant 1min30, puis une étape d'élongation à 72°C pendant 5min et enfin une étape de terminaison à 10°C pendant 2min.

Une électrophorèse est ensuite réalisée sous un champ électrique de 40mA, soit 180V, pendant 30 à 40min, afin de faire migrer les produits sur un gel d'agarose 1,5% contenant du bromure d'éthidium (BET). Puis, le gel est photographié sous UV afin de révéler la migration. Les produits ont ensuite été purifiés et séquencés par l'entreprise Genome Express (Meylan, France, www.genome-express.com).

4.2.2. Position phylogénétique des souches de la collection PMC

Choix du marqueur moléculaire et des amorces

Le marqueur le plus usité chez les procaryotes est le gène ribosomal 16S. Il s'agit d'une région génomique très conservée à cause d'une forte pression de sélection (pour conserver la structure secondaire du ribosome). Cependant cette région reste suffisamment variable pour discriminer bon nombre de genres de cyanobactéries (Hoffmann, 2005).

A travers la littérature, il ressort que les 700 premières paires de bases du gène 16S correspondent à la partie la plus variable de ce dernier et sont donc plus informatives que les autres (Gugger & Hoffmann, 2004). Parmi les amorces disponibles, les amorces 27f et 781ab permettent de cibler cette zone (Neilan *et al.*, 1997). Elles sont par ailleurs spécifiques des cyanobactéries ce qui permet de s'abstenir de travailler en conditions axéniques.

4.2.3. Étude de la diversité spécifique

Choix du marqueur moléculaire et des amorces

Les espèces de cyanobactéries peuvent être différenciées grâce à un marqueur moléculaire hypervariable (Neilan *et al.*, 1997), tel qu'un espaceur (zone non codante située entre deux gènes). Nous avons donc choisi d'utiliser l'espaceur (ou ITS pour 'Internal Transcribed Spacer') situé entre l'ADNr 16S et 23S, également appelé ITS1 16S-23S.

Plusieurs amorces permettent d'amplifier cette partie du génome des cyanobactéries, dont celles décrites par Iteman *et al.* (2000), ou encore Neilan *et al.* (1997). Après un essai sur quelques souches sénégalaises et burkinabées, les amorces 16CITS et 23CITS mises au point par Neilan *et al.*, (1997) apparaissent comme étant les mieux adaptées avec une amplification plus importante que les autres.

Choix du genre étudié

Dans la collection, nous disposons de nombreuses souches appartenant à trois genres potentiellement toxiques, les genres *Cylindrospermopsis* Seenaya & Subba Raju et *Anabaena* (Nostocales) et le genre *Microcystis* (Chroococcales). Le genre *Cylindrospermopsis* ayant été étudié lors d'un travail précédent (Gugger *et al.*, 2005), priorité a été donnée dans cette étude aux deux genres restants. D'un point de vue pratique, l'ITS1 16S-23S des Nostocales se divisent en deux amplicons (Gugger *et al.*, 2002), contrairement à celui des Chroococcales, ce qui complique considérablement l'analyse. Nous avons donc choisi d'amplifier l'ITS1 16S-23S du genre *Microcystis*, pour lequel un grand nombre de séquences est disponible dans GenBank (137 séquences contre 14 séquences pour le genre *Anabaena* et aucune pour le genre *Cylindrospermopsis*).

4.2.4. Analyse phylogénétique

Choix des séquences importées de GenBank

Dans GenBank, les séquences d'ADNr 16S des genres et espèces représentées dans la collection, ainsi que les séquences d'ITS1 des espèces du genre *Microcystis*, ont été

recherchées, puis une analyse de distance rapide a été réalisée. Suite à cette analyse, 2 à 5 séquences par genre ou espèce ont été intégrées dans les analyses phylogénétiques (Annexe5).

Alignement des séquences

Les séquences ont été alignées avec le logiciel MEGA 3.1 (Kumar *et al*, 2004) suivant l'algorithme Clustal X (Thompson *et al*, 1994), puis une correction manuelle a été réalisée. Etant peu nombreux, les sites avec des GAP ont été supprimés de l'alignement.

Constructions phylogénétiques

Les arbres phylogénétiques réalisés ont été construits en utilisant la méthode de maximum de vraisemblance avec le logiciel PHYML (Guindon & Gascuel, 2003), ainsi que la méthode de maximum de parcimonie avec le logiciel PAUP 4.0 (Swofford, 2003). Une analyse de bootstrap a été effectuée en 1000 répliquats pour chaque arbre consensus. Dans le cas de la méthode de maximum de vraisemblance, le modèle évolutif le mieux adapté à notre jeu de données à auparavant été sélectionné par le biais du logiciel Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998).

Enracinement

Les arbres obtenus ont été édités à partir du logiciel TreeView (Page, 1996). L'enracinement a été effectué pour l'analyse de l'ADNr 16S complet avec les genres *Synechococcus* Nägeli et *Prochlorococcus* Chisholm comme groupe externe, avec le genre *Spirulina* (Gomont) Turpin pour l'analyse des genres *Anabaena* et *Aphanizomenon*, et enfin, pour l'analyse du genre *Microcystis* avec le genre *Trichodesmium* (Gomont) Ehrenberg.

4.2.5. Étude de la toxicité

Choix des souches étudiées

La toxicité des souches sénégalaises ayant déjà été étudiée (Berger, 2005) (Annexe 2), nous avons seulement étudié ici les souches burkinabées (Tableau 4).

Extraction des cyanotoxines et spectrométrie de masse

Afin de cribler les différents types de cyanotoxines connues (Chorus et Bartram, 1999) (Annexe 6), une analyse en spectrométrie de masse (MS) et, si nécessaire, par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) a été réalisée. Cette méthode a nécessité l'extraction des cyanotoxines de souches lyophilisées. Puis, les différentes catégories de toxines recherchées (CYN, STXs, ANTXs et MCYSTs) ont été séparés sur colonne de silice C18, selon le protocole mis au point dans le laboratoire (Gugger *et al.*, 2005). Ce protocole a été légèrement modifié, en ajoutant du méthanol absolu, pour lyser totalement les parois cellulaires (Annexe 7).

Les spectres de masse ont été effectués sur un spectromètre de masse à temps de vol (Q-Star Pulsar i Applied Biosystem) équipé d'une source d'ionisation à électrospray (ESI), selon le protocole décrit par Gugger *et al.* (2005). Chaque toxine est identifiée à partir de sa masse m/z (Tableau 8). L'intervalle de masses recherchées pour m/z est ainsi compris entre 100 et 1100. Si un pic correspondant à une des molécules recherchées est détecté, l'ion est sélectionné et fragmenté en mode MS/MS. Les masses des ions fils ainsi obtenus permettent alors d'identifier avec certitude la toxine présente dans l'échantillon.

Cyanotoxines	[M-H ⁺]	ion fils
Antx-a	166,13	91 ; 131 ; 149
Antx-a(S)	252	ND
STXs	300	282 ; 204
CYN	416,17	194 ; 176 ; 336 ; 274
MC-LA	910,5	135
MC-LR	995,5	
MC-RR	1038,5	
MC-YR	1045,5	

Tableau 6 : Récapitulatif des masses m/z des ions monochargés [M+H]⁺ attendues en mode MS et des ions fils obtenus en mode MS/MS pour les principales cyanotoxines recherchées
ND : non déterminé - (d'après Dell'Aversano *et al.*, 2004 et Robillot, 2001)

Extraction des cyanotoxines et test PP2a

Pour les espèces connues dans la littérature comme étant potentiellement productrices de MCYSTs, la concentration de toxines produites a été estimée par un test biochimique d'inhibition de la protéine phosphate de type 2a, appelé test PP2a (Rivasseau *et al.*, 1999 ; Robillot & Hennion, 2004), a été réalisé sur ces espèces. Les cyanotoxines ont été extraites selon le protocole décrit par Robillot (2001) (Annexe 8). Ce test, réalisé en micro-plaque 96 puits, est basé sur la dégradation du para-nitrophényl phosphatase (incolore) en para-nitrophénol (jaune). Cette réaction est inhibée en présence de MCYSTs et le pourcentage d'inhibition est mesuré via l'absorbance mesurée à 405 nm. Les concentrations en microcystines totales sont estimées grâce à une gamme de calibration de standard de MC-LR et exprimées en équivalent de MC-LR par mg de lyophilisat extrait.

5. RÉSULTATS

5.1. Position phylogénétique des souches de la collection PMC

Les analyses phylogénétiques portant sur le gène 16S (Figure 3) ont été effectuées sur 22 séquences africaines (S & BF) et 49 séquences de GenBank, par les méthodes de maximum de parcimonie (MP) et maximum de vraisemblance (ML). Les séquences alignées comportent 433 pb avec un pourcentage de G+C moyen de $54,3 \pm 1,1$. Pour le maximum de vraisemblance, le modèle le mieux adapté pour les séquences p16Sr est celui de GTR (General Time Reversible, Rodriguez *et al.*, 1990) avec coefficient de variation du taux de substitution parmi les sites (gamma) de 0,88 et une proportion de sites invariables (pinvar) de 0,58.

Les deux arbres obtenus en ML et en MP présentent une topologie similaire, un seul est donc présenté ici (Figure 3). Au niveau de la topologie générale de l'arbre obtenu en ML, nous pouvons distinguer trois groupes représentant les trois ordres étudiés, les Chroococcales, les Oscillatoriales et les Nostocales. En effet, ces trois ordres semblent polyphylétiques. Un taxon est dit polyphylétique quand il comprend un ancêtre hypothétique commun, mais pas tous ses descendants, ceci est bien visible chez les Oscillatoriales qui s'insèrent en partie chez les Nostocales. Ainsi, deux groupes se distinguent, avec d'un côté *Limnothrix* Meffert, et *Jaaginema* Anagnostidis & Komàrek se rapprochent du groupe *Anabaena/Aphanizomenon* (Nostocales), tandis que les genres *Planktothrix*, *Arthrospira* et *Phormidium* (Gomont) Kützing s'insèrent de façon non soutenue chez les Oscillatoriales. Il en est de même pour le groupe *Pseudanabaena* Lauterborn /*Spirulina/Planktolyngbya* Anagnostidis & Komàrek (Oscillatoriales) et le genre *Merimopedia* Meyen (Chroococcales). Cependant, ce dernier genre semble monophylétique, il comprend un ancêtre hypothétique commun avec tous ses descendants, tout comme le genre *Microcystis* (Chroococcales), positionné à la base de l'arbre.

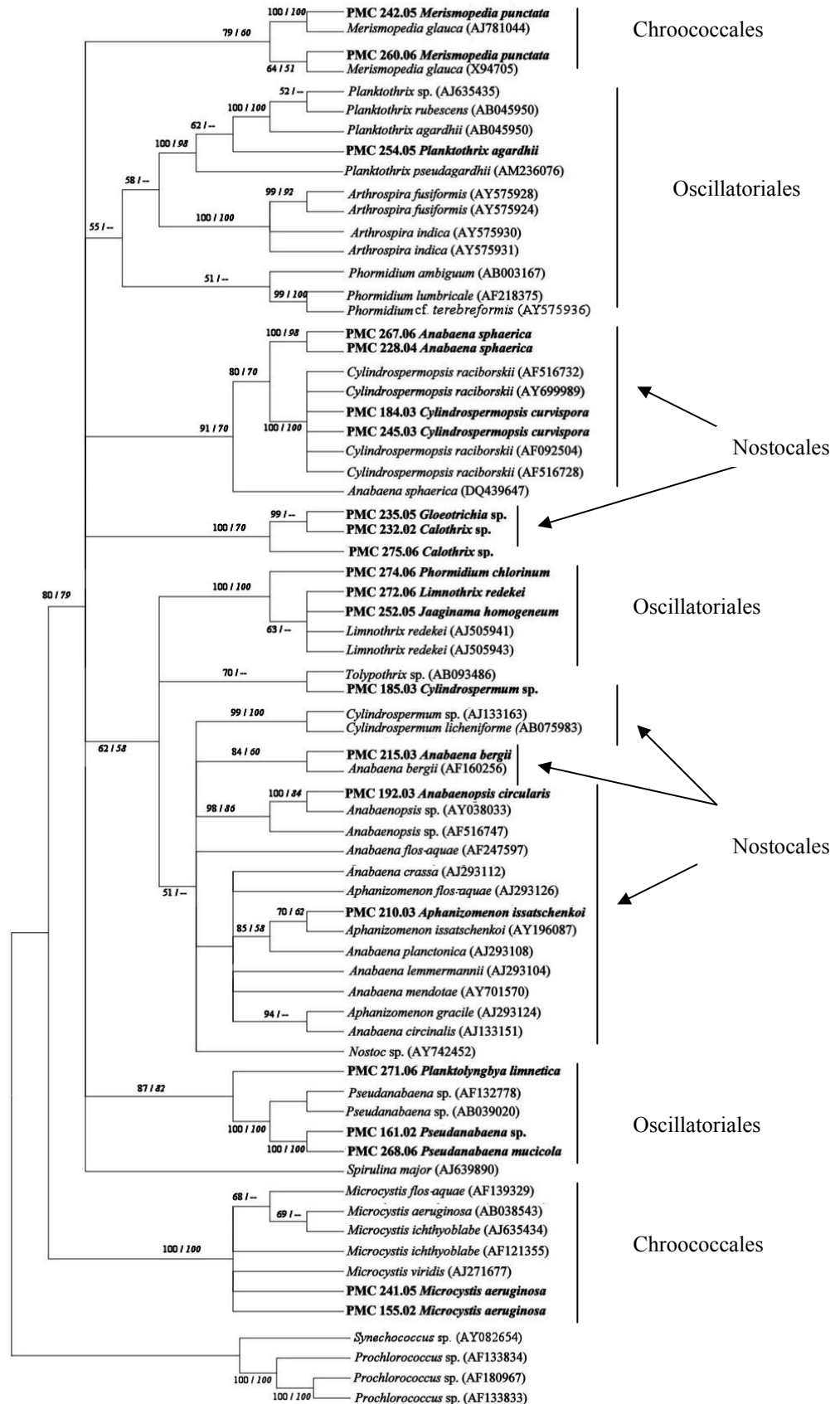


Figure 3 : Arbre phylogénétique consensus de 1000 arbres obtenus en maximum de vraisemblance réalisés à partir de 70 séquences pADNr 16S (433 pb) de cyanobactéries de la collection PMC et de séquences issues de GenBank. Les pourcentages des valeurs de bootstrap correspondant à 1000 répliquats sont reportés au niveau des branches (MP/ML). Les souches africaines séquencées apparaissent en caractère gras.

Les Chroococcales

Dans la phylogénie présentée en Figure 3, les genres *Microcystis* et *Merismopedia* apparaissent comme étant bien soutenus (bootstraps supérieur à 60 %, Figure 3). Toutefois, au sein du genre *Microcystis*, cette analyse ne nous permet pas de distinguer génétiquement les différents morphotypes. De même, l'analyse de 2 séquences de deux espèces de *Merismopedia* ne permet pas de les discriminer clairement.

Les Oscillatoriales

Dans le groupe correspondant aux Oscillatoriales, plusieurs séquences issues de la collection apportent des informations intéressantes. Ainsi, parmi les genres séquencés pour la première fois, *Jaaginema* et *Planktolyngbya* sont placés parmi les Oscillatoriales, *Jaaginema* étant plus proche du genre *Limnothrix*, tandis que *Planktolyngbya* se rapproche du genre *Pseudanabaena*. Ces résultats sont confortés par des valeurs de bootstrap soutenues, tant en ML qu'en MP. Un autre genre appartenant aux Oscillatoriales, *Phormidium*, apparaît clairement polyphylétique avec les trois séquences issues de GenBank proches de celles de *Planktothrix* tandis que la séquence issue du Burkina-Faso s'insère dans le groupe contenant *Jaaginema* et *Limnothrix*.

Les Nostocales

Parmi les Nostocales, le genre *Gloeotrichia* Agardh (séquencé pour la première fois) est regroupé avec le genre *Calothrix* (Bornet & Flahault) Agardh. Les séquences de GenBank du genre *Cylindrospermum* Kützing sont regroupées entre elles, mais la séquence sénégalaise en est très éloignée et se rapproche d'une séquence identifiée comme un *Tolypothrix* (Bornet & Flahault) Kützing. Parmi le genre *Cylindrospermopsis*, les espèces *C. curvispora* Watanabe et *C. raciborskii* (Woloszyńska) Seenayya & Subba Raju ne semble pas être discriminées entre elles. Quant au genre *Anabaenopsis* Woloszyńska, il est fortement soutenu.

Pour les genres *Anabaena* et *Aphanizomenon*, la situation est complexe (Figure 4) et l'introduction d'un plus grand nombre de séquences a été nécessaire afin de préciser la position phylogénétique d'un certain nombre de nos séquences.

Cette analyse a été effectuée sur 8 séquences africaines (S & BF) et 35 séquences de GenBank, par les méthodes de maximum de parcimonie (MP) et maximum de vraisemblance (ML) avec le même modèle que pour les séquences de p16Sr. Nous avons utilisé 2 séquences du genre *Spirulina* comme groupe externe. Il semble impossible de discriminer les genres *Anabaena* et *Aphanizomenon* entre eux, ainsi que les différentes espèces en présence. En effet, les espèces de ces deux genres forment une polytomie avec d'autres groupes bien soutenus, comme *Anabaenopsis*, *Anabaena bergii* (Ostenfeld) et *Cylindrospermum* à la base. Seule une espèce, *Anabaena sphaerica* (Bornet & Flahault), se détache de ce groupe et se rapproche du genre *Cylindrospermopsis*. Ce groupe se trouve à la base du précédent et est soutenu par des valeurs de bootstrap supérieures à 60 en ML.

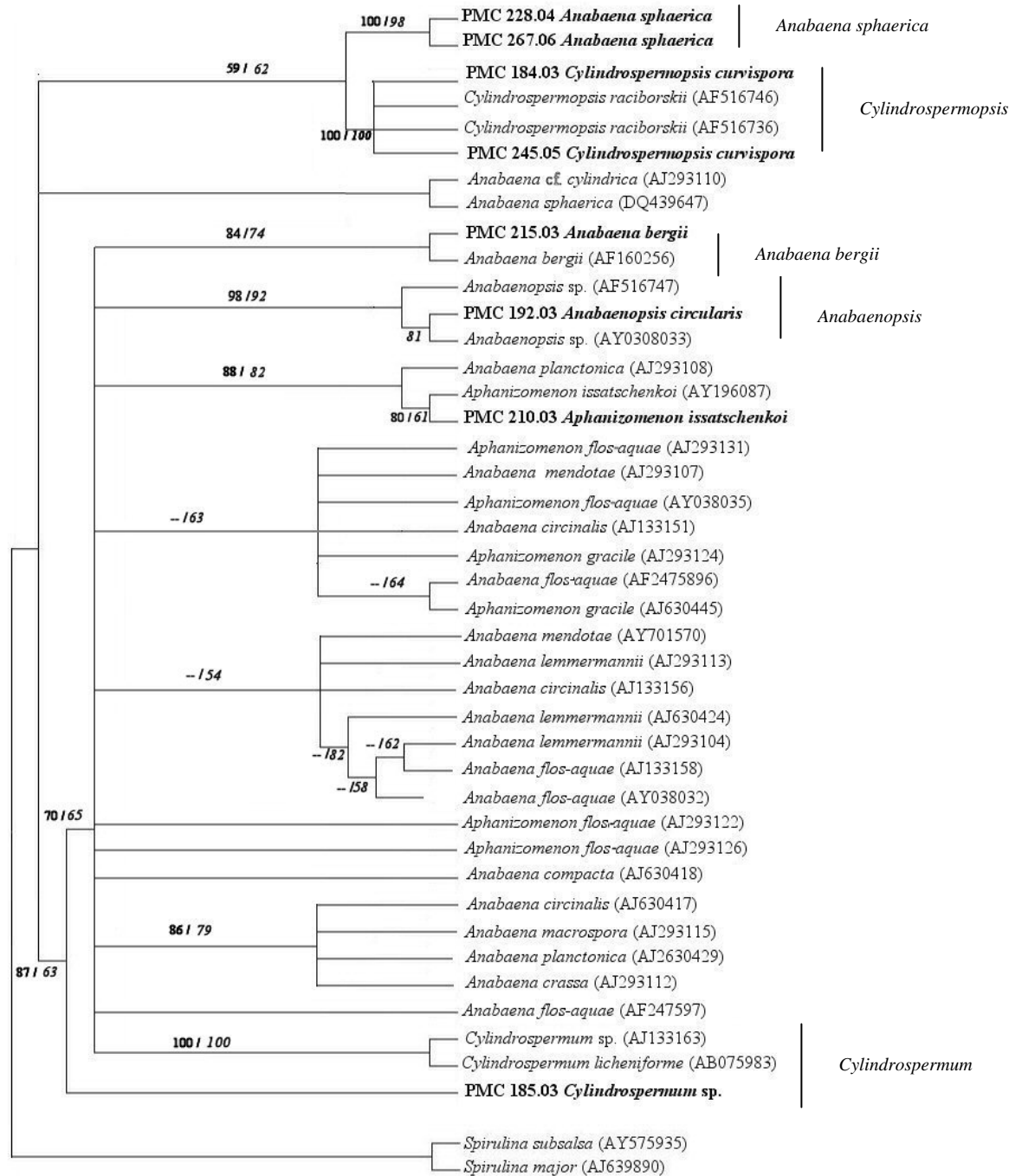


Figure 4 : Arbre phylogénétique consensus de 1000 arbres obtenus en maximum de vraisemblance réalisés à partir de 43 séquences pADNr 16S (433 pb) de cyanobactéries appartenant aux Nostocales de la collection PMC et de séquences issues de GenBank. Les pourcentages des valeurs de bootstrap sont reportés au niveau des branches (MP/ML) et correspondant à 1000 répliquats. Les souches africaines séquencées apparaissent en caractère gras.

5.2. Étude de la diversité spécifique

Deux analyses phylogénétiques ont été effectuées sur 14 souches africaines et 13 souches de GenBank. Ces dernières ont été choisies parce que leur identification était avérée dans des publications et pour certaines, nous disposons des séquences du gène 16S et de l'ITS1 16S-23S. Cinq espèces du genre *Microcystis* se trouvent parmi les souches étudiées : *M. aeruginosa* (Kützing) Kützing, *M. flos-aquae* (Wittrock) Kirchner, *M. ichthyoblabe* Kützing, *M. viridis* (Braun in Rabenhorst) Lemmermann et *M. wesenbergii* (Komárek) Komárek in Kondratieva. La première analyse est basée sur les séquences pADNr 16S et la deuxième sur les séquences partielles d'ITS1 16S-23S. Les méthodes utilisées sont le maximum de parcimonie et le maximum de vraisemblance. Pour les séquences pADNr 16S, le modèle évolutif le mieux adapté est le modèle Hasegawa-Kishino-Yano (HKY ; Hasegawa *et al.*, 1985) avec un coefficient de variation du taux de substitution parmi les sites (gamma) de 0,15 tandis que pour les séquences d'ITS1 16S-23S, il s'agit du modèle unequal-frequency Kimura 3-parameter (K81uf+G ; Kimura, 1981) avec un gamma de 0,75. Nous avons utilisé une séquence du genre *Trichodesmium* comme groupe externe, en utilisant la même souche pour les deux analyses.

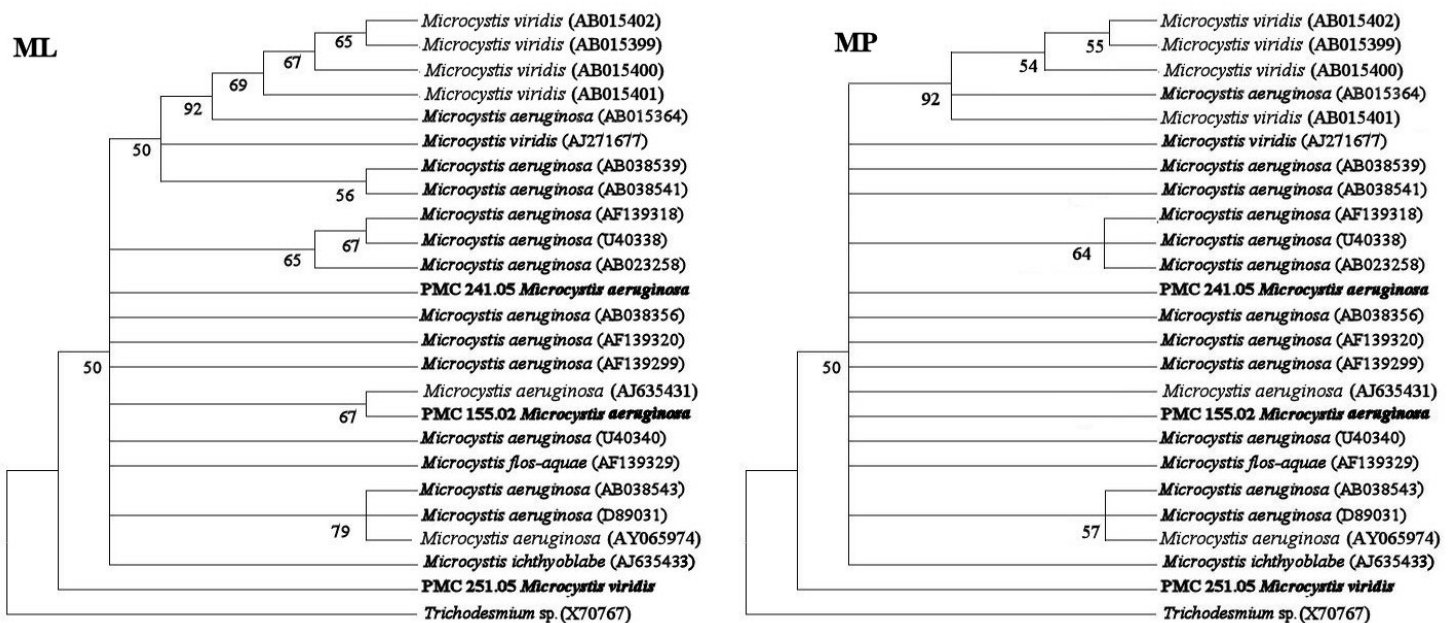


Figure 5 : Arbres phylogénétiques consensus de 1000 arbres obtenus en maximum de vraisemblance (ML) et de 21628 arbres obtenus en maximum de parcimonie (MP) réalisés à partir de 25 séquences pADNr 16S (244 pb) de *Microcystis* de la collection PMC et de séquences issues de GenBank.

Les pourcentages des valeurs de bootstrap sont reportés au niveau des branches et correspondent à 1000 répliquats. Les souches africaines séquencées apparaissent en caractère gras.

La figure 5 ci-dessus montre un signal phylogénétique faible, tant en ML qu'en MP. En effet, les séquences pADNr 16S sont toutes rassemblées et forme une polytomie avec à sa base, une séquence burkinabée de *M. viridis*. Cependant, au sein de cette polytomie, un groupe se distingue avec des séquences de *M. viridis* et quelques unes de *M. aeruginosa*, toutes de GenBank. Au niveau de ce groupe, quelques différences sont observables selon la méthode d'analyse. Ainsi, en ML, ce groupe comprend huit séquences et en MP, il n'en comprend que cinq. Enfin, avec les deux méthodes, deux groupes de trois séquences de *M. aeruginosa* de GenBank se détache des autres et sont plus ou moins bien soutenus à plus de 57 % en MP et plus de 65 % en ML.

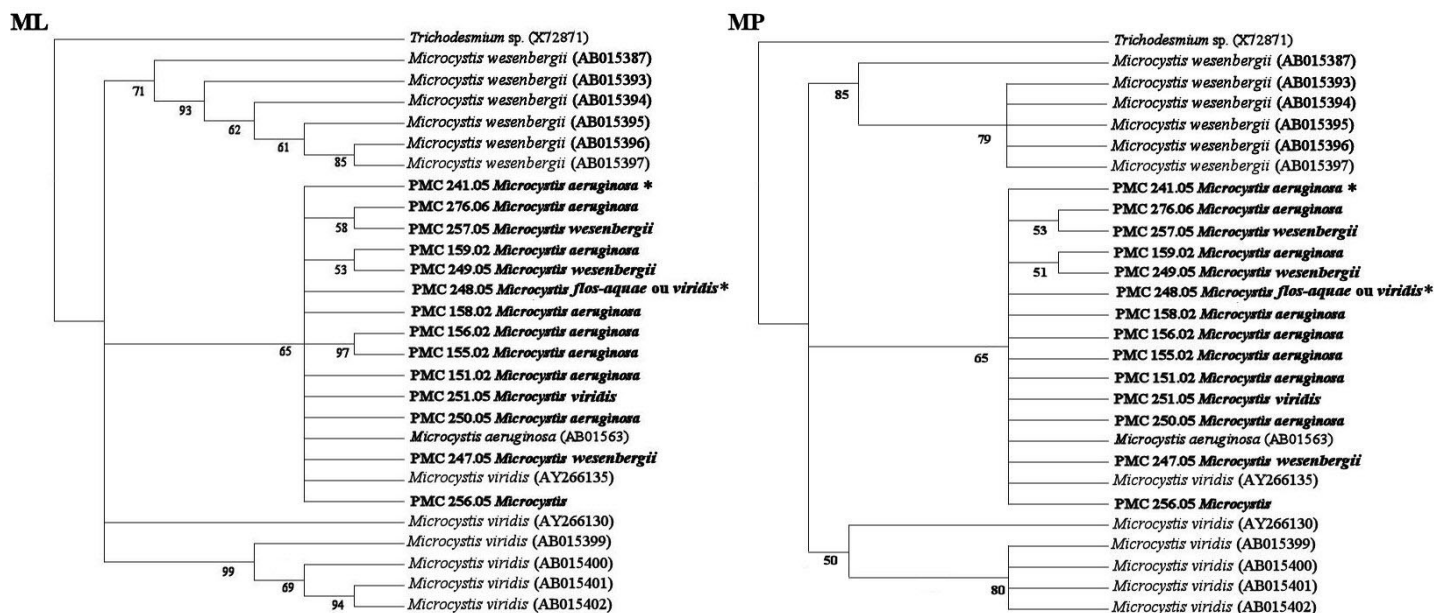


Figure 6 : Arbres phylogénétiques consensus de 1000 arbres obtenus en maximum de vraisemblance (ML) et de 159000 arbres obtenus en maximum de parcimonie (MP) réalisés à partir de 28 séquences partielles d'ITS1 16S-23S (379 pb) de *Microcystis* de la collection PMC et de séquences issues de GenBank. Les pourcentages des valeurs de bootstrap sont reportés au niveau des branches et correspondent à 1000 réplicats. Les souches africaines séquencées apparaissent en caractère gras. Les souches toxiques sont indiquées par une étoile.

La figure 6 ci-dessus montre un signal phylogénétique un plus résolu que précédemment, qui est presque identique aussi bien en ML qu'en MP. En effet, les séquences de l'ITS1 16S-23S soutiennent trois gros groupes distincts : un groupe de séquences de Genbank de *M. wesenbergii* du Japon à 70 % en ML et 85 % en MP, une polytomie des séquences africaines incluant deux séquences de Genbank et enfin, un groupe de séquences de Genbank de *M. viridis* du Japon soutenu à plus à 99% en ML et 80 % en MP. Seules les séquences de *M. viridis* d'Espagne sont plus proches des souches africaines.

5.3. Étude de la toxicité

Dans un premier temps, nous avons recherché les cyanotoxines connues en ESI-MS. Seuls deux souches de *Microcystis* (PMC 241.05 et PMC 248.05) possédaient un ion de m/z 910,5 correspondant à la masse de la MC-LA (Figure 7a). Pour confirmer qu'il s'agissait bien de cette toxine, nous avons fragmenté cet ion (mode MS/MS) et obtenu un ion fils caractéristique de m/z 135, correspondant au groupement ADDA (Figure 7b et Annexe 6).

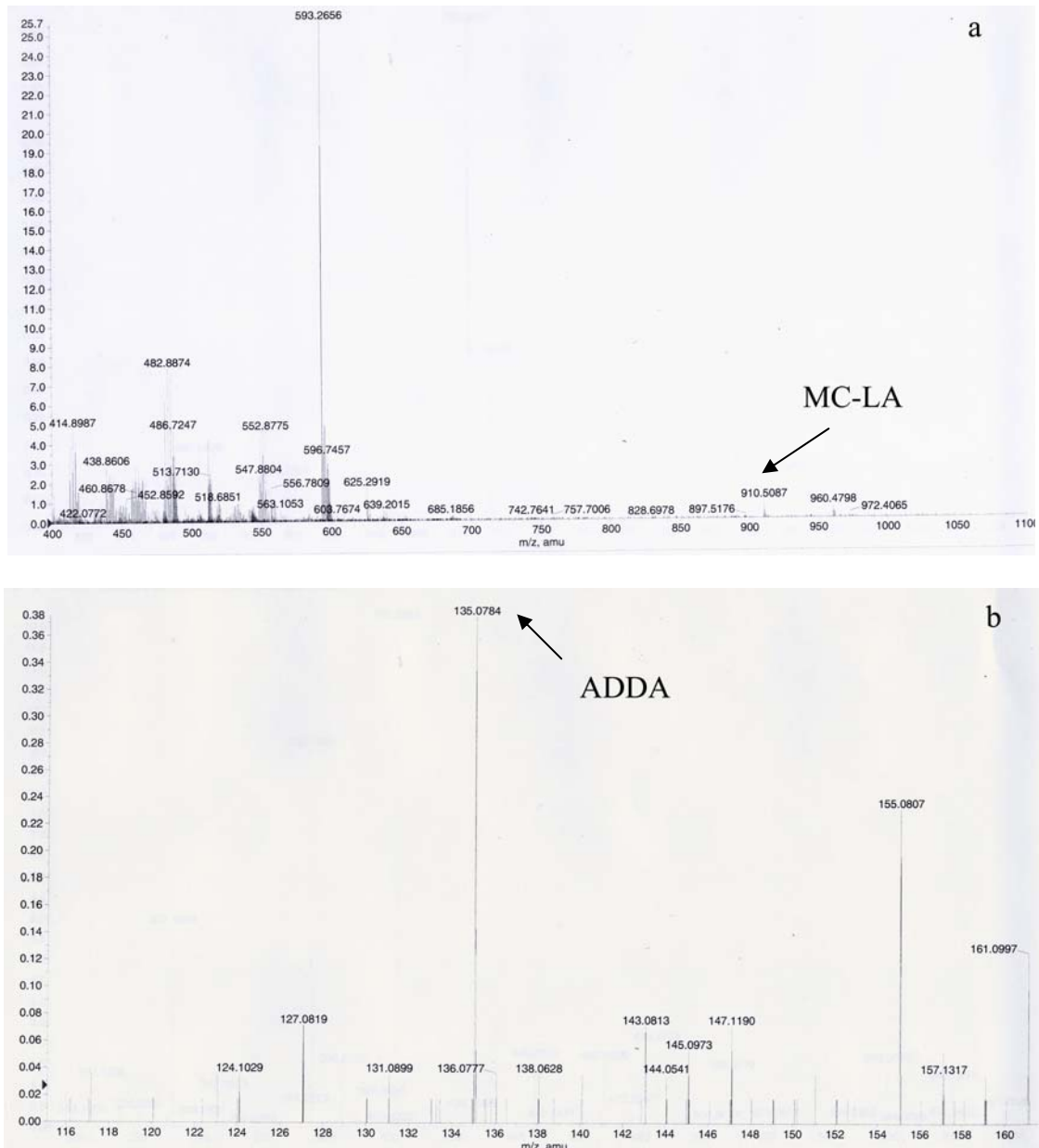


Figure 7 : Spectres ESI-MS (a) et ESI-MS/MS (b) de la souche PMC 241.05 *Microcystis aeruginosa* montrant le pic correspondant à la MC-LA et l'ion fils obtenu

Dans un second temps, toutes les espèces potentiellement productrices de MCYSTs ont été testées sur PP2a afin de confirmer la présence de ces toxines et d'estimer leur concentration. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau suivant (Tableau 7). Ici Comme en spectrométrie, seules les souches PMC 241.05 et PMC 248.05 répondent positivement au test. Les concentrations sont estimées à 2,6 et 1,8 $\mu\text{g eq MC-LR}$ par mg de lyophilisat respectivement.

N° PMC	Espèce	Localité	ESI-MS & MS/MS	Test PP2a (µg eq MC-LR par mg de lyophilisat)
241.05	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Ouahigouya (BF7)	MC-LA	2,6
243.05	<i>Cylindrospermopsis curvispora</i>	Dem (BF2)	négatif	
245.05	<i>Cylindrospermopsis curvispora</i>	Dem (BF2)	négatif	
246.05	<i>Anabaena sphaerica</i>	Dem (BF2)	négatif	
247.05	<i>Microcystis wesenbergii</i>	Ouahigouya (BF7)	négatif	
248.05	<i>Microcystis flos-aquae/viridis ?</i>	Ouahigouya (BF7)	MC-LA	1,8
249.05	<i>Microcystis wesenbergii</i>	Ouahigouya (BF7)	négatif	négatif
250.05	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Sourou (BF8)	négatif	négatif
251.05	<i>Microcystis viridis</i>	Sourou (BF8)	négatif	négatif
252.05	<i>Jaaginema homogeneous</i>	Kompienga (BF14)	négatif	
253.05	<i>Planktothrix</i> sp.	Koupela Itenga (BF15)	négatif	négatif
254.05	<i>Planktothrix agardhii</i>	Toussiana (BF19)	négatif	négatif
255.05	<i>Planktothrix agardhii</i>	Toussiana (BF19)	négatif	négatif
256.05	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Toussiana (BF19)	négatif	négatif
257.05	<i>Microcystis wesenbergii</i>	Toussiana (BF19)	négatif	négatif
258.05	<i>Planktothrix clathrata</i>	Nombamba (BF23)	négatif	
259.05	<i>Planktothrix clathrata</i>	Nombamba (BF23)	négatif	
260.06	<i>Merismopedia punctata</i>	Bam (BF1)	négatif	
262.06	<i>Cylindrospermopsis curvispora</i>	Dem (BF2)	négatif	
263.06	<i>Anabaena sphaerica</i>	Dem (BF2)	négatif	
266.06	<i>Anabaena sphaerica</i>	Sian (BF3)	négatif	
267.06	<i>Anabaena sphaerica</i>	Sian (BF3)	négatif	
268.06	<i>Pseudanabaena mucicola</i>	Sian (BF3)	négatif	
269.06	<i>Pseudanabaena mucicola</i>	Sian (BF3)	négatif	
271.06	<i>Planktolynghya limnetica</i>	Fada N'Gourma (BF13)	négatif	
272.06	<i>Limnothrix redekei</i>	Kompienga (BF14)	négatif	
273.06	<i>Planktothrix agardhii</i>	Koupela Itenga (BF15)	négatif	négatif
274.06	<i>Phormidium chlorinum</i>	Dissin (BF18)	négatif	
275.06	<i>Calothrix</i> sp.	Dissin (BF18)	négatif	
276.06	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Toussiana (BF19)	négatif	négatif

Tableau 7 : Résultats des études de toxicité effectuées (ESI-MS et test PP2a) sur les souches burkinabées

6. DISCUSSION

La diversité et la position phylogénétique des cyanobactéries Ouest africaines sont à ce jour encore largement méconnues. La plupart des études publiées pour ce continent concerne les genres toxiques et sont limitées au Maghreb, à l'Afrique de l'Est et du Sud (Figure 2). Sur les 15 publications parues à ce jour, 23 souches productrices de toxines ont été isolées et leur toxicité étudiée mais sans aucune étude phylogénétique associée. Dans ce contexte, l'étude à grande échelle (2 pays, 40 sites sur 6 bassins versants) entreprise par le laboratoire est novatrice. Elle a permis l'estimation de la biodiversité phytoplanctonique, l'étude des risques cyanotoxiques et la création d'une banque de souches africaines. L'identification et le séquençage de ces dernières confirment la complexité de la phylogénie des cyanobactéries.

6.1. Position phylogénétique des souches de la collection PMC

Grâce aux séquences pADNr 16S obtenues, nous confirmons que les trois ordres étudiés (Chroococcales, Oscillatoriales et Nostocales) sont polyphylétiques (Hoffmann, 2005).

Chez les Nostocales, le rapprochement des genres *Anabaena* et *Aphanizomenon* déjà mis en évidence par Gugger *et al.* (2002) et Rajaniemi *et al.* (2005) a été souligné. En effet, ces deux genres ont été définis sur des critères morphologiques, notamment sur la forme des cellules et de l'apex. Ainsi, *Anabaena* a des cellules rondes tandis que celles de *Aphanizomenon* sont cylindriques. Ce genre présente par ailleurs un apex du trichome effilé et une organisation en faisceaux. Cependant, au vue des analyses moléculaires réalisées sur le 16S, ITS1 16S-23S et *rbcLX* (Gugger *et al.*, 2002), ils ne formeraient qu'un seul et même genre. A l'heure actuelle, aucun scientifique n'a entrepris cette révision taxinomique. Celle-ci semble être complexe compte tenu de la disparité phylogénétique observée au sein de ce genre.

Dans ce travail, nous avons pu mettre en évidence que les espèces *Anabaena bergii* et *Anabaena sphaerica* forment chacune des groupes bien distincts et s'éloignent du groupe *Anabaena/Aphanizomenon* (Figures 3 et 4). *A. bergii* se rapprocherait, d'après la séquence 16S étudiée, du genre *Anabaenopsis*. Pourtant, leur morphologie est nettement différente : *A. bergii* possède des hétérocytes intercalaires, des cellules terminales coniques et une enveloppe mucilagineuse assez marquée notamment autour des cellules différenciées. A l'inverse, le genre *Anabaenopsis* possède des hétérocytes terminaux et doubles en position médiane et un mucilage peu abondant ou très diffus. *A. bergii* est également la seule espèce d'*Anabaena* connue pour produire de la CYN (Wilson *et al.*, 2000), apportant un élément supplémentaire de son éloignement des autres *Anabaena*.

Concernant *Anabaena sphaerica*, les séquences se rapprochent du genre *Cylindrospermopsis* (Figures 3 & 4). Notons que les 2 séquences des souches africaines (en gras) sont regroupées et se rapprochent plus du groupe des *Cylindrospermopsis* que de la séquence indienne d'*A. sphaerica* (DQ439647). Or la morphologie de ces deux genres diffère par la forme et la position des hétérocytes et des akinètes : *A. sphaerica* possède des akinètes sphériques de part et d'autre des hétérocytes intercalaires, tandis que *Cylindrospermopsis* possède des hétérocytes terminaux et des akinètes intercalaires plutôt cylindriques (Figure 8). Toutefois, le faible nombre de séquences d'*A. sphaerica* entraîne un biais certain. Une meilleure résolution de la position phylogénétique de cette espèce pourrait être obtenue en augmentant le nombre de séquençage de souches identifiées de façon certaine mais également en séquençant d'autres gènes.

Au sein du groupe des *Cylindrospermopsis*, qui forme un groupe monophylétique bien défini, les espèces ne sont pas discriminées, ce qui peut s'expliquer par une morphologie proche. En effet, *C. curvispora* se présente sous la forme d'un trichome spiralé de façon plus ou moins lâche, avec des akinètes réniformes. *C. raciborskii* présente quant à lui de nombreuses formes de trichomes (droit, flexueux ou spiralé) avec des akinètes cylindriques ou ovoïdes. L'analyse des séquences 16S tendent à laisser penser qu'un regroupement des deux espèces en une serait possible. Les variations morphologiques pourrait être alors considérées comme révélatrices de l'existence de morphotypes ou écotypes comme le souligne Komárek & Komárková (2003).

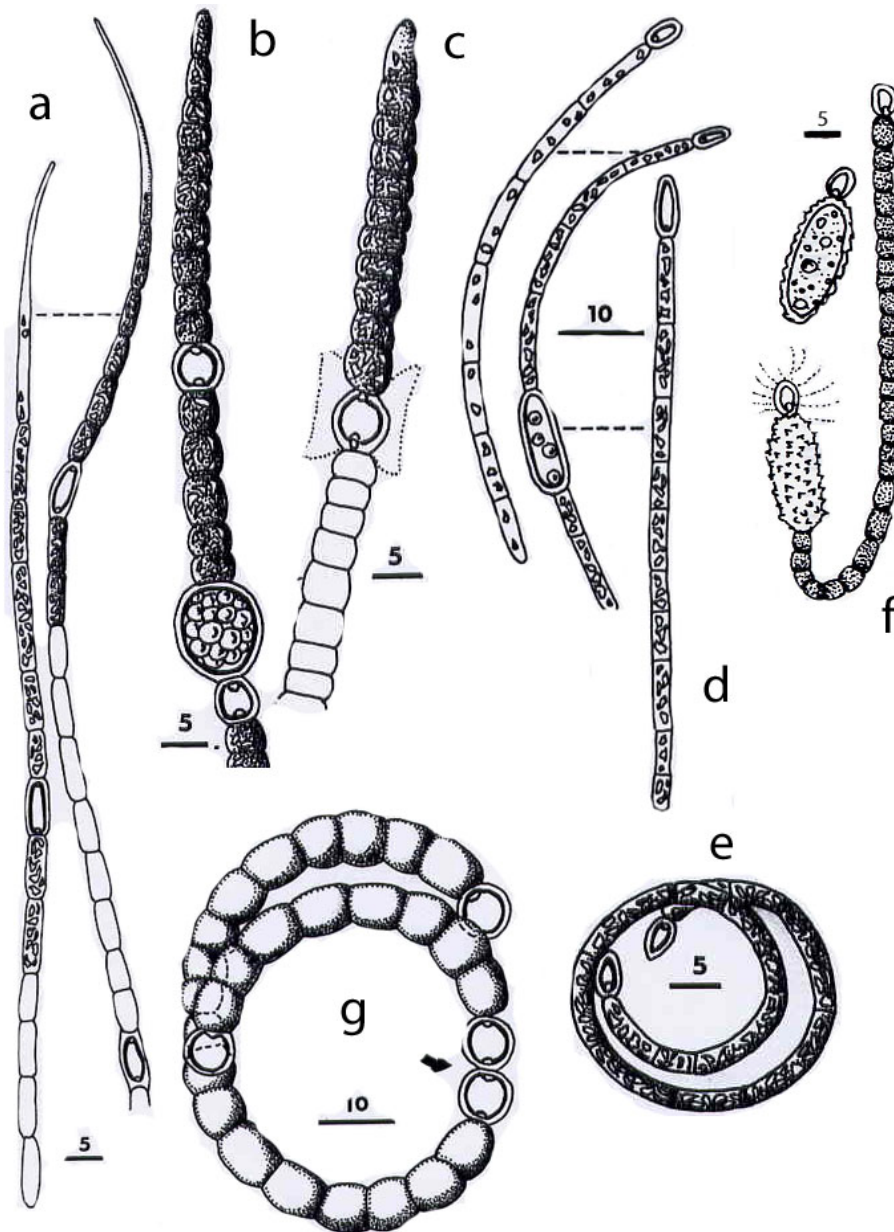


Figure 8 : Dessins représentant la structure générale « type » des genres *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Anabaenopsis* et *Cyndrospermopsis* d'après les dessins de Berger et Couté (Berger, 2005 et Phung *et al*, 1992) *Aphanizomenon issatchenkoi* (a), *Anabaena sphaerica* (b), *Anabaena bergii* (c), *Cyndrospermopsis raciborskii* (d), *Cyndrospermopsis curvispora* (e), *Anabaenopsis mainus* (f), *Anabaenopsis circularis* (g)

Le genre *Cyndrospermum* (Figure 8) se rapproche morphologiquement de *Cyndrospermopsis*, l'apex effilé du trichome de ce dernier étant le principal caractère différenciant ces deux genres. Pourtant, les séquences de *Cyndrospermum* le rapprochent du groupe *Anabaena/Aphanizomenon* (Figures 3 & 4). Cependant, la séquence sénégalaise de *Cyndrospermum* (Famille des Nostocaceae) ne se lie pas avec les autres séquences du genre *Cyndrospermum*, mais se rapproche d'un *Tolypothrix* (Famille des Scytonemataceae) (Figure 3). Ce résultat est surprenant car ce genre est habituellement considéré comme monophylétique (Hoffmann, 2005). Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette position : (i) le genre *Cyndrospermum* serait polyphylétique avec les souches africaines d'un côté et les souches européennes (ici suédoises) de l'autre, (ii) l'identification du *Tolypothrix* et/ou de la souche sénégalaise de *Cyndrospermum* serait mauvaise ou encore, (iii) les séquences de ces deux derniers seraient inexactes.

Enfin, le genre *Gloeotrichia*, séquencé pour la première fois, se rapproche du genre *Calothrix*, aussi bien d'après les séquences pADNr 16S que morphologiquement. Ces deux genres appartiennent à la famille des Scytonemataceae et ont une morphologie similaire : une gaine et des trichomes hétéropolaires, avec d'un côté un hétérocyte terminal suivi d'une ou plusieurs akinètes et de l'autre un poil éffilé. Bourrelly (1985) dit notamment que certaines espèces de *Calothrix* présentent « des akinètes cylindriques placés, comme chez *Gloeotrichia*, à la base du trichome » (Figure 9). Toutefois, *Gloeotrichia* présente une très importante gangue mucilagineuse contrairement à *Calothrix*.

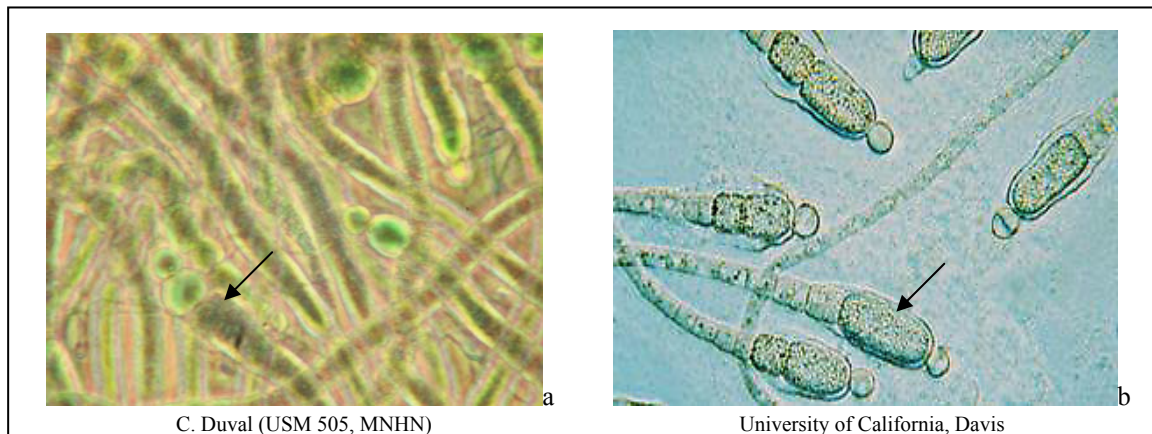


Figure 9 : Photographies des genres *Calothrix* (a) et *Gloeotrichia* (b).
Echelle 10 μ m - Les akinètes sont pointés par une flèche.

L'ADNr 16S utilisé pour connaître la position phylogénétique des souches africaines est un bon marqueur moléculaire pour discriminer les genres et différencier les grands ordres de cyanobactéries. Cependant, la discrimination des genres *Calothrix* et *Gloeotrichia* n'a pas été possible.

Chez les Oscillatoriales, nous avons étudié 7 séquences africaines, dont 2 genres et une espèce séquencés pour la première fois. Pour le genre *Pseudanabaena* (famille des Pseudanabaenaceae, sous-famille des Pseudanabaenoideae), la position des séquences africaines est cohérente avec les séquences publiées (Komárek & Kaštovsky, 2003, Figure 1). Dans l'arbre général construit sur la séquence 16S (Figure 3), le genre *Planktolyngbya* se rapproche du groupe des *Pseudanabaena*. Ce résultat correspond à la classification établie par Anagnostidis & Komárek (1988), ils appartiennent en effet tous les deux à la même famille. Malgré tout, la sous-famille diffère (Leptolyngbyoideae pour *Planktolyngbya*).

Le genre *Jaaginema* est peu connu. Il appartient également à la famille des Pseudanabaenaceae, sous-famille des Pseudanabaenoideae, tout comme le genre *Limnothrix*. Ces deux genres ont récemment été révisés par Komárek & Anagnostidis (2005) et correspondent à des anciens *Oscillatoria* (un bon nombre d'espèces appartenant au genre *Oscillatoria* ont été revues par ces auteurs). La révision taxinomique est donc en accord avec les données moléculaires.

Une autre espèce, *Phormidium chlorinum*, anciennement *Oscillatoria chlorina*, se rapproche de *Limnothrix*, mais s'éloigne des autres *Phormidium* (Famille des Phormidiaceae). Cette position ambiguë nous fait émettre plusieurs hypothèses : (i) le genre *Phormidium* serait polyphylétique, comme le suggère Komárek & Kaštovsky (2003), (ii) l'identification et/ou la séquence serai(en)t fausse(s), (iii) le changement de genre pour cette espèce était-il vraiment justifié ? Enfin, parmi les autres Phormidiaceae, la séquence africaine du genre *Planktothrix* est cohérente avec les autres séquences de ce genre importées de GenBank (Komárek & Kaštovsky, 2003).

Pour les Chroococcales, les genres *Merismopedia* et *Microcystis* apparaissent comme étant monophylétiques dans cette étude (avec de bonnes valeurs de bootstrap, respectivement 70 % et 100 % en ML), ce qui correspond aux données existantes pour *Microcystis* (Rudi *et al.*, 1997), aucune donnée n'existant pour *Merismopedia*. Les espèces de ce dernier genre ne semblent cependant pas être discriminées. D'un point de vue morphologique, *Merimopedia glauca* (Ehrenberg) Kützing et *Merismopedia punctata* Meyen sont différenciées sur la taille des cellules et leur écartement au sein de la colonie, critères subjectifs et pouvant être liés aux conditions de culture. Il est donc difficile de les discriminer morphologiquement et ceci est confirmé moléculairement. Il en est de même au sein du genre *Microcystis*.

6.2. Étude de la diversité spécifique

L'étude de la diversité spécifique réalisée sur ce genre ne nous permet pas de définir des espèces avec le marqueur 16S. Dans ce contexte, il devient nécessaire de regrouper les espèces, comme le suggèrent Otsuka *et al.* (2001). En effet, compte tenu de la variabilité morphologique au sein de ce genre, la dénomination de morphotypes et non d'espèces, comme le suggèrent Via-Ordorika *et al.* (2004), semble plus adaptée (Figure 10).

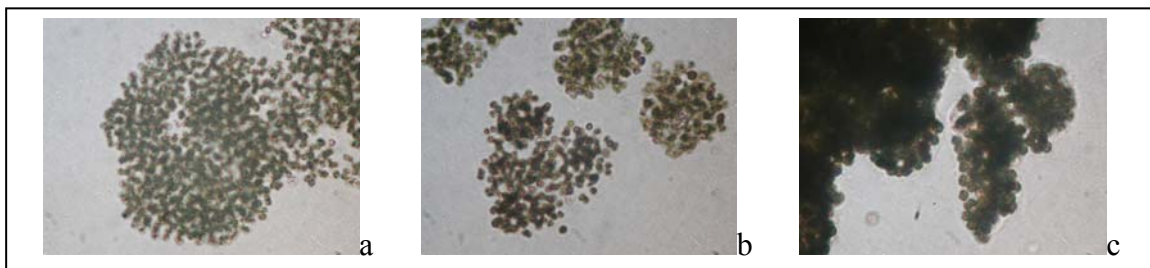


Figure 10 : Photographies des différents morphotypes étudiés de *Microcystis* – M. Gugger (USM 505, MNHN) Echelle 5 µm (a : *M. aeruginosa* ; b : *M. viridis* ; c : *M. wesenbergii*)

De plus, les analyses effectuées sur l'ITS1 16S-23S montrent plus un signal géographique, avec séparation des séquences africaines et espagnoles d'un côté et de l'autre des séquences japonaises. Ce marqueur semble donc plus résolutif que le gène 16S.

Le choix d'amorces spécifiques des cyanobactéries était nécessaire pour travailler sur la collection, qui est conservée en conditions non axéniques. Cependant, les séquences pADNr 16S (256 pb) analysées sont trop petites pour conclure l'étude menée sur le genre *Microcystis*. En effet, pour ce genre, nous disposons de nombreuses séquences dans GenBank, mais ces séquences ne correspondaient pas forcément à la région que nous avons amplifiée. L'approfondissement de cette étude est donc nécessaire : (i) en incorporant des séquences d'autres morphotypes, (ii) en séquençant le gène 16S entièrement, (iii) en ayant plus de souches dont le gène 16S et l'ITS1 16S-23S seraient séquencées (afin de mieux comparer les deux marqueurs) et (iv) en incorporant des séquences de tous les continents.

6.3. Étude de la toxicité

Il existe une grande diversité de cyanotoxines dans le monde (ATXs, CYN, MCYSTs et STXs). L'utilisation de la ESI-MS et ESI-MS/MS est une méthode efficace pour détecter rapidement les cyanotoxines connues en s'affranchissant de leur mode d'action. La séparation sur colonne permet de cibler certains types toxiques sans passer par l'étape éthiquement critiquée du test souris. Cependant, la méthode d'extraction de cyanotoxines de Gugger (2005) a dû être modifiée pour s'adapter aux différents types de cellules (avec sans mucilage, épaisseur de la paroi cellulaire...) et devra être amélioré pour que l'extraction soit la plus optimale possible. Cette technique bien que très sensible et performante reste limitée à la

détection des variants connus (sans la masse et le profil de fragmentation les toxines ne peuvent être identifiées avec certitude), ce qui ne permet pas la recherche de nouvelles toxines. Par ailleurs, cette méthode ne permet pas encore la quantification des variants observés. En effet, pour cela, il faudrait calibrer le spectromètre dans les conditions d'utilisation avec tous les standards purifiés à disposition, soit seulement une dizaine disponibles aujourd'hui

En ce qui concerne les MCYSTs, le test PP2a permet de certifier leur présence puisqu'il est basé sur le mode d'action général de celles-ci. Ce test est également utilisé pour détecter d'autres hépatotoxines, tels que les nodularines qui ont le même mode d'action que les MCYSTs. La limite de cette méthode est qu'elle ne permet pas de distinguer les différents variants mais permet néanmoins d'estimer leur concentration. Robillot & Hennion (2004) ont prouvé à ce sujet montré que ce test est semi quantitatif et donne une estimation de la concentration en MCYSTs (en eq MC-LR), en accord avec les analyses HPLC-MS

En Afrique, sur les 4 catégories de toxines recherchées, seules deux ont été détectées, l'Antx-a et les MCYSTs (Figure 2).

La collection PMC comprend deux souches sénégalaises synthétisant de l'Antx-a et aucune souche synthétisant de MCYSTs bien que de petites quantités aient été détectées sur les échantillons de terrain (Djoudj) (Berger, 2005). A l'inverse, deux souches burkinabées (site BF7 Ouahigouya) synthétisent de la MC-LA, bien qu'aucune toxine n'ait été détectée dans l'échantillon de terrain correspondant. Deux autres sites (BF18, Dissin et BF23, Nombamba) présentaient quand à eux en analyse MS de la MC-YR et les variant déméthylés de la MC-RR et MC-LR sans qu'aucune souche productrice ne soit isolée (Gugger, 2006). Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces différences :

- Le biais lié à l'isolement. Dans l'environnement, de même que dans les efflorescences, les populations de cyanobactéries sont constituées de clones toxiques et non toxiques (Sivonen & Jones, 1999 ; Kurmayer & Kutzenberger, 2003). Ainsi des clones non toxiques ont pu être isolés d'une efflorescence toxique (S, Djoudj et BF, Dissin et Nombamba) et inversement (BF, souche 241.05 et 248.05 isolées de Ouahigouya).
- Le biais induit par la culture. En effet, les conditions de cultures peuvent faire évoluer l'expression des gènes et ainsi réguler la synthèse de toxines (Otsuka *et al.*, 2001).

Enfin, si nous reportons la toxicité des souches de *Microcystis* sur les arbres obtenus (Figures 5 & 6), il est impossible de dissocier les souches toxiques des souches non toxiques, ce qui confirme l'étude d'Otsuka *et al.* (1999) sur des souches asiatiques. Cependant, devant le faible nombre de souches toxiques dans cette analyse, nous ne pouvons pas valider ces résultats. Il semble toutefois que l'ITS1 16S-23S utilisé pour cette étude n'apparait pas comme un bon marqueur moléculaire pour différencier les espèces ou morphotypes du genre *Microcystis*, ni les souches toxiques et non toxiques, mais plutôt comme un marqueur géographique. Cependant, plus de séquences issues de souches productrices de MCYSTs seront nécessaires pour réaliser une étude complète. D'autre part d'autres marqueurs, spécifiques de la toxicité, tels que les gènes de l'opéron *mcy* (Dittmann & Börner, 2004), codant pour les MCYSTs, pourront être utilisés afin de distinguer les souches toxiques des non toxiques. Cependant, selon Via-Ordorika *et al.* (2004), le choix de la séquence *mcy* étudiée joue sur la corrélation présence du gène *mcy*/synthèse de MCYSTs. Ainsi, le gène *mcyA* serait plus résolutif que le gène *mcyB* et leur analyse combinée diminuerait fortement le pourcentage de faux négatifs et faux positifs. De plus, d'après l'étude de ces gènes, la production de MCYSTs serait différente selon les morphotypes de *Microcystis* : (i) *M. wesenbergii* ne possède pas les gènes et ne produit pas de toxine, (ii) *M. ichtyoblabe* et *M. viridis* produisent peu de toxine car moins de 20 % des souches de ces morphotypes possèdent les gènes, (iii) la moitié des souches étudiées de *M. flos-aquae* possède ces gènes et enfin, (iv)

plus de 70 % des souches de *M. aeruginosa* possèdent les gènes *mcy*. Toutefois, cette étude est basée sur des souches européennes, il est donc difficile de généraliser à tous les continents d'autant plus que des variations génétiques corrélées à la géographie semble apparaître pour les ITS. Une étude plus large du même type que celle menée par Via-Ordorika *et al.* (2004) à une échelle plus globale serait primordiale pour vérifier si morphotype et toxicité peuvent être reliés.

7. CONCLUSION & PERSPECTIVES

La présente étude de la collection PMC du Sénégal et du Burkina Faso nous a permis de montrer l'originalité des souches qui la composent.

D'une part, l'étude de leur position phylogénétique confirme que les ordres des Chroococcales, Oscillatoriales et Nostocales sont polyphylétiques et que les genres, décrits uniquement sur des critères morphologiques, ne sont pas toujours soutenus par les données moléculaires (Hoffmann, 2005). Ainsi, l'ADNr 16S utilisé semble être un bon marqueur moléculaire pour différencier les grands ordres de cyanobactéries. Il pourrait être un bon marqueur générique mais ne semble pas assez discriminant pour différencier tous les genres tels qu'ils sont décrits à l'heure actuelle par l'approche botanique (exemple : *Calothrix* et *Gloeotrichia*, *Anabaena* et *Aphanizomenon*). Néanmoins une analyse combinée avec deux ou plus de marqueurs moléculaires dont le 16S complet permettrait de combler les lacunes de cette analyse. L'utilisation des gènes *PC*, codant pour la phycocyanine, *gv* pour « gas vesicle » et *mcy* pour les genres toxiques serait peut être une bonne alternative. De plus, la notion d'espèce chez ces organismes est fortement discutée (Komárek & Anagnostidis, 1998), ce que confirme notre étude du genre *Microcystis*. Une révision taxinomique incluant des caractères morphologiques et moléculaires est donc nécessaire pour classer ces organismes.

La collection PMC ne contient que quatre souches africaines toxiques, deux souches sénégalaises produisant de l'Antx-a et deux souches burkinabées produisant de la MC-LA. Seule l'Antx-a avait été détectée sur les échantillons de terrain (Berger, 2005). En combinant l'étude phylogénétique et l'étude toxique, nous n'avons pas pu discriminer les souches toxiques des souches non toxiques. En effet, l'ITS1 16S-23S n'est pas résolutif pour ces souches, mais semble plus adapté pour étudier la répartition géographique des genres de cyanobactéries. Le développement de plusieurs marqueurs moléculaires, tels que les gènes *mcy* étudiés en analyse combinée (Via-Ordorika *et al.*, 2004), est donc nécessaire afin de discriminer ces différentes souches.

Ainsi, les études fondamentales réalisées sont primordiales pour résoudre les problèmes de santé publique que peuvent engendrer les cyanobactéries. Dans une perspective d'avenir, un outil rapide et bon marché qui discriminerait les souches toxiques des souches non toxiques serait une aide précieuse pour les populations concernées.

Références :

- Abdel-Rahman S., Y. M. el-Ayouti et H. A. Kamael (1993). *Characterisation of heptapeptide toxins extracted from Microcystis aeruginosa (Egyptian isolate). Comparison with some synthesized analogs*. Int. J. Pept. Protein Res. **41** (1):1-7.
- Anagnostidis K. et J. Komàrek (1988). *Modern approach to the classification system of cyanophytes 3- Oscillatoriales*. Algol. Stud. **50-53** 327-472.
- Ballot A., S. Pflugmacher, C. Wiegand, K. Kotut et L. Krienitz (2003). *Cyanobacterial toxins in lake Baringo, Kenya*. Limnologica **33** 2-9.
- Ballot A., L. Krienitz, K. Kotut, C. Wiegand, J. S. Metcalf, G. A. Codd et S. Pflugmacher (2004). *Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in three alkaline Rift Valley lakes of Kenya- Lake Bogoria, Nakuru and Elmeteita*. J. Plankton Res. **26** (8):925-935.
- Berger C. (2005). *Cyanobactéries du Bas Delta du fleuve Sénégal: diversité, toxicité, toxines et risques associés*. Doctorat, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, 211 p.
- Bourrelly P. (1985). *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. III. Les algues bleues et rouges, les Eugléniens, Péridiniens et Cryptomonadines*. Coc. Nouv. Ed. Boubée, Paris, 606 p.
- Brittain S., Z. A. Mohamed, J. Wang, V. K. B. Lehmann, W. W. Carmichael et K. L. Rinehart (2000). *Isolation and characterisation of microcystin from a River Nile strain of Oscillatoria tenuis Agardh ex Gomont*. Toxicon **38** 1768-1771.
- Chorus I. et J. Bartram (1999). *Toxic cyanobacteria in water : a guide to public health significance, monitoring and management*. Spon, London, 416 p.
- Dell'Aversano C., G. K. Eaglesham et M. A. Quilliam (2004). *Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry*. J. Chromatogr. A **1028** (1):155-164.
- Dittmann E. et T. Börner (2004). *Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment*. Toxicol. Appl. Pharm. **203** 192-200.
- Greuter W., J. Mc Neil, F. R. Barrie, H. M. Burdet, V. Demoulin, T. S. Filgueiras, D. H. Nicolson, P. C. Silva, J. E. Skog, P. Trehane, N. J. Turland et D. L. Hawksworth (2000). *International Code of Botanical nomenclature (Saint Louis Code)*. Regnum Vegetabile, Koeltz scientific Books, 474 p.
- Gugger M., C. Lyra, P. Henriksen, A. Couté, J. F. Humbert et K. Sivonen (2002). *Phylogenetic comparison of the cyanobacterial genera Anabaena and Aphanizomenon*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52** 1867-1880.
- Gugger M., R. Molica, B. Le Berre, P. Dufour, C. Bernard et J.-F. Humbert (2005). *Genetic diversity of Cylandrospermopsis strains (Cyanobacteria) isolated from four continents*. Appl. Environ. Microbiol. **71** (2):1097-1100.
- Guindon S. et O. Gascuel (2003). *A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood*. Syst. Biol. **52** (5):696-704.
- Harding W. R., N. Rowe, J. C. Wessels, K. A. Beattie et G. A. Codd (1995). *Death of a dog attributed to the cyanobacterial (blue-green-algal) hepatotoxin nodularin in South Africa*. J. S. Afr. Vet. Assoc. **66** 256-259.
- Hasegawa M., H. Kishino et T. Yano (1985) *Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA*. J. Mol. Evol. **22**:160-174.
- Hoffmann L., J. Komarek et J. Kastovsky (2005). *System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria)-state in 2004*. Algol. Stud. **117** 95-115.
- Iteman I., R. Rippka, N. Tandeau de Marsac et M. Herdman (2002). *rDNA analyses of planktonic heterocystous cyanobacteria, including members of the genera Anabaenopsis and Cyanospira*. Microbiology **148** (2):481-496.
- Kimura M. (1981). *Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **78**:454-458.

- Komárek J. et K. Anagnostidis (1998). *Cyanoprokaryota. 1. Teil. Chroococcales. in: Süßwasserflora von Mitteleuropa*. E. H., G. Gärtner, H. Heynig et D. Mollenhauer, Stuttgart-Jena, 548 p.
- Komárek J. et J. Kaštovsky (2003). *Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines of cyanobacteria*. Arch. Hydrobiol. / Algolog. Stud. **109** (Cyanobact. Res. 4): 305-325.
- Komárek J. et J. Komárková (2003). *Phenotype diversity of the cyanoprokaryotic genus *Cylindrospermopsis* (Nostocales); review 2002*. Czech Phycology **3** 1-30.
- Komárek J. et K. Anagnostidis (2005). *Cyanoprokaryota. 2. Teil. Oscillatoriales. in: Süßwasserflora von Mitteleuropa*. E. H., G. Gärtner, H. Heynig et D. Mollenhauer, Stuttgart-Jena, 759 p.
- Komárek J., J. Komárková et H. Kling (2003). *Filamentous cyanobacteria. In: Freshwater algae of North America*, Elsevier. USA, pp 117-196.
- Kotai J. (1972). *Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae*. Norwegian Institute for Water Research Publication B, Blindern, Oslo, 69 p.
- Krienitz L., A. Ballot, C. Wiegand, K. Kotut, G. A. Codd et S. Pflugmacher (2002). *Cyanotoxin-producing bloom of *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena discoidea* and *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) in Nyanza Gulf of Lake Victoria, Kenya*. Journal of Applied Botany - Angewandte Botanik **76** (5-6):179-183.
- Krienitz L., A. Ballot, K. Kotut, C. Wiegand, S. Putz, J. S. Metcalf, G. A. Codd et S. Pflugmacher (2003). *Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya*. FEMS Microbiol. Ecol. **43** (2):141-148.
- Kumar S., K. Tamura et M. Nei (2004) *MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment* [Briefings in Bioinformatics](#) **5**:150-163.
- Kurmayer R. et T. Kutzenberger (2003). *Application of Real-Time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp.* Appl. Environ. Microbiol. **69** 6723-6730.
- Lapage S. P., P. H. A. Sneath, E. F. Lessel, V. B. D. Skerman, H. P. R. See Liger et W. A. Clark (1992). *International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 revision)*. American society of Microbiology, Washington D. C., 199 p.
- Nasri A.-B., N. Bouaïcha et J. Fastner (2004). *First report of a microcystin-containing bloom of the cyanobacteria *Microcystis* spp. in Lake Oubeia, eastern Algeria*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. **46** 197-202.
- Neilan B. A., J. L. Stuart, A. E. Goodman, P. T. Cox et P. R. Hawkins (1997). *Specific amplification and restriction polymorphisms of the cyanobacterial rRNA operon spacer region*. System. Appl. Microbiol. **20** 612-621.
- Otsuka S., S. Suda, S. Shibata, H. Oyaizu, S. Matsumoto et M. Watanabe (2001). *A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützinger ex Lemmermann 1907 under the Rules of the Bacteriological Code*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51** (873-879).
- Otsuka S., S. Suda, R. Li, M. Watanabe, H. Oyaizu, S. Matsumoto et M. M. Watanabe (1999). *Phylogenetic relationships between toxic and non toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence*. FEMS Microbiol. Let. **172** (15-21).
- Oudra B., M. Loudiki, B. Sbiyyaa, R. Martins, V. Vasconcelos et N. Namikoshi (2001). *Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of Lalla Takerkoust lake-reservoir (Morocco)*. Toxicon **39** 1375-1381.
- Oudra B., M. Loudiki, V. Vasconcelos, B. Sabour, B. Sbiyyaa, K. Oufdou et N. Mezrioul (2002). *Detection and quantification of microcystins from cyanobacteria strains isolated from reservoirs and ponds in Morocco*. Environ. Toxicol. **17** 32-39.
- Page R. D. M. (1996). *TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers*. Computer Applications in the Biosciences **12**: 357-358
- Phung T. N. H., A. Couté et P. Bourelly (1992). *Les cyanophycées du delta du Mékong (Viet-Nam)*. Nova Hedwigia **54** (3-4):403-446.

- Posada D. et K. A. Crandall (1998). *Modeltest: testing the model of DNA substitution*. *Bioinformatics* **14** (9): 817-818.
- Rajaniemi P., P. Hrouzek, K. Kaštovská, R. Willame, A. Rantala, L. Hoffmann, J. Komárek et K. Sivonen (2005). *Phylogenetic and morphological evaluation of the genera Anabaena, Aphanizomenon, Trichormus and Nostoc (Nostocales, Cyanobacteria)*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55** 11-26.
- Rivasseau C., P. Racaud, A. Deguin et M.-C. Hennion (1999). *Development of a bioanalytical phosphatase inhibition test for the monitoring of microcystins in environmental water samples*. *Anal. Chim. Acta* **394** 243-257.
- Robillot C. (2001). *Etude de la complémentarité des méthodes analytiques et bioanalytiques pour la détermination des contaminants organiques environnementaux - Application aux toxines de cyanobactéries et aux xéno-oestrogènes*. Doctorat, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, 280 p.
- Robillot C. et M.-C. Hennion (2004). *Issues arising when interpreting the results of the protein phosphatase 2A inhibition assay for the monitoring of microcystins*. *Anal. Chim. Acta* **512** 339-346.
- Rodriguez F., J. F. Oliver, A. Marin et J. R. Medina (1990). *The general stochastic model of nucleotide substitutions*. *J. Theor. Biol.* **142**:485-501.
- Rudi K., O. M. Skulberg, F. Larsen et K. S. Jakobsen (1997). *Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8*. *App. Environ. Microb.* **63** (2593-2599):
- Sabour B., M. Loudiki, B. Oudra, V. Vasconcelos, R. Martins, S. Oubraim et B. Fawzi (2002). *Toxicology of a Microcystis ichthyoblabe waterbloom from Lake Oued Mellah (Morocco)*. *Environ. Toxicol.* **17** (1):24-31.
- Sivonen K. et G. Jones (1999). *Cyanobacterial toxins In: Toxic cyanobacteria in water*, I. Chorus et J. Bartram. FN Spon, pp 41-111.
- Swofford D. L. (2003). *“PAUP” Phylogenetic Analysis Using Parsimony (And Other Methods) Version 4.0b10* Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp
- Thompson J. D., D. G. Higgins et T.J.Gibson (1994). *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice*. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.
- Van Halderen A., W. R. Harding, J. C. Wesels, D. J. Schneider, E. W. Heine, J. Van des Merwe et J. M. Fourie (1995). *Cyanobacterial (blue-green algae) poisoning of livestock in the western Cape Province of South Africa*. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **66** 260-264.
- Via Ordorika L., J. Fastner, R. Kurmayer, M. Hisbergues, E. Dittman, J. Komarek, M. Erhard et I. Chorus (2004). *Distribution of Microcystin-producing and non-Microcystin-producing Microcystis sp. in European freshwater bodies: detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies*. *System Appl. Microbiol.* **27** 592-602.
- Wilson K. M., M. A. Schembri, P. D. Baker et C. P. Saint (2000). *Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (1):332-338.
- Za M., W. W. Carmichael et A. A. Hussein (2003). *Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus*, Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom*. *Environ. Toxicol.* **18** 137-141.

ANNEXE 1

Les prospections au Sénégal et au Burkina Faso

Au Sénégal, la prospection a été focalisée sur le bas delta du fleuve Sénégal et sur le lac de Guiers. Ainsi, 17 sites d'importance ont été échantillonnés en mai 2002 (Figure A), dont une station située à N'Gnith (site 11) qui alimente Dakar, la capitale, avec plus de 135 000m³ d'eau traitée quotidiennement.

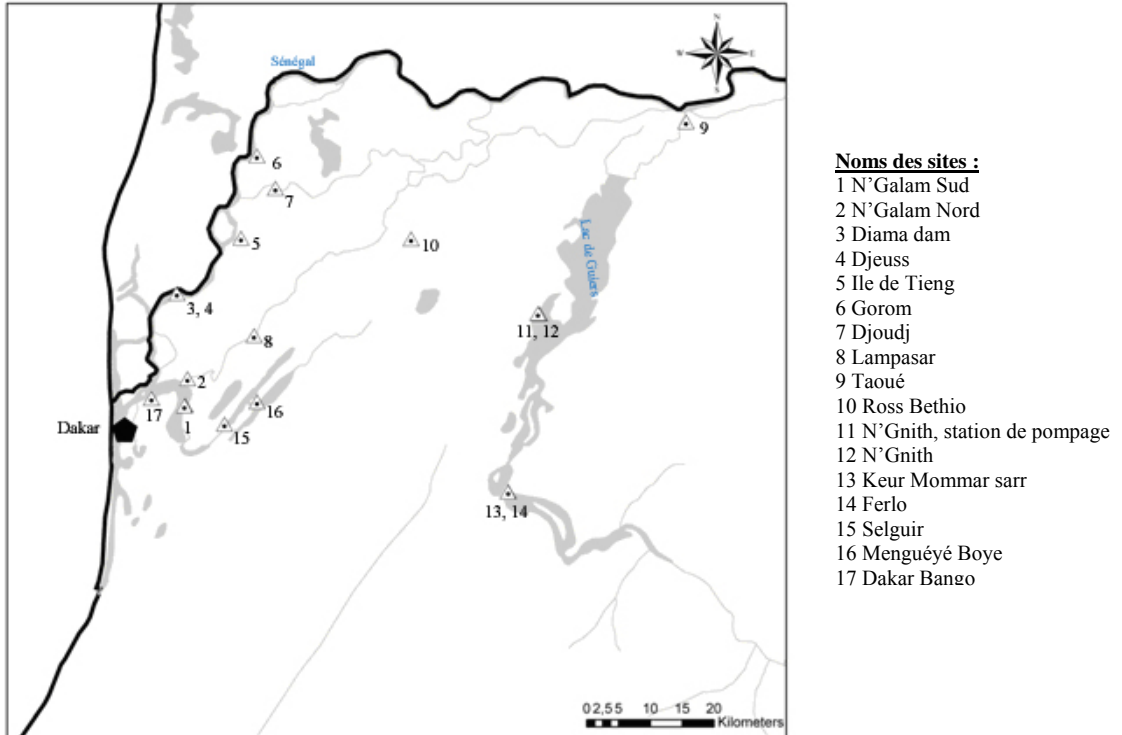


Figure A : Localisation des sites de prospections au Sénégal

Au Burkina Faso, la prospection a été focalisée sur le bassin du Nakambé, dont de nombreux réservoirs de surface alimentent la capitale, Ouagadougou. Ainsi, 23 plans d'eau appartenant à 5 bassins versants ont été échantillonnés (cf Figure B).

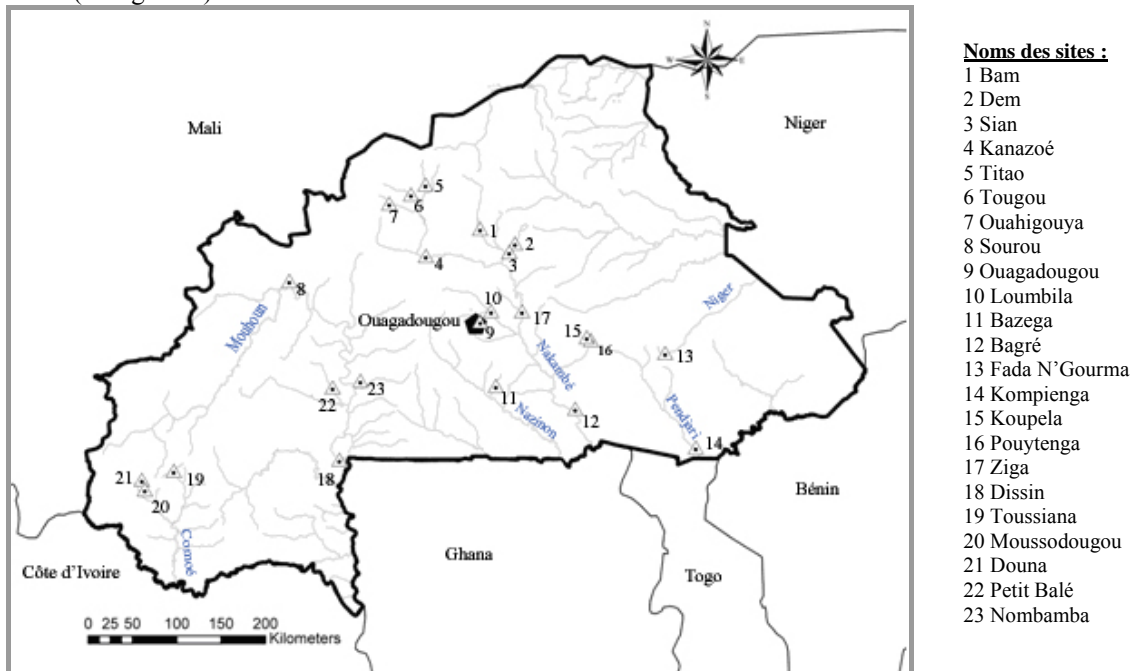


Figure B : Localisation des sites de prospection au Burkina Faso

ANNEXE 2

Détail des souches monoclonales de cyanobactéries sénégalaises en collection

Site de récolte	Espèces	Nombre de clones en collection	Détection de toxines
Lac de Guiers	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> forme droite	12	non toxique
	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> forme flexueuse	7	
	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> forme spiralée	3	
	<i>Cylindrospermopsis curvispora</i>	2	
	<i>Cylindrospermum sp.</i>	3	
	<i>Anabaena spherica</i> var. <i>tenuis</i>	4	
	<i>Gloeotrichia sp.</i>	3	
	<i>Anabaena bergii</i>	1	
Ile de Tieng	<i>Merismopedia punctata</i>	1	non toxique
	<i>Anabaena solitaria</i>	1	
	<i>Anabaena sp.</i>	1	
Djoudj	<i>Microcystis aeruginosa</i>	2	non toxique
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	4	
	<i>Anabaena circularis</i>	3	
	<i>Anabaena solitaria</i>	3	
Djeuss	<i>Anabaena spherica</i> var. <i>tenuis</i>	2	non toxique
	<i>Anabaena solitaria</i>	3	
Dakar Bango	<i>Calothrix sp.</i>	3	non toxique
	<i>Anabaena flos-aquae</i>	4	
	<i>Anabaena solitaria</i>	4	
	<i>Aphanizomenon issatchenkoi</i>	1	
	<i>Aphanizomenon sp.</i>	1	
<i>Pseudanabaena sp.</i>	2	atx-a (2), non toxique (2)	

ANNEXE 3

Liste des séquences importées de GenBank pour les analyses phylogénétiques

Espèce	Ref GenBank	Origine	Toxine produite	Séquence
<i>Anabaena bergii</i>	AF160256	Australie	CYN	ADNr 16S
<i>Anabaena cf. cylindrica</i>	AJ293110	Danemark	Antx-a	ADNr 16S
<i>Anabaena circinalis</i>	AJ133151	Finlande	MCYST/Antx-a	ADNr 16S
<i>Anabaena circinalis</i>	AJ133156	Finlande	MCYST	ADNr 16S
<i>Anabaena circinalis</i>	AJ630417	Finlande		ADNr 16S
<i>Anabaena compacta</i>	AJ630418	République Tchèque		ADNr 16S
<i>Anabaena crassa</i>	AJ293112	Danemark		ADNr 16S
<i>Anabaena flos-aquae</i>	AF247596	Canada	Antx-a	ADNr 16S
<i>Anabaena flos-aquae</i>	AF247597	Canada	Antx-a(S)	ADNr 16S
<i>Anabaena flos-aquae</i>	AJ133158	Norvège		ADNr 16S
<i>Anabaena flos-aquae</i>	AY038032	Canada		ADNr 16S
<i>Anabaena lemmermannii</i>	AJ293104	Finlande	MCYST	ADNr 16S
<i>Anabaena lemmermannii</i>	AJ293113	Danemark	MCYST	ADNr 16S
<i>Anabaena lemmermannii</i>	AJ630424	Finland		ADNr 16S
<i>Anabaena macrospora</i>	AJ293115	France		ADNr 16S
<i>Anabaena mendotae</i>	AJ293107	Danemark		ADNr 16S
<i>Anabaena mendotae</i>	AY701570	Japon		ADNr 16S
<i>Anabaena planctonica</i>	AJ293108	Danemark		ADNr 16S
<i>Anabaena planctonica</i>	AJ630429	Finlande		ADNr 16S
<i>Anabaena sphaerica</i>	DQ439647	Inde		ADNr 16S
<i>Anabaenopsis sp.</i>	AF516747	?		ADNr 16S
<i>Anabaenopsis sp.</i>	AY038033	Espagne		ADNr 16S
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	AJ293122	Danemark		ADNr 16S
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	AY038035	Pays-Bas		ADNr 16S
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	AJ293126	France		ADNr 16S
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	AJ293131	Japon		ADNr 16S
<i>Aphanizomenon gracile</i>	AJ293124	Danemark		ADNr 16S
<i>Aphanizomenon gracile</i>	AJ630445	Finlande		ADNr 16S
<i>Aphanizomenon issatschenkoi</i>	AY196087	Japon		ADNr 16S
<i>Arthrospira fusiformis</i>	AY575924	Kenya		ADNr 16S
<i>Arthrospira fusiformis</i>	AY575928	Kenya		ADNr 16S
<i>Arthrospira indica</i>	AY575930	Inde		ADNr 16S
<i>Arthrospira indica</i>	AY575931	Inde		ADNr 16S
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	AF516736	Allemagne		ADNr 16S
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	AF516746	Floride		ADNr 16S
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	AF516732	Australie	CYN	ADNr 16S
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	AY699989	Portugal		ADNr 16S
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	AF092504	Australie		ADNr 16S
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	AF516728	Australie		ADNr 16S
<i>Cylindrospermum licheniforme</i>	AB075983	?		ADNr 16S
<i>Cylindrospermum sp.</i>	AJ133163	Suède (sol)		ADNr 16S
<i>Limnothrix redekei</i>	AJ505943	Macédoine		ADNr 16S
<i>Limnothrix redekei</i>	AJ505941	Macédoine		ADNr 16S
<i>Merismopedia glauca</i>	AJ781044	Italie		ADNr 16S
<i>Merismopedia glauca</i>	X94705	Allemagne		ADNr 16S
<i>Microcystis aeruginosa</i>	AB038539	Japon		ADNr 16S

Espèce	Ref GenBank	Origine	Toxine produite	Séquence
<i>Microcystis aeruginosa</i>	U40338	Etats-Unis		ADNr 16S
<i>Microcystis aeruginosa</i>	AY065974	Japon		ADNr 16S
<i>Microcystis aeruginosa</i>	AB038356	Japon		ADNr 16S
<i>Microcystis aeruginosa</i>	AJ635431	Italie		ADNr 16S
<i>Microcystis aeruginosa</i>	AB038541	Japon		ADNr 16S
<i>Microcystis aeruginosa</i>	D89031	Japon		ADNr 16S
<i>Microcystis aeruginosa</i>	U40340	Canada		ADNr 16S
<i>Microcystis aeruginosa</i>	AF139318	Etats-Unis		ADNr 16S
<i>Microcystis aeruginosa</i>	AB023258	Japon		ADNr 16S
<i>Microcystis aeruginosa</i>	AF139320	Australie	MCYST	ADNr 16S
<i>Microcystis aeruginosa</i>	AF139299	Pays-Bas	MCYST	ADNr 16S
<i>Microcystis aeruginosa</i>	AB038543	Japon		ADNr 16S
<i>Microcystis aeruginosa</i>	AB015364	Japon		ADNr 16S
<i>Microcystis aeruginosa</i>	AB015363	Japon		ITS1 16S-23S
<i>Microcystis flos-aquae</i>	AF139329	Etats-Unis		ADNr 16S
<i>Microcystis ichthyoblabe</i>	AJ635433	Italie		ADNr 16S
<i>Microcystis viridis</i>	AJ271677	Allemagne		ADNr 16S
<i>Microcystis viridis</i>	AB015402	Japon		ADNr 16S ITS1 16S-23S
<i>Microcystis viridis</i>	AB015400	Japon		ADNr 16S ITS1 16S
<i>Microcystis viridis</i>	AB015401	Japon		ADNr 16S ITS1 16S
<i>Microcystis viridis</i>	AB015299	Japon		ADNr 16S ITS1 16S
<i>Microcystis wesenbergii</i>	AB015387	Japon		ITS1 16S-23S
<i>Microcystis wesenbergii</i>	AB015393	Japon		ITS1 16S-23S
<i>Microcystis wesenbergii</i>	AB015394	Japon		ITS1 16S-23S
<i>Microcystis wesenbergii</i>	AB015395	Japon		ITS1 16S-23S
<i>Microcystis wesenbergii</i>	AB015396	Japon		ITS1 16S-23S
<i>Microcystis wesenbergii</i>	AB015397	Japon		ITS1 16S-23S
<i>Microcystis viridis</i>	AY266130	Allemagne		ITS1 16S-23S
<i>Microcystis viridis</i>	AY266135	Allemagne		ITS1 16S-23S
<i>Nostoc</i> sp.	AY742452	Nouvelle Zélande		ADNr 16S
<i>Phormidium ambiguum</i>	AB003167	?		ADNr 16S
<i>Phormidium cf. terebriformis</i>	AY575936	Kenya		ADNr 16S
<i>Phormidium lumbricale</i>	AF218375	Antarctique		ADNr 16S
<i>Planktothrix agardhii</i>	AB045900	Angleterre		ADNr 16S
<i>Planktothrix pseudagardhii</i>	AM236076	?		ADNr 16S
<i>Planktothrix rubescens</i>	AB045950	Norvège		ADNr 16S
<i>Planktothrix</i> sp.	AJ635435	Italie		ADNr 16S
<i>Prochlorococcus marinus</i>	AF133833	Mer des Sargasses		ADNr 16S
<i>Prochlorococcus marinus</i>	AF180967	Mer des Sargasses		ADNr 16S
<i>Prochlorococcus marinus</i>	AF133834	Mer des Sargasses		ADNr 16S
<i>Pseudanabaena</i> sp.	AB039020	?		ADNr 16S
<i>Pseudanabaena</i> sp.	AF132778	Etats-Unis		ADNr 16S
<i>Spirulina major</i>	AJ639890	Italie		ADNr 16S
<i>Spirulina subsalsa</i>	AY575935	Inde		ADNr 16S
<i>Synechococcus</i> sp.	AY082654	Etats-Unis		ADNr 16S
<i>Tolypothrix</i> sp. *	AB093486	Japon ?		ADNr 16S
<i>Trichodesmium</i> sp.	X72871	?		ITS1 16S-23S

ANNEXE 4

Protocole d'extraction kit QuiaGen (Cat. N°69506) :

D'après le protocole de purification d'ADN de bactérie gram négative (dont font partie les cyanobactéries) :

- prélever 2 mL de culture et déposer dans un falcon de 15 mL
- centrifuger pendant 10 min à 4000 rpm, éliminer le surnageant
- faire 2 cycles de rinçage à l'eau milliQ
- ajouter 180 µL de tampon ATL, puis vortexer

D'après le protocole de purification d'ADN de tissu animal :

- **faire 2/3 cycles de congélation/décongélation**, (10min à -20°C/5min à 55°C)
- ajouter 20 µL de protéinase K, puis vortexer
- incuber à 55°C pendant **3h**, **vortexer toutes les 30 min**
- vortexer pendant 15s
- ajouter 200 µL de tampon AL, puis vortexer
- incuber 10 min à 70°C, puis vortexer
- ajouter 200 µL d'éthanol 100 %, puis vortexer
- centrifuger pendant 3 min à 4000 rpm
- pipeter le volume dans le DNeasy spin column (2 mL)
- centrifuger à 8000 rpm pendant 1 min
- mettre la colonne dans un nouveau tube de 2 mL
- ajouter 500 µL de tampon AW1
- centrifuger à 8000 rpm pendant 1 min
- mettre la colonne dans un nouveau tube de 2 mL
- ajouter 500 µL de tampon AW2
- centrifuger à 14000 rpm pour sécher la membrane pendant 3 min
- **centrifuger à 14000 rpm pendant 3 min dans un nouveau tube**
- mettre la colonne dans un nouveau tube avec bouchon
- ajouter 100 µL de tampon AE
- incuber pendant 1 min à température ambiante
- centrifuger à 8000 rpm pendant 1 min
- ajouter 50 µL de tampon AE dans le même tube
- incuber pendant 1 min à température ambiante
- centrifuger à 8000 rpm pendant 1 min
- faire une mesure de DO ($\lambda_{ADN} = 260$) avant la PCR.
- conservation de l'extrait à -20°C

Les modifications apportées au protocole sont indiquées en caractère gras.

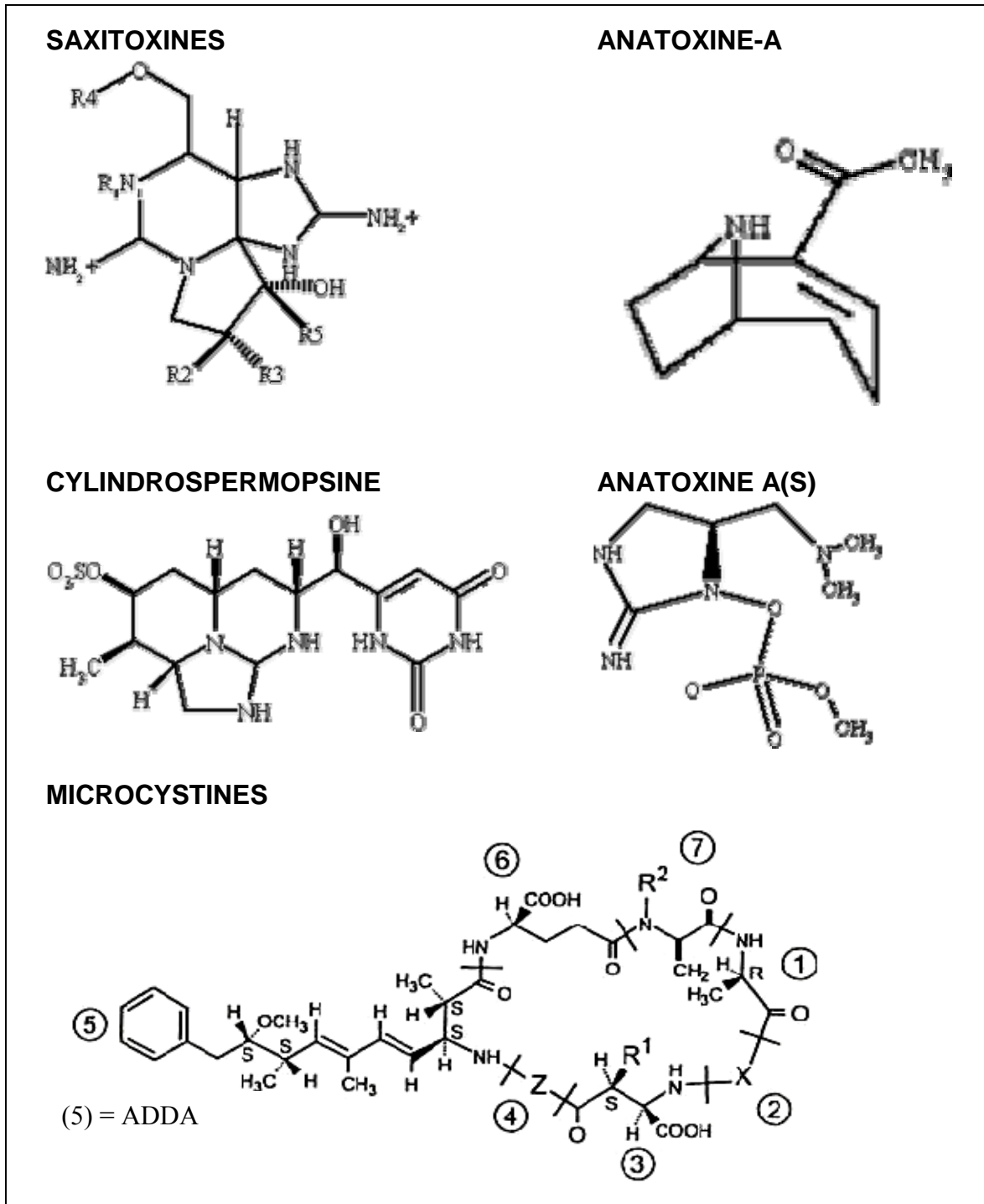
ANNEXE 5

Protocole d'extraction au phénol-chloroforme (selon U. Dorigo, INRA Thonon les Bains)

- prélever 2 mL de culture dans un tube eppendorf
- **centrifuger à 4°C à 4000 rpm pendant 10 min (à la place d'une filtration)**
- **enlever le surnageant puis laver 2 fois à l'eau milliQ**
- ajouter 750 µL de tampon de lyse
- centrifuger à 4°C à 4000 rpm pendant 10 min
- congeler à -80°C pendant 15 min
- décongeler à 55°C pendant 2 min
- **sonicer dans un bain à ultrasons pendant 2 min**, puis vortexer
- centrifuger 30s à vitesse maximum
- ajouter 47 µL de lysosyme puis incubé à 37°C pendant 45 min
- centrifuger 30s à vitesse max
- ajouter 75 µL de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) puis 10 µL de protéinase K
- incubé à 55°C pendant 1h30, **vortexer toutes les 30 min**
- **congeler à -80°C pendant 5 min**
- **décongeler à 55°C pendant 2 min**
- **sonicer dans un bain à ultrasons pendant 2 min, puis vortexer, répéter 3 fois**
- **ajouter 10 µL de protéinase K**
- **incuber à 55°C pendant 1h, vortexer de temps en temps**
- **centrifuger 30s à vitesse max**
- centrifuger à 4°C à 12000 rpm pendant **5 min**
- récupérer le surnageant dans un nouveau tube eppendorf, noter le volume récolté
- purifier avec un volume égal de phenol-chloroforme-isoamyl-alcool, centrifuger à 4°C à 12000 rpm pendant **5 min**, puis récupérer la phase supérieure, qui contient l'ADN, dans un nouveau tube eppendorf
- répéter l'étape précédente jusqu'à ce qu'il n'y ai plus de protéines à l'interface des 2 phases.
- éliminer l'excédent de phenol-chloroform-isoamyl-alcool en ajoutant un volume égal de chloroforme-alcool-isoamylique, centrifuger à 4°C à 12000 rpm pendant 5 min, puis récupérer la phase supérieure dans un nouveau tube eppendorf
- ajouter 10 % du volume d'acétate de sodium
- ajouter 200 % du volume d'éthanol absolu à froid, observer un précipitât blanc, puis mélanger par inversion de tube
- conserver à -80°C pendant 2h
- centrifuger à 4°C à 12000 rpm pendant 30 min, puis enlever le surnageant
- laver le culot avec 300 µL d'éthanol 80 %
- centrifuger à 4°C à 12000 rpm pendant 10 min, puis enlever le surnageant
- pour sécher le culot, centrifuger au speed vac pendant 25 min
- ajouter **50 µL** de TE (tris EDTA)
- solubiliser l'ADN à 37°C pendant **1h puis une nuit au réfrigérateur**
- faire une mesure de DO ($\lambda_{ADN} = 260$) avant la PCR.
- conservation de l'échantillon à -20°C

Les modifications apportées au protocole sont indiquées en caractère gras.

ANNEXE 6



Structure chimique des principales cyanotoxines connues

ANNEXE 7

Protocole d'extraction de cyanotoxines (selon M. Gugger, MNHN, Paris, 2005)

Extraction du 25 avril 2006 (17 souches) :

- reprendre 10 mg de lyophilisat dans 3,5 mL d'eau acidifiée (1% d'acide formique)
- sonicer 3 fois dans un bain à ultrasons pendant 10 min
- **ajouter du méthanol absolu jusqu'à obtenir une concentration de 80 % de MéOH (qsp) puis vortexer**
- **évaporer au speed vac pendant environ 2h à 45°C**
- centrifuger 10 min à 10000 rpm
- filtré 3 à 4 mL de surnageant (filtre de 45µm de diamètre) avant le passage sur colonne C18

Extraction du 04 mai 2006 (12 souches) :

- reprendre 10 mg de lyophilisat dans **3 mL de méthanol absolu puis vortexer**
- sonicer 2 fois dans un bain à ultrasons pendant 10 min (vortexer entre chaque sonication)
- **congélation à -80°C pendant 10 min**
- **sonicer 2 fois dans un bain à ultrasons pendant 10 min (vortexer entre chaque sonication)**
- **centrifuger 10 min à 10000 rpm**
- **répartir le surnageant dans 2 tubes eppendorf de 1,5 mL**
- **évaporer au speed vac pendant 1h à 45°C**
- **reprendre dans 300 µL de méthanol absolu puis vortexer**
- **ajouter 2,7 mL d'eau acidifiée (1 % d'acide formique)**
- centrifuger 10min à 10000rpm
- filtré 3 mL de surnageant (filtre 45µm de diamètre) avant le passage sur colonne C18

- préparation de la colonne d'extraction C18 : passer 3 mL de méthanol absolu, goutte à goutte, puis laver avec 3 mL d'eau milliQ

- passage des différents solvants et récupération de chaque fraction d'élution dans 2 tubes eppendorfs de 1,5mL :
 - Tubes O₁ et O₂ : passage de 3 mL d'échantillon filtré
 - Tubes H₁ et H₂ : élution avec 3 mL d'eau acidifiée (1 % d'acide formique)
 - Tubes 20₁ et 20₂ : élution avec 3 mL d'une solution de méthanol + eau acidifiée (20/80, V/V)
 - Tubes 80₁ et 80₂ : élution avec 3 mL d'une solution de méthanol + eau acidifiée (80/20, V/V)

Recherche des cyanotoxines par spectrométrie de masse dans les tubes suivants :

- tube O₂ : détection des saxitoxines
- tube H₂ : détection des anatoxines et de la cylindrospermopsine
- tube 20₂ : détection des anatoxines et de la cylindrospermopsine
- tube 80₂ : détection des microcystines

Les modifications apportées au protocole sont indiquées en caractère gras.

ANNEXE 8

Protocole du test PP2a d'après Rivasseau et al, (1999) et Robillot & Hennion (2001) :

Extraction des toxines à partir d'une culture :

- filtrer un volume $V_{eb} = 45 \mu\text{L}$ de prélèvement de culture
- congeler le filtre à -20°C
- décongeler le filtre
- extraire dans 8 mL de méthanol absolu
- sonication 3 fois dans un bain à ultrasons pendant 10 min secouer énergiquement entre chaque sonication, afin de détruire le filtre
- centrifugation 10 min à 4000 g
- presser le culot
- filtrer le surnageant sur un petit GF/C
- évaporer au rotavapor à 30°C
- reprendre le résidu dans $600\mu\text{L}$ de méthanol absolu dans un eppendorf de 1,5 mL
- sécher au speedvac à température ambiante pendant 1h
- reprendre le résidu dans un volume $V_r = 200 \mu\text{L}$ de méthanol absolu puis vortexer
- conserver à sec ou repris dans du méthanol absolu à -20°C

Extraction des toxines à partir d'un lyophilisat :

- reprendre 10mg de lyophilisat dans 3mL de méthanol absolu
- sonication 3 fois dans un bain à ultrasons pendant 10 min, vortexer
- centrifugation 10 min à 4000 g
- filtrer le surnageant (filtre de $45\mu\text{m}$ de diamètre)
- évaporer au speed vap à 30°C 1h30
- reprendre le résidu dans $600\mu\text{L}$ de méthanol absolu
- sécher au speedvac à température ambiante pendant 1h
- reprendre le résidu dans un volume $V_r = 200 \mu\text{L}$ de méthanol absolu puis vortexer
- conserver à sec ou repris à -20°C

Préparation des solutions :

	Pour 1 plaque	Tampon
DTT	0,0186 g pour 30 mL	TRIS/HCl
Substrat	0,100 g pour 6 mL	TRIS/HCl/DTT
BSA : Tp enzyme	0,003 g pour 6 mL	TRIS/HCl/DTT
Tp enzyme + enzyme	1,3 μL dans 4,5 mL	TRIS/HCl/DTT/BSA

Préparation des eppendorfs :

- numéroter 24 eppendorfs
- préparer la gamme avec la solution mère de MCYST-LR (200 pg/mL) si besoin est faire une solution fille à $10\text{pg}/\mu\text{L}$ ($12.5\mu\text{L}$ de Sol mère + $237.5\mu\text{L}$ de Tp TRIS/HCl/DTT)
- préparer les dilutions de l'échantillon (dil*10, dil*100, dil*1000...) : dilutions en cascade en prélevant $5 \mu\text{L}$ d'échantillon pour $45\mu\text{L}$ de MéOH

- ➡ tube 1 : témoin solvant : 10µL MeOH + 490µL tp TRIS/HCl/DTT
- ➡ tube 2 à 10 : gamme étalon
- ➡ tube 11 : témoin tampon : 500µL de tp TRIS/HCl/DTT
- ➡ tubes 12 à 24 : échantillons avec un volume Vu de l'échantillon dans 500µL de tp
 - non dilué : 2µL dans 495 µL de tp TRIS/HCl/DTT
 - non dilué : 5 µL dans 495 µL de tp TRIS/HCl/DTT
 - non dilué : 10 µL dans 490 µL de tp TRIS/HCl/DTT
 - dil*10 : 2µL dans 495 µL de tp TRIS/HCl/DTT
 - dil*10 : 5µl dans 495 µL de tp TRIS/HCl/DTT
 - dil*10 : 10µL dans 490 µL de tp TRIS/HCl/DTT
 - dil*100 : ETC.....

Préparation de la plaque :

- disposer 100µL de chaque eppendorf dans les puits correspondants (à chaque fois on fait 4 réplicats)
- disposer 50µL de tampon enzyme sans enzyme [TRIS/HCl/DTT/BSA] dans les rangées A et H (blanc)
- disposer 50 µL du mélange [tampon enzyme + enzyme] dans les rangée B, C, E, F, G,
- disposer 50 µL de solution substrat (40mM) le plus rapidement possible :
DEMARRAGE DE LA REACTION

Lecture de la plaque :

A DO = 405 nm, après une incubation dans une étuve à 37°C pendant 60 min.

Calculs de la concentration en toxine :

Le test PP2a est semi-quantitatif et permet d'évaluer la concentration en MCYSTs grâce à une gamme étalon. Seule la partie linéaire (entre 20 et 80 % d'inhibition de la réaction) est prise en considération pour les calculs. Les concentrations obtenues sont exprimées en µg eq MC-LR par mg de lyophilisat et tiennent compte de toutes les dilutions de l'échantillon et inhérentes au test.

ANNEXE 9

Liste des espèces citées

Anabaena bergii Ostenfeld
Anabaena circularis Rabenhorst
Anabaena flos-aquae Bornet & Flahault
Anabaena solitaria Klebahn
Anabaena sphaerica Bornet & Flahault
Anabaena sphaerica var *tenuis* Welsh
Aphanizomenon issatchenkoi (Ussachew) Proschkina-Lavrenko
Cylindrospermopsis curvispora Watanabe
Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszyńska) Seenayya & Subba Raju
Jaaginema homogeneous (Frémy) Anagnostidis & Komàrek
Limnothrix redekei (Goor) Meffert
Merismopedia punctata Meyen
Microcystis aeruginosa (Kützing) Kützing
Microcystis flos-aquae (Wittrock) Kirchner
Microcystis ichtyoblabe Kützing
Microcystis viridis (Braun in Rabenhorst) Lemmermann
Microcystis wesenbergii (Komàrek) Komàrek in Kondrateva
Phormidium chlorinum (Gomont) Umezaki & Watanabe
Planktolingbya limnetica (Lemmermann) Komàrková Legnerová & Cronberg
Planktothrix agardhii (Gomont) Anagnostidis & Komàrek
Planktothrix clathrata (Skuja) Anagnostidis & Komàrek
Pseudanabaena mucicola (Naumann & Huber-Pestalozzi) Bourrelly

RÉSUMÉ

Les cyanobactéries sont des microorganismes photosynthétiques qui sont connus pour former des proliférations massives en milieu dulçaquicole. Suite à de telles efflorescences, certaines espèces toxiques ont été la cause d'intoxication humaines et animales et soulèvent donc des problèmes pour la gestion de l'eau potable et la santé publique.

L'approvisionnement en eau est un problème récurrent en Afrique sub-saharienne. Les réservoirs de surfaces sont fortement anthropisés et les conditions sont propices à la prolifération cyanobactérienne. Pourtant, très peu d'études ont été réalisées sur cette problématique en Afrique. Dans ce contexte, l'IRD a mené des campagnes de prospections au Sénégal et au Burkina Faso, en collaboration avec le MNHN. Une collection de souches africaines de cyanobactéries a ainsi pu être mise en place. Dans la présente étude, nous proposons d'étudier l'originalité phylogénétique et toxinique de ces souches africaines.

Au cours de ce travail, des séquences de cyanobactéries africaines ont été comparées à d'autres séquences cyanobactériennes d'origines diverses et leur position phylogénétique discutée. Trois genres ont été séquencés pour la première fois. Il ressort de ces analyses que la classification des cyanobactéries, basée principalement sur des critères morphologiques, doit être révisée en considérant des données moléculaires. Une première approche de la diversité de *Microcystis* africains a été entreprise et demande des analyses complémentaires. Au niveau de la toxicité, sur les 30 souches en collection testées, deux sont hépatotoxiques. L'utilisation de différents marqueurs moléculaires a été discutée tant d'un point de vue phylogénétique que toxinique.

Mots clés : cyanobactéries, Afrique, phylogénie, 16S, ITS1, *Microcystis*, toxines.

ABSTRACT

Cyanobacteria are photosynthetic microorganisms known to form massive proliferations in freshwater bodies. Such blooms could be due to toxic species and can be responsible for human and animal intoxications and though arise public health and water treatment concerns.

Water supplying is a recurring problem in sub-Saharan Africa. Reservoirs are highly anthropised and conditions are favourable to cyanobacterial proliferations. However, only a few studies deal with this problematic in Africa. In this context, the IRD realised prospecting campaigns in Senegal and Burkina Faso in collaboration with the MNHN. Though, an African culture collection of cyanobacteria as been created. In the present work, we propose to study the originality of the phylogeny and the toxicity of this African strains.

In this study, African cyanobacterial sequences were compared to sequences from diverse origins and there phylogenetic position discussed. Three genera were sequenced for the first time. It emerges from this analysis that cyanobacterial classification, mainly based on morphological characteristics, should be revised considering molecular data. A first approach of the *Microcystis* diversity has been undertaken but need complementary analysis. Concerning the toxicity, among the 30 collection strains tested, two are hepatotoxic. The use of different molecular markers has been discussed as on phylogeny than on toxicity.

Key words: cyanobacteria, Africa, phylogeny, 16S, ITS1, *Microcystis*, toxins.