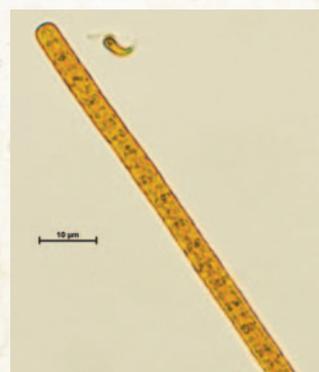
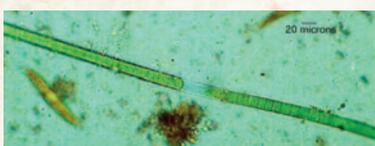
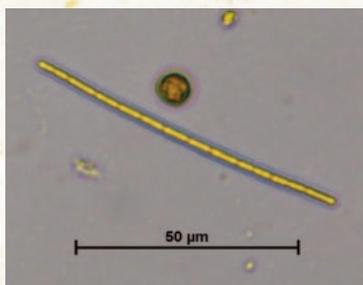
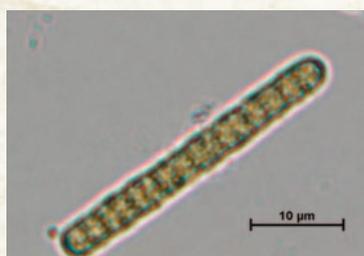
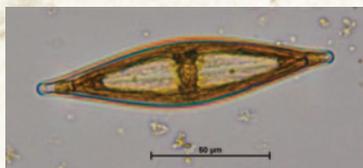
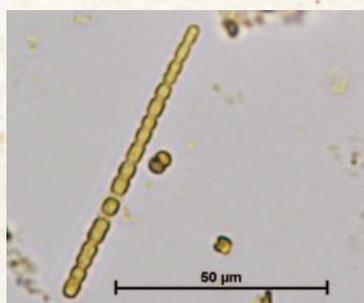
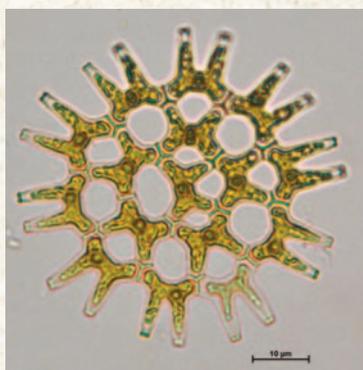
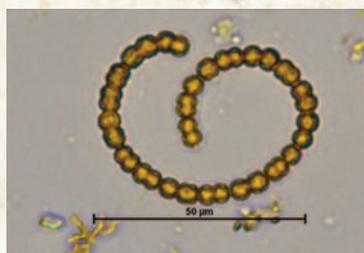


LES CAHIERS SCIENTIFIQUES de la Fondation Pierre Vérots



Page 3 : Les cyanobactéries benthiques

Sylvain Dolédec & Joël Robin

Page 19 : Diversité et diversification des *Pectobacteriaceae*

Céline Brochier
& Nicole Cotte-Pattat



FONDATION
PIERRE
VÉROTS



Pour l'étude et la préservation de
la faune et de la flore de la Dombes

FONDATION
PIERRE
VÉROTS



Pour l'étude et la préservation de
la faune et de la flore de la Dombes

La Fondation Pierre Vérots

La **Fondation Pierre Vérots** a été créée en 1982 et a été reconnue d'utilité publique par décret ministériel en 1984. Elle est née de la volonté d'un industriel lyonnais, Monsieur Pierre Vérots (1898-1985), de protéger la faune et la flore de la Dombes. Située à Saint-Jean-de-Thurigneux, dans le département de l'Ain, elle possède un domaine de plus de 300 ha composé de forêts, d'étangs et de prairies, dont un parc clôturé de 147 ha.

La Fondation Pierre Vérots s'est donné 3 missions inscrites dans ses statuts :

- Faire de son domaine un conservatoire de la faune, de la flore et des milieux dombistes
- Contribuer à la recherche scientifique sur ces espèces et ces milieux
- Participer à l'information du public.

La Fondation examine les demandes de financement qui portent en partie ou en totalité sur l'écologie, la biologie, l'éthologie, la génétique, la climatologie, elle missionne des chercheurs pour établir des relevés et se propose de publier les résultats obtenus sous une forme diffusable.

La Fondation offre un véritable laboratoire à ciel ouvert, permettant d'observer et d'expérimenter librement, sur des temps longs et avec peu de perturbations. Elle apporte aux chercheurs, stagiaires et visiteurs un soutien logistique (terrain, équipements, locaux d'expérimentation), éventuellement un soutien financier, et des possibilités d'hébergement.

Son statut de « Fondation d'utilité publique » l'autorise à recevoir toutes formes de dons ouvrant droit à une réduction d'impôt, et de legs en exonération totale de droits de succession.

Les Cahiers Scientifiques de la Fondation Pierre Vérots n°10 - Juillet 2024

N° ISSN 2739-7750

Responsable de la publication : Philippe NORMAND
Comité de Rédaction : Michel BOULÉTREAU, Joël BROYER, Philippe LEBRETON,
Philippe NORMAND et Philippe RICHOUX
Traductions : Philippe NORMAND

Photos de couverture : Différentes espèces de cyanobactéries observées sous microscope (Photos : J. Robin/ISARA)
et bloom de cyanobactéries en rivière (Photo : C. Robichon)

Réalisation et impression : Multitude Imprimerie - 01600 Trévoux



Fondation Pierre Vérots
261, chemin de Praillebard
01390 Saint Jean de Thurigneux

Tél. : 04 74 00 89 33
Mail : contact@fondation-pierre-verots.fr
www.fondation-pierre-verots.fr

Les cyanobactéries benthiques : facteurs de prolifération et risques écologiques dans les eaux continentales

Responsables scientifiques :
Sylvain Dolédec¹ & Joël Robin²

Autres participantes :
Charlotte Robichon¹ (Doctorante), Delphine Latour³, Fanny Perrière³

¹ Université Claude Bernard Lyon 1, LEHNA UMR 5023, CNRS, ENTPE, F-69622, Villeurbanne, France

² Institut Supérieur d'Agriculture Rhône-Alpes (ISARA), Lyon

³ Université Clermont Auvergne, Laboratoire Microorganisme : Génome, Environnement (LMGE), UMR CNRS 6023

Auteurs correspondants : sylvain.doledec@univ-lyon1.fr et jrobin@isara.fr

Préambule

Cet article a été réalisé à partir du **travail de doctorat** mené par **Charlotte Robichon** (2019-2023), sous la direction des auteurs de cet article, et soutenue le 21/12/2023. La bourse de thèse a été **co-financée** par le dispositif **EUR H2O de l'Université de Lyon** et la **Fondation Pierre Vérots**. Ce travail a également bénéficié d'un partenariat avec l'Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse, le Syndicat de Rivière d'Ain Aval et de ses Affluents (SR3A), l'Union des Pêcheurs de la Rivière d'Ain (AUPRA), Le Conseil Départemental de l'Ain (CD01), la Fédération Départementale de Pêche de l'Ain (FDP01) et Electricité de France (EDF).

Résumé

Les cyanobactéries benthiques sont des micro-organismes photosynthétiques qui se développent à l'interface entre le sédiment et l'eau. La capacité de certaines souches à produire des toxines et les mortalités de mammifères de plus en plus fréquentes liées à leur ingestion mettent en lumière les risques sanitaires et écologiques associés à leur prolifération en rivières et étangs. De plus, les changements thermiques et hydrologiques résultant du dérèglement climatique pourraient exacerber ces proliférations. Si les proliférations planctoniques sont bien documentées, l'impact écologique des développements de cyanobactéries benthiques ainsi que les périodes et les localisations les plus à risques sont peu connus. Dans ce contexte, la thèse de Charlotte Robichon avait pour objectifs (i) d'identifier les facteurs environnementaux principaux influençant le développement des cyanobactéries benthiques, (ii) de rechercher l'existence de lien entre ces facteurs écologiques et les concentrations en anatoxines produites, et (iii) d'étudier l'impact écologique du développement des cyanobactéries benthiques sur les communautés de macroinvertébrés benthiques.

Les résultats de ce travail montrent que :

- (1) Les facteurs hydrauliques (vitesse du courant, profondeur, débit) exercent une influence majeure sur le développement des cyanobactéries. Cette influence est variable au cours de l'été en lien avec le cycle de vie des biofilms et en fonction des variations des autres facteurs environnementaux (concentrations en nutriments, développement des Chlorophycées). Ces résultats fournissent un cadre de gestion qui remet en question les pratiques actuelles de lâchers d'eau en rivière ;
- (2) Les concentrations en anatoxine-a mesurées dans les biofilms sont généralement plus élevées dans les zones de faible courant, soulignant le potentiel risque sanitaire de ces zones généralement dévolues à la baignade ;
- (3) La présence de cyanobactéries dans les biofilms impacte négativement la distribution de quelques taxons de macroinvertébrés benthiques mais ne nuit pas à l'abondance globale des macroinvertébrés benthiques ni à leur biodiversité.

Pourquoi s'intéresser aux cyanobactéries benthiques ?

Les cyanobactéries, parfois improprement appelées « algues bleues », sont des micro-organismes procaryotes photosynthétiques, mi-algues, mi-bactéries classés dans le règne des Eubactéries. On les retrouve dans de nombreux environnements, principalement aquatiques (eaux douces, saumâtres et marines), mais aussi terrestres (Dow & Swoboda, 2002 ; Whitton, 2012). Elles sont capables de se développer dans des conditions environnementales extrêmes et dans des conditions climatiques très variées, polaires, désertiques, tempérées ou tropicales (Seckbach, 2007). Selon les espèces, les cyanobactéries se présentent sous forme unicellulaire ou sous forme de colonies pluricellulaires filamenteuses et peuvent (i) mener une vie planctonique (Fig. 1A : grâce à des vésicules gazeuses intracellulaires) dans la colonne d'eau des lacs et étangs, (ii) être agrégées à la surface de l'eau (on parle alors d'espèces métaphytiques) ou (iii) mener une vie benthique comme constituants des biofilms attachées aux substrats minéraux des fonds de cours d'eau ou aux macrophytes (Fig. 1B).

Le caractère ubiquiste des cyanobactéries s'explique par leurs larges préférences écologiques, mais aussi par le

fait qu'elles possèdent des capacités uniques que les autres algues n'ont pas : (i) la présence de cellules spécialisées leur permettant de fixer l'azote atmosphérique (hétérocystes), (ii) la possibilité de se maintenir dans l'environnement durant les périodes défavorables grâce à des spores (akinètes) et (iii) la possibilité de produire des toxines (Whitton & Potts, 2000).

En conditions environnementales favorables les cyanobactéries prolifèrent massivement et rapidement (Fig. 1B et D). Ces proliférations observées de manière récurrente sur tous les continents ne sont pas sans conséquences écologiques, sanitaires et économiques et expliquent l'intérêt porté sur ces micro-organismes à un niveau international (WHO, 2021). Selon la littérature scientifique, trois genres principaux *Oscillatoria* spp., *Phormidium* spp. et *Lyngbya* spp. sont incriminés dans la prolifération des cyanobactéries benthiques dans les rivières mais aussi dans les plans d'eau (Hudon et al., 2014). Les souches toxiques de *Phormidium* spp. (genre cosmopolite) produisent principalement de l'anatoxine-a dont les effets neurotoxiques¹ sont connus que ce soit dans les milieux lenticques² ou lotiques³ (Faassen et al., 2012).

L'un des enjeux majeurs de l'étude proposée était de mieux anticiper l'apparition des biofilms à cyanobactéries et le risque toxique associé en identifiant les facteurs éco-



Figure 1 : A. Étang de la Dombes (© P. Moiroux ; <https://vpah-auvergne-rhone-alpes.fr/ressource>). B. Développement de cyanobactéries planctoniques (© J. Robin). C. La Basse Rivière d'Ain (© C. Robichon). D. Développement de cyanobactéries benthiques sur un galet de l'Ain

¹ C'est-à-dire bloquant la transmission nerveuse

² Zone de très faible courant et plan d'eau

³ Zone avec courant en rivière

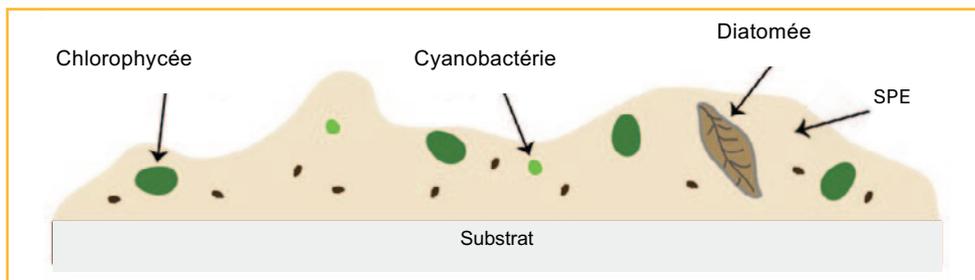


Figure 2 : Schéma de biofilm à cyanobactéries (SPE : substances polymères extracellulaires. Chlorophycée = algue verte ; modifié de Schnurr & Allen (2015)).

logiques du déterminisme de leur développement. Les effets combinés de la radiation solaire, des nutriments, de la température, des variations de débit sur les proliférations algales sont relativement bien documentés en étangs et lacs. En revanche, aucun modèle général ne permet l'identification des facteurs de prolifération des biofilms à cyanobactéries en rivière. Or, ces proliférations pourraient être amenées à s'intensifier en raison des modifications de débit liées aux changements climatiques. Par ailleurs, si sur les plans d'eau, le risque toxique est connu, l'ampleur de ce risque reste à préciser en rivière.

Qu'est-ce qu'un biofilm ?

Le développement sous forme de biofilm accroché à un substrat constitue le mode de développement dominant des communautés bactériennes de rivières, et notamment des cyanobactéries benthiques (Costerton et al., 1978 ; Geesey et al., 1978 ; Lock et al., 1984) mais elles sont moins étudiées dans les plans d'eau au profit des cyanobactéries planctoniques. Les biofilms sont des communautés complexes de micro-organismes (algues, bactéries, champignons, virus, etc.). Ils se développent sur une surface stable (cailloux, graviers, macrophytes) et sont maintenus ensemble par des matrices principalement composées de polysaccharides (SPE dans la Fig. 2), de protéines et d'ADN extracellulaires. On parle de biofilm à cyanobactéries lorsque les cyanobactéries font partie des organismes dominants au sein du biofilm (Fig. 2).

Les biofilms jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement des écosystèmes de rivière (Battin et al., 2016). En contribuant aux flux d'énergie via la photosynthèse et la production de biomasse, les biofilms jouent un rôle nutritif pour les espèces aquatiques (macroinvertébrés et poissons ; Biggs, 1996). Ils peuvent servir de refuge pour d'autres organismes, à travers leur structure tridimensionnelle complexe qui crée de l'hétérogénéité dans les micro-habitats. Par exemple, le développement de certains taxons au sein du biofilm, comme l'algue filamenteuse *Cladophora* spp., peut offrir aux macroinvertébrés benthiques une protection contre les contraintes hydrauliques et la prédation, tout en leur offrant une ressource nutritive (Dodds & Gudder, 1992). En se développant, les biofilms contribuent enfin aux processus biogéochimiques comme le recyclage des nutriments ou la dégradation des polluants. L'importance écologique de ces biofilms fait qu'ils peuvent être utilisés comme indicateurs biologiques pour évaluer le bon état écologique des rivières (Spyra et al., 2017).

Un biofilm, comment ça marche ?

Le cycle de développement d'un biofilm comporte quatre grandes étapes (Echenique-Subiabre et al., 2018 ; McAllister et al., 2016) : le conditionnement initial, la colonisation de la matrice, la maturation, et le détachement et la dispersion (Fig. 3).

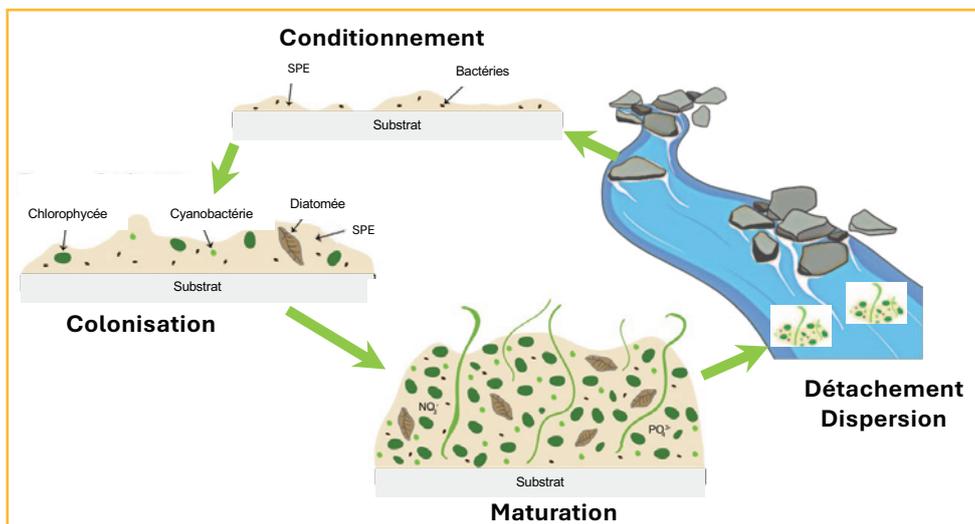


Figure 3 : Représentation schématique des étapes du cycle de vie d'un biofilm à cyanobactéries (ici, plus particulièrement *Phormidium* spp.) (SPE : substances polymères extracellulaires ; adapté de Schnurr & Allen (2015)).

Au cours d'un **conditionnement initial**, les cellules bactériennes colonisent le substrat et sécrètent des exopolysaccharides (SPE ; Fig. 3) qui forment une matrice extracellulaire.

Le développement du biofilm se poursuit avec une phase de **colonisation** de la matrice extracellulaire qui va englober divers micro-organismes. Cette matrice extracellulaire joue donc un rôle important dans l'adhérence au substrat du biofilm et des micro-organismes, la protection des cellules, la rétention d'eau et de nutriments et permet des échanges entre les cellules.

Pendant la phase de **maturation** une grande diversité de bactéries, de cyanobactéries de même que les algues filamenteuses prolifèrent au sein du biofilm. Au cours de cette phase, le biofilm s'étend dans les trois dimensions (surface, épaisseur) selon les conditions de luminosité (Echenique-Subiabre et al., 2018), la compétition pour l'espace et la résistance au broutage (Azim & Asaeda, 2005).

Le détachement intervient lorsque le biofilm est mature. Des bulles d'oxygène résultant de la photosynthèse très importante peuvent alors être emprisonnées à l'intérieur du biofilm, ce qui augmente sa flottabilité. Le biofilm peut alors se détacher en partie ou complètement du substrat, puis flotter à la surface de l'eau pour aller s'échouer sur les berges (Bouma-Gregson et al., 2017). Il s'agit donc aussi d'une phase qui permet la dispersion des cyanobactéries.

Les préférences environnementales des cyanobactéries

Les connaissances actuelles sur les préférences écologiques des cyanobactéries benthiques sont surtout limitées à quelques genres de cyanobactéries comme *Phormidium* spp. (Quiblier et al., 2013 ; Wood et al., 2020). Plusieurs paramètres physico-chimiques de l'eau influencent le développement des biofilms à cyanobactéries :

(1) La **température de l'eau** est le facteur le plus important jouant sur la vitesse de croissance des cyanobactéries benthiques avec des températures élevées induisant une augmentation de la vitesse de croissance tandis que des températures plus basses ont l'effet inverse (Echenique-Subiabre et al., 2018 ; Heath et al., 2015 ; Wood et al., 2017).

(2) Une faible **luminosité** favorise le développement en surface de biofilms à *Phormidium* spp. tandis que l'épaisseur du biofilm augmente à faible profondeur en condition de luminosité élevée et protège les cellules contre le rayonnement en UVs (Echenique-Subiabre et al., 2018).

(3) Contrairement aux cyanobactéries planctoniques pour qui les concentrations en nutriments sont les facteurs majeurs de prolifération (Paerl, 1988), le lien entre le développement des cyanobactéries benthiques et les concentrations en **nutriments** n'est pas clairement établi. Les cyanobactéries benthiques peuvent effectivement se développer en rivières eutrophes⁴ (Loza et al., 2013) ou oligotrophes⁵ (Wood et al., 2017).

(4) Le **régime hydrologique** a également un impact majeur sur l'établissement et le développement des cyanobactéries benthiques (Hart et al., 2013). Les événements de forts débits peuvent induire un arrachage des biofilms de leur substrat (Heath et al., 2011). La plupart du temps, les proliférations de *Phormidium* spp. sont observées à la suite de périodes de faibles débits (Heath et al., 2011). Cependant, des études portant sur des biofilms à *Phormidium* spp. tendent également à montrer que les **conditions hydrauliques locales** influencent la présence des cyanobactéries benthiques qui peuvent se développer sur une gamme large de vitesses de courant allant de 0,3 jusqu'à 1,1 m.s⁻¹ (Echenique-Subiabre et al., 2018 ; Heath et al., 2015).

(5) Enfin, des **interactions biotiques** (compétition, prédation) peuvent influencer le développement des cyanobactéries benthiques au sein des biofilms (i) en lien avec la croissance d'organismes **concurrents** tels que les chlorophycées (Wood et al., 2020), et (ii) en lien avec la **consommation** des biofilms par certains poissons (Hotu, Toxostome) et les macroinvertébrés benthiques⁶ (Capper et al., 2016 ; Visconti et al., 2015).

La toxicité des cyanobactéries : un risque avéré

Les cyanobactéries possèdent la particularité de produire des cyanotoxines à l'intérieur des cellules. La fonction principale de la production de toxines chez les cyanobactéries (benthiques et pélagiques) est encore en débat. En effet, cette production est à la fois coûteuse en

⁴ Une rivière eutrophe, littéralement "sur nourrie", est une rivière qui reçoit des nutriments en excès provoquant des proliférations algales importantes qui ont pour conséquence une dégradation de la qualité physico-chimique et biologique de l'eau (eutrophisation).

⁵ Une rivière oligotrophe, littéralement "peu nourrie" est une rivière contenant peu de nutriments.

⁶ Les macroinvertébrés benthiques sont des organismes sans colonne vertébrale (invertébrés) et visibles à l'œil nu (macro), comme les insectes (larves et/ou adultes), les mollusques, les crustacés et les "vers", qui vivent sur le fond des cours d'eau et des lacs à l'interface eau-sédiment (benthiques). Ces organismes sont à la base des réseaux trophiques reliant les producteurs primaires (algues et bactéries photosynthétiques) et les consommateurs secondaires (poissons).

énergie pour les cellules mais pourrait leur conférer des avantages évolutifs (Heath et al., 2016). L'avantage compétitif acquis par la production de toxines est mis en avant par plusieurs travaux (Christoffersen, 1996 ; Holland & Kinneer, 2013) montrant que les toxines peuvent :

- (1) Avoir un effet allélopathique sur d'autres organismes par exemple pour limiter le développement d'autres algues présentes dans le biofilm ;
- (2) Constituer un système de protection contre les brouetteurs du biofilm ;
- (3) Permettre une optimisation du fonctionnement physiologique des cellules de cyanobactéries en améliorant l'homéostasie, la photosynthèse ou la vitesse de croissance.

Ces hypothèses, souvent non confirmées de manière définitive, montrent que le rôle écologique de la production de cyanotoxines nécessite d'être encore étudié (Janssen, 2019).

Ces toxines ne peuvent être libérées dans l'environnement que lors de la lyse cellulaire par suite de la mort de la cellule, due à un stress physique causant l'abrasion de la paroi cellulaire ou à la consommation par des organismes benthiques. Si les enjeux écotoxicologiques liés aux cyanobactéries lacustres sont bien appréhendés, les risques toxiques induits par le développement des cyanobactéries benthiques et plus spécifiquement en rivière n'ont été connus qu'à partir des années 2000 (Wood et al., 2020). Ces travaux ont été menés à la suite de cas de mortalité de chiens en Europe (Gugger et al., 2005 ; Cadel-Six et al., 2007), en Amérique du Nord (Puschner et al., 2008 ; Bouma-Gregson & Higgins, 2015) et en Nouvelle-Zélande (Hamill, 2001). En France, une vingtaine de

cas de mortalité de chiens ont été enregistrés depuis une quinzaine d'années dans divers cours d'eau (Tarn, Loue, Loire, Cher, Moselle, Ardèche, Ain ; Boisseleau et al., 2018).

Parmi les cyanotoxines, l'anatoxine-a est une des toxines la plus souvent produite dans les biofilms par des genres de cyanobactéries fréquemment observés en rivière (*Phormidium* spp., *Microcoleus* spp., *Oscillatoria* spp. ; Faassen et al., 2012 ; Hudon et al., 2014). L'anatoxine-a avec ses dérivés est une molécule neurotoxique bloquant la transmission nerveuse, dont les effets incluent la paralysie, l'insuffisance respiratoire et la mort des mammifères. Malgré la présence d'anatoxine dans l'eau, les concentrations sont généralement considérées comme trop faibles pour occasionner des risques toxiques avérés (Wood et al., 2018). De plus, l'anatoxine présente dans l'eau se dégrade rapidement en rivière sous l'effet des UVs et de l'action des bactéries lorsqu'elle est sous forme extracellulaire. Le risque toxique est en revanche avéré lors de l'échouage des biofilms sur les berges à la suite de la dispersion (Cf. Fig. 3). Des phénomènes de bioaccumulation ont également été mis en évidence face à une exposition des organismes aquatiques à l'anatoxine-a (poisson, Oswald et al., 2007 ; Colas et al., 2020 ; macroinvertébrés, Kelly et al., 2019). Dans ce contexte, **les objectifs du travail de thèse de Charlotte Robichon** visaient à produire des connaissances supplémentaires concernant les proliférations de cyanobactéries en rivière sur le plan (i) de leur déterminisme (facteurs environnementaux clés), (ii) du risque toxique associé (production d'anatoxine) et (iii) des conséquences sur la distribution des organismes aquatiques et le réseau trophique (macroinvertébrés benthiques).

La Basse Rivière d'Ain

Contexte écologique

Le choix de la rivière d'Ain a été motivé sur la base des suivis réalisés par le SR3A⁷ et à la suite d'études préliminaires (Frossard et al., 2014 ; Dolédec et al., 2017) qui ont révélé la présence de cyanobactéries potentiellement toxiques sur toute la rivière d'Ain. De plus, des cas de mortalité canine en été 2017 ont été attribués à l'ingestion de biofilms de cyanobactéries et à une intoxication probablement due à l'anatoxine-a. La rivière d'Ain comprend

MATÉRIEL ET MÉTHODES

deux zones caractéristiques qui diffèrent par leur morphologie et leur fonctionnement hydrologique :

- (1) La partie amont (185 km), où ont été construits 5 barrages hydroélectriques entre 1931 et 1970. Le barrage de Vouglans (1968) situé le plus en amont, est le 3^e grand réservoir artificiel français et règle l'écrêtement des crues (crue centennale de 2750 m³.s⁻¹ à Pont d'Ain) et les soutiens d'étiage (débit minimal de 6 m³.s⁻¹ à Allement, en août 2003) de la rivière d'Ain. On trouve ensuite les barrages de Saut-Mortier (1968), Coiselet (1970), Cize Bolozon (1931) et Allement (1960).

⁷ Le Syndicat de la rivière d'Ain Aval et ses Affluents est une structure publique née en 2018 de la volonté de 7 intercommunalités de gérer conjointement la ressource en eau, de préserver et de restaurer les rivières et les milieux aquatiques, de réduire les inondations, et de protéger la biodiversité.

(2) La partie aval (après Allement) est communément appelée **Basse Rivière d'Ain** (BRA, 53 km) jusqu'à la confluence avec le Rhône. La rivière traverse une plaine alluviale en pente douce (0.15% en moyenne) où elle développe un faciès en méandres dynamiques, créant ainsi une grande diversité d'habitats (Bravard et al., 1990).

La BRA a fait l'objet d'un classement en site Natura 2000 « Basse Vallée de l'Ain, Confluence Ain-Rhône » (FR8201653) au titre de la directive européenne « Habitats, Faune, Flore » mais subit également plusieurs types de pressions incluant : (i) des prélèvements conséquents dans la nappe alluviale de l'Ain en été pour l'irrigation (Le Behec et al., 2010), (ii) une forte activité touristique axée sur les loisirs nautiques et la pêche, et (iii) des apports en en fertilisants qui peuvent contribuer à l'eutrophisation estivale avec des proliférations d'algues vertes filamenteuses et des cyanobactéries. A ce titre, outre la régulation des fluctuations saisonnières des débits par les barrages hydroélectriques, des lâchers d'eau (réalisés sous le contrôle d'une cellule dite d'alerte) tentent de réduire l'eutrophisation et/ou de diminuer la température de l'eau dans la BRA. Ces lâchers peuvent entraîner des variations importantes et rapides de débits ($15 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ à $100 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ pour des vitesses de courant entre 1.3 et $1.8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$) alternant avec des périodes de débits faibles et stables pour assurer le remplissage des retenues de barrages. Malgré tout, la

BRA reste une rivière que l'on peut qualifier d'oligo-mésotrophe sur la base des concentrations en nutriments modérées observées (Frossard et al., 2014).

Protocole de mesures

Pour capturer la diversité des situations écologiques, le **protocole d'échantillonnage** a porté sur 4 tronçons d'intérêt (250 à 500 mètres de linéaire ; Fig. 4A) connus pour la récurrence de proliférations de cyanobactéries. Six campagnes d'échantillonnage ont été réalisées au cours de l'été 2020 pendant la période propice au développement des cyanobactéries (2-3 juin, 29-30 juin, 15-16 juillet, 23-24 juillet, 27-28 juillet et 24-25 août)⁸.

Sur chaque tronçon, trois zones hydrauliques ont été délimitées à partir d'un modèle hydrodynamique 2D (voir ZABR, 2016) qui fournit les valeurs de vitesse moyenne de courant et de hauteur d'eau pour différentes valeurs de débits à une résolution de 4 m^2 (Fig. 4B).

Les trois zones hydrauliques ont été délimitées pour une gamme de débits allant de 15 à $40 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ (débits les plus fréquents en période estivale) selon les critères suivants :

- (1) **Zone hydraulique #1** considérée comme favorable au développement des cyanobactéries benthiques présentant des vitesses de courant faibles ($< 0,1 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$) et stables (toujours $< 0,2 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$).

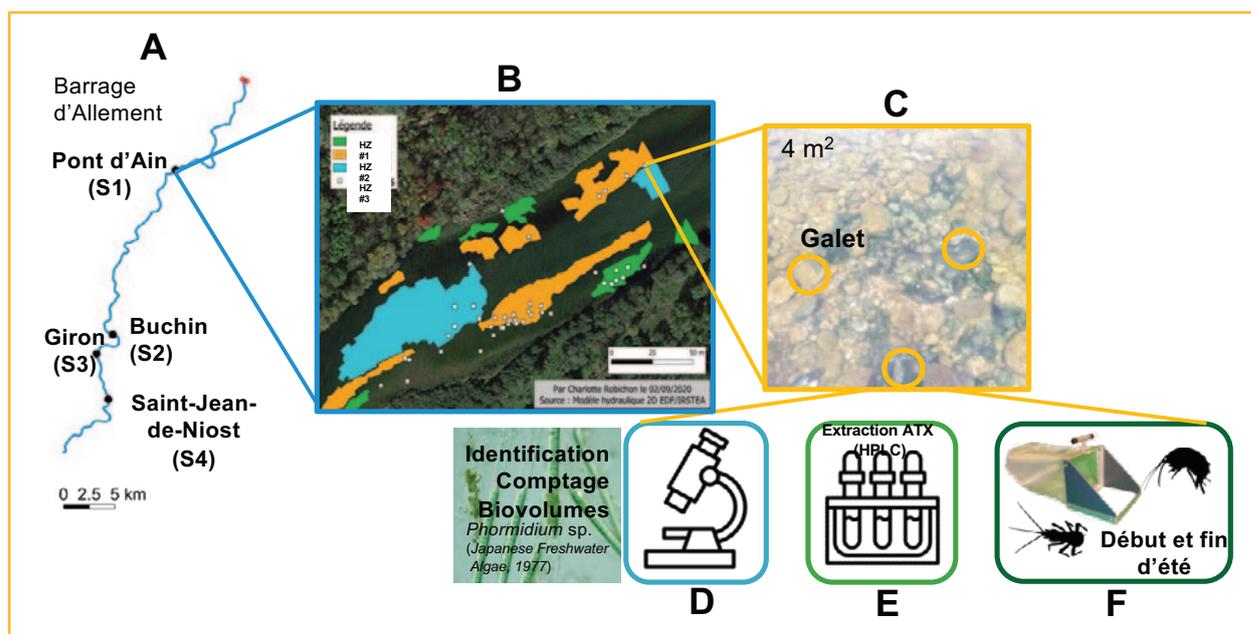


Figure 4 : Protocole d'échantillonnage de l'étude sur la rivière d'Ain. **A.** Les 4 stations prospectées. **B.** les trois zones hydrauliques sélectionnées sur un tronçon donné à partir d'un modèle hydrodynamique 2D (carrés blancs = placettes sélectionnées sur le tronçon). **C.** Les 3 galets sélectionnés aléatoirement sur une placette. Le galet est l'unité d'échantillonnage à partir de laquelle ont été effectués les comptages et identification algaux (**D**), le dosage d'anatoxine (**E**) et les prélèvements d'invertébrés benthiques (**F**).

⁸ Les campagnes des 23/07/20 et 24/07/20 n'ont finalement pas été prises en compte ici car peu différentes des campagnes des 15/07/20 et 16/07/20.

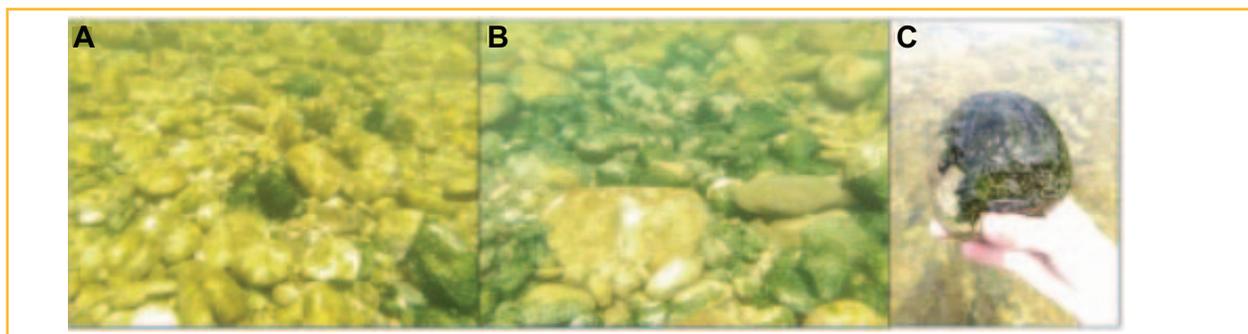


Figure 5 : A. Placette avec un biofilm peu épais. B. Placette avec biofilm bien développé. C. Galet présentant un biofilm à cyanobactéries bien développé et reconnaissable à la couleur vert foncé.

(2) **Zone hydraulique #2** considérée comme favorable aux cyanobactéries benthiques à de faibles débits ($< 15 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) avec des vitesses de courant faibles ($< 0,1 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$) et stables. En revanche, la vitesse de courant peut être $> 0,2 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ lorsque les débits augmentent.

(3) **Zone hydraulique #3** considérée comme défavorable au développement des cyanobactéries avec des vitesses du courant systématiquement $> 0,8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ même à des débits $< 15 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$.

Dans chaque zone hydraulique et sur des **placettes** de 4 m^2 , **3 galets** ont été sélectionnés aléatoirement pour y prélever le biofilm (Fig. 4C et Fig. 5). Au total, **733 échantillons de biofilm** ont été prélevés puis homogénéisés avant l'identification et le comptage en laboratoire (Fig. 4D). Les **communautés photosynthétiques ont été identifiées jusqu'au niveau du genre** grâce à leurs caractéristiques morphologiques, en suivant plusieurs guides d'identification et le biovolume (en $\mu\text{m}^3 \cdot \text{cm}^{-2}$) de chaque genre a été quantifié. Un total de 273 échantillons a été sélectionné pour **l'extraction et la quantification des anatoxines**⁹ (Fig. 4E).

Les **macroinvertébrés benthiques ont été échantillonnés** au niveau de chaque **galet** lors des campagnes de début et de fin d'été 2020 à l'aide d'un filet Surber normalisé (Fig. 4F ; AFNOR XP T90 388, 2010). Au total, 180 échantillons (30 placettes par date) ont été collectés et conservés dans de l'éthanol à 96° jusqu'au tri et jusqu'à l'identification des individus (Tachet et al., 2010).

Des mesures de variables physicochimiques ont été réalisées au niveau de chaque :

- (1) Galet : hauteur d'eau et vitesse de courant moyenne.
- (2) Placette : température de l'eau, pH, conductivité, concentrations en ammonium, nitrates et orthophosphates, substrats (sable, gravier, petits galets et blocs).

Enfin, pour prendre en compte les récents changements hydrologiques associés aux événements de lâchers d'eau des barrages, le débit maximal des 15 jours précédant l'échantillonnage a été calculé à partir des

données hydrologiques disponibles (stations d'enregistrement de Pont-d'Ain et Chazey-sur-Ain).

Étangs de la Fondation Pierre Vérots

Contexte écologique

Les étangs de la Fondation Pierre Vérots sont situés au sein d'un bassin versant plutôt forestier. Au nombre de quatre, ils ont des fonctions différentes. En tête de bassin, les étangs Riquet (4 ha) et Boufflers (24 ha) sont gérés dans un but conservatoire, ils ne sont donc vidangés que rarement. L'étang Page (3,2 ha), en relation possible avec Boufflers, est destiné à accueillir des études expérimentales spécifiques, telles que l'étude trophique et écologique d'un étang sans poisson réalisée au cours des années antérieures. Enfin, l'étang Praillebard (20 ha), à l'aval de Riquet et Boufflers, est géré tel qu'un étang de pisciculture traditionnel avec en moyenne 4 ans en eau et un empoisonnage classique alternant avec un assec utilisé pour des cultures. Chaque étang dispose de chenaux permettant la collecte de l'eau en provenance de l'amont et d'un dispositif de vidange. Ces étangs sont caractérisés par une profondeur moyenne similaire ($\sim 70 \text{ cm}$) avec des profondeurs maximales comprises entre 1,6 et 2,6 m. Le fond des étangs est principalement de structure limono-argileuse, comme la plupart des étangs de la région. Seules les digues principales sont renforcées avec l'implantation de substrats grossiers de type roches et galets à leur base. C'est en particulier le cas des étangs Boufflers et de Praillebard.

Du point de vue trophique, les étangs de la Fondation Pierre Vérots sont classés eutrophes à hypereutrophes. Ils sont très riches en éléments nutritifs qui s'accumulent au cours des années en eau. De ce fait, la productivité primaire y est importante, avec souvent une présence significative d'herbiers de plantes aquatiques (Praillebard, Page, Riquet), et parfois des proliférations algales intenses (Boufflers, Praillebard).

⁹ Ces analyses ont été réalisées au Laboratoire de Microbiologie, Génome et Environnement (LMGE) de l'Université de Clermont-Ferrand.

Protocole de mesures

Les étangs de la Fondation Pierre Vérots ont fait l'objet d'un suivi du développement des cyanobactéries benthiques et de leur toxicité en milieu lentique. Plus particulièrement, les étangs de Praillebard et Boufflers

ont été échantillonnés mensuellement (juin, juillet et août 2021) au niveau des zones présentant des substrats grossiers (graviers, cailloux des digues), en suivant le même protocole que pour l'échantillonnage des cyanobactéries benthiques sur la BRA (Fig. 6).

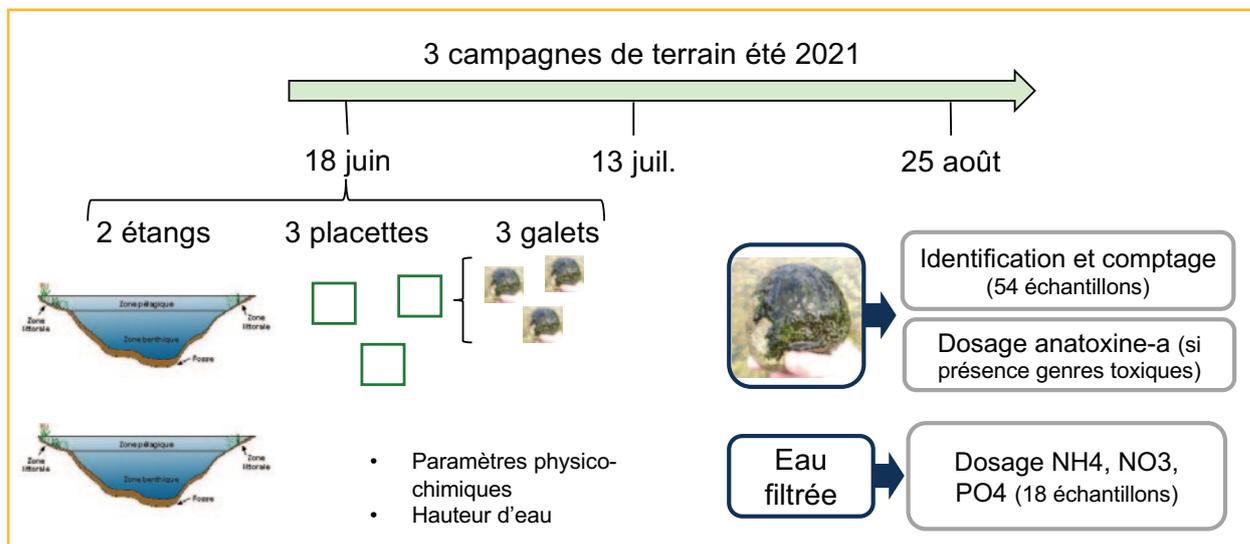


Figure 6 : Protocole d'échantillonnage de l'étude sur les étangs de la Fondation Pierre Vérots (© Charlotte Robichon).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Étangs de la Fondation Pierre Vérots

Les analyses des communautés photosynthétiques des biofilms ont révélé des biovolumes de cyanobactéries très faibles (100 à 1000 fois plus faibles que les maxima observés en rivière), et les analyses des concentrations en anatoxines ont donné des concentrations négligeables, le plus souvent inférieures au seuil de quantification. De plus, les biomasses de biofilm récoltées se sont parfois

avérées insuffisantes pour réaliser le protocole d'extraction d'anatoxines utilisé sur les biofilms de la rivière d'Ain. Seul *Phormidium* spp. a pu être identifiée au sein des prélèvements d'étangs.

Nos mesures de terrain et ces analyses corroborent l'hypothèse que les biofilms à cyanobactéries en étang ne se développent que très peu du fait de conditions défavorables, avec notamment une luminosité trop faible et un support physique moins adapté (peu de galets).

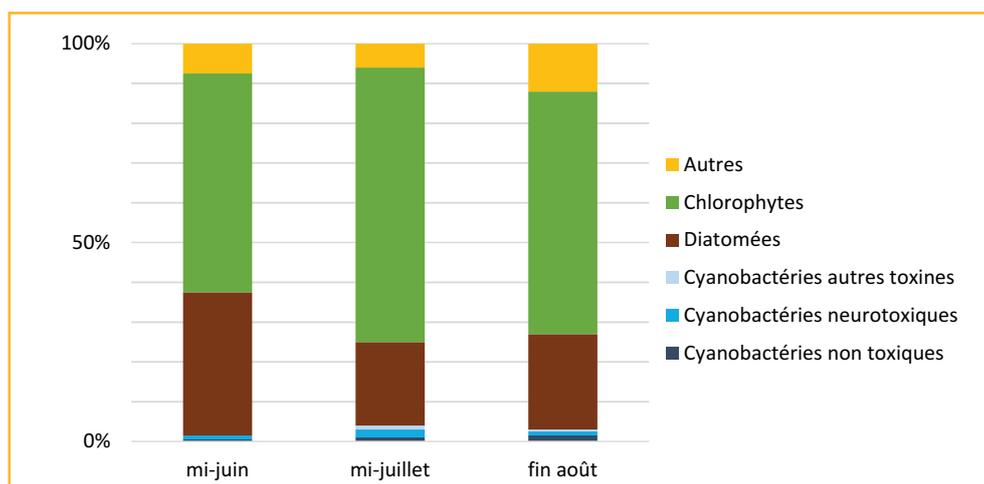


Figure 7 : Distribution temporelle des abondances relatives des différents groupes dans le biofilm des étangs.

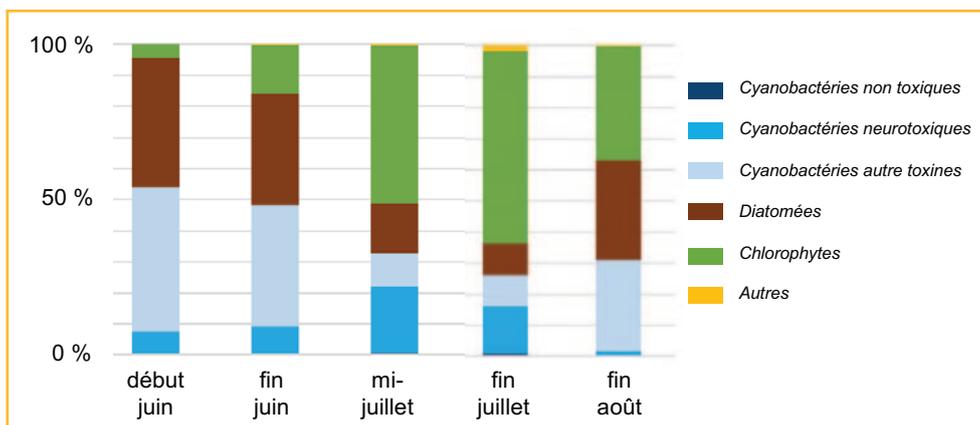


Figure 8 : Distribution temporelle des abondances relatives des différents groupes dans le biofilm de la BRA.

Basse Rivière d’Ain

Quels facteurs favorisent leur implantation ?¹⁰

Un total de 23 genres de cyanobactéries a été identifié. Ils représentent entre 30 et 50% des biovolumes algaux (Fig. 8).

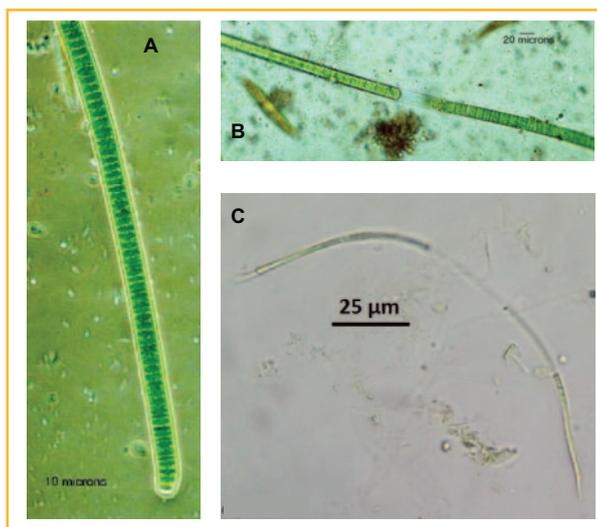


Figure 9 : Quelques spécimens de cyanobactéries.
 A. *Phormidium* spp. (© J. Robin).
 B. *Lyngbya* spp. (© J. Robin).
 C. *Planktolyngbya* spp. (© E. Capo).

Quatre genres connus pour contenir des espèces potentiellement toxiques dominent (>50%) les assemblages de cyanobactéries (*Phormidium* spp., *Lyngbya* spp., *Planktolyngbya* spp., *Oscillatoria* spp. ; Fig. 9).

Sur le plan écologique, le biovolume total des cyanobactéries est globalement plus faible dans la zone à faible courant (HZ#1 ; Fig. 10) avec un déplacement vers les zones à plus fort courant à la fin de l’été (HZ#2 ; Fig. 10). Parmi les quatre genres de cyanobactéries les plus abondants, certains apparaissent pendant les périodes de débit stable (*Phormidium* spp. et *Oscillatoria* spp.), tandis que d’autres se développent pendant les périodes de fortes variations de débit (*Lyngbya* spp. et *Planktolyngbya* spp. ; Fig. 11B) soulignant l’influence importante des paramètres hydrauliques sur l’installation et le développement des cyanobactéries benthiques en rivière (Fig. 11C).

En revanche, les épisodes de forts débits n’entraînent pas systématiquement une diminution des biovolumes de cyanobactéries. En effet, malgré des lâchers d’eau destinés à arracher les algues et le biofilm en fin d’été (Fig. 11), le développement des cyanobactéries benthiques ne diminue pas de manière significative (Fig. 10). Ces lâchers d’eau de 100 m³.s⁻¹ pendant une heure ne sont donc pas une solution viable pour réduire le développement des cyanobactéries benthiques.

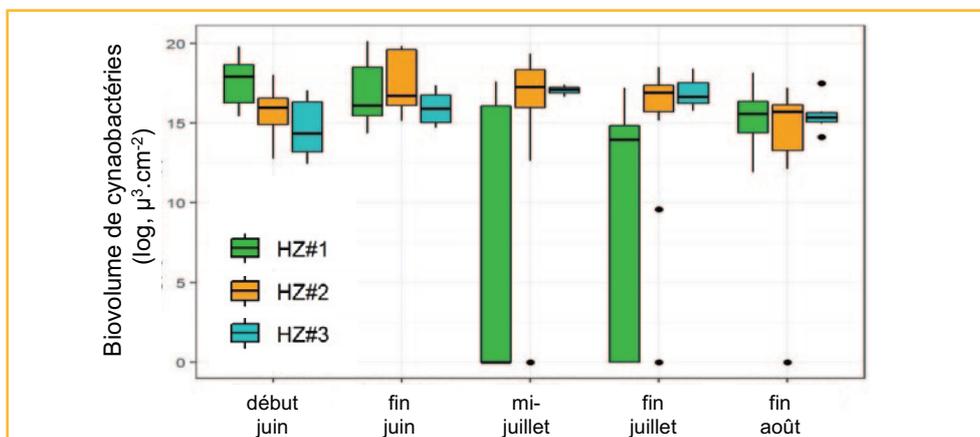


Figure 10 : Distribution temporelle des abondances relatives des différents groupes dans le biofilm de la BRA.

¹⁰ Les résultats de cette étude ont fait l’objet d’une publication dans la revue *Science of the Total Environment* (DOI : <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162142>).

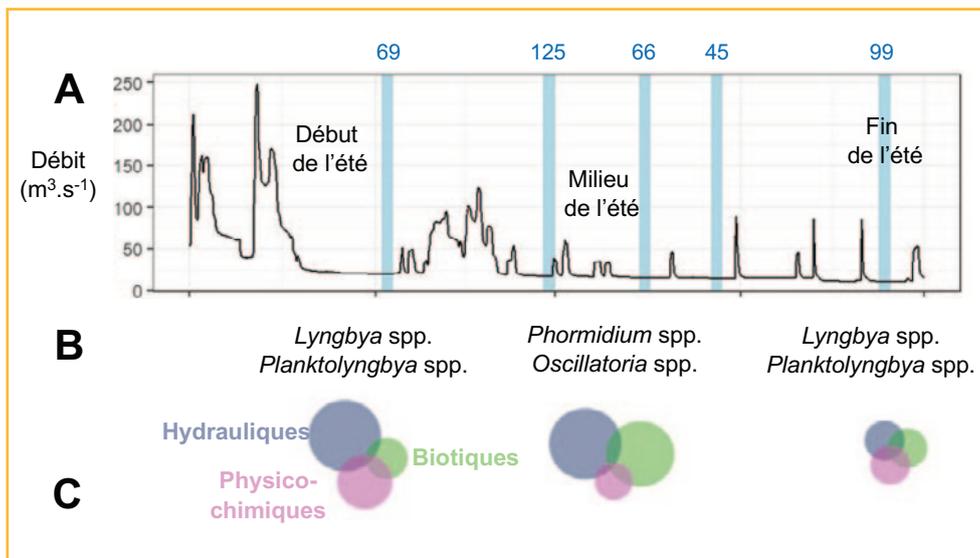


Figure 11 : A. Chronologie des événements hydrologiques sur la période d'échantillonnage (les barres bleues matérialisent les échantillonnages). B. Genres dominants de cyanobactéries benthiques. C. Contributions relatives (taille des cercles proportionnelle à ces contributions) des paramètres environnementaux impliqués (Hydrauliques : profondeur, vitesse de courant, granulométrie ; Biotiques : présence de chlorophycées, diatomées, ou autres algues ; Physico-chimiques : pH, température, conductivité, nutriments). En bleu, les valeurs moyennes de débits des 15 jours précédant l'échantillonnage.

D'autres paramètres environnementaux influencent le développement des cyanobactéries. Tout d'abord, en milieu d'été, le plus rapide développement des chlorophycées au sein des biofilms induit un déclin des cyanobactéries (Fig. 10 ; Fig. 11C). Ensuite, les températures de l'eau (température maximale de 20,9°C) plus élevées en milieu et fin d'été sont susceptibles de favoriser le développement des cyanobactéries benthiques. Enfin, les concentrations en nutriments ont un effet mineur en début et fin d'été en lien avec des phases d'implantation et/ou de réimplantation des cyanobactéries.

La synthèse des influences environnementales sur la prolifération ou le déclin des cyanobactéries montre que l'environnement n'intervient pas de manière univoque sur toute la période estivale mais que certains éléments environnementaux ont un impact négatif ou positif en fonction de la période d'intérêt (Fig. 12).

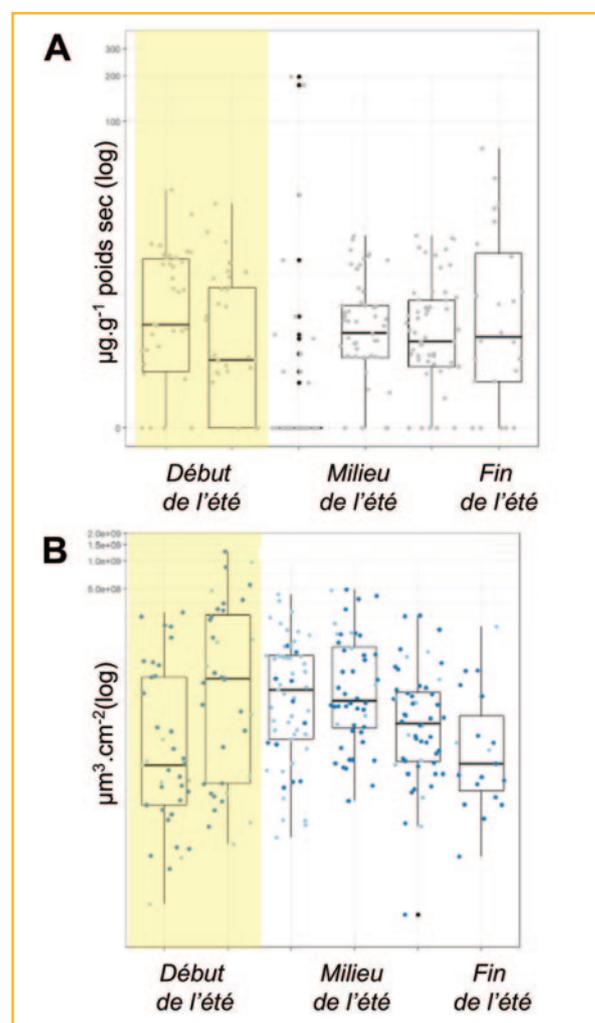
	Début d'été	Milieu d'été	Fin d'été
Hydrologie	–	ns	ns
Température	ns	+	ns
Nutriments	+	ns	+
Autres algues	ns	–	ns

Figure 12 : Synthèse des influences positives (+) et négatives (-) des paramètres environnementaux sur l'abondance des biofilms à cyanobactéries (ns : pas d'influence).

Figure 13 : A. Evolution estivale des concentrations en anatoxine-a (Les points gris représentent chaque échantillon et les points noirs représentent les mesures extrêmes). B. Evolution estivale des biovolumes de cyanobactéries potentiellement productrices d'anatoxine-a (les échantillons contenant de l'anatoxine-a sont en bleu foncé, ceux n'en contenant pas sont en bleu clair).

Quels facteurs favorisent leur production d'anatoxine ?

Les concentrations en anatoxines retrouvées dans les échantillons s'étendent en moyenne de 4.3 à 10.5 µg.g⁻¹ du poids sec avec des concentrations nettement plus élevées dans certains échantillons pour lesquels le risque toxique est significatif (jusqu'à 200 µg.g⁻¹, Fig. 13A).



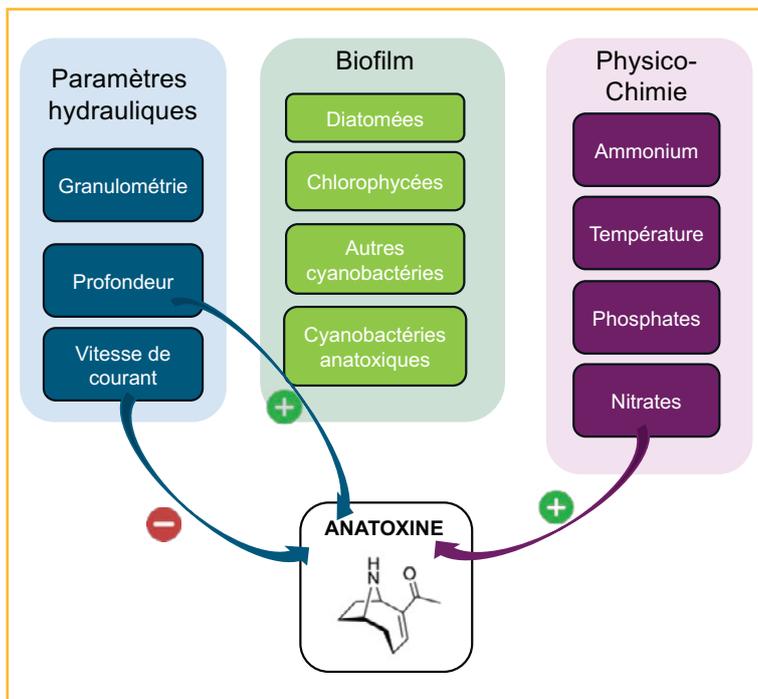


Figure 14 : Principales relations obtenues par modélisation statistique pour expliquer les concentrations en anatoxine dans les échantillons.

Le rôle écologique supposé de l'anatoxine-a serait de favoriser l'implantation des cyanobactéries en permettant notamment une augmentation de leur vitesse de croissance. Si l'on se concentre sur le début de l'été, on observe une relation inverse entre concentration en anatoxine (Fig. 13A) et biovolume de cyanobactéries neurotoxiques (Fig. 13B) qui invalide ce mécanisme.

Plusieurs relations ont pu être identifiées entre les paramètres environnementaux et la production d'anatoxine-a (Fig. 14). Les variables hydrauliques (hauteur d'eau et vitesse de courant) exercent une influence majeure et consistante au cours de l'été sur la production d'anatoxine-a. Ainsi, malgré la capacité des cyanobactéries à se développer à des vitesses de courant supérieures à 1 m.s^{-1} , leur production d'anatoxines est plus importante dans des zones de faibles courants (influence <0 de la vitesse de courant ; Fig. 14). Par ailleurs, des conditions peu profondes donc plus exposées au rayonnement solaire sont défavorables à la production d'anatoxine-a. Au regard de ces résultats, les conditions de stress environnemental (forte vitesse = abrasion, forte luminosité = influence négative des rayons UV) représentent probablement un coût énergétique tel qu'il diminue ou inhibe la production d'anatoxine-a par les cyanobactéries.

Comme évoqué précédemment, une compétition semble s'instaurer entre les chlorophycées et les cyanobactéries au milieu de l'été. À cette période, le modèle statistique décèle une influence négative des chlorophycées sur la production d'anatoxine-a (non montré). Ce résultat suggère l'existence de mécanismes complexes de compétition

et d'allélopathie entre les chlorophycées et les cyanobactéries. Les genres et espèces présents, les composés qu'ils libèrent ainsi que le stade de développement du biofilm pourraient influencer ces relations de compétitions et méritent des études approfondies en conditions contrôlées.

Influence sur les maillons trophiques supérieurs : L'exemple des macroinvertébrés benthiques

En tant que consommateurs primaires, les macroinvertébrés benthiques peuvent être particulièrement sujets à l'ingestion de biofilm de cyanobactéries potentiellement toxiques. De plus, la prolifération de cyanobactéries peut colmater les interstices du substrat limitant la libre circulation des organismes. Cette partie de l'étude s'est plus particulièrement penchée sur les hypothèses suivantes :

- (1) La structure des communautés¹¹ de macroinvertébrés benthiques est influencée par les développements de cyanobactéries benthiques au profit de taxons généralistes ;
- (2) Le développement des cyanobactéries et les concentrations fortes en anatoxines limitent l'abondance des invertébrés et plus particulièrement des mangeurs de biofilms.

L'étude de la niche écologique moyenne (Dolédec et al. 2000) des communautés de macroinvertébrés benthiques révèle que celles-ci sont moins influencées par les variables considérées dont la présence de cyanobactéries

¹¹ La structure de la communauté comprend au sens large sa composition en espèces, leur abondance relative et les interactions entre les différentes espèces.

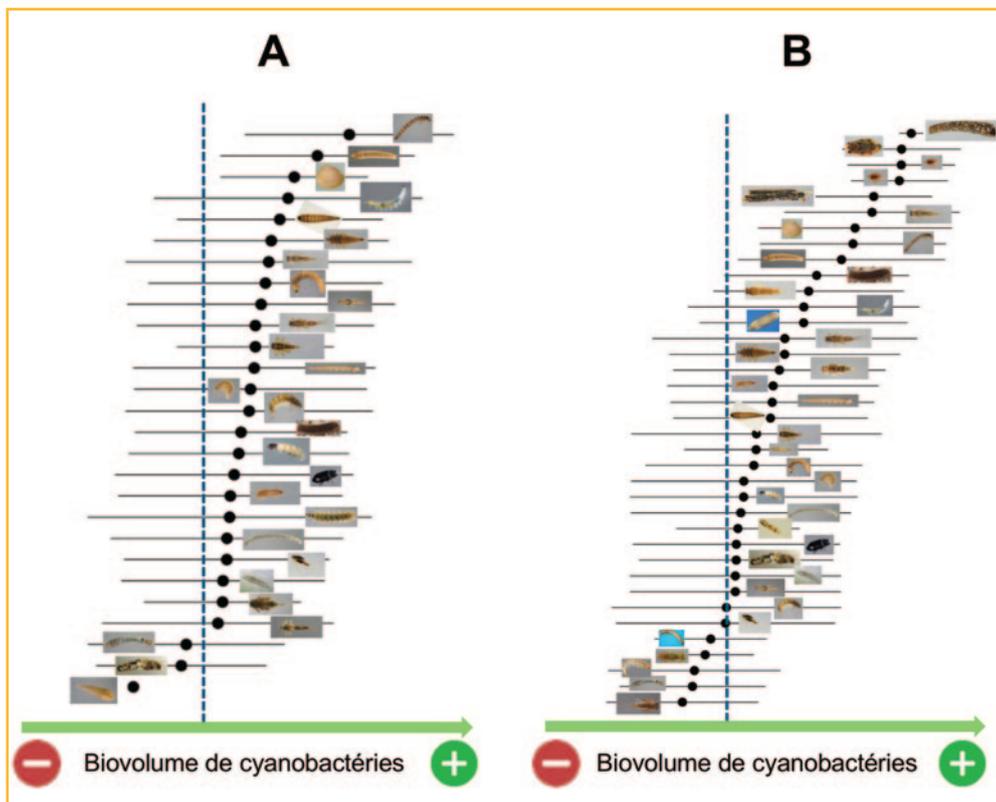


Figure 15 : Distribution des taxons influencés significativement par la présence de cyanobactéries. **A.** Début d'été. **B.** Fin d'été. Le pointillé indique la position moyenne d'une espèce théorique uniformément répartie dans tous les échantillons. Chaque point noir (position moyenne) associé à un trait horizontal (amplitude de niche) correspond à un taxon dont la photo est donnée¹³. Plus la position moyenne d'un taxon est proche de la ligne pointillée, plus le taxon est ubiquiste. Plus la position moyenne d'un taxon s'éloigne de la ligne pointillée vers la gauche (signe "-") plus il apparaît éviter les zones à cyanobactéries. Plus la position moyenne d'un taxon s'éloigne de la ligne pointillée vers la droite (signe "+") plus il apparaît préférer les zones à cyanobactéries.

benthiques en début qu'en fin d'été (OMI moyen¹² = 5,1, P= 0.178, et OMI moyen = 4,3, P=0.009). En début d'été, sur les 27 taxons (parmi un total de 63 taxons présents) dont la niche environnementale est significativement influencée par les variables considérées, seuls 3 taxons (*Helobdella* spp. (Achètes), *Setodes* spp. (Trichoptères) et Simuliidae (Diptères)) évitent les zones trop colonisées par les cyanobactéries benthiques (Fig. 15A), tandis que de nombreux taxons connus pour consommer du biofilm sont soit positivement influencés par les cyanobactéries benthiques (*Planorbidae* (Mollusques), *Limnius* spp., *Oulimnius* spp., *Elmis* spp. (Coléoptères Elmidae) ; Fig. 15A), soit ubiquistes (*Baetis* spp. (Ephéméroptères) ; Fig. 15A).

En fin d'été, sur les 39 taxons (parmi un total de 71 taxons présents) présentant une niche écologique significativement influencée par les variables considérées 5 taxons (*Rhithrogena* spp. (Ephéméroptères), Simuliidae (Diptères), *Cheumatopsyche* spp. (Trichoptères), *Onychogomphus* spp. (Odonate) et *Stenelmis* spp. (Coléoptères Elmidae)) évitent les zones trop colonisées par les cyanobactéries benthiques (Fig. 15B), tandis que des taxons algivores (*Haliplidae* (Coléoptères), *Micronecta* spp. (Hétéroptères)) ou connus pour consommer du biofilm (*Limnius* spp., *Oulimnius* spp., *Elmis* spp. (Coléoptères

Elmidae), *Potamanthus* spp. (Ephéméroptères) ; Fig. 15B) sont positivement influencés par les cyanobactéries benthiques. Enfin, à cette période, on trouve de nombreux taxons ubiquistes dans les communautés (*Baetis* spp. (Ephéméroptères), *Hydropsyche* (Trichoptères), *Leuctra* spp. (Plécoptères), *Dugesia* spp. (Turbellariés), *Setodes* spp. (Trichoptères), *Esolus* spp. (Coléoptères Elmidae) ; Fig. 15B).

Contrairement aux hypothèses initiales, les cyanobactéries benthiques semblent donc favoriser les taxons se nourrissant de microphytes et de biofilm. Cela renforce l'idée selon laquelle les cyanobactéries ne semblent pas être une ressource alimentaire évitée par les brouteurs de biofilms, peut-être du fait de leur association fréquente avec des diatomées dont la richesse nutritive est importante. Par ailleurs, le développement des différents taxons photosynthétiques (cyanobactéries benthiques et chlorophycées) montre une forte hétérogénéité spatiale à l'échelle des placettes échantillonnées (4 m²) et les macroinvertébrés benthiques sont en mesure de trouver des ressources alimentaires qui leur conviennent en restant à proximité des patches de cyanobactéries.

¹² OMI pour "Outlying Mean Index". Pour chaque taxon on calcule la position moyenne des taxons sur le gradient de sites. L'OMI moyen est la moyenne de ces valeurs. Un test de permutation permet de s'assurer de la significativité statistique de cette valeur. Ce test donne une valeur de probabilité (P) qui, si elle est supérieure à 0,05, permet d'émettre des doutes sur l'OMI moyen.

¹³ Voir <http://www.perla.developpement-durable.gouv.fr/index.php>.

Ce travail de thèse a permis de qualifier de manière plus précise le développement de ces biofilms à cyanobactéries dans les étangs de la Fondation Vérots et dans la rivière d'Ain et d'apporter des perspectives sur les solutions à envisager pour anticiper les risques sanitaires.

Les résultats concernant l'étude des biofilms au sein des étangs permettent d'une façon globale de conclure que le risque toxique lié aux biofilms à cyanobactéries est très faible voire nul dans ces milieux : les biovolumes de cyanobactéries benthiques retrouvés sont très faibles et les concentrations en anatoxines sont quasi nulles pour l'ensemble des échantillons récoltés. Le risque toxique associé aux cyanobactéries est donc davantage lié aux cyanobactéries pélagiques dont on connaît les préférences pour les milieux eutrophes et stagnants comme les étangs.

Les résultats obtenus sur la rivière d'Ain précisent que plusieurs paramètres environnementaux (température, concentrations en nitrates, vitesse du courant) peuvent alternativement jouer un rôle dans le développement des cyanobactéries benthiques au cours de l'été. Mais les conditions hydrauliques sont sans doute les plus importantes : ainsi, des profondeurs moyennes et des vitesses modérées procurent un environnement favorable à ces cyanobactéries benthiques, que l'on aurait vues davantage capables de se développer dans des gammes de vitesses de courant plus faibles.

En termes de toxicité, les concentrations d'anatoxine-a (neurotoxines pouvant à forte dose provoquer la mort de mammifères) sont généralement faibles à modérées (<50 µg.g⁻¹ de poids sec de biofilm). En revanche, certains échantillons contenaient jusqu'à 200 µg.g⁻¹ de poids sec de biofilm. Dans ces situations, le biofilm présente un risque toxique élevé dans le cas d'une ingestion par un mammifère. Ces fortes concentrations en anatoxine-a retrouvées dans les biofilms étaient généralement liées à des vitesses de courant assez faibles et à forte profondeur donc dans des zones proches potentiellement de baignades.

En termes de perspectives pour la gestion du risque lié aux biofilms à cyanobactéries, le travail de thèse de Charlotte Robichon permet de préconiser plusieurs pistes :

- (1) Suivre l'évolution des paramètres abiotiques facilement disponibles (débit, température de l'eau, prévisions météorologiques notamment l'évolution thermique à 15 jours, etc.) pour anticiper les zones et périodes de développement maximal de ces cyanobactéries.
- (2) Se rapprocher de la stratégie de surveillance proposée par l'ANSES visant, au cours des périodes considérées comme à risque, à quantifier les anatoxines et autres toxines de cyanobactéries benthiques. Ces analyses permettraient la mise en place d'un plan de prévention des risques, pouvant aller jusqu'à la fermeture de la baignade ou la non-consommation de poisson.
- (3) Adapter les lâchers d'eau. Tels qu'ils sont pratiqués sur la rivière d'Ain, ces lâchers sont souvent inefficaces pour cet objectif d'arrachage. Il faudrait que ces lâchers soient associés à des débits significativement plus élevés et sans doute sur des durées plus longues pour assurer un arrachement significatif. Mais augmenter plus violemment les débits présente d'autres inconvénients, notamment au niveau de la sécurité, et ils favorisent le dépôt de biofilms sur les zones latérales du lit en été. Un plan de gestion opérationnelle des lâchers reste à construire.

Bibliographie

- AFNOR XP T90 388. 2010. Qualité de l'eau - Traitement au laboratoire d'échantillons contenant des macro-invertébrés de cours d'eau.
- ANSES. 2020. Actualisation de l'évaluation des risques liés aux cyanobactéries et leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, les eaux de loisirs et les eaux destinées aux activités de pêche professionnelle et de loisir (Rapport d'expertise collective). ANSES, Maisons-Alfort.
- Azim, M.E. & Asaeda, T. 2005. Periphyton structure, diversity and colonization. In : Azim, M.E., Verdegem, M.C.J., van Dam, A.A., Beveridge, M.C.M. (Eds.), *Periphyton: Ecology, Exploitation and Management*. CAB International, Wallingford, pp. 15-33.
<https://doi.org/10.1079/9780851990965.0015>
- Battin, T.J., Besemer, K., Bengtsson, M.M., Romani, A.M. & Packmann, A.I. 2016. The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 14 : 251-263.
- Biggs, B.J.F. 1996. Patterns in Benthic Algae of Streams. In : Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L. (Eds.), *Algal Ecology*. Elsevier, pp. 31-56.
<https://doi.org/10.1016/B978-012668450-6/50031-X>
- Boisseleau, D., Peigner, P. & Polato, T. 2018. Cas groupés d'intoxications de chiens par de cyanobactéries dans la Loire. *Bulletin épidémiologique* 82 : 1-2.
- Bouma-Gregson, K. & Higgins, P. 2015. Cyanobacteria and cyanotoxins in the Eel River, 2013 – 2014. University of California, Berkeley, CA. pp.18.
- Bouma-Gregson, K., Power, M.E. & Bormans, M. 2017. Rise and fall of toxic benthic freshwater cyanobacteria (*Anabaena* spp.) in the Eel river: Buoyancy and dispersal. *Harmful Algae* 66 : 79-87.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.05.007>
- Bravard, J.P., Franc, O., Landon, N., Large, J.L. & Peiry, J.L. 1990. La basse vallée de l'Ain : étude géomorphologique. Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse et Conseil Général de l'Ain. pp. 113.
- Cadel-Six, S., Peyraud-Thomas, C., Briant, L., de Marsac, N.T., Rippka, R. & Mejean, A. 2007. Different Genotypes of Anatoxin-Producing Cyanobacteria Coexist in the Tarn River, France. *Applied and Environmental Microbiology* 73 : 7605-7614.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01225-07>
- Capper, A., Erickson, A.A., Ritson-Williams, R., Becerro, M.A., Arthur, K.A. & Paul, V.J. 2016. Palatability and chemical defenses of benthic cyanobacteria to a suite of herbivores. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 474 : 100-108.
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.09.008>
- Colas, S., Duval, C. & Marie, B. 2020. Toxicity, transfer and depuration of anatoxin-a (cyanobacterial neurotoxin) in medaka fish exposed by single-dose gavage. *Aquatic Toxicology* 222 : 105422.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105422>
- Costerton, J.W., Geesey, G.G. & Cheng, K.J. 1978. How Bacteria Stick. *Scientific American* 238 : 86-95.
<https://doi.org/10.1038/scientificamerican0178-86>
- Dodds, W.K. & Gudder, D.A. 1992. The ecology of Cladophora. *Journal of Phycology* 28 : 415-427.
- Dolédec, S., Chessel, D. & Gimaret-Carpentier, C. 2000. Niche separation in community analysis: a new method. *Ecology* 81 : 2914-2927.
- Dolédec, S., Mermillod-Blondin, F., Simon, L., Alric, B., Persat, H., Robin, J., Blemus, J. & Vienney, A. 2017. Dynamique, fonctionnement et biodiversité des communautés aquatiques face aux pressions anthropiques sur la vallée de l'Ain. Rapport final, Convention CNRS 109651, pp. 114 + annexes.
- Dow, C.S. & Swoboda, U.K. 2002. Cyanotoxins. In: Whitton, B.A., Potts, M. (Eds.), *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 613-632.
<https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7-22>
- Echenique-Subiabre, I., Tenon, M., Humbert, J.F., Quiblier, C. 2018. Spatial and temporal variability in the development and potential toxicity of *Phormidium* biofilms in the Tarn river, France. *Toxins* 10 : 1-14.
<https://doi.org/10.3390/toxins10100418>
- Faassen, E.J., Harkema, L., Begeman, L. & Lurling, M. 2012. First report of (homo)anatoxin-a and dog neurotoxicosis after ingestion of benthic cyanobacteria in The Netherlands. *Toxicon* 60 : 378-384.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.335>
- Frossard, V., Versanne-Janodet, S. & Aleya, L. 2014. Factors supporting harmful macroalgal blooms in flowing waters: A 2-year study in the Lower Ain River, France. *Harmful Algae* 33 : 19-28.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.01.001148>
- Geesey, G.G., Mutch, R., Costerton, J.W. & Green, R.B. 1978. Sessile bacteria: An important component of the microbial population in small mountain streams 1: Epilithic microbial populations. *Limnology and Oceanography* 23 : 1214-1223.
<https://doi.org/10.4319/lo.1978.23.6.1214>
- Gugger, M., Lenoir, S., Berger, C., Ledreux, A., Druart J.C., Humbert, J.F., Guette, C. & Bernard C. 2005. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* 45 : 919-928. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.031>
- Hart, D.D., Biggs, B.J.F., Nikora, V.I. & Flinders, C.A. 2013. Flow effects on periphyton patches and their ecological

- consequences in a New Zealand river. *Freshwater Biology* 58 : 1588-1602. <https://doi.org/10.1111/fwb.12147149>
- Heath, M., Wood, S. & Ryan, K. 2011. Spatial and temporal variability in *Phormidium* mats and associated anatoxin-a and homoanatoxin-a in two New Zealand rivers. *Aquatic Microbial Ecology* 64 : 69-79. <https://doi.org/10.3354/ame01516>
- Heath, M.W., Wood, S.A., Brasell, K.A., Young, R.G. & Ryan, K.G. 2015. Development of Habitat Suitability Criteria and In-Stream Habitat Assessment for the Benthic Cyanobacteria *Phormidium*. *River and Research Application* 31 : 98-108. <https://doi.org/10.1002/rra.2722>
- Hudon, C., De Sève, M. & Cattaneo, A. 2014. Increasing occurrence of the benthic filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei* : a symptom of freshwater ecosystem degradation. *Freshwater Science* 33 : 606-618. <https://doi.org/10.1086/675932>
- Kelly, L.T., Puddick, J., Ryan, K.G., Champeau, O. & Wood, S.A. 2019. An ecotoxicological assessment of the acute toxicity of anatoxin congeners on New Zealand *Deleatidium* species (mayflies). *Inland Waters* 10 : 101-108. <https://doi.org/10.1080/20442041.2019.1626151>
- Le Behec, G., Herivaux, C. & Gourcy, L. 2010. La gestion qualitative et quantitative de la ressource en eau sur le territoire du SAGE de la basse vallée de l'Ain. In : 17ème journées techniques du Comité Français d'Hydrogéologie de l'Association Internationale des Hydrogéologues. pp. 11.
- Lock, M.A., Wallace, R.R., Costerton, J.W., Ventullo, R.M. & Charlton, S.E. 1984. River Epilithon: Toward a Structural-Functional Model. *Oikos* 42 : 10. <https://doi.org/10.2307/3544604>
- Loza, V., Perona, E., Carmona, J. & Mateo, P. 2013. Phenotypic and genotypic characteristics of *Phormidium*-like cyanobacteria inhabiting microbial mats are correlated with the trophic status of running waters. *European Journal of Phycology* 48 : 235-252. <https://doi.org/10.1080/09670262.2013.799715153>
- McAllister, T.G. 2018. *Phormidium* accrual cycles in Canterbury rivers: the effects of nutrients and flow. University of Canterbury, Waterways Center for Freshwater Management. PhD thesis, pp. 213.
- McAllister, T.G., Wood, S.A. & Hawes, I. 2016. The rise of toxic benthic *Phormidium* proliferations: A review of their taxonomy, distribution, toxin content and factors regulating prevalence and increased severity. *Harmful Algae* 55 : 282-294. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.04.002>
- Osswald, J., Rellán, S., Carvalho, A.P., Gago, A. & Vasconcelos, V. 2007. Acute effects of an anatoxin-a producing cyanobacterium on juvenile fish *Cyprinus carpio* L. *Toxicon* 49 : 693-698.
- Paerl, H.W. & Huisman, J. 2009. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports* 1 : 27-37. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2008.00004.x>
- Park, H.D., Watanabe, M.F., Harada, K.I., Nagai, H., Suzuki, M., Watanabe, M. & Hayashi, H. 1993. Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters. *Natural Toxins* 1 : 353-360. <https://doi.org/10.1002/nt.2620010606>
- Piégay, H., Arnaud, F., Naudet, G., Capra, H., Spitoni, M., et al. 2016. Caractérisation physique et thermique des habitats aquatiques de l'Ain. [Rapport de recherche] EVS - UMR 5600; IRSTEA; Ecole des Mines de Saint Etienne; Laboratoire de Géologie de Lyon, pp. 66 <hal-01313825>
- Puschner, B., Hoff, B. & Tor, E.R. 2008. Diagnosis of Anatoxin-a poisoning in Dogs from North America. *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation* 20 : 89-92. <https://doi.org/10.1177/104063870802000119>
- Quiblier, C., Wood, S., Echenique-Subiabre, I., Heath, M., Villeneuve, A. & Humbert, J.F. 2013. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria - Ecology, toxin production and risk management. *Water Research* 47 : 5464-5479. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.042>
- Schnurr, P. & Allen, D.G. 2015. Factors affecting algae biofilm growth and lipid production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 52 : 418-429
- Seckbach, J. 2007. Algae and cyanobacteria in extreme environments, Cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology. Springer Science & Business Media, New York.
- Spyra, A., Kubicka, J. & Strzelec, M. 2017. The Use of Biological Indices for the Assessment of the River Quality (Ruda River, Poland). *Ecological Chemistry and Engineering S* 24 : 285-298. <https://doi.org/10.1515/eces-2017-0020>
- Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M. & Usseglio-Polatera, P. 2010. Invertébrés d'eau douce : systématique, biologie, écologie. Nouvelle éd. revue et augmentée. CNRS (Ed.), Paris, pp. 588.
- Visconti, A., Cattaneo, A., Gagnon, P. & Hudon, C. 2015. Do freshwater gastropods avoid the benthic cyanobacterium *Lyngbya wollei*? *Inland Waters* 5 : 39-48. <https://doi.org/10.5268/IW-5.1.744>
- Whitton, B.A. 2012. Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time. Springer Science & Business Media.
- Whitton, B.A. & Potts, M. 2000. Introduction to the cyanobacteria. Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space. Springer Science & Business Media.

- Wood, S.A., Atalah, J., Wagenhoff, A., Brown, L., Doehring, K., Young, R.G. & Hawes, I. 2017. Effect of river flow, temperature, and water chemistry on proliferations of the benthic anatoxin-producing cyanobacterium *Phormidium*. *Freshwater Science* 36 : 63-76. <https://doi.org/10.1086/690114>
- Wood, S.A., Biessy, L. & Puddick, J. 2018. Anatoxins are consistently released into the water of streams with *Microcoleus autumnalis*-dominated (cyanobacteria) proliferations. *Harmful Algae* 80 : 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.10.001>
- Wood, S.A., Kelly, L.T., Bouma-Gregson, K., Humbert, J.F., Laughinghouse, H.D., Lazorchak, J., McAllister, T.G., McQueen, A., Pokrzywinski, K., Puddick, J., Quiblier, C., Reitz, L.A., Ryan, K.G., Vadeboncoeur, Y., Zastepa, A. & Davis, T.W. 2020. Toxic benthic freshwater cyanobacterial proliferations: Challenges and solutions for enhancing knowledge and improving monitoring and mitigation. *Freshwater Biology* 65 : 1824-1842 [fwb.13532. https://doi.org/10.1111/fwb.13532](https://doi.org/10.1111/fwb.13532)
- World Health Organization. 2021. Guidelines on recreational water quality. Volume 1. Coastal and fresh waters. WHO, Geneva (Switzerland), pp. 138.

Diversité et diversification des *Pectobacteriaceae*, une famille de bactéries phytopathogènes d'importance mondiale

Responsables scientifiques :
Céline Brochier¹ & Nicole Cotte-Pattat²

Autres participants :
Jean-Pierre Flandrois¹, Sylvie Reverchon², Jérôme Briolay³

¹ Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, VetAgro Sup, Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, UMR5558, F-69622, Villeurbanne, France

² INSA Lyon, Laboratoire Microbiologie, Adaptation, Pathogénie (MAP) - UMR 5240

³ Université Claude Bernard Lyon 1, Plateforme Développement de Techniques et Analyse Moléculaire de la Biodiversité

Auteur correspondant : celine.brochier-armanet@univ-lyon1.fr

Résumé

Les bactéries de la famille des *Pectobacteriaceae* comprennent des pathogènes de plantes majeurs provoquant la pourriture des végétaux infectés. Ce symptôme est dû à la production massive de pectinases capables de dégrader la pectine des parois végétales, un composé majeur pour la structuration des végétaux. Au sein des *Pectobacteriaceae*, le genre *Dickeya* est particulièrement étudié car il cause d'importantes pertes agricoles au niveau mondial sur des cultures essentielles à l'alimentation humaine, comme la pomme de terre, le maïs ou le riz.

Bien que la plupart des espèces de *Dickeya* aient été isolées à partir de végétaux infectés, certaines l'ont été à partir d'échantillons environnementaux liés aux milieux aquatiques. Malgré cela, les connaissances actuelles sur les *Dickeya* proviennent majoritairement de l'étude des espèces pathogènes, négligeant ainsi la biodiversité réelle de ces bactéries. Il y a quelques années, nous avons initié une analyse des souches issues des environnements aquatiques afin de caractériser ces bactéries et de mieux comprendre leur physiologie, leur écologie, leur évolution et leurs liens avec les espèces pathogènes. L'analyse d'échantillons d'eau provenant d'étangs de la Fondation Pierre Vérots (convention n°04-CE-05/2017) a ainsi permis d'isoler de nombreuses souches dont une nouvelle espèce aquatique, nommée *Dickeya lacustris*. Par ailleurs, nos travaux suggèrent que les espèces aquatiques sont les premières à avoir divergé au sein du genre *Dickeya* et que les souches pathogènes pourraient dériver d'espèces aquatiques.

Notre objectif est maintenant de réaliser une étude approfondie des premières étapes de la diversification des *Dickeya*, avec une attention particulière pour les espèces aquatiques, *D. aquatica* et *D. lacustris*. Les données génomiques sur ces espèces étant très limitées, nous avons entrepris de séquencer le génome de six souches (trois de chaque espèce) isolées sur le site de la Fondation Pierre Vérots. Ces nouvelles données, combinées à l'analyse de génomes de genres proches, contribueront à retracer l'histoire évolutive de la famille des *Pectobacteriaceae* et fourniront des informations sur leurs capacités d'adaptation, notamment en ce qui concerne leur pouvoir pathogène et leur écologie.

INTRODUCTION

Chez les bactéries, l'ordre des *Enterobacterales* est subdivisé en neuf familles : les *Budviciaceae*, les *Enterobacteriaceae*, les *Erwiniaceae*, les *Hafniaceae*, les *Morganellaceae*, les *Pectobacteriaceae*, les *Thorselliaceae*, les *Yersiniaceae*, et les *Bruguierivoracaceae* (cette dernière n'étant pas encore officiellement reconnue). Parmi elles, les *Pectobacteriaceae* font l'objet de beaucoup d'attention car elles regroupent des pathogènes de plantes majeurs caractérisés par une production massive de pectinases capables de dégrader la pectine des parois végétales et provoquant un symptôme de pourriture (Fig. 1). Au sein des *Pectobacteriaceae*, le genre *Dickeya* est particulièrement étudié car il s'attaque à une grande variété de cultures vivrières (dont la pomme de terre, le maïs et le riz) et de plantes ornementales et cause d'importantes pertes économiques au niveau mondial (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2020). Cependant, des



| **Figure 1** : Macération provoquée par *Dickeya dadantii* sur endive.

souches de *Dickeya* ont aussi été identifiées dans des environnements aquatiques comme les rivières et, grâce aux travaux précédemment réalisés sur le site de la Fondation Pierre Vérots, nous avons pu également mettre en évidence leur présence dans des étangs (convention n°04-CE-05/2017).

En particulier, en 2019, nous avons décrit une nouvelle espèce, *Dickeya lacustris*, provenant d'étangs du domaine de Praillebard (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2019) (Fig. 2), portant à douze le nombre d'espèces de *Dickeya* formellement reconnues (*D. aquatica*, *D. chrysanthemi*, *D. dadantii*, *D. dianthicola*, *D. fangzhongdai*, *D. lacustris*, *D. oryzae*, *D. parazeae*, *D. poaceiphila*, *D. solani*, *D. undicola* et *D. zaeae*), dont trois sont des espèces aquatiques (*D. lacustris*, *D. aquatica* et *D. undicola*). *D. lacustris* s'est révélée proche de *D. aquatica* isolée à partir d'eaux de rivière. Cette dernière, décrite en 2014, n'avait jusqu'alors été trouvée qu'en Angleterre et Finlande (Parkinson et al., 2014). Nos travaux suggèrent que les espèces aquatiques seraient les premières à avoir divergé au sein des *Dickeya* et que, contrairement à ce qui était supposé, ces bactéries possèdent un potentiel pathogène (Duprey et al., 2019). Ils ont également permis de mieux cerner l'origine évolutive des *Dickeya* en identifiant ses plus proches « cousins ». Ainsi, nous avons révélé l'existence d'une nouvelle lignée de *Pectobacteriaceae* isolées à partir d'environnements



| **Figure 2** : Un des étangs du site de Praillebard dans lequel les souches de *Dickeya* de cette étude ont été isolées.

aquatiques, appelée provisoirement *Prodigiosinella* et qui représente probablement un nouveau genre très proche des *Dickeya* (Duprey et al., 2019). Plus récemment, de nouvelles investigations nous ont permis de différencier le genre *Musicola* qui regroupe actuellement deux espèces : *Musicola paradisiaca* et *Musicola keenii*, autrefois considérées comme des *Dickeya* (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2021). Les deux genres *Musicola* et *Prodigiosinella* représentent des lignées « cousines » des *Dickeya* au sein des *Pectobacteriaceae* et des clés pour retracer les étapes qui ont conduit à l'émergence des *Dickeya*.

Notre objectif est maintenant de comprendre les premières étapes de leur diversification, avec un intérêt particulier pour les espèces aquatiques *D. aquatica* et *D. lacustris*. Pour pouvoir aborder ces questions il est essentiel de disposer de données biologiques et génomiques fiables. Or, au moment où le projet a débuté, très peu de souches aquatiques de *Dickeya* avaient été décrites et séquencées. Nous nous sommes donc fixés comme premier objectif de compléter les données génomiques présentes dans les banques de données publiques en

séquençant le génome de six souches isolées du site de Praillebard, trois de *D. aquatica* (souches JDA74, IS80 et IS92) et trois de *D. lacustris* (S29, J114b et A14). En parallèle, nous avons entrepris une caractérisation phénotypique de ces souches. Ce travail a été complété par le séquençage de souches du genre *Prodigiosinella*, pour lequel un seul génome avait été séquencé. L'analyse des génomes obtenus fournira des informations précieuses sur leurs phénotypes, notamment en ce qui concerne la capacité infectieuse et l'écologie des *Dickeya* aquatiques. Leur comparaison avec les souches pathogènes déjà décrites et séquencées permettra de reconstituer le contenu en gènes des génomes des ancêtres des *Dickeya* et d'identifier les événements évolutifs ayant accompagné les premières étapes de la diversification de ce genre. Ces résultats devraient éclairer l'histoire évolutive des *Dickeya* et ainsi permettre de mieux comprendre leur rôle dans l'environnement et le passage d'un mode de vie libre dans l'environnement à celui de pathogène spécialisé.

Souches et conditions de culture

Les souches sélectionnées (*D. aquatica* JDA74, IS80 et IS92 et *D. lacustris* S29, S24 et J114) sont décrites dans la [Table 1](#). La souche 3937 de *Dickeya dadantii* a été utilisée comme témoin dans la plupart des analyses. Les cultures de ces souches ont été réalisées à 30°C en milieu riche LB ou minimum M63, contenant 15 g/L de gélose pour les milieux solides.

Analyse phénotypique des souches de *Dickeya*

La production d'enzymes extracellulaires est analysée par mesure des activités pectinase, cellulase et protéase sur des milieux spécifiques ([Fig. 3](#)). La sécrétion de pectinases est mise en évidence après 24 h de croissance sur des boîtes de Petri contenant du milieu M63 additionné de glycérol (2 g/L) et de polygalacturonate (4 g/L). Après inondation des boîtes quelques secondes avec une solution saturée d'acétate de cuivre, une zone claire apparaît

autour des colonies capables de dégrader le polygalacturonate. La sécrétion de cellulases est détectée après 24h de croissance sur des boîtes de Petri contenant du milieu M63 additionné de glycérol (2 g/L) et de carboxy-méthylcellulose (10 g/L). Après inondation 10 min avec une solution de rouge congo (5 g/L) et lavage 5 min avec une solution de NaCl 1 M, des zones claires apparaissent autour des colonies capables de dégrader la cellulose. La sécrétion de protéase est visualisée sur des boîtes de milieu LB contenant du lait écrémé en poudre (6,25 g/L). Dans chaque cas, le diamètre des zones claires entourant les colonies est mesuré après incubation de 24 h.

Pour mesurer la motilité bactérienne de type « swimming », c'est-à-dire une nage à l'intérieur du milieu, les souches bactériennes sont inoculées à partir de colonies par piqûre dans un milieu LB à 3 g/L de gélose. Pour mesurer la motilité de type « swarming », c'est-à-dire un déplacement à la surface d'un milieu, 2 µl de culture bactérienne cultivée en LB sont déposés à la surface de boîtes LB à 6 g/L de gélose additionnées de 5 g/L de glucose. Les boîtes sont incubées 24 h à 30°C puis le diamètre de la zone de croissance est mesuré.

Pour réaliser les tests de virulence, les souches sont cultivées pendant une nuit dans du milieu LB liquide

MATÉRIEL ET MÉTHODES

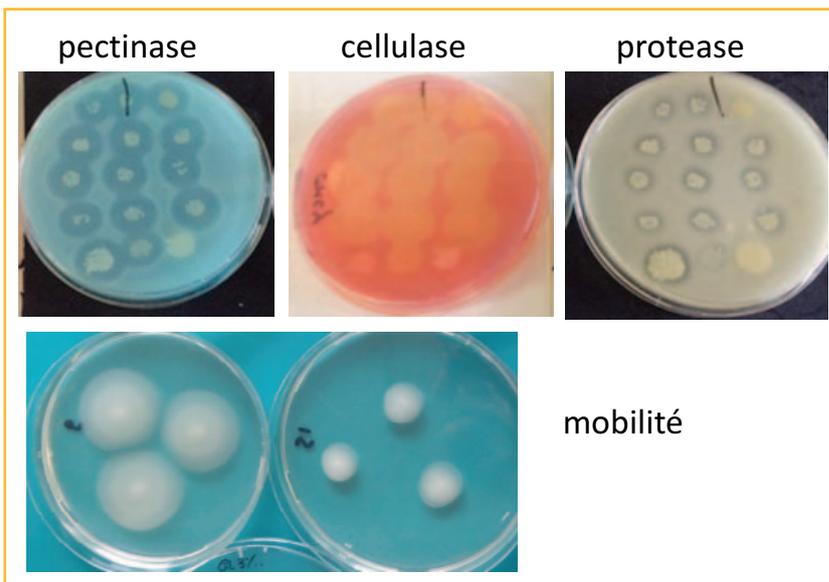


Figure 3 : Tests utilisés pour détecter les activités pectinase, cellulase et protéase ainsi que la mobilité des bactéries.

sous agitation. Ensuite, 100 µL des cultures LB ont été étalés sur une plaque de TSA à 10% qui a été incubée pendant 24 heures. Les bactéries sont centrifugées et remises en suspension dans du milieu M63 et ajustées à une DO600 nm de 0,1 (feuille d'endive) ou 1,0 (pomme de terre). Pour les feuilles d'endive, 10 µL de suspension bactérienne sont déposés sur une courte incision pratiquée au centre de la feuille. Pour la pomme de terre, 10 µL de la suspension bactérienne ont été injectés dans le tubercule. Les plantes inoculées sont placées sur un papier humide dans une boîte en plastique hermétique pour éviter la perte d'humidité. Les zones de macération sont mesurées après incubation à 30°C pendant 24 h (endive) ou prélevées et pesées après incubation à 30°C pendant 48 h (pomme de terre).

Extraction de l'ADN génomique et séquençage des génomes des six nouvelles souches

L'extraction de l'ADN total des 6 souches sélectionnées a été réalisée à l'aide d'un kit New England Biolabs (<https://international.neb.com/monarch/high-molecular-weight-dna-extraction>) qui permet d'obtenir de longs fragments d'ADN. La quantification et le contrôle qualité de l'ADN ont été effectués au DTAMB, par électrophorèse en gel d'agarose, d'un spectrophotomètre Nanodrop, d'un fluorimètre Qubit4 et d'un système d'électrophorèse capillaire Fragment Analyzer 5200 (<https://www.dtamb.univ-lyon1.fr/>). L'ADN génomique a ensuite été séquençé par couplage des méthodes Illumina et Nanopore. Le séquençage Illumina a été réalisé par un prestataire externe (Microbes NG, UK). Le séquençage Nanopore a été réalisé sur l'équipement MinION de la plateforme

DTAMB (FR BioEnViS, FR3728, UCBL-CNRS), en utilisant trois cellules (flow cells) pour six souches. Les séquences génomiques obtenues ont été annotées à l'aide du logiciel PGAP (prokaryotic annotation pipeline) développé au NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Analyses phylogénétiques

Une banque de données rassemblant les six génomes de *Dickeya* séquencés dans le cadre de cette étude, un génome représentatif de chaque espèce de *Pectobacteriaceae*, ainsi que trois à quatre génomes représentatifs des autres familles d'*Enterobacterales* sont utilisés comme références extérieures. Deux analyses phylogénétiques ont été réalisées : l'analyse du gène *gapA* et celle des gènes codant pour les protéines ribosomiques, afin d'identifier formellement les six souches étudiées et de les positionner dans la phylogénie des *Dickeya*. Pour chaque analyse, les séquences des gènes ont été recherchées dans les génomes de la banque. Les séquences ont été alignées avec les logiciels MUSCLE (pour *gapA*) et KALIGN (pour les gènes des protéines ribosomiques). Les alignements obtenus ont été utilisés pour reconstruire les phylogénies par la méthode du maximum de vraisemblance à l'aide du logiciel IQ-TREE. L'alignement du gène *gapA* compte 996 positions. Pour les protéines ribosomiques, les alignements des gènes correspondants ont été concaténés (c'est-à-dire mis bout à bout) pour construire un super-alignement de très grande taille (19 308 positions). Il s'agit d'une approche couramment utilisée en phylogénie moléculaire pour améliorer la reconstruction des arbres. Elle consiste à analyser plusieurs gènes de manière simultanée ce qui permet de combiner le signal phylogénétique qu'ils portent.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Sélection des isolats à séquencer

Plusieurs souches isolées à partir de milieux aquatiques forment des espèces distinctes au sein du genre *Dickeya* (i.e. *D. aquatica*, *D. lacustris* ou *D. undicola*) (Duprey et al., 2019, Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2019). Ces souches aquatiques, considérées initialement non pathogènes, ont suscité moins d'intérêt que les isolats pathogènes et ont été peu étudiées. À titre d'exemple, moins de 10 souches, souvent mal caractérisées, avaient été décrites pour chaque espèce au début de ce projet (Table 1). De plus, seuls cinq génomes ont été séquencés, trois pour *D. aquatica* (147/2T, DW 0440 et CSL RW240) et deux pour *D. lacustris* (S29T et lsb1) (Table 1). Cependant, quatre de ces cinq génomes (y compris celui de S29T qui est la souche type de *D. lacustris*) sont de faible qualité et n'ont pas pu être complètement assemblés. Ces génomes se présentent donc sous la forme de nombreux fragments et sont probablement incomplets.

L'analyse de nouvelles souches était donc un préalable nécessaire pour obtenir plus d'information sur la diversité génétique et la physiologie de ces souches d'eau.

De 2017 à 2019, nous avons isolé plusieurs souches de *Dickeya* dans le cadre d'une collaboration avec la Fondation Pierre Vérots, parmi lesquelles nous en avons choisi cinq pour des analyses plus approfondies. Afin de maximiser la diversité des isolats retenus, nous avons privilégié la sélection de souches isolées à des années différentes, provenant d'étangs différents mais aussi de la rhizosphère de plantes de berge. Ces isolats ont été déposés dans la collection CFBP (collection française de bactéries phytopathogènes). Nous avons également entrepris la réanalyse de la souche type de *D. lacustris* (S29T) dont le génome disponible était de faible qualité.

L'identification préliminaire des isolats a été réalisée sur la base du séquençage et de l'analyse phylogénétique du gène *gapA* (Fig. 4). L'arbre obtenu positionne sans ambiguïté les souches étudiées avec les souches du genre *Dickeya*. Plus précisément, trois d'entre elles (S29,

Désignation	Origine	Année	Environnement	Critères d'identification
<i>D. aquatica</i>				
174/2 ^T , NCPPB 4580 ^T	UK	2012	Eau de rivière	Génome
DW0440	Finlande	2005	Eau de rivière	Génome
CSL RW240	UK		Eau de rivière	Génome
181/2	UK	2012	Eau de rivière	Gènes <i>gyrB</i> , <i>infB</i> and <i>rpoB</i>
Dw054	Finlande	2005	Eau de rivière	Gène 16S rRNA
Dw0431	Finlande		Eau de rivière	Gène 16S rRNA
Dw0512	Finlande	2005	Eau de rivière	Gène 16S rRNA
JDA74, CFBP 8722	France	2018	Rhizosphère de <i>S. dulcamara</i>	Gène <i>gapA</i> , génome, phénotype
IS80, CFBP9042	France	2019	Eau d'étang	Gène <i>gapA</i> , génome, phénotype
IS92, CFBP9043	France	2019	Eau d'étang	Gène <i>gapA</i> , génome, phénotype
<i>D. lacustris</i>				
S29 ^T , CFBP 8647 ^T	France	2017	Eau d'étang	Génome
lsb1	Pakistan	2021	Selles humains	Génome
S39, CFBP8649	France	2017	Rhizosphère de <i>S. dulcamara</i>	Gène <i>gapA</i>
S12, CFBP8648	France	2017	Eau d'étang	Gène <i>gapA</i>
S15	France	2017	Eau d'étang	Gène <i>gapA</i>
S17	France	2017	Eau d'étang	Gène <i>gapA</i>
S29, CFBP 8647	France	2017	Eau d'étang	Génome, phénotype
J114b, CFBP8721	France	2018	Eau d'étang	Gène <i>gapA</i> , génome, phénotype
A14, CFBP9041	France	2019	Eau d'étang	Gène <i>gapA</i> , génome, phénotype

Table 1 : Caractéristiques des souches de *D. aquatica* et *D. lacustris* connues en janvier 2023. Les six souches dont le nom est souligné correspondent à celles dont le génome a été séquencé dans le cadre de cette étude. Cinq d'entre-elles sont des nouveaux isolats. La sixième correspond à la souche type de *D. lacustris* (S29T). Notre objectif était de réétudier et de reséquencer le génome de cette souche car celui disponible dans les banques de données était d'une qualité insuffisante. À noter que la séquence du génome de la souche lsb1 a été déposée dans les bases de données en janvier 2023.

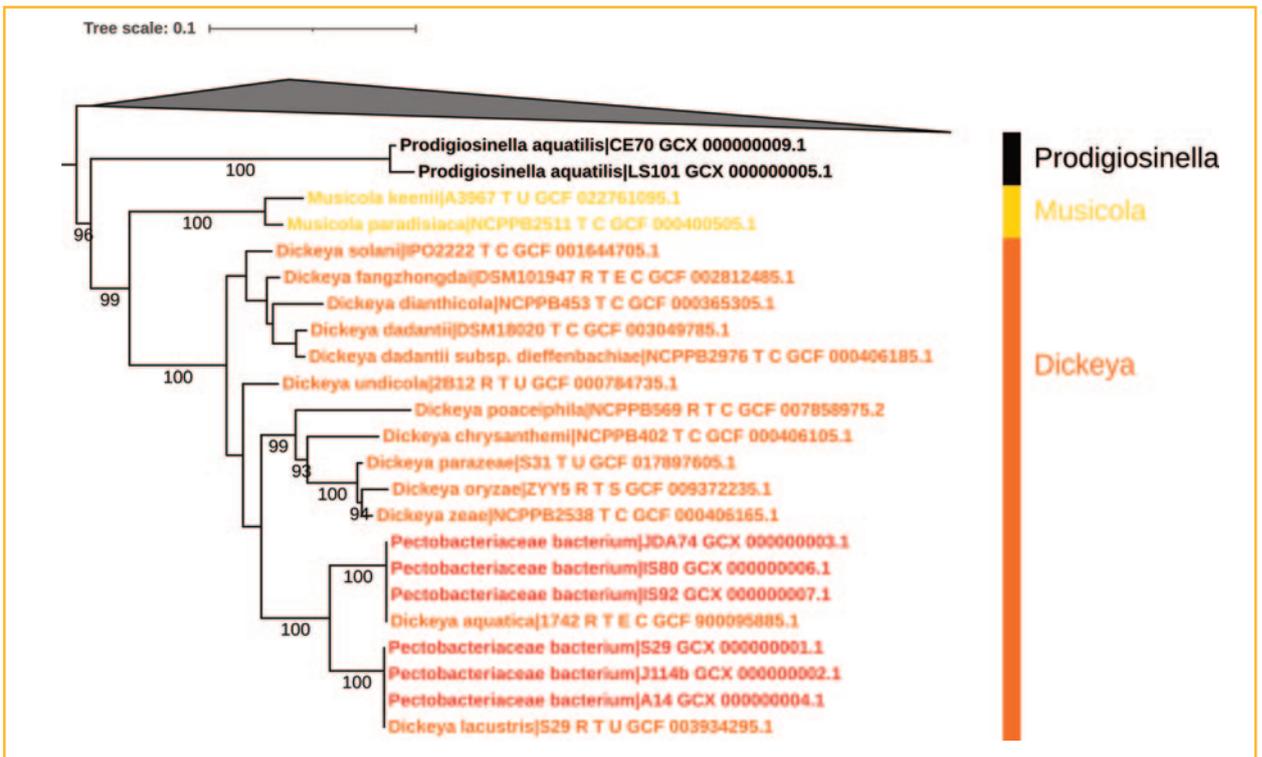


Figure 4 : Phylogénie du gène *gapA* des cinq souches isolées à partir d'échantillons d'eau dans le cadre de cette étude et de la souche S29 en vue d'une réanalyse. Les séquences du gène *gapA* des six souches d'intérêt sont indiquées en rouge. Les séquences disponibles des souches types des 12 espèces de *Dickeya* reconnues ont été ajoutées comme témoin. La phylogénie inclut également les gènes des autres espèces de *Pectobacteriaceae* et des représentants des autres familles d'*Enterobacterales*. Pour ne pas surcharger la figure, seule la partie de l'arbre contenant les *Dickeya* (en orange) et les genres voisins (*Musicola* en jaune et *Prodigiosinella* en noir) est détaillée. La position des autres séquences est indiquée par le triangle gris. Les nombres associés aux branches représentent les valeurs de « ultra fast » bootstrap estimées par IQ-TREE (ces valeurs varient de 0 à 100%). Seules les valeurs significatives (>90%) sont indiquées. La barre d'échelle représente le nombre moyen de substitutions par site de l'alignement.

J114b et A14) se positionnent avec la souche type de *D. lacustris* (BV = 100%), alors que les trois autres (JDA74, IS80 et IS92) sont regroupées avec la souche type de *D. aquatica* (BV = 100%). La très forte identité des séquences du gène *gapA* observée entre S29, J114b et A14 et la souche type de *D. lacustris* d'une part et JDA74, IS80 et IS92 et la souche type de *D. aquatica* d'autre part suggère qu'ils appartiennent à ces espèces. Ces six souches ont été retenues en vue d'une caractérisation phénotypique plus poussée et du séquençage de leur génome.

Caractérisation phénotypique des isolats sélectionnés

Une caractérisation phénotypique des six souches retenues a été réalisée par l'analyse de leur capacité à assimiler diverses sources de carbone et résister à certains stress (Table 2). Les souches de *D. aquatica* et *D. lacustris* se distinguent par le fait qu'elles utilisent globalement moins de sources de carbone que les autres *Dickeya*. Elles sont notamment incapables d'assimiler le xylose et le mannitol. Elles résistent bien à la chaleur, étant

capables de croître à 41°C et, dans le cas de *D. lacustris*, encore faiblement à 43°C (Table 2). Par contre, elles résistent assez mal aux fortes osmolarités, ce qui semble normal pour des bactéries vivant dans l'eau douce.

La sécrétion d'enzymes extracellulaires, les mobilités de type swimming (nage dans le milieu) et de type swarming (déplacement sur une surface), ainsi que la virulence sur endives et pomme de terre ont également été testées (Table 3). Les souches de *D. aquatica* et de *D. lacustris* sécrètent des enzymes capables de dégrader les tissus végétaux, un peu moins de pectinases mais un peu plus de cellulases que la souche pathogène témoin (Table 3). Elles sont dotées d'une bonne mobilité de type swimming qui leur permet de se déplacer dans un milieu liquide mais ne montrent pas de mobilité de type swarming utilisée par de nombreuses *Dickeya* pour se déplacer sur des surfaces (Table 3). Elles sont capables de provoquer une macération importante sur les deux plantes modèles testées, l'endive et la pomme de terre (Table 3). Une comparaison entre les souches d'intérêt et des souches pathogènes montre donc que les souches de l'eau sont assez semblables aux souches isolées à partir de plantes malades et ont un potentiel de virulence non négligeable.

Espèces	Souches	Sources de carbone					Température		Osmolarité	
		Mel	Mtl	Xyl	Dara	Tre	41°C	43°C	NaCl 0.3M	NaCl 0.5M
<i>D. dadantii</i>	3937	+	+	+	W	-	W	-	+	-
<i>D. aquatica</i>	174/2T	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>D. aquatica</i>	JDA74	-	-	-	-	-	+	-	W	-
<i>D. aquatica</i>	IS80	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>D. aquatica</i>	IS92	-	-	-	-	-	+	-	W	-
<i>D. lacustris</i>	S29T	-	-	-	-	-	+	W	+	-
<i>D. lacustris</i>	S24	-	-	-	-	-	+	W	-	-
<i>D. lacustris</i>	S39	-	-	-	-	-	+	W	+	-
<i>D. lacustris</i>	J114	-	-	-	-	-	+	W	-	-

Table 2 : Caractérisation phénotypique, assimilation des sucres et résistance aux stress des isolats d'intérêt. La souche modèle *D. dadantii* 3937, ainsi que la souche type de *D. aquatica*, ainsi que la souche S39 et la souche type de *D. lacustris* sont utilisées comme témoin. La capacité à assimiler diverses sources de carbone a été testée en milieu minimum M63 additionné d'une seule source de carbone, en particulier mélibiose (Mel), mannitol (Mtl), D-arabinose (Dara) ou tréhalose (Tre). La résistance à de fortes températures et osmolarités a été testée en milieu LB et M63 glycérol, respectivement. (w= faible)

Espèces	Souches	Sécrétion d'enzymes			Mobilité		Virulence	
		Pel mm	Cel mm	Prt mm	Swimming mm	Swarming mm	Endive mm	Pomme de g
<i>D. dadantii</i>	3937	18	11	10	31±2	51±7	75±16	2.93±0.42
<i>D. aquatica</i>	174/2T	12	14	11	23±1	3±1	18±5	1.14±0.37
<i>D. aquatica</i>	JDA74	13	14	11	24±2	5±1	27±11	1.33±0.21
<i>D. aquatica</i>	IS80	12	13	11	19±3	4±1	24±9	1.12±0.27
<i>D. aquatica</i>	IS92	12	14	10	20±2	5±1	30±15	1.15±0.28
<i>D. lacustris</i>	S29T	12	13	12	28±1	3±1	32±16	0.92±0.19
<i>D. lacustris</i>	S24	13	14	13	31±1	4±1	55±14	1.94±0.21
<i>D. lacustris</i>	S39	12	14	12	30±3	5±1	61±16	2.49±0.39
<i>D. lacustris</i>	J114	12	15	13	32±4	4±1	52±11	0.93±0.29

Table 3 : Caractérisation des souches, sécrétion d'enzymes, mobilité et virulence des isolats d'intérêt. La souche modèle *D. dadantii* 3937, ainsi que la souche type de *D. aquatica*, ainsi que la souche S39 et la souche type de *D. lacustris* sont utilisées comme témoin. La capacité à produire des enzymes extracellulaires dont les pectinases (Pel), les cellulases (Cel) et les protéases (Prt), a été testée dans des milieux spécifiques contenant un substrat de ces enzymes. La mobilité a été testée par inoculation dans un milieu semi-liquide peu concentré en agar (6 à 8 g/L), soit par piquure dans le milieu (swimming), soit par dépôt en surface (swarming). La taille des halos de croissance est mesurée après 24h. La capacité de virulence est testée par infection de feuilles d'endive ou de tubercules de pomme de terre. La longueur de la zone macérée après 24h et le poids de tissus macérés après 48h ont été mesurés.

Analyses génomiques des souches sélectionnées

Les génomes des six souches d'intérêt ont été séquencés et comparés aux génomes de *D. aquatica* et *D. lacustris* présents dans les bases de données publiques. Le séquençage a été réalisé par un couplage de deux méthodes : la méthode Oxford Nanopore Technologies, qui génère des lectures longues mais présentant un niveau relativement élevé d'erreurs et la méthode Illumina qui produit des lectures courtes mais avec peu d'erreurs. Le couplage de ces deux types

d'approches permet d'améliorer la qualité des séquences des génomes : les lectures longues obtenues avec le nanopore facilitent l'étape d'assemblage tandis que les lectures courtes permettent de corriger les erreurs de séquence.

Les trois génomes de *D. aquatica* séquencés sont de relative bonne qualité. L'assemblage des lectures a permis d'obtenir des génomes peu fragmentés : un fragment pour IS80, deux pour IS92 et six pour JDA74 (Table 4). Pour rappel, au niveau des génomes disponibles dans les banques de données, seul le génome de la souche type 174/2T est complètement assemblé (un seul fragment), les génomes des souches DW 0440 et CSL

RW240 étant quant à eux très fragmentés (47 et 26 fragments, respectivement). Les génomes des souches JDA74 et IS92 ont des caractéristiques assez proches de celles de la souche type (Table 4), notamment pour ce qui concerne la taille, le nombre d'ARNr ou le nombre d'ARNt. En comparaison, les génomes des souches DW 0440 et CSL RW240 sont légèrement plus petits, contiennent un nombre beaucoup plus faible de gènes codant pour des ARNt et d'ARNr, suggérant que ces génomes ne sont pas complets et qu'il y a des erreurs d'assemblage et/ou de séquençage, ce qui est cohérent avec le niveau élevé de fragmentation des séquences de ces génomes. Le génome de la souche IS80 présente, quant à lui, des caractéristiques atypiques et surprenantes. Tout d'abord, bien qu'il soit de taille comparable et contienne un nombre proche d'ARNr et d'ARNt, il contient beaucoup moins de gènes que les cinq autres (3 121 contre 3 747-3 882), et un nombre très élevé de pseudogènes (968 contre 95-281). Cette souche va faire l'objet d'analyses complémentaires pour déterminer s'il s'agit d'erreurs liées à une faible qualité de la séquence génomique ou s'il s'agit réellement de pseudogènes, consécutifs par exemple à un phénomène de réduction du génome.

Pour ce qui concerne les trois souches S29, J114b et A14 de *D. lacustris*, les génomes ont pu être assemblés complètement (un seul fragment), alors que les génomes

de S29T et Isb1 disponibles dans les banques de données, depuis 2018 et janvier 2023, étaient très fortement fragmentés (118 et 107 fragments, respectivement) (Table 5). Les génomes des trois souches d'intérêt présentent des caractéristiques très similaires à celles des génomes de Isb1 et de la souche type S29^T concernant la taille et le nombre de gènes. Par contre, ils présentent le même nombre d'ARNr que les souches de *D. aquatica*, alors que les génomes précédents de S29^T et Isb1 codaient pour un nombre d'ARNr étonnamment plus faible. Ce point, comme la grande fragmentation de ces génomes, peut refléter une qualité moindre de ces séquences et justifie notre démarche de reséquençage du génome de la souche type S29^T qui est amenée à être utilisée comme référence dans la communauté scientifique.

Analyses phylogénétiques

Une analyse phylogénétique complémentaire a été réalisée pour préciser la position des six souches séquencées au sein des *Dickeya* en utilisant les séquences des gènes codant pour les protéines ribosomiques (Figure 5). L'arbre obtenu est très bien résolu (quasi-totalité des BV > 90%). Ceci indique que le super-alignement utilisé pour construire les arbres contient un signal phylogénétique

<i>Dickeya aquatica</i>	174/2 ^T	DW 0440	CSL RW240	JDA74	IS80	IS92
Date de séquençage	Août 2018	Juin 2013	Janvier 2016	Nov. 2022	Nov. 2022	Nov. 2022
Numéro d'accès du	GCF_900095885.1	GCF_000406285.1	GCF_000406085.2	-	-	-
BioProject	PRJEB15300	PRJNA173398	PRJNA172955	PRJNA905946	PRJNA905946	PRJNA905946
BioSample	SAMEA4416159	SAMN02470098	SAMN02470084	SAMN31888675	SAMN31888676	SAMN31888677
Origine	Rivière (Royaume-Uni)	Rivière (Finlande)	Rivière (Royaume-Uni)	Rizosphère (Dombes)	Étang (Dombes)	Étang (Dombes)
Niveau d'assemblage	Génome complet	Chromosome	Chromosome	Non déterminé	Non déterminé	Non déterminé
Complétude	92,59%	92,83%	92,33%	Non déterminé	Non déterminé	Non déterminé
Niveau contamination	3,09%	2,84%	3,19%	Non déterminé	Non déterminé	Non déterminé
Taille*	4 501 560 bp	4 306 477 bp	4 264 625 bp	4 492 548 bp	4 387 865 bp	4 425 250 bp
Nombre de fragments	1	47	26	6	1	2
CC% du génome	53,6%	53,4%	53,5%	53,5%	53,5%	53,5%
Gènes	4 086	3 969	3 965	4 132	4 193	3 951
CDS**	3 882	3 769	3 796	3 747	3 121	3 743
rRNAs 5S	8	0	2	8	8	9
rRNAs 16S	7	1	1	7	7	8
rRNAs 23S	7	1	2	7	7	8
tRNAs	76	57	64	77	77	78
ncRNAs	5	5	5	5	5	5
Pseudogènes	101	136	95	281	968	100
CRISPR arrays	4	4	7	4	4	4

* Taille du fragment le plus long, ** Gènes codant pour des protéines

Table 4 : Caractéristiques des génomes séquencés dans cette étude et des génomes des souches types de *Dickeya aquatica* ayant été séquencés dans le cadre d'études précédentes et disponibles dans les bases de données.

fort, ce qui n'est pas surprenant compte-tenu de sa grande taille (19 308 positions analysées, à comparer avec les 996 positions du gène *gapA*). Au sein des *Pectobacteriaceae*, les différents genres sont bien délimités (BV = 100%) y compris pour le genre *Brenneria* qui est proche du genre *Affinibrenneria* et le genre *Pectobacterium* qui est proche du genre *Samsonia*. Bien qu'ils soient relativement plus éloignés, les genres *Pectobacterium* et *Dickeya* provoquent des maladies très similaires sur les plantes cultivées (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2020).

Cet arbre retrouve une grande proximité entre les genres *Dickeya* et *Musicola* (BV = 100%), ainsi qu'avec les genres *Lonsdalea* (phytopathogène d'arbres) et *Prodigiosinella*. Enfin, ils confirment la très grande proximité des souches JDA74, IS80 et IS92 avec la souche type de *D. aquatica* (BV = 100%) et celle des souches S29, J114b et A14 avec la souche type de *D. lacustris* (BV = 100%). De plus, cette phylogénie confirme la proximité entre les espèces *D. aquatica* et *D. lacustris* décrite précédemment, ainsi que leur branchement profond au sein des *Dickeya* (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2019). Enfin, il est intéressant de remarquer que les distances qui séparent *D. lacustris* et *D. aquatica* des autres espèces de *Dickeya* sont importantes, suggérant que ces souches sont éloignées du point de vue évolutif.

Calcul des distances entre les génomes des souches de *D. lacustris* et *D. aquatica*

Bien qu'il n'y ait pas de définition formelle de la délimitation entre les genres, l'attribution à un même genre est peu recommandée lorsqu'une faible proportion des séquences génomiques peut être alignée. Ainsi il a été observé que la limite entre les genres correspond généralement à une fraction alignée d'environ 60% (Barco et al., 2020). Dans le genre *Dickeya*, les génomes des dix espèces principales (*D. chrysanthemi*, *D. dadantii*, *D. dianthicola*, *D. fangzhongdai*, *D. oryzae*, *D. parazeae*, *D. poaceaphila*, *D. solani*, *D. undicola* et *D. zaeae*) peuvent être alignés entre eux sur au moins 58 % de leur longueur totale. Ces dix espèces constituent donc un groupe cohérent correspondant au noyau du genre *Dickeya*. En revanche, la fraction alignée des génomes de *D. lacustris* et *D. aquatica* avec les autres espèces de *Dickeya* est inférieure à 41 % et devient même inférieure à 18% avec les espèces du genre *Musicola* (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2021). Ceci suggère que les espèces *D. aquatica* et *D. lacustris* pourraient représenter un genre distinct au sein des *Pectobacteriaceae*.

<i>Dickeya lacustris</i>					
Souches	S29T	Isb1	S29T	J114b	A14
Date de séquençage	Déc. 2018	Jan. 2023	Nov. 2022	Nov. 2022	Nov. 2022
N° accès du génome	GCF_003934295.1	GCF_027571425.1	-	-	-
BioProject	PRJNA479749	PRJNA915953	PRJNA905946	PRJNA905946	PRJNA905946
BioSample	SAMN09603982	SAMN32409324	SAMN31888538	SAMN31888639	SAMN31888640
Origine	Étang (Dombes)	Selles humains	Étang (Dombes)	Étang (Dombes)	Étang (Dombes)
Niveau d'assemblage	Génome complet	Chromosome	Non déterminé	Non déterminé	Non déterminé
Complétude	93,07%	89,02%	Non déterminé	Non déterminé	Non déterminé
Niveau contamination	3,36%	3,7%	Non déterminé	Non déterminé	Non déterminé
Taille*	4 306 505 bp	~4 500 00 pb	4 365 770 pb	4 366 875 bp	4 366 585 bp
Nombre de fragments	118 contigs	107 contigs	1	1	1
CC% du génome	53,1%	53,1%	53,1%	53,2%	53,2%
Gènes	3 928	3 958	3 967	3 932	3 971
CDS**	3 751	3 674	3 673	3 759	3 692
rRNAs 5S	6	4	8	8	8
rRNAs 16S	3	3	7	7	7
rRNAs 23S	1	1	7	7	7
tRNAs	69	69	76	74	76
ncRNAs	6	6	6	6	6
Pseudogènes	92	201	190	71	175
CRISPR arrays	4	4	4	4	4

* Taille du fragment le plus long, ** Gènes codant pour des protéines

Table 5 : Caractéristiques des génomes séquencés dans cette étude et des génomes des souches types de *Dickeya lacustris* ayant été séquencés dans le cadre d'études précédentes et disponibles dans les bases de données.

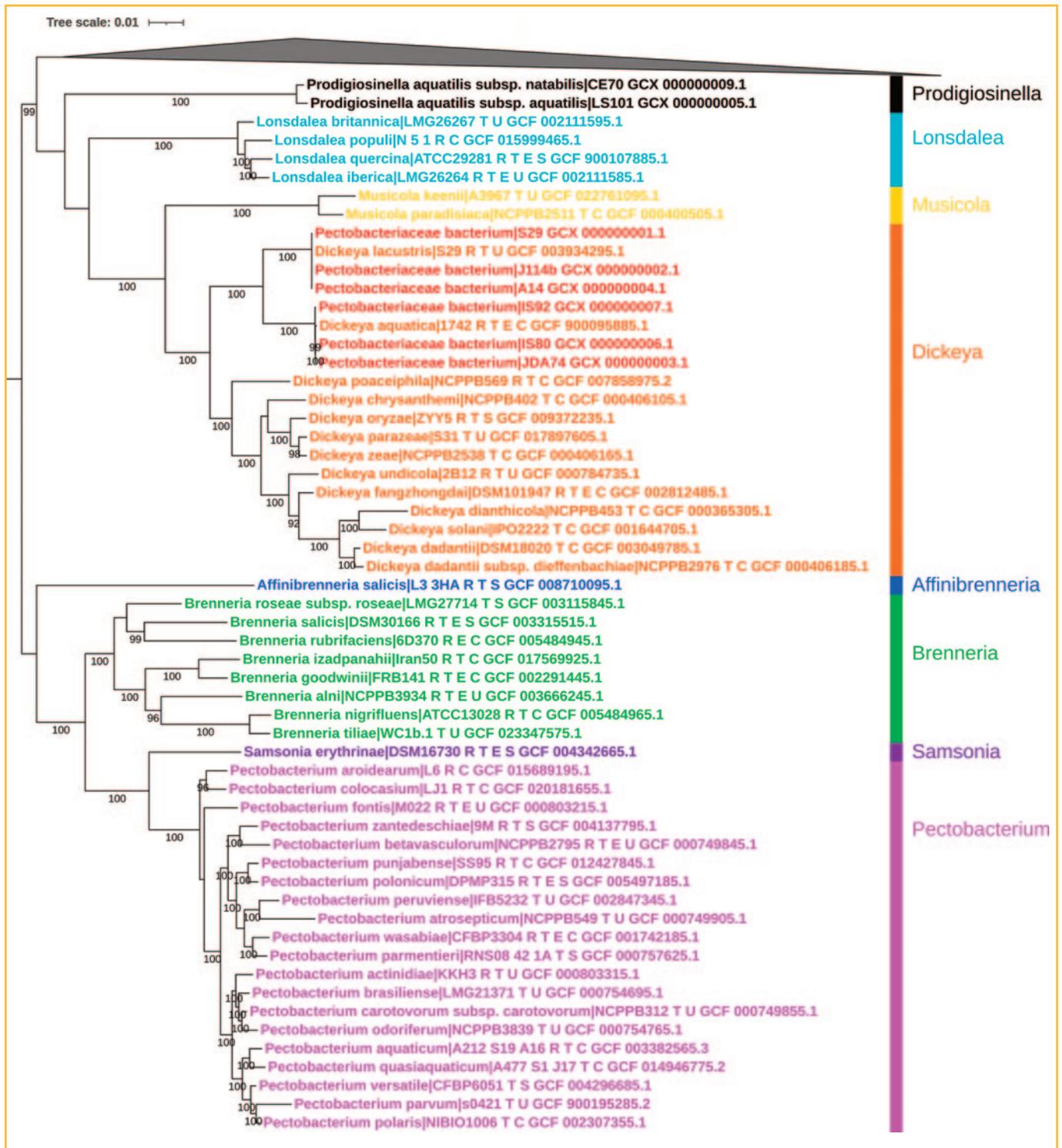


Figure 5 : Phylogénie des *Pectobacteriaceae* basée sur l'analyse des gènes codant pour les protéines ribosomiques. L'arbre a été inféré par la méthode du maximum de vraisemblance avec le logiciel IQ-TREE. Le nom des genres de *Pectobacteriaceae* est indiqué à droite. Les nombres associés aux branches représentent les valeurs de « ultra fast » bootstrap estimées par IQ-TREE (ces valeurs varient de 0 à 100%). Pour ne pas surcharger l'arbre, seules les valeurs significatives (> 90%) sont indiquées. Les séquences correspondant aux six souches d'intérêt sont indiquées en rouge. Comme attendu, elles se positionnent avec *D. lacustris* (S29, J114b et A14) et *D. aquatica* (IS92, IS80 et JDA74). La barre d'échelle représente le nombre moyen de substitutions par site s'étant produit au cours de l'évolution.

Grâce au soutien de la Fondation Pierre Vérots, nous avons pu approfondir la physiologie et séquencer le génome de six souches de *Dickeya* appartenant à deux espèces inféodées aux milieux aquatiques, *D. lacustris* et *D. aquatica*. Bien qu'occupant une position clé dans l'histoire des *Dickeya*, les espèces aquatiques ont été très peu étudiées, probablement parce que, contrairement aux autres espèces, ce ne sont pas des pathogènes connus de plantes cultivées ou ornementales et ont donc un impact économique négligeable.

Les premières analyses des génomes confirment d'une part la proche parenté entre *D. lacustris* et *D. aquatica* et d'autre part leur éloignement des autres espèces de *Dickeya*. Ceci pourrait suggérer que ces deux espèces représentent un genre distinct mais proche du genre *Dickeya*. Des analyses sont en cours pour décrypter en profondeur l'information contenue dans ces génomes, en particulier pour identifier les gènes essentiels au mode de vie aquatique, mais aussi pour comprendre et retracer les premières étapes de l'émergence des souches pathogènes.

Au niveau phénotypique, les deux espèces *D. lacustris* et *D. aquatica* montrent des particularités métaboliques par rapport aux dix autres espèces du genre *Dickeya*, comme la non assimilation du xylose ou du mannitol. Leur équipement en facteurs de virulence est assez similaire à celui des autres *Dickeya* et elles ont une capacité de macération comparable sur différents légumes. Ceci suggère que ces deux espèces pourraient être des pathogènes de plantes non cultivées. L'hypothèse la plus probable serait alors qu'elles ont une gamme d'hôtes limitée, n'interagissant qu'avec des plantes sauvages présentes dans l'eau ou sur la berge des étangs. Les données collectées dans le cadre de ce projet constituent une mine d'informations qui va nous permettre dans les mois à venir de tester l'ensemble de ces hypothèses.

Bibliographie

- Adeolu, M., Alnajjar, S., Naushad, S., Gupta, RS. 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 : 5575-5599.
- Duprey, A., Taib, N., Leonard, S., Garin, T., Flandrois, JP., Nasser, W., Brochier-Armanet, C., Reverchon, S. 2019. The phytopathogenic nature of *Dickeya aquatica* 174/2 and the dynamic early evolution of *Dickeya* pathogenicity. *Environmental Microbiology* 21(8): 2809-2835.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Gueguen, E., Shevchik, VE. 2020. *Dickeya* Plant Pathogens. In *Encyclopedia of Life Science*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ2020: 1-10.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Jacot-des-Combes, C., Briolay, J. 2019. *Dickeya lacustris* sp. nov., a water-living pectinolytic bacterium isolated from lakes in France. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69 : 721-726.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Jacot-des-Combes, C., Briolay, J., Pritchard, L. 2021. Proposal for the creation of a new genus *Musicola* gen. nov., reclassification of *Dickeya paradisiaca* (Samson et al., 2005) as *Musicola paradisiaca* comb. nov. and description of a new species *Musicola keenii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71, 005037.
- Parkinson, N., DeVos, P., Pirhonen, M., Elphinstone, J. 2014. *Dickeya aquatica* sp. nov., isolated from waterways. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64 : 2264-2266.



LES PUBLICATIONS de la Fondation Pierre Vérots

*Pour l'étude et la préservation de
la faune et de la flore de la Dombes*

Les Cahiers Scientifiques :

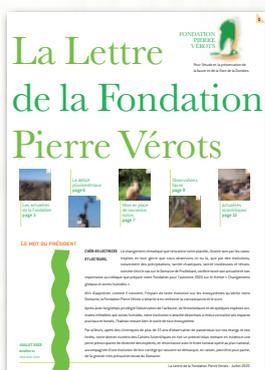


En publiant des articles de fond, les Cahiers Scientifiques visent à restituer les connaissances scientifiques acquises au sein de son domaine ou avec son soutien, à un public le plus large possible en s'appuyant sur un comité de lecture qui aura pour but de s'assurer de la qualité et de l'exactitude des faits rapportés. Ils permettent également de faire le point sur les questions d'ordre général et les défis qui concernent la Dombes, son patrimoine, son environnement biologique, environnemental et sociétal ainsi que les zones humides de manière générale.

Les Cahiers Scientifiques se veulent ainsi un organe de diffusion des connaissances, d'information et de sensibilisation auprès d'un lectorat Dombiste très large.

La Lettre :

Par de brèves nouvelles, la Lettre cherche à faire connaître la vie et les activités de la Fondation : actualités et projets scientifiques, vie et gestion du domaine, observations climatiques, ornithologiques, piscicoles, forestières, etc.



Les colloques de la Fondation :

Tous les 4 ou 5 ans la Fondation organise un congrès sur un sujet d'intérêt dombiste. Des personnalités sont invitées à donner des conférences spécialisées devant un large public, suivies de discussions et débats. A l'issue du congrès la Fondation publie et diffuse les Actes du Congrès qui rassemblent l'intégralité des interventions des conférenciers et des débats qui ont suivi.



Toutes ces publications sont consultables sur notre site Internet :
www.fondation-pierre-verots.fr

ou sur simple demande à contact@fondation-pierre-verots.fr

Retrouvez-nous également sur notre page Facebook



LES CAHIERS SCIENTIFIQUES de la Fondation Pierre Vérots

Juillet 2024
Numéro 10

FONDATION
PIERRE
VÉROTS



Fondation Pierre Vérots
261, chemin de Praillebard
01390 Saint Jean de Thurigneux
Tél. : 04 74 00 89 33
Mail : contact@fondation-pierre-verots.fr
www.fondation-pierre-verots.fr

ABSTRACT

Benthic cyanobacteria : proliferation factors and ecological risks in continental water bodies

Sylvain Dolédec¹ & Joël Robin²

¹ Université Claude Bernard Lyon 1, LEHNA UMR 5023,
CNRS, ENTPE, F-69622, Villeurbanne, France

² Institut Supérieur d'Agriculture Rhône-Alpes (ISARA),
Lyon

Benthic cyanobacteria are photosynthetic microorganisms that develop at the interface between sediment and water. The capacity of certain strains to produce toxins and the increasingly frequent deaths of mammals linked to their ingestion highlight the health and ecological risks associated with their proliferation in rivers and ponds. In addition, thermal and hydrological changes resulting from climate change could exacerbate these proliferations. If planktonic proliferations are well documented, the ecological impact of the development of benthic cyanobacteria as well as the periods and locations most at risk are little known. In this context, the objectives of Charlotte Robichon's thesis were to (i) identify the main environmental factors

influencing the development of benthic cyanobacteria, (ii) investigate the existence of a link between these ecological factors and the concentrations of toxoids produced, and (iii) study the ecological impact of the development of benthic cyanobacteria on benthic macroinvertebrate communities.

The results of this work show that:

(1) Hydraulic factors (current speed, depth, flow) have a major influence on the development of cyanobacteria. This influence varies during the summer in relation to the life cycle of the biofilms and depending on variations in other environmental factors (nutrient concentrations, development of *Chlorophyceae*). These results

provide a management framework that calls into question current water release practices in rivers.

- (2) Anatoxin-a concentrations measured in biofilms are generally higher in areas of low current, highlighting the potential health risk of these areas generally reserved for swimming.
- (3) The presence of benthic cyanobacteria in biofilms negatively impacts the distribution of few benthic macroinvertebrate taxa but does not harm the overall abundance of benthic macroinvertebrates or their biodiversity.

Diversity and diversification of *Pectobacteriaceae*, a family of phytopathogenic bacteria with a global importance

Céline Brochier¹ & Nicole Cotte-Pattat²

¹ Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, VetAgro Sup,
Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, UMR5558,
F-69622, Villeurbanne, France

² INSA Lyon, Laboratoire Microbiologie, Adaptation, Pathogénie
(MAP) - UMR 5240

Bacteria of the *Pectobacteriaceae* family include major plant pathogens that cause rotting of infected plants. This symptom is due to the massive production of pectinases capable of degrading pectin, a major plant compound supporting the plant cell wall integrity. Within *Pectobacteriaceae*, the genus *Dickeya* is particularly studied because it causes important agricultural losses at the world level on crops essential for human food, such as potato, maize or rice.

Although most *Dickeya* species have been isolated from infected plants, some have been isolated from environmental samples, mostly from aquatic environments. However, the current

knowledge of *Dickeya* is still mainly based on the study of plant pathogenic species, thus neglecting the real biodiversity of these bacteria. In recent years, we have initiated the analysis of strains from aquatic environments in order to characterize these bacteria and to better understand their physiology, ecology, evolution and their links with pathogenic species. The analysis of water samples from lakes of the Pierre Vérots Foundation (convention n°04-CE-05/2017) had allowed us to isolate numerous strains including a new aquatic species named *Dickeya lacustris*. Furthermore, our works indicate that aquatic *Dickeya* lineages may be the oldest and that pathogenic species could derive from aquatic species.

Our goal is now to perform an in-depth study of the early stages of *Dickeya* diversification, with a particular focus on the aquatic species, *Dickeya aquatica* and *Dickeya lacustris*. As genomic data on these species are very limited, we have undertaken to sequence the genome of six new strains (three of each species) isolated at the Pierre Vérots Foundation site. Combined with the analysis of genomes of related genera, these new data will contribute to retrace the evolutionary history of the *Pectobacteriaceae* family and will provide information on their adaptive capacities, particularly with respect to their pathogenicity and ecology.