

Fiche projet Accord Cadre ZABR – Agence de l'eau

2024 - CyanoBenToxOmic - INRAE_CARRTEL&UNIGE- Diversité, distribution et potentiel toxique des cyanobactéries benthiques dans le Léman

INTITULE DU PROJET : « Diversité, distribution et potentiel toxique des cyanobactéries benthiques dans le Léman »

Responsable scientifique du projet:

- Nom TROMAS
- Prénom Nicolas
- Organisme du contact INRAE
- Fonction Directeur de recherche junior
- Courriel tomas.nicolas@gmail.com / nicolas.tomas@inrae.fr
- Téléphone

Référent (s) administratif(s) :

- Nom BOISTARD
- Prénom Pascal
- Organisme du contact INRAE
- Fonction Président du Centre Lyon-Grenoble Auvergne-Rhône-Alpes INRAE
- Courriel pascal.boistard@inrae.fr

EQUIPES DE RECHERCHES ZABR CONCERNÉES et CONTACT SCIENTIFIQUE DE L'EQUIPE

(Equipe membre ou associée de la ZABR)

INRAE CARRTEL – Nicolas Tromas
Université de Genève – Bastiaan Ibelings

AUTRES PARTENAIRES

(Préciser leur degré d'implication et leur accord)

- Recherche : Stéphan Jacquet – INRAE CARRTEL (Mise en place du projet et échantillonnage) ; Jöel Robin – ISARA (Conseils, échantillonnage) ; Alexandre Richard et Valentin Vasselon – SCIMABIO (Développement de biomarqueurs)

THEMATIQUE NATURE ET OPERATION (ne rien compléter)

- Thématique : Etude recherche et réseau de suivi
- Nature du projet : Etude générale et recherche
- Type d'opération : Recherche et innovation
- **Intitulé de l'opération :**

LOCALISATION DU PROJET: (se remplit automatiquement -Ne rien remplir)

- **Commune principale et numéro INSEE** : à compléter
- **Sous bassin versant**
- **Nom du cours d'eau**
- Contrat (si intégré dans un contrat de rivière, un SAGE ou un autre contrat avec l'agence de l'eau)

RESUME DU PROJET GLOBAL

Fiche projet ZABR – modèle type

- **Résumé : 3000 caractères espaces inclus**

A ce jour, une grande partie de la recherche s'est concentrée sur la compréhension des proliférations de cyanobactéries planctoniques afin de développer des modèles prédictifs et des mesures appropriées pour réduire la fréquence et l'intensité de ces efflorescences (1). Au cours des cinq dernières années, on a constaté une augmentation des études sur les cyanobactéries benthiques toxiques dans les rivières et les lacs du monde entier (2, 3). Les activités anthropiques et les changements climatiques favorisent le développement de populations de cyanobactéries ainsi que la fréquence et la persistance des efflorescences nuisibles de cyanobactéries (cyanHAB) (4). De plus en plus d'observations de cyanobactéries benthiques toxiques ont été faites en région Rhônes-Alpes ou à proximité, notamment en France dans l'Ain (5) et en Suisse dans le lac Neuchatel (5). Ces cyanobactéries peuvent produire un large éventail de cyanotoxines dont certaines peuvent être nocives pour les organismes aquatiques et terrestres (6, 7). Plusieurs groupes de cyanobactéries planctoniques sont régulièrement trouvés dans le Léman (8, 9) comme *Planktothrix*, *Pseudoanabaena*, ou *Aphanizomenon*. Ces différents genres cyanobactériens peuvent être toxiques et sont suivis par l'observatoire des lacs OLA et la plateforme expérimentale LEXPLORE. La présence de cyanobactéries benthiques et notamment de *Tychomena* a également été observée (9). Cependant, à ce jour, il n'existe aucune information sur la distribution de ces tapis benthiques de cyanobactéries dans le plus grand lac naturel profond d'Europe occidental et de ses tributaires. De plus, le niveau de risque posé par ces cyanobactéries dans ce lac reste inconnu, ce qui empêche une gestion appropriée des risques (10).

Il est donc nécessaire d'identifier et de caractériser la distribution et la prolifération des cyanobactéries benthiques toxiques au niveau de ce lac et surtout de ses affluents. En effet, les populations de cyanobactéries benthiques se développeraient dans les ruisseaux et les rivières et des tapis cyanobactériens flottants (détachés de leur support initial de développement) seraient transportés jusqu'au lac. Ces tapis se situeraient davantage à l'embouchure entre rivière et lac (7). Dans ce projet, nous proposons de réaliser un échantillonnage spatio-temporel sur 18 mois, afin d'évaluer la distribution et de déterminer les paramètres environnementaux associés (installation de capteurs avec enregistrement de données) à de possibles proliférations. En utilisant une approche de séquençage haut débit (appelé « shotgun metagenomic ») nous pourrons caractériser la composition de ces tapis benthiques et évaluer leur capacité toxigénique (e.g présence de cluster de gènes de cyanotoxines). Nous pourrons également caractériser la composition microbienne (bactéries hétérotrophes, autres cyanobactéries, virus) qui composent ces biofilms cyanobactériens et qui pourraient avoir un rôle important dans leur formation (11, 12). En combinant cette approche « omic » avec une analyse LC-MS/MS des métabolites secondaires, nous pourrons mesurer la toxicité de ces cyanobactéries benthiques et valider nos modèles métaboliques basés sur le génome. Finalement, nous identifierons des biomarqueurs à partir des génomes cyanobactériens toxiques, facilitant leur identification future lors de suivis des composantes cyanobactériennes. Les approches pluridisciplinaires décrites dans cette proposition contribueront de manière significative à une meilleure compréhension de la niche écologique et des capacités métaboliques et toxiques de ces cyanobactéries benthiques. Les résultats de cette étude permettront d'identifier les paramètres associés au développement des tapis cyanobactériens et de prédire dans quels environnements particuliers ils pourraient se développer.

ENCART 2024- CyanoBenToxOmic -EQUIPE 1 : CARRTEL (UMR INRAE-USMB) - Nicolas TROMAS.

Tâches de l'équipe : conceptualisation, réalisation et valorisation. En raison de ses compétences et de son savoir dans la communauté cyanobactérienne du Léman, en génomique microbienne et de l'implantation de système d'échantillonnage efficace du Léman ; le temps imparti sera de 60% pour Nicolas Tromas porteur du projet, 20% pour Stéphan Jacquet, 100% pour un futur étudiant en master 2 et 25% pour un futur étudiant en thèse (sous la supervision de Nicolas Tromas). L'équipe SCIMABIO collaborera sur ce projet et notamment la partie développement de biomarqueurs. Elle investira du temps à hauteur de 15%. Joël Robin est collaborateur sur ce projet afin de faire un suivi avec son projet sur les cyanobactéries benthiques de l'Ain et fournira des conseils sur l'échantillonnage et l'identification des cyanobactéries. Il investira du temps à hauteur de 10%.

Détails des activités :

Analyse de la population cyanobactérienne et de son microbiome (sous-traitance plateforme 'omic)

Analyse des associations entre facteurs environnementaux et abondance des cyanobactéries

Analyse des capacités métaboliques et toxiques

Développement de marqueur génétique pour mieux identifier les souches toxiques

ENCART 2024- CyanoBenToxOmic -EQUIPE 2 Université de Genève - Bastiaan Ibelings

Tâches de l'équipe : réalisation et valorisation. En raison de ses compétences en écologie, en exotoxicologie et de son implication dans les plateformes d'échantillonnage efficace du Léman ; le temps impari sera de 50% pour Bastiaan Ibelings, 40% pour un futur étudiant en thèse financé par un autre projet. Elisabeth Janssen (EAWAG) collaborera sur ce projet pour nous accompagner dans les analyses de cyanotoxines (sous-traitance).

Détails des activités :

Mise en place de capteurs (paramètres hydrauliques et physique)

Échantillonnage du lac et des affluents principaux (embouchure)

Mesures des paramètres physico-chimiques

Quantifications des cyanotoxines

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

(3 000 caractères espaces compris)

- **Contexte général**

Au cours des deux dernières décennies, la découverte d'espèces de cyanobactéries benthiques impliquées dans des intoxications animales a considérablement augmenté (13-16). Des cas de décès de chiens directement associés à des cyanobactéries benthiques ont été signalés au Canada (16), en France (17, 18) et en Suisse (7). Ces cyanobactéries peuvent former des tapis ou biofilms microbiens comprenant une multitude de microorganismes (diverses cyanobactéries, virus, protistes, ...)(12, 19). On trouve ces cyanobactéries benthiques dans les rivières et les lacs (19), et certaines espèces ont la capacité de produire un éventail de cyanotoxines dont certaines sont neurotoxiques (e.g (dihydro)anatoxin-a). Ces cyanotoxines peuvent être nocives pour les organismes aquatiques et terrestres (6). À ce jour, les facteurs environnementaux qui favorisent leur développement dans les rivières ne sont pas entièrement compris et sont souvent limités à des taxons ou des espèces spécifiques. Si la majorité des études se sont concentrées sur les genres *Phormidium* et *Microcoleus* (19, 20), d'autres genres, potentiellement toxiques peuvent aussi se développer comme présenté récemment par notre collaborateur Joël Robin lors d'une analyse récente des cyanobactéries benthiques dans l'Ain (5).

Dans cette récente étude, les chercheurs ont caractérisé les cyanobactéries benthiques dans une rivière et ont mis en évidence que les variables hydrauliques pouvaient expliquer le biovolume et la composition de ces cyanobactéries et que certaines variables nutritives associées à la température pouvaient également expliquer le développement de ces biofilms cyanobactériens (5). À ce jour, et ce malgré l'augmentation d'études sur les cyanobactéries benthiques ces 5 dernières années (19), les paramètres associés à la prolifération de ces tapis cyanobactériens et surtout à la production de cyanotoxines demeurent peu clairs voir inconnus. Afin d'améliorer les modèles de prévention et de prédition des risques liés aux cyanobactéries toxiques, il est aujourd'hui critique d'inclure la communauté des cyanobactéries benthiques, et ce d'autant plus que ces populations se situent toujours sur faible fond et le plus souvent proches du littoral. Pour cela, nous devons mieux comprendre leur distribution et les facteurs qui favorisent leur installation. Il est également primordial de pouvoir identifier les conditions favorables à leur prolifération et à la production de leur cyanotoxines.

Le site pour mener à bien ce projet est le Léman en incluant l'embouchure avec ses principaux affluents (Rhône, Dranse, Aubonne et Venoge) (7). Ce site est bien connu pour ses efflorescences passées de *Planktothrix rubescens*, une cyanobactérie planctonique généralement toxique (21). Plusieurs études dont cette de notre collaborateur Stéphan Jacquet, ont montré que le réchauffement climatique pourrait augmenter la présence de cyanobactéries toxiques dans les années à venir (22). Si la température moyenne du lac augmente (22), l'impact sur les cyanobactéries benthiques n'est toutefois pas encore connu. D'autre part, la prolifération des moules Quaggas pourrait entraîner une clarification du lac, explosant une plus grande partie des sédiments à la lumière. Ces nouvelles zones exposées pourraient être rapidement colonisées par des cyanobactériens benthiques. Nous proposons ici, une analyse de haute résolution multidisciplinaire des communautés cyanobactériennes benthiques du Léman où le genre toxigénique *Tychomena* (23) a été observé lors d'une analyse préliminaire réalisée récemment (9).

- **Contexte ZABR :**

• Axe prioritaire associé : Les risques environnementaux et la vulnérabilité des milieux.

• **Thématique ZABR : (1) Flux polluants, Ecotoxicologie, Ecosystèmes.** Question associée : Des changements globaux, comme les modifications climatiques et hydrologiques, peuvent-ils renforcer ou modifier les effets des polluants sur les organismes et les communautés ?

(2) Changement Climatique et Ressources (CCR). Question associée : Comment les effets du changement climatique impactent les ressources (eau, biodiversité) ainsi que le fonctionnement et les capacités de résilience des écosystèmes aquatiques ?

Site Atelier ou Observatoire ZABR : Observatoire des Lacs : OLA et Plateforme LéXPORE (24)

• **Besoin de connaissance Agence de l'eau :** Substances et risques associés, enjeux de santé-environnement

FINALITE ET ATTENDUS OPERATIONNELS

(3 000 caractères espaces compris)

- Objectifs scientifiques**

Questions clés de ce projet : Quelle est la distribution et la composition des cyanobactéries benthiques ? Quelle est leur capacité toxigénique ? Quelles sont les variables abiotiques et biotiques associées à la formation de ces biofilms cyanobactériens ?

Hypothèse : Le genre toxigénique *Tychonema* a déjà été observé au niveau du Léman (9) mais son origine et la présence d'autres cyanobactéries benthiques demeurent inconnues. D'après nos connaissances actuelles, il y aurait une plus grande probabilité d'observer ces cyanobactéries au niveau des embouchures avec les affluents (7). De plus, ces cyanobactéries seraient potentiellement dispersées différemment au niveau du lac en fonction des variations hydrauliques et de la taille de l'affluent (25). Nous posons comme hypothèse que *Tychonema* n'est probablement pas le seul genre présent au niveau du lac et que les cyanobactéries benthiques viendraient principalement des affluents. L'impact des affluents n'étant pas le même, notre seconde hypothèse est que l'on observera de l'affluent le plus important (Rhône) une plus grande abondance de cyanobactéries benthiques. Finalement, si la composition cyanobactérienne du biofilm varie en fonction des forces hydrauliques, de la température et de l'accès à la lumière (7, 25); nous devrions donc observer une différence entre les populations cyanobactériennes des affluents (température plus faible, plus de forces hydrauliques) et celles présentes aux embouchures du lac (plus de lumière et température plus élevée).

Force du projet : Les raisons de la production de cyanotoxines dans ces biofilms demeurent incertaines et l'impact des variables biotiques (e.g bactéries hétérotrophes, virus) qui composent ces tapis n'a été que très peu étudié. Pourtant, ces informations pourraient aider notre compréhension sur la formation des tapis et la production de toxines (12). En combinant l'information des variables environnementales et biotiques, nous pourrons ainsi mieux anticiper la formation de ces tapis toxiques.

Objectif : Dans cette étude, nous analyserons la dynamique spatio-temporelle des tapis cyanobactériens afin de (Obj.1) déterminer quelles sont les variables environnementales (incluant les variables hydrologiques) associées au processus de développement de ces tapis cyanobactériens. Nous pourrons ainsi comparer nos observations à l'étude précédente au niveau de l'Ain. (Obj.2) Nous évaluerons la variation de la composition microbienne des tapis cellulaires. Nous pourrons ainsi déterminer la présence de souches cyanobactériennes toxigéniques (présence de gènes de toxicité) et d'identifier les composants biotiques (autres cyanobactéries, bactéries ou virus) associés. Dans cette étape, nous proposons une approche où nous pourrons dépasser les limites souvent associées aux mesures de paramètres physico-chimiques. En effet, il est presque impossible de pouvoir mesurer ou estimer toutes les dimensions d'une niche écologique pour une bactérie. Par contre, l'utilisation de l'information contenue dans la communauté microbienne reflète la niche écologique et permet donc de compléter les mesures environnementales manquantes (26). (Obj.3) Nous quantifierons les cyanotoxines et associerons la production de cyanotoxines avec la composition microbienne et les variables environnementales. Nous pourrons ainsi comparer les capacités génétiques des cyanobactéries toxiques et non toxiques afin d'examiner les différences qui peuvent prédire leur succès dans des environnements particuliers. Finalement, (Obj.4) nous identifierons des biomarqueurs génétiques à partir des génomes séquencés afin de pouvoir développer une méthode de détection plus rapide des souches toxiques cyanobactériennes. À travers ces différents objectifs, nous pourrons tester et potentiellement valider nos hypothèses de départ.

Multidisciplinarité : Les équipes membres du projet ont une expertise différente (écologie microbienne, exotoxicologie, biomonitoring, génomique microbienne) mais très complémentaire, ce qui sera un atout pour mener à bien ce projet.

LIVRABLES :

- **Attendus opérationnels**

- Mise en place d'une carte de distribution des cyanobactéries benthique au niveau de Léman ;
- Évaluation du risque cyanotoxique et identification des zones potentiellement à risque (présence, même faible de cyanotoxines liées aux cyanobactéries benthiques) ;
- Amélioration des modèles de prévention et de prédition des cyanobactéries toxiques sur le lac ;
- Développement de marqueurs génétiques pour mieux assurer le suivi des cyanobactéries benthiques
- L'ensemble de ces résultats présente un fort intérêt pour le gestionnaire du lac, la CIPEL.
- Rédaction de rapports et articles scientifiques

- **Rayonnement du projet**

- Les résultats seront présentés aux commissions, associations et collectivités locales associées au Léman (e.g association pour la sauvegarde du lac Léman, CIPEL) ;
- Ce projet fera l'objet d'une communication orale lors d'un congrès international (e.g AquaEcOomics 2025)
- Une ou plusieurs publications scientifiques seront réalisées.

DESCRIPTIF DETAILLE

(4000 caractères espace compris) :

- **Méthodologie**

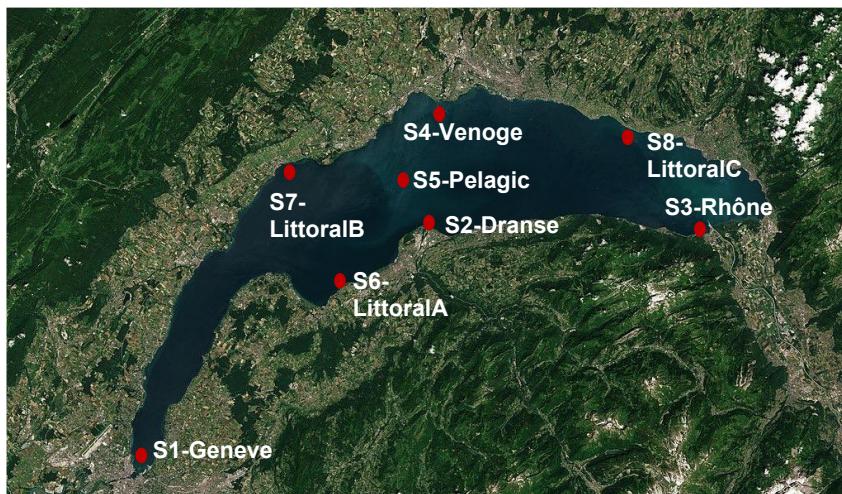


Figure1. Sites d'échantillonnage

Objectif.1 : Quelles sont les variables environnementales associées au développement des tapis cyanobactériens ?

Échantillonnage : Nous réaliserons un premier échantillonnage de type « *snapshot* » sur 8 sites, afin d'évaluer la distribution des cyanobactéries benthiques (Figure 1). Les sites associés avec un affluent seront échantillonnés au niveau de l'affluent et de l'embouchure. En fonction de l'abondance des cyanobactéries qui sera évaluée par microscopie et *amplicon sequencing* (16S), 2 sites seront ensuite choisis où nous ferons un échantillonnage à plus haute fréquence d'une fois par mois pendant 1 an. La prise d'échantillons se fera en triplicat et l'eau sera également filtrée sur des filtres à 0,22 µm. Nous aurons donc un total de 96 échantillons au minimum. L'échantillonnage se fera avec un appui humain et financier porté par le projet Interreg – ALGA.

Analyse physico-chimique des sites : Pour chacun des échantillons, nous ferons une analyse des paramètres du lac (température, pH, oxygénation, profondeur, turbidité). Des capteurs avec enregistrement de données seront installés sur les 2 sites choisis d'échantillonnage à haute fréquence afin de capturer la

dynamique des paramètres environnementaux. Les nutriments (phosphore total, carbone organique dissous, azote ammoniacal, nitrites/nitrates, ...) seront également mesurés. Cette analyse sera réalisée en effort commun par CARRTEL et UNIGE.

Nous pourrons ainsi identifier par des approches multivariées quelles sont les variables abiotiques associées à la présence des biofilms cyanobactériens.

Objectif.2 : Quelle est la composition microbienne des tapis cyanobactériens ?

Métagénomique : L'ADN sera extrait de chacun des échantillons de biofilms (triplicats) et des filtres 0,22 µm. L'ADN des biofilms sera ensuite séquencé sur Novaseq6000 (2x150 pb) afin de caractériser la composition des biofilms en cyanobactéries mais aussi des autres variables biotiques présentes (e.g. les virus). Les séquences provenant des filtres seront également analysées afin de déterminer la communauté microbienne environnante mais libre de ces tapis microbiens.

Nous pourrons taxonomiquement identifier les cyanobactéries benthiques et déterminer la présence de cluster de gènes impliqués dans la production de cyanotoxines. Nous pourrons également modéliser les interactions métaboliques entre les cyanobactéries et les autres membres du biofilm afin de mieux évaluer la nature des relations entre les différents membres. Par exemple, il est possible que certains membres du biofilm procurent des éléments nutritifs nécessaires à la croissance des cyanobactéries (e.g vitamine B12).

Objectif.3 : Quelle est la capacité toxique de ces tapis cyanobactériens ?

Analyse des cyanotoxines : Pour chacun des échantillons, une quantification des cyanotoxines (microcystine totale, anatoxines, saxitoxine et cylindrospermopsine) sera réalisée par LC-MS/MS.

Nous pourrons ainsi valider nos observations réalisées à partir des gènes (Obj.2) et associer les variables abiotiques (Obj.1) et biotiques (Obj.2) avec la production de cyanotoxines. Ces résultats permettront de mieux caractériser le milieu favorable au développement des souches toxiques.

Objectif.4 : Comment mieux suivre ces tapis cyanobactériens ?

Identification de biomarqueurs : La métagénomique est un outil puissant mais coûteux et encore complexe en analyse. Il est donc nécessaire de pouvoir évaluer le risque toxique avec des outils plus rapides. À partir des génomes de cyanobactéries toxiques et non toxiques, nous identifierons les régions uniques à ces génomes afin de pouvoir développer des marqueurs génétiques. Ces marqueurs seront testés et validés sur les différents échantillons obtenus à partir des biofilms et de l'eau filtrée.

Évaluation de risques : Nous sommes conscients que ce projet est ambitieux et il sera appuyé financièrement et humainement par le projet déjà financé Interreg ALGA (2024-2026) orchestré par Stéphan Jacquet (FR) et Bastian Ibelings (CH), tous deux partenaires du projet. Ce projet ALGA consiste à étudier comment les blooms algaux (c'est-à-dire la prolifération de microalgues incluant les cyanobactéries) peuvent impacter, dans un contexte de changement climatique, la qualité des eaux du Léman ainsi que les différents services qui en découlent comme l'approvisionnement en eau potable, la pêche (professionnelle et récréative) ou encore les activités de loisirs. Le projet CyanoBenToxOmic est complémentaire dans le sens où il se concentre sur les cyanobactéries benthiques en utilisant une approche de plus haute résolution et notamment de métagénomique.

Échantillonnage : Notre équipe a une grande connaissance du lac (validé par plusieurs dizaines de publications) et de l'écologie des cyanobactéries. Elle participe déjà activement à l'échantillonnage du lac (suivi CIPEL par le CARRTEL & LéXPLORE). D'autres projet Interreg mené par CARRTEL, ont déjà mise en avant la présence de ces biofilms mais leur composition au niveau cyanobactéries benthiques n'a pas encore été analysée (Interreg Eco-Alpswater). Des échantillons de mats observés au niveau du lac Léman sont toujours disponibles et pourront compléter notre analyse (27).

Analyse des données : Notre équipe a une profonde connaissance en génomique microbienne et les plateformes impliquées (e.g plateforme d'analyse chimique du CARRTEL, plateforme de biologie moléculaire du CARRTEL, collaboration en sous-traitance avec EAWAG) permettront de faire les analyses physico-chimique et toxique du lacs. Un(e) étudiant en thèse (début Septembre 2024) travaillera également sur ce projet dans le cadre de son projet de thèse sur le microbiome des cyanobactéries (co-supervision Nicolas Tromas et Isabelle Domaizon) via un financement associé à la chaire de recherche de Nicolas Tromas.

Site d'échantillonnage : Même si le site d'échantillonnage est le lac Léman, ce sont ses affluents et leur apport des tapis cyanobactériens que nous suivrons au niveau des embouchures (Rhône, Dranse et Venoge). Ce projet est également complémentaire de ce qui a déjà été fait sur l'Ain et assurera un suivi en comparant les données obtenues (e.g composition des tapis cyanobactériens par *shotgun métagénomique* et analyses des variables associées).

DUREE DU PROJET: 24 mois

- Date de début : Janvier 2025
- Date de fin : Juin 2026

CALENDRIER PRÉVISIONNEL : Deux stagiaires de Master appuieront le début du projet dans l'échantillonnage, les extractions ADN et l'analyse des données.

	Détails	Temporalité
Objectif 1	Snapshot – Création d'une carte de présence des Cyanobactéries benthiques. Sélection des sites les plus impactés	Été-Automne 2024
Objectif 1	Échantillonnage sur sites sélectionnées et mesures des paramètres	Janvier 2025- Janvier 2026
Objectif 1	Recrutement étudiants master2	Hiver-Printemps 2025
Objectif 2	Séquençage et Identification des cyanobactéries benthiques	Hiver 2025-2026
Objectif 2	Identification des paramètres abiotiques et biotiques associés aux cyanob.	Hiver 2025-2026
Objectif 3	Analyse des risques toxiques (e.g présence de gènes de toxicité)	Hiver 2025 – Printemps 2026
Objectif 3	Validation de la présence de cyanotoxines (LC-MS/MS et/ou ELISA)	Janvier 2025- Janvier 2026
Objectif 4	Développement de biomarqueurs génétiques de détection	Printemps 2026
Rapport/Articles	Rédaction des rapports et articles scientifiques.	Printemps - Été 2026

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rousso, B.Z., Bertone, E., Stewart, R. and Hamilton, D.P., 2020. A systematic literature review of forecasting and predictive models for cyanobacteria blooms in freshwater lakes. *Water Research*, 182, p.115959.
2. Cadel-Six S., Peyraud-Thomas C., Brient L., De Marsac N.T., Rippka, R., Mejean A. Different genotypes of anatoxin- producing cyanobacteria coexist in the Tarn River, France. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73: 7605–7614. <https://doi.org/10.1128/AEM.01225-07> PMID: 17933923.
3. Wood S.A., Kelly L., Bouma-Gregson K., Humbert J.F. Laughinghouse IV H.D., Lazorchak J., McAllister T., McQueen A., Pokrzynski K., Puddick J., Quiblier C., Reitz L.A., Ryan K., 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(10): 1824–1842. doi:10.1111/fwb.13532.
4. Paerl HW, Huisman J. Climate. Blooms like it hot. *Science*. 2008 Apr 4;320(5872):57-8. doi: 10.1126/science.1155398. PMID: 18388279.
5. Robichon C, Robin J, Dolédec S. Relative effect of hydraulics, physico-chemistry and other biofilm algae on benthic cyanobacteria assemblages in a regulated river. *Sci Total Environ*. 2023 May 10;872:162142. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.162142. Epub 2023 Feb 9. PMID: 36764542.
6. Quiblier C., Wood S.A., 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(15), 5464–5479. 10.1016/j.watres.2013.06.042.
7. Pilar Junier, Guillaume Cailleau, Mathilda Fatton, Pauline Udriet, Isha Hashmi, Danae Bregnard, Andrea Corona-Ramirez, Eva di Francesco, Thierry Kuhn, Naïma Mangia, Sami Zhioua, Daniel Hunkeler, Saskia Bindschedler, Simon Sieber, Diego Gonzalez. A single *Microcoleus* species causes benthic cyanotoxic blooms worldwide. *bioRxiv*
8. Derot, Jonathan, Hiroshi Yajima, and Stéphan Jacquet. "Advances in forecasting harmful algal blooms using machine learning models: A case study with *Planktothrix rubescens* in Lake Geneva." *Harmful Algae* 99 (2020): 101906

9. Carratalà, Anna, Coralie Chappelier, Oliver Selmoni, Annie S. Guillaume, Hannah E. Chmiel, Natacha Pasche, Charlotte Weil, Tamar Kohn, and Stéphane Joost. "Vertical distribution and seasonal dynamics of planktonic cyanobacteria communities in a water column of deep mesotrophic Lake Geneva." *Frontiers in Microbiology* 14 (2023): 1295193
10. Chorus, I. and Welker, M., 2021. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management (p. 858). Taylor & Francis.
11. Pérez-Carrascal, O.M., Tromas, N., Terrat, Y. et al. Single-colony sequencing reveals microbe-by-microbiome phylosymbiosis between the cyanobacterium *Microcystis* and its associated bacteria. *Microbiome* 9, 194 (2021).
12. Valadez-Cano, Cecilio, Adrian Reyes-Prieto, and Janice Lawrence. "Novel virulent and temperate cyanophages predicted to infect *Microcoleus* associated with anatoxin-producing benthic mats." *Environmental Microbiology* 25, no. 12 (2023): 3319-3332.
13. Bouma-Gregson K, Kudela R.M., Power M.E. (2018). Widespread anatoxin-a detection in benthic cyanobacterial mats throughout a river network. *PLoS One*, 13(5), e0197669. doi:10.1371/journal.pone.0197669.
14. Cantoral Uriza E., Asencio A., Aboal M. (2017). Are we underestimating benthic cyanotoxins? Extensive sampling results from Spain. *Toxins*, 9(12), 385. 10.3390/toxins9120385.
15. 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. 10.1016/j.hal.2016.04.002.
16. McPhail C. (2019). Cyanobacteria confirmed as cause of dog's sudden death after swim in St. John River CBC News · <https://www.cbc.ca/news/canada/new-brunswick/cyanobacteria- blue- green-algae-dog-death-fredericton-1.5229540>.
17. Cadel-Six, S., Peyraud-Thomas, C., Brient, L., De Marsac, N.T., Rippka, R. and Mejean, A., 2007. Different genotypes of anatoxin-producing cyanobacteria coexist in the Tarn River, France. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(23), pp.7605-7614.
18. Gugger, M., Lenoir, S., Berger, C., Ledreux, A., Druart, J.C., Humbert, J.F., Guette, C. and 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(7), pp.919-928.
19. Wood, S.A., Kelly, L., Bouma-Gregson, K., Humbert, J.F., Laughinghouse IV, H.D., Lazorchak, J., McAllister, T., McQueen, A., Pokrzynski, K., Puddick, J. and Quiblier, C., 2020. Toxic benthic freshwater cyanobacterial proliferations: Challenges and solutions for enhancing knowledge and improving monitoring and mitigation. *Freshwater biology*, 65(10), p.1824.
20. Vadeboncoeur, Y., Moore, M.V., Stewart, S.D., Chandra, S., Atkins, K.S., Baron, J.S., Bouma-Gregson, K., Brothers, S., Francoeur, S.N., Genzoli, L. and Higgins, S.N., 2021. Blue waters, green bottoms: benthic filamentous algal blooms are an emerging threat to clear lakes worldwide. *BioScience*, 71(10), pp.1011-1027.
21. Jacquet, S., Briand, J.F., Leboulanger, C., Avois-Jacquet, C., Oberhaus, L., Tassin, B., Vinçon-Leite, B., Paolini, G., Druart, J.C., Anneville, O. and Humbert, J.F., 2005. The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful algae*, 4(4), pp.651-672.
22. Kakouei, K., Kraemer, B.M., Anneville, O., Carvalho, L., Feuchtmayr, H., Graham, J.L., Higgins, S., Pomati, F., Rudstam, L.G., Stockwell, J.D. and Thackeray, S.J., 2021. Phytoplankton and cyanobacteria abundances in mid-21st century lakes depend strongly on future land use and climate projections. *Global Change Biology*, 27(24), pp.6409-6422.
23. Shams, S. et al. Anatoxin-a producing *Tychonema* (cyanobacteria) in European waterbodies. *Water Res.* 69, 68–79 (2015)

24. Wüest, A., Bouffard, D., Guillard, J., Ibelings, B.W., Lavanchy, S., Perga, M.E. and Pasche, N., 2021. LéXPLORÉ: A floating laboratory on Lake Geneva offering unique lake research opportunities. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water*, 8(5), p.e1544.
25. Johnston, L.H., Huang, Y., Bermarija, T.D., Rafuse, C., Zamlynny, L., Bruce, M.R., Graham, C., Comeau, A.M., Valadez-Cano, C., Lawrence, J.E. and Beach, D.G., 2024. Proliferation and anatoxin production of benthic cyanobacteria associated with canine mortalities along a stream-lake continuum. *Science of The Total Environment*, 917, p.170476.
26. Tromas, N., Taranu, Z.E., Castelli, M., Pimentel, J.S., Pereira, D.A., Marcoz, R., Shapiro, B.J. and Giani, A., 2020. The evolution of realized niches within freshwater *Synechococcus*. *Environmental microbiology*, 22(4), pp.1238-1250.
27. Salmaso, N., Vasselon, V., Rimet, F., Vautier, M., Elersek, T., Boscaini, A., Donati, C., Moretto, M., Pindo, M., Riccioni, G. and Stefani, E., 2022. DNA sequence and taxonomic gap analyses to quantify the coverage of aquatic cyanobacteria and eukaryotic microalgae in reference databases: Results of a survey in the Alpine region. *Science of the Total Environment*, 834, p.155175.