

Available online at <http://ajol.info/index.php/ijbcs>

Int. J. Biol. Chem. Sci. 8(2): 551-565, April 2014

ISSN 1997-342X (Online), ISSN 1991-8631 (Print)

**International Journal
of Biological and
Chemical Sciences**

Original Paper

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Essai préliminaire de mise en œuvre de culture de cyanobactérie en Côte d'Ivoire

Kalpa J. COULIBALY ^{1*}, N. GROGA ², M.K. SOUMAHORO ¹,
M. KOUDOUGOU ¹, J.E. EBROTIE-BROU ³, M.T. KOUASSI-HAULLEY ¹,
A. OUATTARA ¹, H. FAYE-KETTE ¹ et M. DOSSO ¹

¹ Institut Pasteur de Côte d'Ivoire ; 01 BP 490 Abidjan, Côte d'Ivoire.

² Université Lorougnon Guède de Côte d'Ivoire ; 01 BP 150 Daloa, Côte d'Ivoire.

³ Université Nangui Abrogoua ; 02 BP 801 Abidjan, Côte d'Ivoire.

* Auteur correspondant ; E-mail : kalpyjuliencoulibaly@pasteur.ci

RESUME

Les cyanobactéries sont des bactéries photosynthétiques capable produire des métabolites secondaires dont les cyanotoxines. Les blooms à cyanobactérie toxiques représentent des menaces aussi bien pour l'environnement que l'homme et les animaux. L'étude des toxines et autres métabolites nécessitent des cultures viables de cyanobactérie. Cependant, la culture *in vitro* de cyanobactérie en Côte d'Ivoire est peu développée. Cette étude s'est donnée pour objectif d'expérimenter la culture *in vitro* de cyanobactérie à partir d'échantillon de phytoplankton récolté dans la nature. Une revue de la littérature a servi de base à cette étude. Elle a permis d'identifier un site de prélèvement, des techniques et des clés d'identification des cyanobactéries. Elle a également permis la sélection de milieux de culture à utiliser. Un « incubateur artisanal » a été développé pour la culture de cyanobactéries. Le milieu Bold modifié (M1) était statistiquement le plus adapté à la culture des cyanobactéries en général. La composition de ce milieu pourrait avoir favorisé le développement de certains genres aux dépens d'autres. La culture de cyanobactéries a été mise en œuvre. Il reste cependant à améliorer la technique à poursuivre vers la purification des cultures et l'étude des métabolites secondaires.

© 2014 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords : Cyanobacterie, Culture, Environnement, Identification, Côte d'Ivoire.

INTRODUCTION

Les cyanobactéries anciennement appelées algues bleues sont des micro-organismes qui se développent sur une grande variété d'écosystèmes. En milieu aquatique, ils sont retrouvés aussi bien dans les eaux continentales que marines. Depuis plusieurs décennies, de fortes proliférations de cyanobactéries sont signalées sur plusieurs cours d'eau à travers le monde. Ces

proliférations ou blooms à cyanobactéries sont inquiétantes car certaines espèces les occasionnant peuvent produire des substances hydrosolubles potentiellement toxiques (Merve et al., 2012 ; Lüring et al., 2013). Ces toxines ou cyanotoxines peuvent être hépatotoxiques, neurotoxiques et dermatotoxiques (Vial et al., 2004 ; Pearson et al., 2010). Ainsi, les intoxications accidentelles liées à la contamination des eaux

© 2014 International Formulae Group. All rights reserved.

DOI : <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v8i2.14>

de surface par des toxines synthétisées par les cyanobactéries sont connues depuis plus d'un siècle. En effet l'empoisonnement du bétail en Australie a été relaté dès 1878 (Francis et al., 1878). Il en est de même pour les chiens et autres animaux aux Pays-Bas et dans bien d'autres pays (Merve et al., 2012 ; Lüring et al., 2013 ; Baker et al., 2013). En 1996 au Brésil, on a relevé un accident ayant entraîné la mort d'une soixantaine de personnes, insuffisants rénaux dialysés par une eau contaminée par une cyanotoxine (Bittencourt-Oliveira et al., 2011). En Europe, tous les pays font état de la prolifération de ces microorganismes et du risque pour les humains et les animaux (Vial et al., 2004)

La répartition des cyanobactéries à potentiel toxique s'étend à tous les continents, l'Afrique et l'Asie ne sont pas épargnées. Des cas d'intoxication de bétail par des cyanotoxines hépatotoxiques sont décrits en Afrique, ainsi qu'un cas d'intoxication d'un rhinocéros blanc par *Microcystis aeruginosa* (El Ghazali et al., 2011). L'Afrique du Sud est souvent citée dans les publications (Mbukwa et al., 2012 ; Carrasco et al., 2012). En Afrique de l'Ouest, des études menées au Burkina ont pu mettre en évidence la présence des cyanobactéries dans les sources d'eau potable (Cecchi et al., 2005). En dehors des toxines, d'autres substances d'intérêt médical et pharmaceutiques sont aussi produits par ces microorganismes. (Rangel et al., 2014). En Côte d'Ivoire, de nombreuses études sur le phytoplancton ont été effectuées et ont fait mention de la présence de cyanobactéries dans différents plans d'eau (N'gohesse et al., 2007 ; Komoé et al., 2009 ; Ouattara et al., 2001 ; Adon et al., 2011 ; Grogga et al., 2012 ; Niamien-Ebrotié et al., 2013). Récemment, une étude dédiée aux cyanobactéries a été réalisée (Salla et al., 2011). Cependant il n'existe pas de données sur les cyanobactéries en culture en dehors des cultures en bassin de *Spirulina* sp, ni sur leur potentiel toxique. En effet, la disposition de souches viables de cyanobactéries permet de réaliser de nombreuses études notamment ceux sur les

métabolites secondaires produits par ces microorganismes de grand intérêt (Oufdou et al., 2009). Ceci a motivé la confection de nombreuses collections dont celle de l'Institut Pasteur de Paris. Les cyanobactéries sont cultivées sur divers milieux biologiques (Barberousse et al., 2006 ; Oufdou et al., 2009 ; Selvan et al., 2013).

Cette étude entre dans le cadre d'un programme de recherche qui ambitionne d'étudier les principaux métabolites secondaires (toxines, antimicrobiens.....), des cyanobactéries isolées des plans d'eau en Côte d'Ivoire, leurs supports génétiques et les conditions de leurs productions. La pertinence de cette étude réside dans l'intérêt écologique et socio-économique de ces cours d'eau d'une part et le risque sanitaire que pourraient représenter ces microorganismes d'autre part. Ce travail inaugural du programme se donne donc comme objectif d'aider à la mise en place de culture *in vitro* de cyanobactérie en Côte d'Ivoire.

Il consistera à : inventorier les genres de cyanobactéries issue des récoltes sur le terrain ; Expérimenter des milieux et des conditions de culture de cyanobactérie en Côte d'Ivoire; valider les cultures en utilisant des critères d'identification et de dénombrement.

MATERIEL ET METHODES

Campagnes de mesures et d'échantillonnage

Les cyanobactéries mises en culture dans cette étude ont été prélevées dans les eaux de la lagune Aghien (Figure 1). Cette dernière a une superficie de 19.5 km² et est située à environ 5 km au Nord de Bingerville dans le bassin versant du fleuve Comoé ; ses coordonnées GPS se situe entre 5°20 et 5°30 latitude Nord et 3°50 et 3°55 longitude Ouest. Ce plan d'eau hypertrophique (N'gohesse et al., 2007) est le lieu de développement de divers genres de cyanobactéries tels que *Microcystis* sp, *Anabeana* sp, *Oscillatoria* sp, *Cylindrospermopsis* sp pour ne citer que ceux-

là (N'gohe et al., 2007 ; Humbert et al., 2011).

Un plan d'échantillonnage fut établi selon les points sélectionnés suivant le rapport d'expertise sur le phytoplancton de la lagune Aghien (Humbert et al., 2011). Les points les plus simples d'accès avec un nombre de genres élevés ont été retenus (Figure 2).

Techniques de prélèvement

Un filet à plancton de 20 µm de vide de maille a servi pour la récolte des cyanobactéries et du phytoplancton en général. A l'aide d'un seau à bec de 5 litres de capacité, un échantillon de 20 litres d'eau de lagune a été prélevé et filtré à travers le filet à plancton. Le culot retenu au niveau du collecteur a été transvasé dans deux piluliers de 50 ml chacun. Un des tubes a été fixé au lugol à 1% v/v pour l'identification microscopique et le second non fixé a servi pour la culture.

Préparation des milieux de culture

Les milieux BOLD (M1), BG11(M2), et CONWAY(M3) ont été sélectionnés pour expérimenter la culture des cyanobactéries. Ils ont été préparés suivant les formules et les indicateurs décrits par (Barberousse et al., 2006).

Inventaire des genres de cyanobactéries en présence

Tous les échantillons ont été observés au microscope optique afin d'identifier les genres de cyanobactéries en présence comme décrit dans la section identification et dénombrement plus bas. Une numération des cyanobactéries a été réalisée simultanément à la mise en culture.

Ensemencement et incubation

Deux expérimentations ont été réalisées. Une première expérience avec les milieux reconstitués tels que décrits et à la température du laboratoire (+20 °C en moyenne et luminosité du laboratoire). C'était

une grande salle (8,72 m x 4,29 m x 3,21 m) éclairée par 4 ampoules néon MAZDA FLUOR M2TF 36W/LJ de 1,2 m de long, de 32 Watt produisant une lumière type lumière du jour de 3350 lumens chacun. D'où une intensité lumineuse globale de 706,66 lux. Une seconde expérience avec une légère modification de la composition des milieux Bold et Conways, une température contrôlée de 25±1 °C ; des milieux placés dans un incubateur «maison» (Figure 3) avec une luminosité continue. L'Incubateur est constitué d'une enceinte en polyéthylène de 55 cm x 40 cm x 37 cm. Il est surmonté d'une charpente de bois sur laquelle sont montées deux ampoules néons MAZDA FLUOR M2TF 18W/LJ de 18 W produisant une lumière du jour de 1350 lumens chacune et mesurant de 60 cm de long. L'incubateur avait donc une intensité lumineuse totale de 50766 lux.

Dans le milieu M1 modifié, le dihydrogéné-phosphate de potassium (KH₂PO₄) a été remplacé par le di-potassium hydrogéné-phosphate (K₂HPO₄) avec une quantité augmentée passant de 7,5 g à 17,5 g, et le molybdate de sodium remplace le molybdate d'ammonium.

Dans le M3 modifié, la vitamine B1 a été supprimée. Le milieu M2 n'a subi aucune modification. Environ 10 ml de phytoplancton récolté est mis en culture dans 100ml de milieu de culture dans des contenants en verre. L'incubation a été suivie pendant 6 semaines dans une salle dont la température a été maintenue à 25±1 °C. Les flacons sont remués plusieurs fois par semaine manuellement comme indiqué par Selvan et al. (2013).

Identification et dénombrement

L'identification a été faite par observation entre lame et lamelle au microscope photonique suivant les clefs morphologiques des cyanobactéries décrites par KOMAREK et ANAGNOSTIDIS (1998 ; 2005) ainsi que par Jhon et al. (2003). Une

surveillance qualitative et quantitative des cultures a été réalisée de façon hebdomadaire de H0 à H7 (J0 à J 47). Un contrôle de qualité des milieux a été réalisé par l'ensemencement d'eau distillée stérile en guise de milieu témoin. La croissance des cyanobactéries est appréciée par la numération des souches en culture.

La cellule de Malassez (1 µl de capacité) a été utilisée pour le dénombrement des cellules (Affssa/AFSSET, 2006 ; Li, 2010).

Tests statistiques

Une comparaison des moyennes des concentrations des cyanobactéries a été faite par une analyse des variances avec répétition

d'expérience prenant en compte deux facteurs: le temps et l'échantillon par le logiciel STATA.

Le taux de croissance a été calculé selon la formule (Robert et al., 2004 ; OCDE, 2011)

$$\mu_{i-j} = \ln X_j - \ln X_i / t_j - t_i$$

où :

μ_{i-j} est le taux de croissance spécifique moyen du temps i au temps j ;

X_i est la biomasse au temps i ;

X_j est la biomasse au temps j.

Le taux de croissance a permis de calculer le taux de dédoublement « k » par unité de temps suivant la formule : $k = \mu / \ln(2) = \mu / 0,693$



Figure 1 : Réseau lagunaire dans la région d'Abidjan (Guiral et Ferhi, 1989).

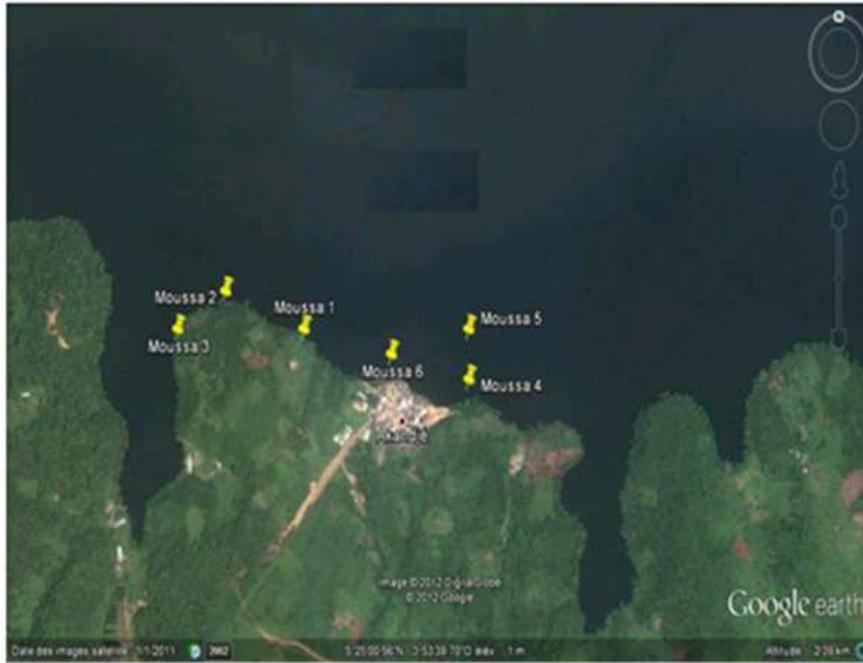


Figure 2 : Localisation des points de prélèvement (Google earth, juin 2012).



Figure 3 : Incubateur artisanal.

RESULTATS

Au total, 12 échantillons ont été réalisés et mis en culture sur trois milieux (M1, M2, M3). De ces prélèvements, un inventaire des genres de cyanobactéries a été fait sans préciser les familles (Tableau 1).

Première expérimentation

Au cours de cette expérimentation, il n'a pas été observé de culture de cyanobactérie ni autres phytoplanctons dans les milieux en présence après six (06) semaines d'observation (Tableau 2).

Deuxième expérimentation

Biodiversité des cyanobactéries

Différents genres de cyanobactéries ont été identifiés dans les échantillons d'eau prélevés. Un total de neuf genres différents de cyanobactérie ont été identifiés des prélèvements réalisés (Tableau 1). Sur les 9 genres de cyanobactéries récoltés et mis en culture, 6 genres se sont développés (Tableau 3), soit une déperdition de 33.3% (Figure 5).

Evolution des concentrations moyennes de cyanobactéries selon les milieux

Le phytoplancton récolté a été mis en culture sur trois milieux M1 (milieu Bold) ; M2 (milieu BG11) ; M3 (milieu Conway). Le nombre de bactérie a été estimé toutes les semaines soit, tous les 7 jours afin d'évaluer la croissance pendant 42 jours (6 semaines).

Après culture en milieux liquides, une croissance des bactéries a été observée de façon macroscopique par le changement de couleur des milieux au fil des semaines. A la numération cellulaire, il a été obtenu une concentration moyenne de $131,56.10^5$ cellules/ml soit 68% de la biomasse totale cultivée dans le milieu M1 modifié, $39,4.10^5$ cellules/ml soit 21% avec le M2 et pour le M3 modifié, $21,61.10^5$ cellules/ml soit 11% (Figure 4). Le milieu M1 modifié s'est

avéré statistiquement plus performant pour la culture ($P < 0,001$), suivi du milieu BG11.

Il y a eu une baisse de croissance des cyanobactéries sur l'ensemble des milieux de culture à la première semaine de culture. Ce phénomène a été suivi par une croissance progressive sur tous les milieux (Figure 6).

La croissance des cyanobactéries a été plus marquée sur le milieu M1 modifié. Il y a été observé après une légère croissance négative à la première semaine (-0,070/semaine), une augmentation continue des bactéries de la 2^{ème} à la 5^{ème} avec un taux de croissance maximum de 0.99/semaine. Le taux de croissance hebdomadaire moyen de H0 à H6 donc de J0 à J42 était de 0,195/semaine pour M1 contre 0,001/semaine pour le milieu M2 et un taux de croissance hebdomadaire négatif de l'ordre de -0,234/semaine pour le milieu M3.

La courbe de croissance des cyanobactéries dans le milieu BG11 (M2) suit celle du milieu Bold (M1) mais de façon moins marquée. En effet, le taux de croissance négatif d'entrée est plus grand (-1.06) et ceux des autres semaines bien que positifs sont moins importants. (Tx maximum= 0,58/semaine). Cependant, la croissance s'est poursuivie jusqu'à la 5^{ème} semaine avant la décroissance.

Quant au milieu M3, la décroissance a débuté à la 4^{ème} semaine, et la biomasse cyanobactérienne dans ce milieu est restée en dessous de celle des autres milieux pendant toute l'étude.

Une accélération de la croissance a été observée à partir de 21 jours (H3) surtout pour M1 et M3 qui ont vu leur concentration cellulaire doubler pratiquement. La croissance a connu un ralentissement dès J28 (H4) avant de s'inverser à partir de J35 (H5). Il faut cependant noter que la chute a débuté à J28 dans le milieu M3.

Taux de croissance

Globalement, les taux de croissance négatifs à la fin de la première semaine, étaient positifs dès la fin de la seconde semaine. La croissance semble alors plus importante dans le milieu Conways suivi du milieu BG11 et enfin le milieu Bold. Les taux de croissance les plus élevés ont été observés entre J21 et J28 (H3 et H4) dans les milieux

M1 et M3 soit 0,99/semaine et 0,89/semaine respectivement (Tableau 4). Ils l'étaient pour M2 entre J14 et J21.

Le taux de dédoublement k est resté constamment au dessus de 0,5/semaine entre H2 et H4 pour le milieu Bold alors qu'ils étaient moins élevés pour les autres milieux (Tableau 5).

Tableau 1: Biodiversité des cyanobactéries après collecte.

Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4	Echantillon 5	Echantillon 6
<i>Anabaena</i>			<i>Anabaena</i>		
<i>Oscillatoria</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Anabaena</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Oscillatoria</i>	
<i>Microcystis</i>	<i>Planktothrix</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Anabaena</i>
<i>Planktothrix</i>	<i>Pseudoanabaena</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Planktothrix</i>	<i>Pseudoanabaena</i>	<i>Oscillatoria</i>
<i>Pseudoanabaena</i>	<i>Limnothrix</i>	<i>Pseudoanabaena</i>	<i>Pseudoanabaena</i>	<i>Aphanizomenon</i>	<i>Microcystis</i>
<i>Aphanizomenon</i>	<i>Lyngbya</i>	<i>Aphanocapsa</i>	<i>Aphanizomenon</i>		
<i>Limnothrix</i>			<i>Aphanocapsa</i>		
<i>Aphanocapsa</i>					

Tableau 2: Résultats de la première expérimentation.

	J0= S0	J7 = S1	J14 = S2	J21 = S3	J28 = S4	J35 = S5	J42 = S6
Echantillon 1	29,14	0	0	0	0	0	0
Echantillon 2	19.87	0	0	0	0	0	0
Echantillon 3	58.23	0	0	0	0	0	0
Echantillon 4	30.69	0	0	0	0	0	0
Echantillon 5	32.52	0	0	0	0	0	0
Echantillon 6	40.56	0	0	0	0	0	0

Aucune croissance bactérienne n'a été observée.

Tableau 3: Biodiversité des cyanobactéries cultivables.

Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4	Echantillon 5	Echantillon 6
<i>Oscillatoria</i>	<i>Planktothrix</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Oscillatoria</i>
<i>Microcystis</i>	<i>Pseudoanabaena</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Microcystis</i>
<i>Planktothrix</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Pseudoanabaena</i>	<i>Aphanizomenon</i>	<i>Pseudoanabaena</i>	<i>Aphanocapsa</i>
<i>Aphanocapsa</i>	<i>Aphanocapsa</i>	<i>Aphanocapsa</i>	<i>Aphanocapsa</i>	<i>Aphanizomenon</i>	
		<i>Aphanizomenon</i>		<i>Aphanocapsa</i>	

Tableau 4 : Taux de croissance hebdomadaire des cyanobactéries suivant les milieux de culture.

	Bold	BG11	Conway
J0			
J7	-0,070	-1,016	-2,577
J14	0,459	0,581	1,233
J21	0,357	0,342	0,266
J28	0,999	0,150	0,894
J35	0,141	0,221	-0,162
J42	-0,712	-0,270	-1,062

Tableau 5 : Taux de dédoublement « k » hebdomadaire des cyanobactéries suivant les milieux de culture.

	Bold	BG11	Conway
J0	,		
J7	-0,101	-1,466	-3,718
J14	0,662	0,839	1,779
J21	0,515	0,493	0,384
J28	1,442	0,217	1,291
J35	0,203	0,319	-0,233
J42	-1,027	-0,390	-1,533

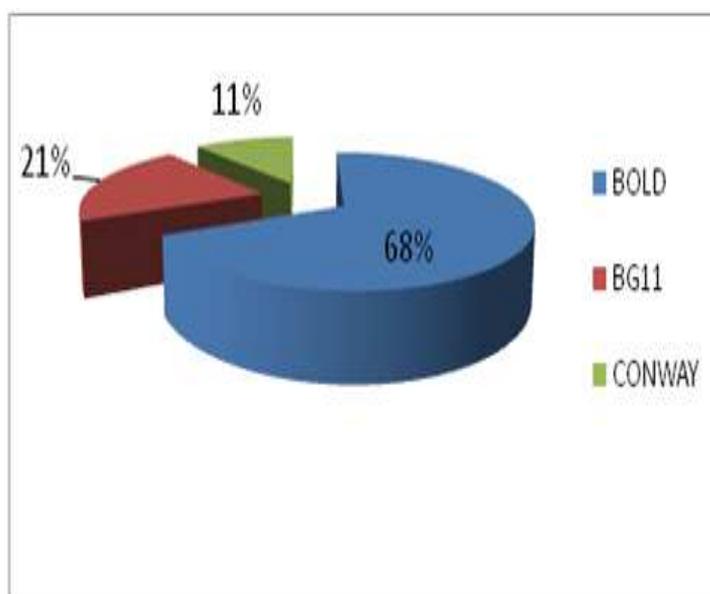
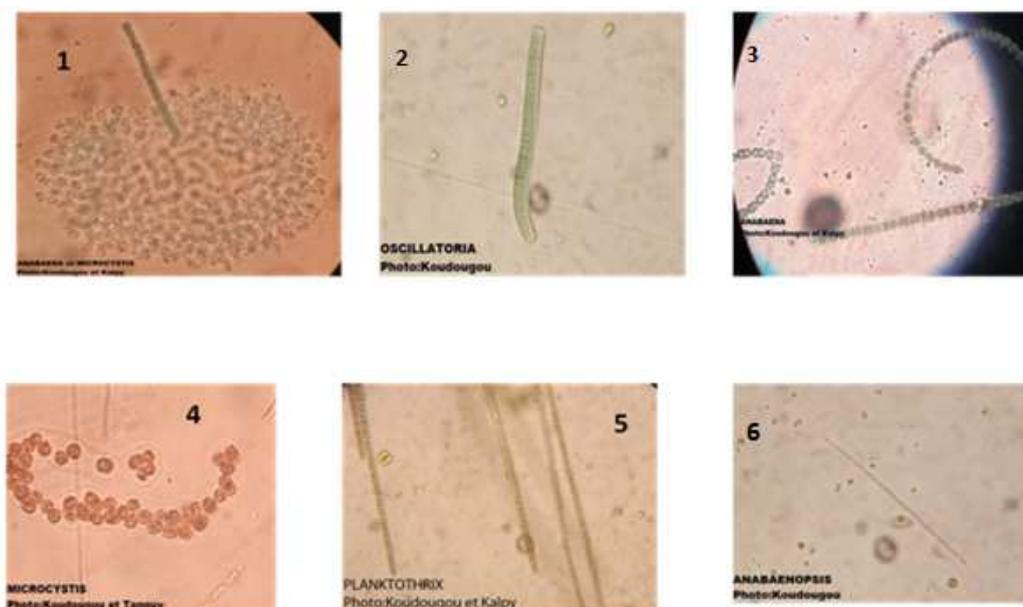


Figure 4 : Concentration moyenne des cyanobactéries après culture (BOLD (M1) BG11 (M2) CONWAY (M3)).



1: *Anabaena* et *Microcystis*; 2: *Oscillatoria*; 3: *Anabaena*; 4: *Microcystis*; 5: *Planktothrix*; 6: *Anabaenopsis*
 (Photo: Koudougou M; Coulibaly-Kalpy J; Kouassi-Haoulley T)

Figure 5 : Principaux genres de cyanobactéries récoltés dans la lagune Aghiens.

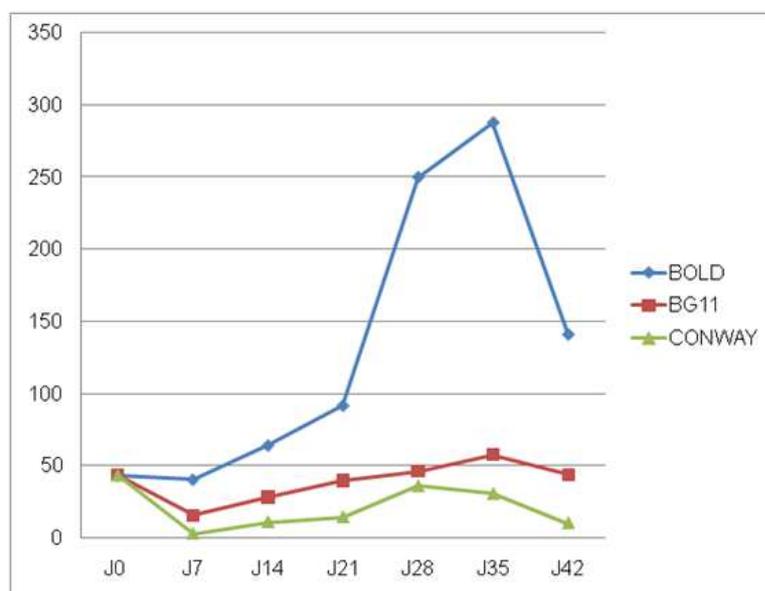


Figure 6 : Evolution des concentrations moyennes de cyanobactéries par milieu au cours du temps.

DISCUSSION

Ces expérimentations ont été effectuées dans des conditions différentes. Après l'absence de culture observée dans la première expérimentation, une modification de certains paramètres (luminosité, température....) a permis la croissance de cyanobactéries.

Contrairement à certains auteurs comme (Pellerin et al., 2012), il n'y a pas eu de croissance à la luminosité et à la température ambiante (celle du laboratoire). Cet échec pourrait être attribué à de nombreux paramètres non contrôlé tel que l'intensité lumineuse, et des variations de température dans la première expérimentation. En effet, l'intensité lumineuse du laboratoire a été estimée à 706 lux (http://www.neolux.fr/FR/outils_conversions.php). Ceci ne correspond qu'à environ 9,5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (www.apogeeinstruments.co.uk/conversion-ppf-to-lux) largement en dessous des 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ décrit dans l'étude de Oufdou et al. (2009) mais aussi par Rangel et al. (2014) pour la culture des mêmes microorganismes. Cet auteur a également eu recours à une enceinte thermostatée. Les températures étaient alors autour de 23 ± 3 °C. Cependant, Rantala et al. (2011) ont réussi à cultiver des souches de cyanobactérie à une plus faible intensité lumineuse mais avec une température constante de 23 °C (Rantala et al., 2011). L'intensité lumineuse très importante pour la culture des cyanobactéries est toutefois différente d'une souche à l'autre (Monestier, 2006). Selon Renaud et al. (2011), il y a une différence statistiquement significative entre les taux de croissance suivant une faible ou une haute intensité lumineuse (Renaud et al., 2011). La croissance des cyanobactéries du genre *synecochoccus* évolue avec l'intensité lumineuse selon Silva et al. (2014). Il faut toutefois préciser que la température du laboratoire autour de +20 °C (Pellerin et al., 2012) en général en occident peut varier

fortement en Afrique selon les conditions climatiques et le type de laboratoire.

Les modifications des paramètres de cultures, et surtout la mise en place de dispositifs tel que l'incubateur a permis de rapprocher les conditions culturelles de certains auteurs. (Rangel et al., 2014 ; Oufdou et al., 2009). Le contrôle des paramètres, température ($T^\circ = 25 \pm 1$ °C, éclairage 24h/24 à la lumière fluorescente de néon de 18 W dans un incubateur artisanal adapté a conduit au développement des cyanobactéries. L'intensité lumineuse est passée à 50766 lux soit environ 686 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ permettant ainsi un éclairage plus fort par mètre carré que celui de la luminosité ambiante du laboratoire. Cette constatation a été faite aussi par Rangel et al. (2014), Oufdou et al. (2009) et Ferris et al. (1991) qui ont mis des souches en cultures à 25 °C avec des photopériodes continues ou alternées. Bouarab et al. (2002) pensent que la croissance de microalgue ou microorganisme apparenté est fonction de la température et de l'intensité lumineuse mais aussi de la composition du milieu.

Une relative forte biodiversité a été observée aux différents points de prélèvements. Ainsi, il a été identifié (9) genres dans les différentes stations de prélèvement. Ces résultats sont conformes à ceux de (N'Gohesse et al., 2007) et (Humbert et al., 2012) qui ont dénombré respectivement quatre et dix genres. La différence au niveau des nombres de genre de (N'Gohesse et al., 2007) pourrait s'expliquer par les différences de périodes d'étude 2012 et 2007 respectivement mais aussi du fait des zones échantillonnées. En effet, la diversité des activités anthropiques suivant les berges de la lagune pourrait être à l'origine d'une grande différence dans la composition chimique des points de prélèvement et donc des genres en présence.

Dans cette étude, six genres sur les neuf mis en culture se sont développés, soit 66.66% de succès. Pour la culture des cyanobactéries, l'avantage statistiquement significatif du milieu M1 modifié sur les milieux M2 et M3 modifié pourrait s'expliquer en partie par la composition des milieux (Zhao et al., 2014). En effet, la concentration en nitrate des milieux serait un facteur limitant de certains genres de cyanobactéries, quand l'absence de chlorure de sodium limiterait la croissance d'autres souches. (Selvan et al., 2013).

En effet, pour Selvan et al. (2013), le nitrate de sodium est la meilleure source d'azote pour permettre la culture des cyanobactéries, et tous les milieux utilisés dans cette étude en étaient pourvus mais à des concentrations différentes. Le milieu M3 avait la plus forte concentration et le milieu M2 la plus faible. Or le genre *Anabaena* selon (Rantala et al., 2011 ; Allen et Stanier, 1968) ne peut se développer que sur un milieu sans azote. Cette assertion est aussi défendue par Kato et al. (2012) qui soutiennent que les cyanobactéries hétérocytes capables de fixer l'azote ne connaissent pas une bonne croissance sur des milieux renfermant de l'azote. Selvan et al. (2013) ont également montré que la présence de NaCl dans le milieu permettait le développement de certaines souches de cyanobactérie telles que les *Lyngbya* sp et les *Synechococcus* sp. Seul le milieu M1 disposait dans sa formule de NaCl. Malgré l'extraordinaire capacité des cyanobactéries à s'adapter à diverses conditions, la présence de NaCl influencerait leur vitesse de croissance et pourrait même inhiber le développement de certaines souches. (Bano et al., 2004). Cela pourrait expliquer que le milieu M1 ait favorisé le développement de plus de biomasse, car adapté probablement à la culture de beaucoup plus de genre de cyanobactérie que les autres. Au cours de cette étude, il n'y a pas eu de

développement des cyanobactéries du genre *Anabaena*, *Lyngbya* et *Limnothrix* qui n'ont pu se développer bien que présentes dans le plan d'eau échantillonnée.

Une baisse du nombre de cyanobactéries a été constatée au départ, suivie d'une croissance observable dès 14 jours (H2) et une accélération à partir de 21 jours (H3). Cette chute inaugurale correspondrait à la période d'adaptation des cyanobactéries aux milieux de culture comme l'avait fait remarquer Robert et al. (2004). Les croissances bactériennes observées dans cette étude sont en adéquation avec celles de Ferris et al. (1991) ainsi que celles de Roger et al. (1976). Ferris et al. (1991) qui ont observé des cultures positives et dénombrables sur milieu solide à partir de 14 jours quand Roger et al. (1976) en observait après 21 jours d'incubation. Il est donc à noter que la croissance diminue dès le 28^{ème} jour (H4). Cette constatation permet de préjuger d'une période de repiquage des cultures afin de maintenir une phase exponentielle de croissance qui se situerait donc autour de la 4^{ème} semaine (H4=J28). C'est aussi l'avis de Moore et al. (2007) qui a travaillé sur des souches *Phlorococcus* sp.

Outre le milieu M2, les autres milieux utilisés étaient différents de ceux utilisés dans cette étude.

Cette étude présente quelques limites, notamment le caractère non monospécifique des microorganismes. L'étude de la culture des cyanobactéries se fait habituellement sur des souches connues de cyanobactérie.

Le mode de prélèvement ne permet pas d'étudier toutes les cyanobactéries notamment les nano et picocyanobactéries du fait de la taille des mailles du filet à plancton utilisé (20 µm). Par conséquent, cette étude ne saurait prétendre décrire l'ensemble des cyanobactéries. La mesure de l'intensité lumineuse a utilisé des tables de conversion et

aurait pu être plus précise en utilisant des appareils dédiés à cela.

Cependant, cette étude pourrait avoir le mérite d'avoir jeté les bases de la culture *in vitro* des cyanobactéries en Côte d'Ivoire, et pourrait donc aider dans un proche avenir à définir des paramètres de lumière, de température selon les espèces isolées dans les plans d'eau ivoiriens.

Conclusion

Ce travail a porté sur l'essai de mise en place de la culture *in vitro* de cyanobactéries en Côte d'Ivoire. Bien que réalisé à travers le monde, il a semblé important de tenter cette expérience dans le contexte ivoirien. L'échec de la première expérimentation a permis de mettre en évidence les difficultés liées à cette culture. Les difficultés résidaient dans la maîtrise de plusieurs paramètres dont la disponibilité des milieux et leur pureté mais aussi le contrôle de la température d'incubation et l'intensité lumineuse. La culture des cyanobactéries a pu être réalisée sur trois milieux parmi lesquels le milieu BOLD et le milieu BG11, mais seulement en condition contrôlée. Elle a nécessité de modifier certains paramètres pourtant considérés comme acquis. D'autres études complémentaires devraient être initiées en tenant compte des limites de la présente afin de pouvoir d'une part maîtriser la technique de la culture des cyanobactéries et d'autre part de disposer à terme de souches pures, voire axéniques de cyanobactéries. Ce qui ouvrirait la voie à des études des souches africaines de cyanobactéries dans leur environnement d'origine.

REMERCIEMENTS

Nos remerciements aux collègues de l'Université Nagui Abrogoua d'Abidjan pour leur aide et leurs conseils en espérant approfondir notre coopération dans le futur.

Merci aux techniciens de l'Unité de microbiologie de l'environnement de l'Institut Pasteur et à la Chefferie traditionnelle du village d'Akandjé pour leur accueil.

REFERENCES

- Adon MP, Ouattara A, Gourene G. 2011. Seasonal variation in the diversity and abundance of phytoplankton in a small African tropical reservoir. *African Journal of Microbiology Research*, **5**(18): 2616-2026.
- AFSSA, AFSSET. 2006. Rapport sur l'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives. Juillet 2006.
- Allen MM, Stanier RY. 1968. Growth and Division of Some Unicellular Blue-green Algae. *J. gen. Microbiol.*, **51**: 199-202.
- Backer LC, Landsberg JH, Miller M, Keel K, Taylor TK. 2013. Canine Cyanotoxin Poisonings in the United States (1920s–2012): Review of Suspected and Confirmed Cases from Three Data Sources. *Toxins*, **5**: 1597-1628.
- Bano A, Siddiqui PJA. 2004. Characterization of five marine cyanobacterial species with respect to their pH and salinity requirements. *Pak. J. Bot.*, **36**(1): 133-143.
- Barberousse H. 2006. Etude de la diversité des algues et des cyanobactéries colonisant les revêtements de façade en France et recherche des facteurs favorisant leur implantation. PhD Thèse, Muséum National d'Histoire Naturelle, p 192.
- Bittencourt-Oliveira MC, Oliveira MC and Pinto E. 2011. Diversity of microcystin-producing genotypes in Brazilian strains of *Microcystis* (Cyanobacteria). *Braz. J. Biol.*, **71**(1): 209-216.

- Bouarab L, Loudiki M, Dauta A. 2002. Croissance en autotrophie et en mixotrophie de la microalgue *Micractinium pusillum* Fres. isolée d'un lagunage naturel : influence de la lumière et de la température. *Revue des Sciences de l'Eau*, **15**(1): 73-86.
- Carrasco NK, Perissinotto R. 2012. Development of a Halotolerant Community in the St. Lucia Estuary (South Africa) during a Hypersaline Phase. *PLoS ONE*, **7**(1): e29927.
- Cecchi P, Arfi R, Berger C. 2005. Cyanobactéries, potentiel toxique et ressources en eau du Burkina-Faso, Rapport de mission, p 35.
- El Ghazali I, Saqrane S, Saker M, Youness O, Oudra B, Vasconcelos V, Del Campo FF. 2011. Caractérisation biochimique et moléculaire d'efflorescences à cyanobactéries toxiques dans le réservoir Lalla Takerkoust (Maroc). *Revue des Sciences de l'Eau / Journal of Water Science*, **24**(2): 117-128.
- Ferris MJ and Hirsch CF. 1991. Method for Isolation and Purification of Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**(5): 1448-1452.
- Francis G. 1878. Poisonous Australian Lake. *Nature*, **18**: 11-12.
- Groga N. 2012. Structure, fonctionnement et dynamique du phytoplancton dans le lac de Taabo (Côte d'Ivoire). PhD Thèse, Université de Toulouse, p. 224.
- Humbert JF. 2012. Lagune Aghien, Rapport sur la mission, p. 25
- John DM, Whitton BA, Brook AJ. 2003. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles, An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*. Cambridge University Press: Cambridge; 702
- Kato Y, Shibamoto T, Yamamoto S, Watanabe T, Ishida N, Sugiura M, Rappaport F, Boussac A. 2012. Influence of the PsbA1/PsbA3, Ca²⁺/Sr²⁺ and Cl⁻/Br⁻ exchanges on the redox potential of the primary quinone QA in Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* as revealed by spectroelectrochemistry. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1817**: 1998-2004.
- Komárek J, Anagnostidis K. 1998. *Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales*, Ettl H, Gärtner G, Heynig H, Mollenhauer D (eds). Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1, Gustav Fischer: Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm; 548.
- Komárek J, Anagnostidis K. 2005. *Cyanoprokaryota 2, Oscillatoriales* (2nd Part) Büdel B, Krienitz L, Gärtner G, Schagerl M (eds). Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2. Elsevier/Spektrum: Heidelberg; 759.
- Komoé K, Da KP, Kouassi AM, Aka NM, Kamanzi AK, Adingra AA. 2009. Seasonal Distribution of Phytoplankton in Grand-Lahou Lagoon (Côte d'Ivoire). *European Journal of Scientific Research*; **26**(3): 329-341.
- Li L. 2010. Séquestration biologique du carbone par les cyanobactéries. PhD Thèse, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, p. 208.
- Lürling M, Faassen EJ. 2013. Dog Poisonings Associated with a *Microcystis aeruginosa* Bloom in the Netherlands. *Toxins*, **5**: 556-567.
- Mbukwa EA, Msagati TA, Mamba BB. 2012. Quantitative Variations of Intracellular Microcystin-LR, -RR and -YR in Samples Collected from Four Locations in Hartbeespoort Dam in North West Province (South Africa) During the

- 2010/2011 Summer Season. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **9**(10): 3484-3505.
- Merwe VDD, Sebbag L, Nietfeld JC, Aubel MT, Foss A, Carney E. 2012. Investigation of a *Microcystis aeruginosa* cyanobacterial freshwater harmful algal bloom associated with acute microcystin toxicosis in a dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **24**(4): 679–687.
- Monestier T. 2006. La problématique cyanobactéries sur le bassin versant de la dordogne. Etude de cas : retenue de bort les orgues. Master Environnement Restauration des Milieux Aquatiques Continentaux, Université Blaise Pascal, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Mauriac, p. 86
- Moore LR, Coe A, Zinser ER, Saito MA, Sullivan MB, Lindell D, Frois-Moniz K, Waterbury J, Chisholm WS. 2007. Culturing the marine cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Limnol. Oceanogr. Methods*, **5**: 353–362.
- N’Gohesse-Kouassi E. 2007. Caractérisation phytoplanctonique et bactériologique des eaux de la Lagune Aghien (Cote d’Ivoire). Mémoire de DEA, Université Abobo-Adjamé, Abidjan, p 60.
- Niamien-Ebrottié JE, Konan KF, Edia OE, Ouattara A, Gourène G. 2013. Composition et variation spatio-saisonnière du peuplement algal des rivières côtières du Sud-est de la Côte d’Ivoire. *J. Appl. Biosci.*, **66**: 5147–5161.
- OCDE. 2011. Lignes directrices de l’OCDE pour les essais de produits chimiques : Algues d’eau douce et cyanobactéries, essai d’inhibition de la croissance. P. 29.
- Ouattara A, Podoor N, Gourène G. 2001. Études préliminaires de la distribution spatio-temporelle du phytoplancton dans un système fluvio-lacustre africain (Bassin Bia ; Côte d’Ivoire). *Hydroécol. Appl.*, **13**: 113-132.
- Oufdou K, Oudra B. 2009. Substances bioactives élaborées par des cyanobactéries isolées de certains écosystèmes aquatiques marocains. *Afrique Science*, **5**(2): 260 – 279.
- Pearson L, Mihali T, Moffitt M, Kellmann R, Neilan B. 2010. On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. *Mar. Drugs*, **8**: 1650-1680.
- Pellerin MJ. Culture de cyanobactéries. Protocoles expérimentaux, 2p, http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/culturede_cellules/cyanobacteries.htm, consulté le 07 mai 2012.
- Rangel M, Martins JCG, Garcia AN, Conserva GAA, Costa-Neves A, Sant’Anna CL and al. 2014. Analysis of the Toxicity and Histopathology Induced by the Oral Administration of *Pseudanabaena galeata* and *Geitlerinema splendidum* (Cyanobacteria) Extracts to Mice. *Mar. Drugs*, **12**: 508-524.
- Rantala-Ylinen A, Kana S, Wang H, Rouhiainen L, Wahlsten M, Rizzi E, Berg K, Gugger M, Sivonen K. 2011. Anatoxin-a synthetase Gene Cluster of the Cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 37 and Molecular Methods To Detect Potential Producers. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**(20): 7271–7278.
- Renaud SL, Pick FR, Fortin N. 2011. Effect of Light Intensity on the Relative Dominance of Toxicogenic and Nontoxicogenic Strains of *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**(19): 7016–7022.
- Robert R, Chrétiennot-Dinet MJ, Kaas R, Martin-Jézéquel V, Moal J, Le Coz JR,

- Nicolas JL, Bernard E, Connan JP, Le Dean L, Gourrierc G, Leroy B, Quéré C. 2004. Amélioration des productions phytoplanctoniques en éclosérie de mollusques : caractérisation des microalgues fourrage. Report Ifremer DRV/RA/RST/LPI/2004-2005, 150 p.
- Salla M, Kouhete PD, Koffi SO, Traore D. 2011. Cyanobactéries des rivières Boubo et Mé dans le Sud côtier de la Côte d'Ivoire. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **5**(4): 1365-1373.
- Selvan BK, Revathi M, Piriya PS, Vasanth PT, D Immuanual Gilwax Prabhu, Vennison SJ. 2013. Biodiesel production from marine cyanobacteria cultured in plate and tubular photobioreactors. *Indian Journal of Experimental Biology*, **51**: 262-268.
- Silva CSP, Silva-Stenico ME, Fiore MF, Ferreira de Castro H, Molgéro Da Rós PC. 2014. Optimization of the cultivation conditions for *Synechococcus* sp. PCC7942 (cyanobacterium) to be used as feedstock for biodiesel production. *Algal Research*, **3**:1-7
- Vial V. 2004. Approche pour caractériser l'exposition aux cyanobactéries sur des plans d'eau à usage récréatif. Mémoire d'Ingénieur, Ecole Nationale de Santé Publique, Rennes, p. 72.
- Zhao Y, Quigg A. 2014. Nutrient Limitation in Northern Gulf of Mexico (NGOM): Phytoplankton Communities and Photosynthesis Respond to Nutrient. Pulse. *PLoS ONE* 9(2): e88732. doi:10.1371/journal.pone.0088732.