MASTER GESTION DE L'ENVIRONNEMENT
Deuxième année

Spécialité : Fonctionnement et Restauration des Milieux Aquatiques Continentaux

MÉMOIRE DE STAGE :

Caractérisation des relations allélopathiques entre macrophytes aquatiques et cyanobactéries d'eau douce par approche métabolomique non-ciblée

par

Samuel MAUBERT

Structure d'accueil :

INRAE

50 avenue de Verdun
33610 CESTAS FRANCE

Responsables :

Juliette ROSEBERY
Nicolas CREUSOT
Sylvia MOREIRA

Remerciements

En premier lieu je remercie l'équipe ECOVEA de l'INRAE de Cestas pour m'avoir accepté en tant que stagiaire sur ce projet.

Je remercie vivement Juliette ROSEBERY pour sa disponibilité et pour ses échanges précieux.

Je tiens également à remercier Nicolas CREUSOT, pour sa patience, son implication et sa disponibilité lors de ce stage et notamment pour les analyses métabolomiques.

Aussi, je me dois de remercier Sylvia MOREIRA pour son aide et son appui technique au laboratoire.

Je remercie aussi Sébastien BOUTRY pour l'aide avec les scripts R et sa bonne humeur qu'il sait dispenser au quotidien.

Merci aussi à l'ensemble du personnel permanent comme stagiaires du laboratoire biomarqueurs.

Mes remerciements s'adressent également à Pierre, mon collègue de promo avec qui les pauses café, tout comme les sorties au bar ont embellies les longs jours pluvieux de la périphérie Bordelaise.

Aussi, je tiens à remercier Monique et Jean-Pierre ARTENU sans qui la réalisation de ce travail n'aurait pu voir le jour. Leur bienveillance n'ayant d'égal que leur hospitalité : encore une fois merci.

Je n'oublie pas non plus de remercier Léa pour son soutien indéfectible, sa dévotion et son enthousiasme tout au long de ces travaux.

Pour clore ce préambule, je remercie ma famille et plus particulièrement mes parents. Voyez dans l'aboutissement de ce travail, mes remerciements les plus sincères tant pour l'affection et le soutient que vous avez su me prodiguer. Votre présence et vos encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais.

Présentation de la structure d'accueil

Le présent stage a eu lieu au sein de l'INRAE. Il s'agit de l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement. Cet établissement public est créé le 1er janvier 2020 suite à la fusion entre l'Inra et l'Irstea.

Le site de l'INRAE Cestas-Gazinet comprend deux unités de recherche dont l'unité EABX (Ecosystèmes aquatiques et changements globaux) qui fait partie du département AQUA. Cette même unité regroupe deux équipes dont l'équipe ECOVEA (Ecologie des Communautés Végétales Aquatiques et impact des pressions multiples). Elle s'intéresse aux problématiques liées à la biodiversité et au fonctionnement des communautés végétales en plan d'eau et cours d'eau face aux changements globaux. C'est au sein de cette dernière que s'est déroulé le présent stage. Il s'inscrit dans le premier axe de recherche dont le but est de caractériser les interactions biotiques potentielles pour mieux comprendre les dynamiques spatiales et temporelles de la biodiversité. Il répond aussi à un deuxième axe de recherche évaluant la vulnérabilité et la viabilité des communautés végétales aquatiques face aux pressions en jeu, ici biotiques, dans le contexte de changement global.

La réalisation de ce stage s'est faite sous la supervision de Mme. Rosebery Juliette, Directrice de Recherche, Mme. Moreira Sylvia, Ingénieure d'Etudes et M. Creusot Nicolas, Chargé de Recherche. Le CVA (Centre de Valorisation des Agroressources) de Brive-la-Gaillarde est partenaire de ce projet. Cet organisme est spécialisé dans le développement de procédés d'écoextraction et d'analyse de matières végétales et extraits obtenus. Leur contribution directe à ce stage a été de fournir des extraits de macrophytes préalablement récoltés en milieu naturel par l'équipe ECOVEA (2018 et 2019). Aussi, ce stage s'inscrit dans le cadre du projet EXOBIO (financements Carnot Eau & Environnement) faisant suite aux résultats du précédents projet BECAME (financements LabEx COTE et INRAE).

Table des matières

Remerciements ii

Présentation de la structure d'accueil iii

Table des matières iv

Liste des figures v

Liste des tableaux v

Liste des définitions v

Liste des abréviations vi

Introduction 1

I. Etat de l'art 3

I-A) Première problématique : Prolifération d'espèces de macrophytes aquatiques envahissantes dans les lacs aquitains 3

I-B) Seconde problématique : Recrudescence des blooms de cyanobactéries dans les lacs aquitains… 5

I-C) L'allélopathie : une solution de biocontrôle contre les blooms de cyanobactéries ? . 6

II. Matériel & méthodes 9

I-A) Mise en culture, entretien et suivi de l'état de santé de la souche de *Microcystis aeruginosa*……. 9

I-B) Exposition de *M. aeruginosa* aux extraits de macrophytes 10

1. Exposition 11

2 Mesure des paramètres photosynthétiques 13

3. Approche métabolomique 15

4. Caractérisation de l'évolution temporelle des extraits 21

III. Résultats 22

I-A) Paramètres photosynthétiques 22

1. Concentration en chlorophylle 22

2. Rendement photosynthétique 23

I-B) Réponse métabolomique : vision globale 24

I-C) Annotation préliminaire 25

1. Lagarosiphon major 25

2. Egeria densa 26

IV. Discussion 27

Conclusion 30

Bibliographie 31

Liste des figures

Figure 1 : Photographies de L. major et E. densa 3
Figure 2 : Schéma des principales étapes expérimentales mises en place au cours de l'étude 9
Figure 3 : Photographie du PhytoPAM 10
Figure 4 : Concentration en chlorophylle (µg/L) de la souche de M. aeruginosa mesurée à l'aide du PhytoPAM en fonction du temps et des concentrations d'extrait de L.major et d'E. densa. Les individus contrôle sont en gris et l'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en extrait. 22
Figure 5 : Rendement photosynthétique de la souche de M. aeruginosa mesurée à l'aide du PhytoPAM en fonction du temps et des concentrations d'extrait de L.major et d'E. densa. Les individu contrôle sont en gris et l'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en extrait.... 23
Figure 6 :Représentation graphique des PLS-DA. Les paramètres utilisés pour l'obtention des ces graphiques sont les suivants : Normalisation par la médianne, transformation par la racine carré, Pareto 24
Figure 7 : Taux d'enrichissement pour le macrophyte L. major calculé à partir de l'outil Enrichment analysis sur la plateforme MetaboAnalyst 5.0 25
Figure 8 : Taux d'enrichissement pour le macrophyte E. densa calculé à partir de l'outil Enrichment analysis sur la plateforme MetaboAnalyst 5.0 26

Liste des tableaux

Tableau 1 : Modalités expérimentales de l'exposition en ballon. Mise en contact de M. aeruginosa avec les différentes concentrations en extraits 12
Tableau 2 : Modalités expérimentales de l'expérience de caractérisation du vieillissement des extraits de macrophytes..... 21

Liste des définitions

[1] **Eutrophisation** : Apport excessif d'éléments nutritifs dans les eaux, entraînant une prolifération végétale, un appauvrissement en oxygène et un déséquilibre de l'écosystème.

[2] **Epilimnion** : L'épilimnion est la couche supérieure d'une masse d'eau stable (lac, étang, lagune), directement en contact avec l'atmosphère

[3] **Zoff** : Le ballon nommé « Zoff », uniquement rempli avec du milieu de culture BG11 et de l'eau distillée est un échantillon de calibration du PhytoPAM permettant de faire le « blanc » sur ce dernier.

[4] **Endo-métabolome** : Ensemble des métabolites intracellulaires présents à un moment donné dans un système biologique.
[5] **Exo-métabolome** : Ensemble des métabolites d'un système biologique excrétés dans le milieu extracellulaire ou dans le milieu de culture.

[6] **LC-HRMS** : Chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse à haute résolution..

Liste des abréviations

CVA : Centre de Valorisation des Agroressources

E. densa *: Egeria densa*

EEE : Espèces Exotiques Envahissantes

ESI : ionisation par électronébuliseur

L. major *: Lagarosiphon major*

M. aeruginosa ou **PMC679** : *Microcystis aeruginosa*

MCs : Microcystines

PAM : Pulse Amplitude Modulation

UICN : Union internationale pour la conservation de la nature

Introduction

Ces cinquante dernières années, la dégradation des écosystèmes aquatiques s'est significativement accélérée (Johnson & Host, 1996 ; Poff *et al.,* 2002). Ce phénomène est en grande partie dû à une croissance démographique sans précédent. Cette augmentation de la population mondiale s'accompagne d'une augmentation des pratiques agriculturales intensives, de l'industrie et de l'urbanisation. Tous ces facteurs sont autant de sources de pollution se déversant chaque jour dans les écosystèmes aquatiques dont les milieux lacustres sont souvent l'exutoire. Ainsi, un grand nombre de pressions s'exercent sur ces derniers, dont l'eutrophisation[1] qui impacte directement leur fonctionnement. En particulier, l'augmentation induite des concentrations en nutriments entraîne la prolifération d'espèces envahissantes comme certains macrophytes aquatiques (Ramachandra *et al.,* 2014). Ces plantes perturbent l'équilibre des cycles biogéochimiques et la biodiversité en place (Schultz & Dibble, 2012). Les lacs aquitains sont ainsi soumis à la prolifération de deux hydrophytes: *Egeria densa* et *Lagarosiphon major* (Ribaudo *et al.,* 2015). Afin de réguler la population de ces individus, un plan de gestion local a été mis en place. Cette pratique onéreuse et chronophage consiste à arracher les herbiers en place mais sans valorisation des biomasses de macrophytes prélevées (Fernandez & Zuazo 2013).
Autre conséquence de l'eutrophisation générale des milieux lacustres, les lacs aquitains sont également la cible de proliférations cyanobactériennes très importantes durant la saison estivale. Ces dernières entrainent, elles aussi, des perturbations d'ordre écologiques mais aussi économiques et sanitaires (Chorus & Welker, 2021).

Cette double problématique (proliférations macrophytiques et cyanobactériennes) pourrait toutefois trouver une voie de résolution si l'on étudiait plus finement les relations allélopathiques existantes entre cyanobactéries et macrophytes. En effet, au vu des éléments trouvés dans la littérature au sujet des macrophytes, il est légitime de se demander quelle est la potentielle action de ces derniers sur la croissance des cyanobactéries. Il semblerait qu'*Egeria densa* et *Lagarosiphon major* soient en mesure de produire des métabolites secondaires capables de limiter les proliférations de cyanobactéries en milieu lacustre (Kurashov *et al.,* 2021). Les enjeux de l'allélopathie dans les processus de gestion sont considérables (Michelsen *et al.,* 1995). Ce phénomène apparait de plus en plus fréquemment comme une solution de biocontrôle potentielle permettant de remplacer les traitements chimiques traditionnels qui ont, pour la plupart, des conséquences délétères sur l'écosystème. Aussi, la mise en évidence d'une action inhibitrice des efflorescences

[1] **Eutrophisation** : Apport excessif d'éléments nutritifs dans les eaux, entraînant une prolifération végétale, un appauvrissement en oxygène et un déséquilibre de l'écosystème.

cyanobactériennes par les macrophytes aquatiques invasifs permettrait le développement d'une voie de valorisation des produits de la gestion de ces derniers.

Dans ce contexte, l'objectif de ces travaux a donc été de caractériser les relations allélopathiques existantes entre les macrophytes aquatiques *Egeria densa* et *Lagarosiphon major*, et la cyanobactérie toxinogène *Microcystis aeruginosa*, via une approche combinant des descripteurs physiologiques et métabolomiques. Plus précisément, il s'agissait de déterminer l'effet des biomolécules produites par ces macrophytes sur la croissance des cyanobactéries, les performances photosynthétiques et les voies métaboliques.

Ce rapport présente l'état de l'art sur lequel nous nous sommes appuyés pour répondre à cette problématique (I), avant de décrire les méthodes mises en place (II). Dans une troisième partie les résultats obtenus à l'issue des expériences menées sont détaillés (III), avant d'apporter des éléments d'interprétation et de discussion (IV) autour de ceux-ci.

I. Etat de l'art

Les espèces exotiques envahissantes (EEE), définies selon l'IUCN comme des espèces allochtones végétales ou animales dont l'implantation menace les écosystèmes et leurs communautés représentent aujourd'hui un des principaux facteurs d'érosion de la biodiversité à l'échelle mondiale (Sarat *et al.,* 2015). Cette problématique concerne l'ensemble des écosystèmes (aquatiques et terrestres). Le territoire français ne déroge pas à la règle et il en va donc de même pour les lacs aquitains. Ces derniers se sont formés à la suite de la dernière glaciation dans le bassin hydrographique Adour-Garonne (Le Mat, 2018). Leur faible profondeur et leur forte eutrophisation déterminent largement la composition des peuplements qui leur sont inféodés (Beuffe, 2001), et les rendent particulièrement vulnérables à l'installation des EEE. Ces particularités écologiques font que ces écosystèmes sont également soumis à de fortes proliférations de cyanobactéries. Celles-ci représentent une menace d'ordre économique, environnementale et sanitaire (de Oliveira Fernandes *et al.,* 2009).

I-A) Première problématique : Prolifération d'espèces de macrophytes aquatiques envahissantes dans les lacs aquitains

À l'échelle mondiale, les milieux aquatiques sont de plus en plus régulièrement le siège de proliférations macrophytiques. Depuis les dernières décennies, nombre d'espèces végétales allochtones connues pour leur caractère invasif sont ainsi introduites par les activités anthropiques à travers le globe. Ces introductions peuvent être volontaires (expérimentations scientifiques, cultures) ou involontaires (transport par voie maritime, erreurs humaines) (Sculthorpe, 1967 ; Pieterse & Murphy, 1990). Il en va de même pour le territoire français et en particulier les lacs aquitains. En effet, Dutartre et ses collaborateurs estiment à plus de 300 le nombre d'espèces de macrophytes aquatiques envahissantes en France au cours l'année 2015. Ces végétaux sont particulièrement compétitifs et possèdent un taux de croissance très élevé (Peltre *et al.,* 2008). Ils sont alors capables de coloniser de larges zones. C'est notamment le cas de deux espèces de macrophytes : le Grand Lagarosiphon (*Lagarosiphon major*) et l'Elodée dense (*Egeria densa*).

Lagarosiphon major

Egeria densa

***Figure 1** : Photographies de L. major et E. densa* sur le lac de Parentis-Biscarrosse

Ces deux espèces, appartenant à la famille des Hydrocharitacées, sont des hydrophytes. C'est-à-dire que ce sont des plantes dont les racines sont entièrement immergées et qui ne supportent pas la moindre exondation (Dutartre, 2002). Aussi, ces organismes sont très ubiquistes mais se développent préférentiellement dans des milieux lentiques et riches en matière organique (Berghen, 1969). De plus, ce sont des espèces diploïdes à reproduction asexuée. Leur processus de colonisation se fait par bouturage et croissance végétative, formant ainsi des herbiers très denses (Yarrow *et al.,* 2009). De par leur développement très important *L. major* et *E. densa* sont aujourd'hui caractérisées comme étant des macrophytes invasifs en France métropolitaine et dans les plans d'eau du Sud-Ouest (Bertrin *et al.,* 2012 ; Haury & Dutartre, 2015). Ces proliférations ne sont pas sans conséquences. En effet, elles entraînent tout d'abord des perturbations d'ordre physico-chimiques : modification du cycle des nutriments, de la pénétration lumineuse, du pH, ou encore de la concentration en oxygène (Dutartre *et al.,* 2008). À cela s'ajoute des perturbations au niveau des relations entre les individus (compétition, prédation) et de l'hétérogénéité des habitats (Bickel & Gloss, 2009). De surcroit, le développement massif de ces macrophytes impacte également l'économie locale (gêne physique pour la pêche et les activités nautiques de loisir et notamment pour la navigation motorisée) (Pickhan & Dutartre, 2016).

C'est d'ailleurs ce phénomène qui tente d'être endiguer dans la région des Grands Lacs, dans le Sud-Ouest de la France. Ainsi, une procédure de gestion locale spécifique à *Lagarosiphon major* et *Egeria densa* a été mise en place depuis 1989 au moyen de campagnes de moissonnage et d'arrachage annuelles sur les milieux lacustres concernés (Dutartre *et al.*, 1989). Afin de déterminer les zones majoritairement colonisées par ces végétaux, des opérations d'échosondages précèdent les campagnes d'arrachage et/ou de moissonnage (Fernandez & Zuazo, 2013). Une fois coupés, les fragments végétaux sont ensuite récoltés dans le but d'être desséchés puis épandus. Néanmoins, ces pratiques sont relativement coûteuses et ne proposent pas de solution de valorisation des biomasses récoltées.

C'est donc dans cette optique de valorisation que de récentes études ont été menées, produisant des avancées scientifiques qui ont permis de mettre en évidence la capacité de certaines plantes à synthétiser des composés bioactifs capables d'influencer, par allélopathie, certaines communautés au sein du réseau trophique (Gopal & Goel, 1993 ; Espinosa-Rodríguez *et al.,* 2016).

I-B) Seconde problématique : Recrudescence des blooms de cyanobactéries dans les lacs aquitains

Les cyanobactéries sont des micro-organismes appartenant au règne des eubactéries (Whitton *et al.*, 2012). Ce sont des êtres-vivants photosynthétiques à Gram négatif qui se développent en milieux terrestres et aquatiques, qu'ils soient saumâtres, marins ou dulçaquicoles. Lorsque les conditions environnementales leur sont favorables, elles peuvent proliférer de manière massive et rapide (Whitton *et al.*, 1982). On parle alors d'efflorescence (ou « bloom » en anglais). La présence de cyanobactéries est observée de plus en plus fréquemment sur tous les continents (De Boutray, 2017). Les grands lacs aquitains ne font donc pas exception. Ils sont soumis à un climat océanique particulier formant des conditions propices à l'apparition d'efflorescences cyanobactériennes. En effet, l'importante charge en nutriments ainsi que la mise en place d'une stratification thermique estivale, permettant à l'épilimnion[2] de se réchauffer totalement, aboutit au fait que les cyanobactéries dominent la communauté algale à certaines périodes, jusqu'à former des blooms (Cellamare, 2009).

Parmi toutes les cyanobactéries présentes dans les lacs aquitains, *Microcystis aeruginosa* est un organisme modèle de par sa capacité à produire des cyanotoxines. Il s'agit d'une cyanobactérie toxinogène capable de former des colonies (Cohen & Gurevitz, 2006). La présence de cette espèce est avérée dans plusieurs lacs aquitains comme celui de Parentis-Biscarosse (Laplace-Treyture & Moreira, 2016). En effet, son apparition est attestée dès le mois de juin sur le lac où elle représente environ cinquante pour cent de la communauté algale pour atteindre quatre-vingt-treize pour cent en janvier (Moreira *et al.*, 2015). La dominance de *Microcystis aeruginosa* s'explique en partie par la présence de vésicules gazeuses intracellulaires, qui expliquent en partie leur succès compétitif. Ces structures confèrent à cet organisme une grande flottabilité dans la colonne d'eau (Damerval, 1990). De plus, comme précisé plus haut, nous avons à faire à un genre colonial. Ainsi, la capacité de former des colonies accroît leur rapport $\frac{Surface}{Volume}$, augmentant ainsi d'autant plus leur flottabilité. Cet avantage évolutif explique en partie leur faculté à s'accumuler à la surface de l'eau. La présence de pigments accessoires (*e.g.* phycocyanine), couplée à cette flottabilité rend les cyanobactéries très compétitives au niveau des ressources alimentaires (*i.e.* photosynthèse) (Humbert & Fastner, 2017). Comme c'est le cas pour *M. aeruginosa*, certaines cyanobactéries sont en mesure de produire des toxines que l'on qualifie de « cyanotoxines » (Carmichael, 1997). Une même espèce de cyanobactérie a la capacité de produire plusieurs toxines et une même toxine peut être produite par différentes espèces de cyanobactéries. Les cyanotoxines sont biosynthétisées à la suite d'un stress environnemental (*e.g.* température, intensité lumineuse, pH, quantité en nutriments, présence de polluants) (Chorus, 2001). Parmi ces toxines, on citera notamment les

[2] **Epilimnion** : L'épilimnion est la couche supérieure d'une masse d'eau stable (lac, étang, lagune), directement en contact avec l'atmosphère

microcystines (MCs) qui sont des héptapeptides monocycliques dont la production dépend de la présence des gènes de biosynthèse. Ces toxines font partie de la famille des hépatotoxines. Elles ont la particularité d'affecter le foie en inhibant l'activité phosphatase et le cycle cellulaire (Dawson, 1998). Les proliférations récurrentes et la production de toxines par les cyanobactéries explique la préoccupation croissante des pouvoirs publics au regard des conséquences écologiques, sanitaires et économiques associées. En effet, la formation de ces blooms entraîne un déséquilibre du fonctionnement du réseau trophique : diminution de l'intensité lumineuse ; induction de périodes anoxiques ; mortalité de la faune (Paerl & Otten, 2013). Outre les conséquences d'ordre écologiques, les cyanobactéries représentent également un danger pour les eaux destinées à la consommation humaine ou récréatives : contamination des réservoirs d'eau potable (Chorus *et al.*, 2000) ; pertes économiques liées à la fermeture des zones de baignades (OMS, 2003).

I-C) L'allélopathie : une solution de biocontrôle contre les blooms de cyanobactéries ?

Le terme d'allélopathie désigne tout effet, direct ou indirect, bénéfique ou délétère, exercé par des plantes, des protistes (microalgues, ciliés), des bactéries ou des virus sur d'autres organismes aquatiques par la production de composés chimiques qui transitent par l'environnement (Rice, 1984). La première observation d'une relation allélopathique impliquant des hydrophytes remonte à 1954 (Oborn *et al.,* 1954). Depuis, il a été largement rapporté que ces organismes étaient en mesure de modifier leur environnement ainsi que les communautés qui les entourent par la sécrétion de molécules bioactives. En effet, selon plusieurs travaux de recherche, il est maintenant attesté que les macrophytes aquatiques sont en mesure de réduire la croissance et la biomasse du phytoplancton par allélopathie (Xian *et al.,* 2006 ; Lahrouni *et al.,* 2015). Toutefois, l'impact précis que ceux-ci exercent sur les voies métaboliques des organismes cibles sont encore méconnus. Selon Hilt et Gross (2008), les cyanobactéries seraient le groupe algal le plus sensible aux composés bioactifs synthétisés par les macrophytes aquatiques en raison de leur nature procaryote (Zhu *et al.,* 2021). Ces composés se répartissent par ailleurs en différentes classes. Ce sont principalement des polyphénols, des acides gras, des composés soufrés ou azotés et des terpénoïdes (Nakai *et al.,* 2012 ; Zhu *et al.*, 2021).

Pour tenter de mettre en évidence ces composés et leur mode d'action, plusieurs stratégies sont décrites dans la littérature (Hu & Hong, 2008). D'abord, les souches de cyanobactéries peuvent être cultivées dans un milieu synthétique (BG11) (Allen & Stanier, 1968) puis en présence d'extraits de macrophytes aquatiques. La concentration de ces derniers est généralement de l'ordre du gramme par Litre (Mohamed & Al-Shehri, 2010). Par ailleurs, les expériences menées prennent souvent pour cible l'espèce de cyanobactérie *M. aeruginosa* (Stanier *et al.,* 1971). Il est également possible de

procéder à une mise en co-culture des cyanobactéries et des macrophytes aquatiques. Certains comme Mohamed (2017) utilisent quant à eux des exsudats de macrophytes. La concentration en cyanobactéries lors de l'inoculation varie entre 10^4 et 10^6 cellules par millilitre (Nakai *et al.,* 1999 ; Espinosa-Rodríguez *et al.,* 2016 ; Maredová *et al.,* 2021) et la durée de l'expérience est couramment comprise entre 72 et 360 heures (Nakai *et al.,* 1999 ; Aliota *et al.,* 1991).

Pour mesurer les paramètres de croissance des cyanobactéries qui seraient potentiellement affectés face aux molécules allélopathiques, la bibliographie fait état de deux types de méthodes. D'une part les méthodes directes : comptage cellulaire, détermination du poids sec ou de la biomasse (Li *et al.,* 2013 ; Islam & Beardall 2017). D'autre part les méthodes indirectes : mesure de la concentration en pigments, autres composés (Azote, Carbone), mesure de densité optique (Chen *et al.,* 2016 ; Bouchamma *et al.,* 2004). Pour ce qui est des mesures de toxicité chez *M. aeruginosa* induite par la production de MCs, certains auteurs préconisent un suivi par test de dosage immuno-enzymatique ELISA (Geada *et al.,* 2017). Aussi, afin de mettre en évidence la réponse photosynthétique des cyanobactéries face aux composés allélochimiques, de nombreuses études, préconisent de mesurer des paramètres comme la concentration en chlorophylle ou le rendement photosynthétique (Wang *et al.,* 2016).

Toutefois, ce type de méthode montre des limites en termes de sensibilité de la réponse de l'organisme cible à différentes concentrations de molécules bioactives (Zhang *et al.,* 2014). Il semblerait que les approches métabolomiques puissent faire preuve d'une sensibilité accrue en ce qui concerne la mise en évidence d'interactions de nature allélopathique, notamment entre cyanobactéries et macrophytes (Li *et al.,* 2010). En effet, l'utilisation d'outils moléculaires (*i.e.* omiques) et en particulier la métabolomique permet d'investiguer une réponse moléculaire plus sensible et plus précoce car elle précède les changements en termes d'altération du métabolisme et de croissance (Segers *et al.*, 2019). Apparue dans les années 1990 suite aux progrès techniques dans les domaines de la biologie moléculaire et de la chimie analytique, la métabolomique est définie comme étant l'étude du métabolome à un instant et dans une situation donnée (Cochereau & Junot, 2013 ; Urbanczyk *et al.,* 2003). Les métabolites sont des molécules organiques de petite taille (inférieure à 2000Da) impliquées dans des processus métaboliques, qu'elles en soient les produits ou les substrats. Ainsi, le métabolome représente ce qui est issu *in fine* de l'expression fonctionnelle des gènes dans des conditions environnementales particulières (*i.e.* phénotype moléculaire) (Ferreira *et al.,* 2021). Il s'agit d'une part de métabolites primaires impliqués dans les processus de croissance ou de reproduction et de métabolites secondaires (ou spécialisés) impliqués dans les phénomènes d'interactions chimiques. Sur le plan méthodologique, on distingue généralement la métabolomique ciblée permettant l'analyse de métabolites spécifiques appartenant à une même famille de molécules (acides aminés, lipides) et la métabolomique non-ciblée qui analyse de manière globale des métabolites dont on ne connait a priori pas la famille (*i.e.*

empreinte métabolomique) (Pezzatti *et al.,* 2020). La signature de l'effet de composés d'intérêt sur le métabolome de l'organisme cible peut être acquise par spectrométrie à résonnance magnétique nucléaire (RMN) ou par spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) couplée à des techniques de séparation (chromatographie liquide ou gazeuse notamment). La LC-HRMS/MS est actuellement la méthode la plus répandue en raison de sa plus grande sensibilité (Breitling *et al.,* 2006). Cette méthode est doublement pertinente à utiliser dans la caractérisation des interactions allélopathiques car elle permet d'une part de déterminer la réponse biochimique associée à celles-ci et d'autre part d'identifier les métabolites secondaires potentiellement responsables de cette réponse.

Au sein du laboratoire, les précédents projets BECAME (BioactivE Compounds in Aquatic invasive Macrophytes : Ecological insights and potential industrial applications) I et II menés par l'équipe ECOVEA chez EABX ont permis de poser l'hypothèse d'une action inhibitrice d'*E. densa* et de *L. major* sur l'activité photosynthétique d'une culture de *Microcystis aeruginosa*, ainsi que sur sa capacité à produire des toxines (*i.e.* microcystines)

Ainsi, l'objectif du présent travail a donc été de chercher à savoir si nous pouvions observer un effet inhibitteur des extraits de *Lagarosiphon major* et d'*Egeria densa* sur le métabolome de *Microcystis aeruginosa* à plus faible concentration que lors du projet BECAME II par des approches de métabolomique, a priori plus sensibles que les mesures exploratoires portant sur l'activité photosynthétique. Pour se faire, une culture de *M. aeruginosa* a été exposée durant 96 heures à une gamme de concentrations croissante d'extraits de macrophytes afin de mettre en évidence une altération de l'endo-métabolome de *M. aeruginosa* par les extraits. Le projet vise ainsi à participer au développement d'une approche innovante, permettant *in fine* aux gestionnaires de rendre rentable leurs interventions sur le milieu en conciliant protection de la biodiversité (contrôle des herbiers d'espèces invasives) et valorisation des biomasses récoltées. Il s'agit d'une alternative aux stratégies de contrôle actuellement mises en place vis-à-vis des blooms de cyanobactéries, connues pour leur caractère délétère sur l'environnement car affectant généralement l'ensemble des organismes aquatiques (Defoirdt *et al.*, 2013,(Bormans *et al.,* 2016 ; Jančula *et al.,* 2014 ; Wilken *et al.,* 2014). La régulation des efflorescences cyanobactériennes par allélopathie semble à l'inverse n'avoir que peu d'impacts non désirés sur l'environnement. La grande sélectivité des molécules ainsi que leurs faibles concentrations en seraient les principales raisons (Nakai *et al.,* 1996).

II. Matériel & méthodes

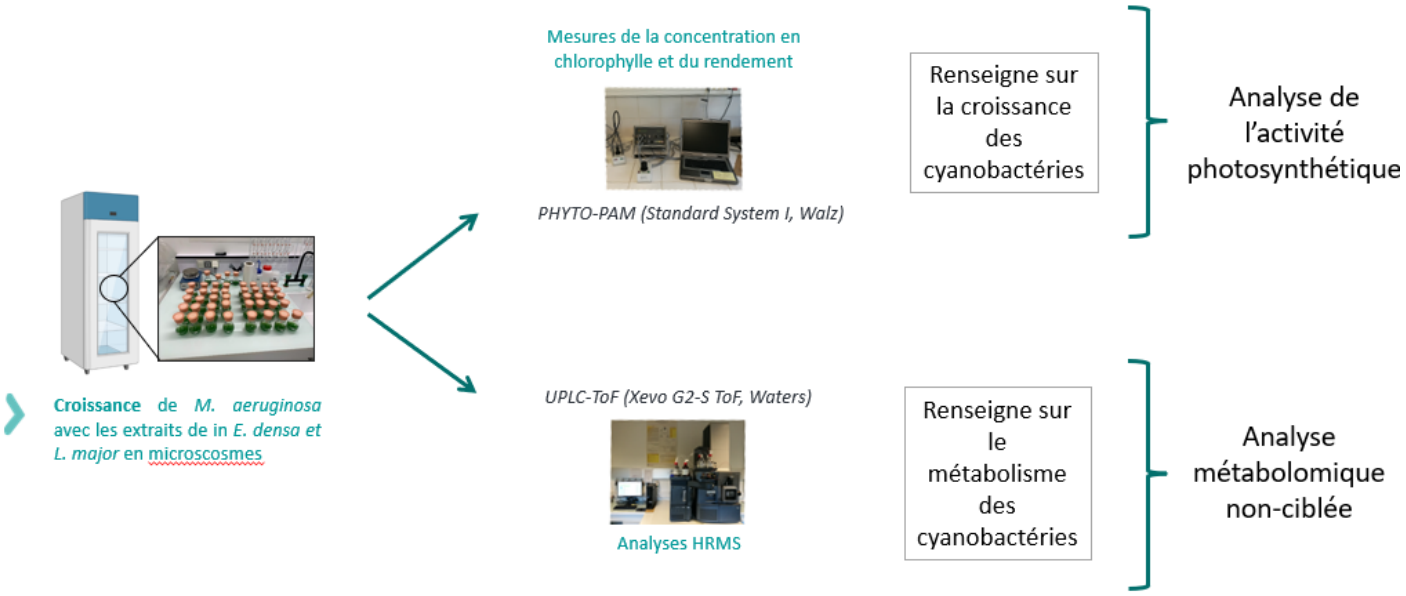


***Figure 2** : Schéma des principales étapes expérimentales mises en place au cours de l'étude*

Comme le montre la figure 2, cette étude se découpe en deux étapes bien distinctes. D'abord, nous avons voulu mesurer l'activité photosynthétique de notre souche de cyanobactéries à travers différents paramètres physiologiques à l''aide d'un spectrophotomètre. Après cela, nous avons mis en place des analyses métabolomiques non-ciblées afin de caractériser l'évolution du métabolisme de cette même souche de cyanobactéries.

I-A) Mise en culture, entretien et suivi de l'état de santé de la souche de *Microcystis aeruginosa*

Pour mener à bien notre étude, le MHHN (Muséum national d'Histoire Naturelle) de Paris nous a préalablement fourni la souche clonale et toxique *Microcystis aeruginosa* MNHN-PMC-2010-679. Cette souche sera dans la suite du rapport nommée PMC 679.10, « *M. aeruginosa* » ou « cyanobactéries ». Trois mois avant le début des expérimentations, elle a été inoculée dans des ballons en verre d'une contenance de 100mL sur du milieu synthétique BG11 (milieu de culture spécifique aux cyanobactéries), commercialisé par la société *Sigma-Aldrich©*. Ceux-ci ont été scellés par des bouchons en silicone afin d'assurer les échanges gazeux nécessaires au bon fonctionnement du métabolisme cellulaire de ces organismes.

Les cyanobactéries contenues dans les ballons ont été repiquées avant le début de chaque exposition. Le repiquage a été fractionné et progressif. En effet, les souches de *M. aeruginosa* ont été repiquées en majorité toutes les deux semaines. Ce repiquage a eu lieu en conditions stériles, dans une pièce dédiée, au moyen d'un bec bunsen électrique afin de limiter toutes contaminations biologiques de la culture par des microorganismes (bactéries, levures, mycètes, virus) et la contamination croisée (autres

souches algales). Le repiquage permet d'accroitre la densité cellulaire lorsque le milieu est appauvri en nutriments et ainsi obtenir un volume de cyanobactéries suffisant pour pouvoir débuter les expérimentations (1100mL soit 25mL/ballon). Les ballons contenant notre souche de cyanobactéries ont été placés dans une enceinte thermorégulée programmée sur 25°C. L'intérieur de l'enceinte étant équipé de LEDS, ces dernières permettent de reproduire une luminosité de 18µmol.s-1.m^{-2} à 4000K (couleur de la lumière naturelle). Le tout est organisé en cycles nycthéméraux de 16 heures de « jour » et 8 heures de « nuit ». Cette température et cette luminosité sont conseillées pour garantir une croissance optimale à l'espèce *Microcystis aeruginosa* (Lavoie *et al.,* 2007). Les ballons ont également été agités cinq jours sur sept à heure fixe afin d'en homogénéiser le contenu et ainsi éviter la formation d'agrégats. De plus, la place des ballons dans l'enceinte est aléatoirement modifiée chaque jour afin de pallier le biais d'éclairage potentiellement non-homogène dans cette même enceinte. Afin de vérifier l'état physiologique et la croissance des cyanobactéries, nous avons effectué un suivi de la chlorophylle totale et du rendement photosynthétique (*cf.* partie III.A).

I-B) Exposition de *M. aeruginosa* aux extraits de macrophytes

Durant les expérimentations, la souche de cyanobactéries PMC679 a été mise en contact des extraits de deux espèces de macrophytes aquatiques : *Lagarosiphon major* et *Egeria densa*. Ces macrophytes ont été prélevés *in situ* au cours de l'année 2018 sur le lac de Parentis-Biscarrosse par par l'équipe ECOVEA (V. Bertrin). Le CVA a ensuite réalisé une extraction éthanolique des matrices végétales après leur séchage.

Pour obtenir nos cinq concentrations d'intérêt à partir des extraits de macrophytes nécessaire à la mise en œuvre de l'expérience, des dilutions en cascade ont été réalisées dans de l'eau distillée. L'eau distillée a été utilisée à ce stade car les extraits avaient été préalablement préparés dans un mélange éthanolique contenant 66% d'Ethanol et 34% d'eau distillée. Compte tenu de son fort potentiel d'évaporation, l'éthanol n'était plus qu'à l'état de traces une fois les extraits livrés par le CVA. Ensuite, pour les différents niveaux de dilution, un volume d'extrait a été placé dans les ballons puis complété à 25ml avec du BG11 afin d'apporter une quantité suffisante de nutriments aux cyanobactéries pour que ce paramètre ne limite pas leur croissance durant l'expérience. Grâce aux dilutions en cascade, la même proportion d'eau distillée a ainsi été distribuée dans chacun des ballons (3,3%). Un biais expérimental est alors évité. Chaque ballon a ensuite été complété par 25 ml de culture de *M. aeruginosa* afin d'obtenir un volume de 50mL par ballon.

1. Exposition

Pour réaliser cette expérience, il a été choisi de mettre en contact les cyanobactéries avec les extraits macrophytiques d'*E. densa* et de *L. major* selon la gamme de concentrations suivante : 10 ; 3,3 ; 1,1 ; 0,4 et 0,1 g de poids sec d'extrait de macrophytes/L. Ces concentrations font écho aux précédents travaux ayant eu lieu dans le cadre du projet BECAME mené par l'équipe ECOVEA de l'INRAE Cestas en 2021. En effet, des concentrations avoisinant les 10 g de poids sec d'extrait/L avaient montré un impact sur les capacités photosynthétiques des souches de *M. aeruginosa* (Campillo, 2021).

La mise en contact des macrophytes et des cyanobactéries aux cinq concentrations évoquées ci-dessus a été réalisée à l'intérieur de ballons en verre d'une contenance de 100mL, identiques à ceux décrits précédemment. Le nombre total de ballons était de 44 car chaque condition (*i.e.* concentration) a été testée en quadruplicats pour assurer la significativité statistique des résultats, et des contrôles ont également été prévus (canobactéries sans extraits). Pour ces derniers, différentes modalités ont été prévues. On retrouvera deux modalités T0. Une correspondant aux contrôles cyanobactéries avant repiquage (dernier repiquage avant exposition) et une autre après ce même repiquage. Le but était ici de savoir si ce dernier pouvait avoir un effet sur le métabolome de notre souche de cyanobactérie. La dernière modalité contrôle correspond au temps final de l'exposition (Tf). L'exposition a duré 96 heures au sein de l'enceinte thermorégulée décrite plus haut. La durée de l'expérience est en accord avec les ouvrages trouvés dans la littérature ainsi qu'avec l'expérience mise en place lors du projet BECAME II. Cette durée permet d'appréhender l'effet des extraits de macrophytes sur la croissance de cyanobactéries à moyen terme. Les ballons ont là encore été agités manuellement et changés de place à l'intérieur de l'enceinte pour limiter l'hétérogénéité des conditions expérimentales dans l'enceinte (luminosité & température) tous les jours. Les modalités expérimentales étaient les suivantes :

Conditions		Composition	Répliquat
1 « Zoff[3] »		50mL de BG11 et d'eau distillée diluée au 1/30eme du volume total du ballon	1
Cyanobactéries contrôle		25mL de *M.aeruginosa* + 25mL de BG11	4
Egeria densa	Concentration : 10g/L	25mL de solution diluée à 10g/L d'*E. densa* + 25mL de *M.aeruginosa*	4
	Concentration : 3,3g/L	25mL de solution diluée à 3,3g/L d'*E. densa* + 25mL de *M.aeruginosa*	4

[3] Le ballon nommé « **Zoff** »,uniquement rempli avec du milieu de culture BG11 et de l'eau distillée est un échantillon de calibration du PhytoPAM permettant de faire le « blanc » sur ce dernier.

	Concentration : 1,1 g/L	25mL de solution diluée à 1,1g/L d'*E. densa* + 25mL de *M.aeruginosa*	4
	Concentration : 0,4g/L	25mL de solution diluée à 0,4g/L d'*E. densa* + 25mL de *M.aeruginosa*	4
	Concentration : 0,1g/L	25mL de solution diluée à 0,1g/L d'*E. densa* + 25mL de *M.aeruginosa*	4
Lagarosiphon major	Concentration : 10g/L	25mL de solution diluée à 10g/L de *L. major* + 25mL de *M.aeruginosa*	4
	Concentration : 3,3g/L	25mL de solution diluée à 3,3g/L de *L. major* + 25mL de *M.aeruginosa*	4
	Concentration : 1,1 g/L	25mL de solution diluée à 1,1g/L de *L. major* + 25mL de *M.aeruginosa*	4
	Concentration : 0,4g/L	25mL de solution diluée à 0,4g/L de *L. major* + 25mL de *M.aeruginosa*	4
	Concentration : 0,1g/L	25mL de solution diluée à 0,1g/L de *L. major* + 25mL de *M.aeruginosa*	4

Tableau 1 : *Modalités expérimentales de l'exposition en ballon. Mise en contact de M. aeruginosa avec les différentes concentrations en extraits*

En parallèle de l'exposition des cultures de cyanobactéries aux extraits de macrophytes, nous avons aussi mis en place une expérience visant à caractériser l'évolution temporelle des extraits. Celle-ci sera détaillée plus loin. Il n'y avait ici pas de cyanobactéries, uniquement les extraits de macrophytes. Elle a permis la mesure du bruit de fond de la photosynthèse et de la chlorophylle ainsi que de soustraire les signaux propres aux extraits lors des analyses métabolomique.

Comme dit précédemment, pour l'exposition de notre souche de cyanobactéries au contact des différents extraits de macrophytes, la température au sein de l'enceinte de culture atteint 25°C. Cette température est suffisamment élevée pour provoquer une forte évaporation dans les ballons. Pour tenter de la caractériser, les ballons ont été pesés à T0 (0h) puis à Tf (96h).

Par ailleurs, tous les contenants utilisés lors de cette expérience ont été stérilisés par un cycle de lavage à l'eau savonneuse, à l'éthanol puis par un passage à l'autoclave.

2. Mesure des paramètres photosynthétiques

Lors de l'exposition , un suivi méticuleux de la croissance et de l'état physiologique des ballons de cyanobactéries exposées aux extraits de macrophytes a été réalisé chaque jour. Pour cela, la concentration en chlorophylle et le rendement photosynthétique sont mesurés à l'aide du PhytoPAM sur chaque ballon. Trois mesures de ces paramètres sont réalisées pour chaque répliquat.

La concentration en chlorophylle ainsi que le rendement photosynthétique sont des paramètres qui nous renseignent sur le bon développement et l'état de santé des cyanobactéries dans nos milieux. Ils ont été estimés au moyen d'un fluorimètre en lumière modulée appelé « PhytoPAM ».

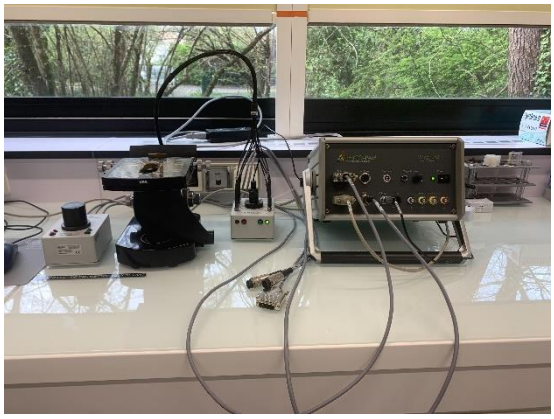


***Figure 4** : Photographie du PhytoPAM*

Dans le cas de nos expérimentations, les mesures ont été faites en mode « benthique » ou « EDF ». Ces paramètres analytiques sont les plus adaptés pour les cultures de cyanobactéries en ballons. En effet, ils ne causent aucunes pertes volumiques dans nos ballons de culture et ainsi n'induisent pas de mort cellulaire. Aussi, le mode benthique permet de limiter les contaminations biologiques. Le PhytoPAM permet de mesurer les performances photosynthétiques en réponse à l'excitation des pigments chlorophylliens contenus dans les thylakoïdes chloroplastiques des cyanobactéries par un ensemble de LEDs. Celles-ci émettent des rayonnements lumineux à différentes longueurs d'ondes du spectre UV-visible : 470nm ; 520nm ; 645nm et 665nm. On retrouve d'abord les impulsions « de mesure ». Elles sont appliquées alternativement à haute fréquence sur l'échantillon grâce à une fibre optique directement reliée à l'instrument. Cette lumière est dans notre cas absorbée par les cyanobactéries puis réémise sous forme de fluorescence. Chaque groupe algal étant caractérisé par une association de pigments chlorophylliens particulière, l'information reçue pour les différentes longueurs d'ondes permet au PhytoPAM de définir à quel groupe algal appartient l'échantillon. Pour *M. aeruginosa*, la fluorescence est particulièrement forte à 645nm en raison de l'absorbance de la phycocyanine et de l'allophycocyanine, pigments accessoires caractéristiques des cyanobactéries. Ainsi, il est possible de déterminer la concentration en chlorophylle de la culture. Le rendement photosynthétique est quant à lui mesuré en appliquant à

l'échantillon un flash lumineux intense de 655nm pendant 0,2 seconde. Il s'agit de « l'impulsion de saturation ». Elle a pour effet de saturer en photons le photosystème II des individus. De ce fait, la voie photochimique est bloquée et la dissipation thermique de l'énergie en excès étant négligeable, l'activité de fluorescence (F) est maximale (Fm). Le rendement photosynthétique est donc défini comme étant l'efficacité de transmission d'un photon absorbé partant de l'antenne du thylakoïde jusqu'au centre réactionnel de la photosynthèse. La détermination du rendement photosynthétique nous renseignera sur les capacités photosynthétiques des cyanobactéries. En effet, cette mesure reflète ici l'état physiologique de notre culture. Cette mesure sert également de référence et complète les mesures de concentration en chlorophylle qui renseigne quant à elle sur le taux de multiplication des cellules algales. Par ailleurs, l'emploi du PhytoPAM en tant qu'outil de mesure pour le suivi des cyanobactéries, présente de nombreux avantages : rapidité des mesures, peu de manipulations de l'échantillon, aucune période d'incubation, méthode relativement peu invasive et mesure de la photosynthèse brute (Houliez, 2012). Parmi les différentes techniques de suivi existantes, et en tenant compte des contraintes techniques, l'emploi du PhytoPAM a été choisi comme étant la méthode la plus pertinente.

Afin d'estimer la densité cellulaire de la culture PMC 679.10 en parallèle des mesures de chlorophylle et de rendement, des comptages cellulaires en triplicatas sont également réalisés les premiers et derniers jours des cycles de repiquage au moyen d'un microscope droit en contraste de phase et objectif x40. Un volume de 125µL est déposé sur une cellule de Nageotte (50 µL), divisée en quarante bandes. Afin d'avoir une valeur moyennée du nombre d'individus par unité de volume, les cellules sont comptées sur dix bandes. La densité cellulaire est ainsi obtenue (Morin *et al.,* 2010). La culture a été diluée au préalable avec du milieu BG11, dans de l'eau minérale, puis fixée au Lugol alcalin. Cela permet une meilleure sédimentation et minimise l'erreur de répétabilité liée à l'observateur. Celle-ci est estimée à 5% (comptage répété d'une bande de cellule de Nageotte par le même opérateur, sur plusieurs bandes et échantillons).

De plus, des comptages cellulaires sont aussi mis en place à T0 et Tf selon le même protocole que décrit plus haut afin d'établir une correspondance entre la concentration en chlorophylle et la densité cellulaire de la souche PMC679.

L'éventuelle différences de réponse entre les modalités d'exposition ont été testées par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (Ostertagova *et al.,* 2014).

3. Approche métabolomique

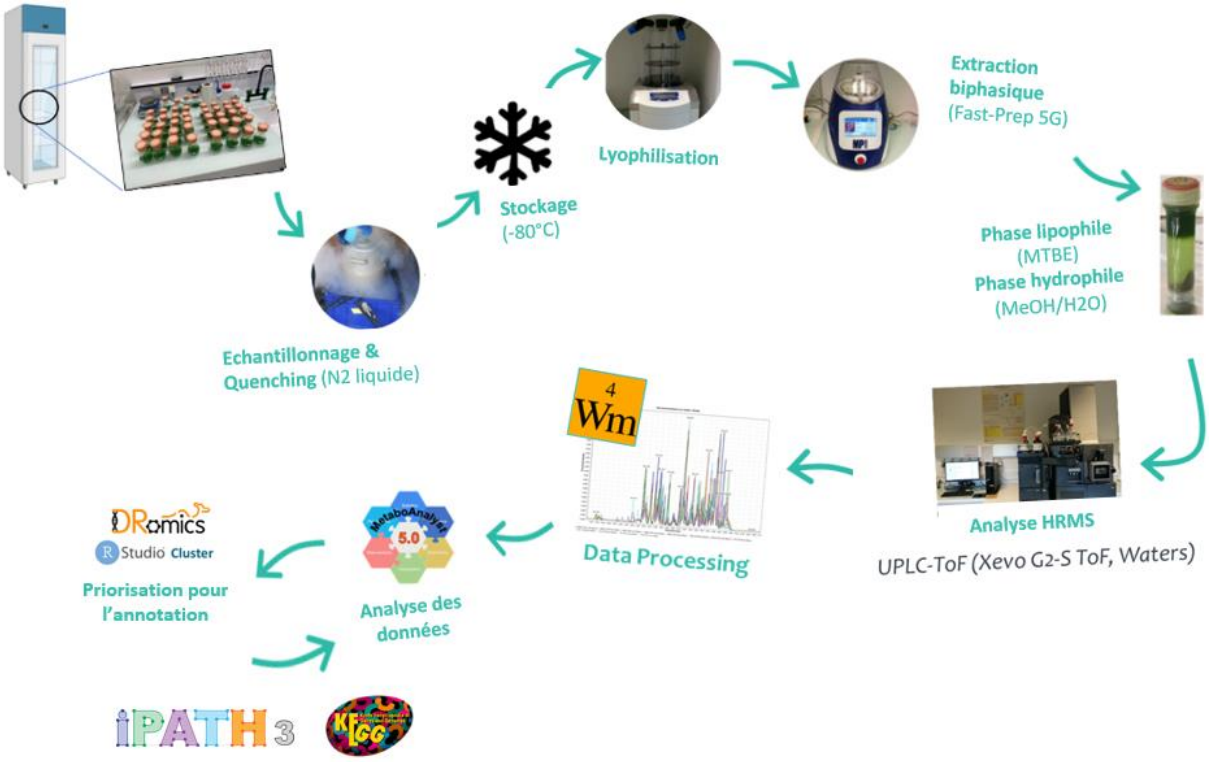


***Figure 3** : Schéma des étapes ayant été mise en place dans le cadre des analyses métabolomiques*

Cette partie du travail a été réalisée en étroite collaboration avec le laboratoire Biomarqueurs présent sur le site de l'INRAe de Cestas. Le déroulement des analyses métabolomiques mises en place lors de cette étude s'est structuré selon différentes étapes qui sont détaillées ci-après. Nos échantillons seront analysés à l'aide d'un dispositif de spectrométrie de masse. Cette méthode est basée sur le principe d'une séparation des molécules en fonction de leur rapport masse sur charge électronique (rapport m/z). Cette séparation se fait selon une méthode de type MS/MS. Cette méthode consiste à sélectionner un composé via une technique de spectrométrie de masse, à le fragmenter puis à effectuer une seconde spectrométrie de masse sur les fragments générés par la première spectrométrie. Dans cette étude, les résultats ont été produits avec une méthode dite « MS1 ». Cette dernière consiste à faire passer les composés présents dans nos échantillons (composés « parent ») dans un détecteur de masse afin d'obtenir un signal correspondant au rapport m/z (masse du composé / charge électronique) de chaque composé. Il existe également une seconde méthode dite « MS2 ». Elle est complémentaire à la première puisqu'elle consiste à sélectionner les composés parents d'intérêts pour les faire entrer en collision avec un gaz à haute pression afin de les fragmenter. Le processus de collision permet de gagner en précision lors de l'identification des composés.

a) *Quenching*

Cette première étape permet de figer le métabolisme cellulaire et les réactions enzymatiques s'exerçant dans les échantillons. Pour se faire un volume de 20mL a été prélevé sur chaque réplicat à T0 avant puis après repiquage des cyanobactéries ainsi qu'après 96 heures d'exposition (Tf). Le fait de quencher les échantillons avant et après repiquage permet de caractériser le possible effet du repiquage sur le métabolome des cyanobactéries. Les échantillons ainsi prélevés sont transférés dans des tubes Falcon de 50mL qui sont cryogénisés au moyen d'azote liquide à -196°C durant 5 minutes. Les tubes Falcon sont ensuite stockés dans un congélateur à -80°C.

b) *Lyophilisation*

La lyophilisation est communément utilisée pour éliminer toute trace d'eau et de solvant dans les échantillons. Aussi, ce processus fait appel au phénomène de sublimation. En effet, les échantillons préalablement congelés à basse température, sont placés dans un compartiment sous vide au sein du lyophilisateur. L'abaissement de la pression en deçà du point triple sur la courbe de tension de vapeur de l'eau entraîne une sublimation de la glace. De ce fait, l'eau à l'état de glace présente dans les tubes Falcon s'élimine sous forme de vapeur sans passer par l'état liquide. L'élimination de l'eau garantit une meilleure précision lors de l'analyse des résultats ainsi qu'une meilleure conservation des métabolites avant extraction.

Dans le cas présent, une étape préliminaire de centrifugation a été réalisé sur les échantillons de cyanobactéries afin de séparer l'endo-métabolome[4] (culot du Falcon contenant les cyanobactéries) de l'exo-métabolome[5] (surnageant contenant le milieu de culture). Pour se faire, les tubes Falcon stockés au congélateur -80°C, ont été placés dans un réfrigérateur pour décongélation lente. Une fois décongelés, les tubes ont été centrifugés à froid afin de limiter au maximum toute activité enzymatique. À la suite de cela, le surnageant et le culot de chaque échantillon ont été collectés puis répartis dans des contenants de nouveau placés à -80°C. Une fois recongelés, ces derniers ont été répartis dans des lyophilisateurs de paillasse Benchtop Pro 3l, *SP Scientific©* pour une durée de plusieurs jours. Dans le cadre de ce travail, seul l'endo-métabolome a été investigué.

[4] **Endo-métabolome** : Ensemble des métabolites intracellulaires présents à un moment donné dans un système biologique.

[5] **Exo-métabolome** : Ensemble des métabolites d'un système biologique excrétés dans le milieu extracellulaire ou dans le milieu de culture.

c) *Extraction*

Cette étape a pour objectif d'extraire au sein d'une matrice biologique (ici notre souche de *Microcystis aeruginosa*), des métabolites présentant une large gamme de propriétés physico-chimiques. Cela permettra de mettre en évidence de manière sensible une altération du phénotype moléculaire de *M. aeruginosa* par comparaison avec des cultures non exposées. L'entièreté des manipulations a lieu sur glace afin de minimiser la reprise des réactions enzymatiques et des contaminations. Ici, seul l'endo-métabolome a été extrait en vue de mettre en évidence la modulation de certaines voies biochimiques par les extraits de macrophytes.

L'extraction se fait en deux temps. Le premier cycle consiste à réaliser une extraction solide/liquide. Pour cela, environ 10 mg du culot (*i.e.* endo-métabolome) de chaque échantillon précédemment sublimé est distribué dans des microtubes de 2mL contenant 150mg de microbilles de verre d'un diamètre de 0,5mm. Les microbilles introduites permettent de lyser mécaniquement la matrice biologique suite à une agitation intense à l'aide d'un homogénéisateur multidirectionnel FastPrep-5G *MPbiomedical©* Avant cette étape de lyse mécanique, on procède au dopage des échantillons par l'ajout d'étalons internes qui permettront de corriger la perte qui a lieu dans notre matrice au cours de la manipulation lors d'une quantification ultérieure. Après cela, tous les microtubes sont supplémentés avec deux mélanges de solvants : l'un est composé de Méthyl tert-butyl éther/Méthanol (MTBE/MeOH) et l'autre de Eau/Méthanol (H2O/MeOH), tous deux en proportion 3:1. Ces solvants d'extraction facilitent la séparation des composés polaires et apolaires en créant deux phases (hydrophile et lipophile) dans les tubes. Ainsi, selon leur hydrophobicité, les composés se répartissent dans la phase qui leur est propre.

Chaque cycle d'extraction consiste d'abord en l'ajout de 1mL MeOH/MTBE puis des étalons internes dans chaque échantillons. Entre chaque ajout, les échantillons sont homogénéisés à l'aide du Fastprep puis placés dans un congélateur à -80°C pendant quelques minutes. On procède à deux cycles d'homogénéisation/congélation puis 650µL du mélange H20/MeOH est ajouté dans chaque échantillon. À la suite de cela, on procède à une nouvelle phase de Fastprep suivie d'une étape de centrifugation. En effet, tous les échantillons sont placés dans une centrifugeuse à froid pendant 5 minutes à 12000 rpm. La centrifugation a pour effet de culoter les débris matriciels et les microbilles au fond des microtubes. Cela permet aussi de finaliser la séparation des phases lipophiles et hydrophiles amorcées par l'ajout des solvants dans les tubes. À l'issue de cette centrifugation, les phases hydrophiles et lipophiles sont récupérées et placées dans des vials ambrés séparés. Suite à la récupération des phases, un deuxième cycle d'extraction (ici liquide/liquide) est mis en œuvre afin d'accroitre le rendement d'extraction. Là encore, les deux phases sont prélevées et réparties dans leurs vials respectifs. Une fois les phases contenant les différents métabolites séparées lors des extractions, elles sont ensuite évaporées en vue de les concentrer et de les reprendre

dans un solvant compatible avec les conditions chromatographiques (Acétonitrile (ACN) et d'eau ultrapure (50:50 ; v:v) pour la phase hydrophyle, ACN et Isopropanol (50:50, v:v) pour la phase lipophyle). L'évaporation est réalisée à l'aide d'un concentrateur à vide SpeedVac Concentrator (Thermo Fisher Scientific©). Une fois repris, le contenu de chaque échantillon est transféré dans un vial avec insert stocké à -80°C en attendant son injection.

De plus, pour procéder à l'étape d'extraction, des conditions standards jouant le rôle de blancs sont nécessaires. Il s'agit notamment des blancs de procédure qui sont utilisés pour évaluer toute contamination possible lors de la préparation. Ils sont composés que des mélanges de solvants. Aussi, chaque vials ambrés a été pesé avant et après extraction afin de caractériser le volume de solution introduit dans chaque contenant.

d) *Analyse non ciblée par LC-HRMS*[6]

Chaque échantillon est finalement analysé sur un système couplant une chromatographie liquide à ultra-haute performance (UPLC) et un spectromètre de masse haute résolution (HRMS) de type TOF, équipé d'une source électrospray (UHPLC-Hclass, Xevo G2-S ToF, *Waters©*).

Dans un premier temps, les échantillons subissent une séparation chromatographique. Dans le cas présent, 10 µL d'échantillons ont été injectés et séparés sur une colonne HSST3 (150mm x 2.1 x 1.7µ). Suite à la séparation chromatographique, l'extrait est introduit dans le spectromètre à l'aide d'une source électrospray. Cette étape permet de faire passer les ions de la phase liquide à une phase gazeuse (*i.e.* nébulisation) tout en les chargeant positivement ou négativement selon la différence de potentiel appliqué. Ces modes d'ionisations sont complémentaires en vue d'obtenir une empreinte métabolomique globale des composés présents en solution. Dans notre cas, la source d'électrospray a été utilisée en mode positif et négatif pour chaque échantillon. Une fois nébulisés, les ions transitent dans un analyseur à temps de vol. Ce type d'analyseur dit à haute résolution permet de mesurer la masse (m/z) d'un ion avec une très grande précision (de l'ordre du ppm) permettant ainsi de déterminer sa formule brute en lien avec la masse mono-isotopique et le patron isotopique associé.

Dans le cas présent, les données ont été acquises sur le logiciel Mass Lynx en mode résolution par MSe centroïdes, qui consiste en l'alternance d'un full scan entre 50 et 1500 m/z à basse énergie (6Kv) et à haute énergie (10-40 Kv) de collision. Il en résulte alors l'obtention de spectres à basse et haute énergie permettant d'acquérir des informations sur l'ion précurseur (équivalent à une MS1) et ses fragments (équivalent

[6] **LC-HRMS :** Chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse à haute résolution

à une MS2) nécessaire à l'identification des métabolites (*i.e.* par recoupement avec des bases de données).

Concernant l'analyse non ciblée par UHPLC-HRMS, de la leucine a également été infusé à intervalle régulier en parallèle de l'injection des échantillons dans l'UPLC-ESI-ToF afin de corriger la dérive du rapport m/z et de vérifier l'état du système (résolution & sensibilité). De plus, pour chaque fraction (hydrophile et lipophile), un « pool QC » est réalisé. Cet échantillon contient un même volume de tous les échantillons en cours d'analyse. Ce pool QC permet de préparer l'UPLC-ESI-TOF à recevoir l'ensemble des métabolites présents dans chaque échantillon. Il permet également de corriger la dérive de l'intensité des signaux durant le traitement des données.

e) *Analyse des données métabolomiques*

L'analyse consiste en 3 étapes : le traitement des données brutes sur Workflow for Metabolomics (https://workflow4metabolomics.org/), la priorisation des signaux sous R et leur annotation (*i.e.* identification préliminaire de métabolites candidats) sous MetaboAnalyst 5.0 (https://www.metaboanalyst.ca/). Notons ici que seule la fraction hydrophile de nos données a été analysée dans cette étude.

(1) Obtention des listes de signaux

La première étape (*pré-processing*) consiste en la détection des signaux au sein des échantillons puis en leur alignement le long de l'ensemble de ces échantillons selon leur rapport m/z, leur intensité et leur temps de rétention (Rt). Pour se faire, les données brutes ont été converties au format mzML. La seconde étape (*processing*) a d'abord consisté en la filtration des signaux obtenus selon différents critères : la proportion de signaux non détectés, le coefficient de variation de l'intensité des signaux au sein des QC (contrôles qualités), l'intensité de signaux au sein des blancs de procédures et des blancs d'injections. Une fois filtrés, les signaux ont été normalisés par le poids sec des échantillons après lyophilisation. Ces deux étapes ont permis l'obtention de liste de signaux en fonction de l'extrait de macrophyte et du mode d'ionisation. Dans le cadre de ce stage, seule la fraction hydrophile a été analysée. La troisième étape a consisté à supprimer les signaux des extraits de macrophytes au sein de extraits de cyano à l'aide d'un script R.

(2) Analyses chimiométriques

Les différentes listes de signaux précédemment constituées ont été importées sur la plateforme MetaboAnalyst 5.0 afin de visualiser notre jeu de données dans sa globalité et ainsi avoir une vision synthétique de la réponse métabolomique des cyanobactéries aux extraits de macrophytes. Pour se faire, nos données ont été représentées sous la forme de PLS-DA (analyse discriminante par les moindres carrés partiels). Ce genre de représentation est utilisée lorsque la régression linéaire multiple n'est pas applicable (Vancolen, 2004). Elle permet une analyse qualitative ou discriminante. La PLS-DA est basée sur la covariance des axes X et Y.

(3) Priorisation des signaux et annotation

Ensuite, nous avons aussi voulu prioriser l'annotation des signaux en raison de leur nombre trop important. La priorisation a pour objectif d'identifier les signaux les plus pertinents au regard de l'effet des extraits de macrophytes sur le métabolisme des cyanobactéries (*i.e.* signaux augmentant ou diminuant avec la concentration en extrait). Pour ce faire deux outils ont été utilisés : un script R permettant de regrouper les signaux selon leur tendance à partir d'une classification hiérarchique ascendante (Schollee *et al.*, 2018) et le logiciel DROMICs permettant de caractériser le comportement dose-réponse de chacun des signaux selon cinq modèles mathématiques (Hill, log probit…) et 4 tendances (augmentation, diminution, courbe en cloche et courbe en U) (Larras *et al.,* 2018). À l'issue de cette étape seuls les signaux augmentant ou diminuant avec la concentration en extraits ont été conservés pour être identifiés.

Cette identification a été réalisé à l'aide de l'outils « Functionnal anaylysis » sous Metabo-Analyst 5.0 qui permet l'annotation des signaux à partir des librairies KEGG basées sur la masse mono-isotopique acquise en MS1 (*i.e.* basse énergie MSe). Dans le cas présent, la librairie de l'espèce *Synochoccus elonggatus* a été utilisée pour annoter nos signaux.

Une fois ces derniers annotés, nous avons réalisé une analyse d'enrichissement sous Métabo-Analyst afin de mettre en lumière les voies de signalisation potentiellement modulées par les extraits de macrophytes. Nous avons ensuite replacé les métabolites candidats dans leurs voies métaboliques à partir du logiciel Ipath3 (https://pathways.embl.de/).

Bien que pertinente en première approche pour obtenir une liste de métabolites candidats, l'annotation basée sur la MS1 ne permet en aucun cas d'identifier avec cette certitude les métabolites. Aussi en parallèle de ces investigations basées sur la MS1,

nous avons commencé à prospecter les informations de fragmentation fournis par les spectres de masse à haute énergie à l'aide du logiciel MS-DIAL. Ces investigations sont en cours au sein du laboratoire et ne sont donc pas présentées dans le présent rapport.

4. Caractérisation de l'évolution temporelle des extraits

Cette étape a été mise en œuvre afin de caractériser l'activité photosynthétique et les métabolites contenus dans les extraits de macrophytes en fonction du temps. Il est en effet indispensable d'isoler dans nos résultats la réponse directement attribuable aux cyanobactéries, en excluant tout artéfact dû aux extraits de macrophytes. Cette expérience sert donc de témoin à l'expérimentation principale. La durée de l'expérience, pour un total de 20 ballons (*cf.* Tableau 2), est de 96 heures à 25°C dans la même enceinte thermorégulée que celle utilisée précédemment. Ici, seules les deux concentrations médianes (3,3 et 0,4 g/L d'extrait) seront testées avec 5 réplicats sur *E. densa* et *L. major*. Les solutions sont préparées de la même manière que lors de l'exposition précédente, ainsi que les mesures de concentration en chlorophylle a et de rendement photosynthétique. De plus, les ballons sont également homogénéisés et changés de place chaque jour. Les modalités expérimentales sont présentées ci-dessous :

Conditions		Composition	Répliquats
1 « Zoff »		50mL de BG11 et d'eau distillée diluée au 1/30eme du volume total du ballon	1
Egeria densa	Concentration : 3,3g/L	50mL de solution diluée à 3,3g/L d'*E. densa*	5
	Concentration : 0,4g/L	50mL de solution diluée à 0,4g/L d'*E. densa*	5
Lagarosiphon major	Concentration : 3,3g/L	50mL de solution diluée à 3,3g/L de *L. major*	5
	Concentration : 0,4g/L	50mL de solution diluée à 0,4g/L de *L. major*	5

Tableau 2 : *Modalités expérimentales de l'expérience de caractérisation du vieillissement des extraits de macrophytes*

La concentration en chlorophylle et le rendement photosynthétique ont été mesurés à T0 puis Tf afin d'appréhender les potentiels changements pouvant avoir lieu au cours de l'exposition.

III. Résultats

I-A) Paramètres photosynthétiques

Ici, les graphiques sont basés sur les moyennes de la concentration en chlorophylle totale et du rendement photosynthétique des quadruplicats pour chaque modalité et pour chaque jour. De plus, les comparaisons statistiques sont faites entre les individus contrôles et les différentes concentrations en extraits.

1. Concentration en chlorophylle

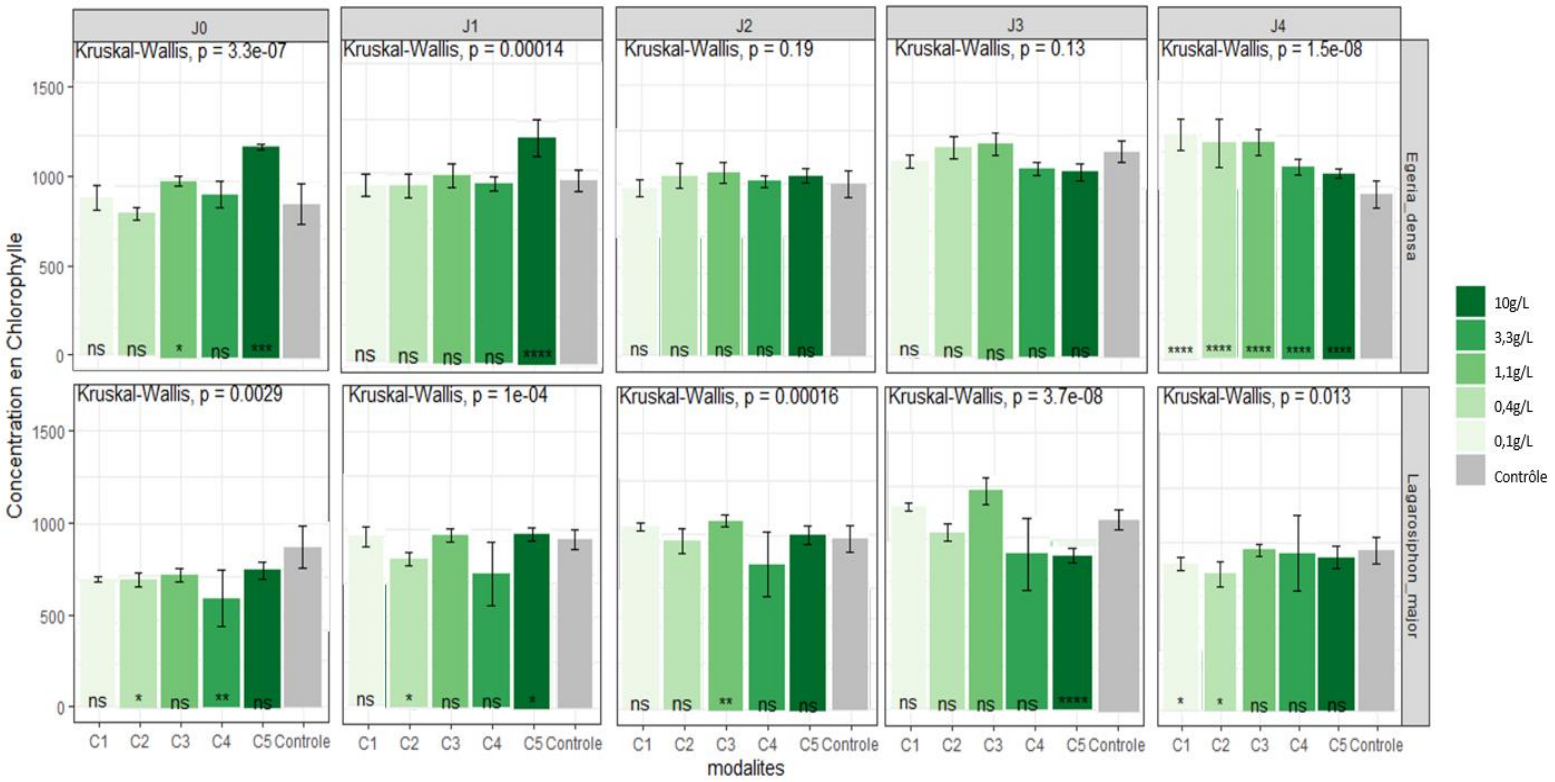


Figure 5 *: Concentration en chlorophylle (µg/L) de la souche de M. aeruginosa mesurée à l'aide du PhytoPAM en fonction du temps et des concentrations d'extrait de L.major et d'E. densa. Les individus contrôle sont en gris et l'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en extrait.*

On remarque tout d'abord que la concentration en chlorophylle moyenne des individus « contrôle » est stable durant toute la durée de l'expérience (environ 900µg/L). Ceci semble indiquer qu'aucun stress n'est venu perturber la croissance de ces individus et qu'il n'y a pas eu de croissance de M. aeruginosa durant l'expérimentation.

Quel que soit l'extrait de macrophyte utilisé, la concentration en chlorophylle de *M. aeruginosa* varie de manière anarchique. Globalement ces résultats sont peu signifcatifs et sans logique claire.

2. Rendement photosynthétique

La figure 5 nous renseigne sur la valeur moyenne du rendement photosynthétique en fonction des concentrations en extraits au cours du temps.

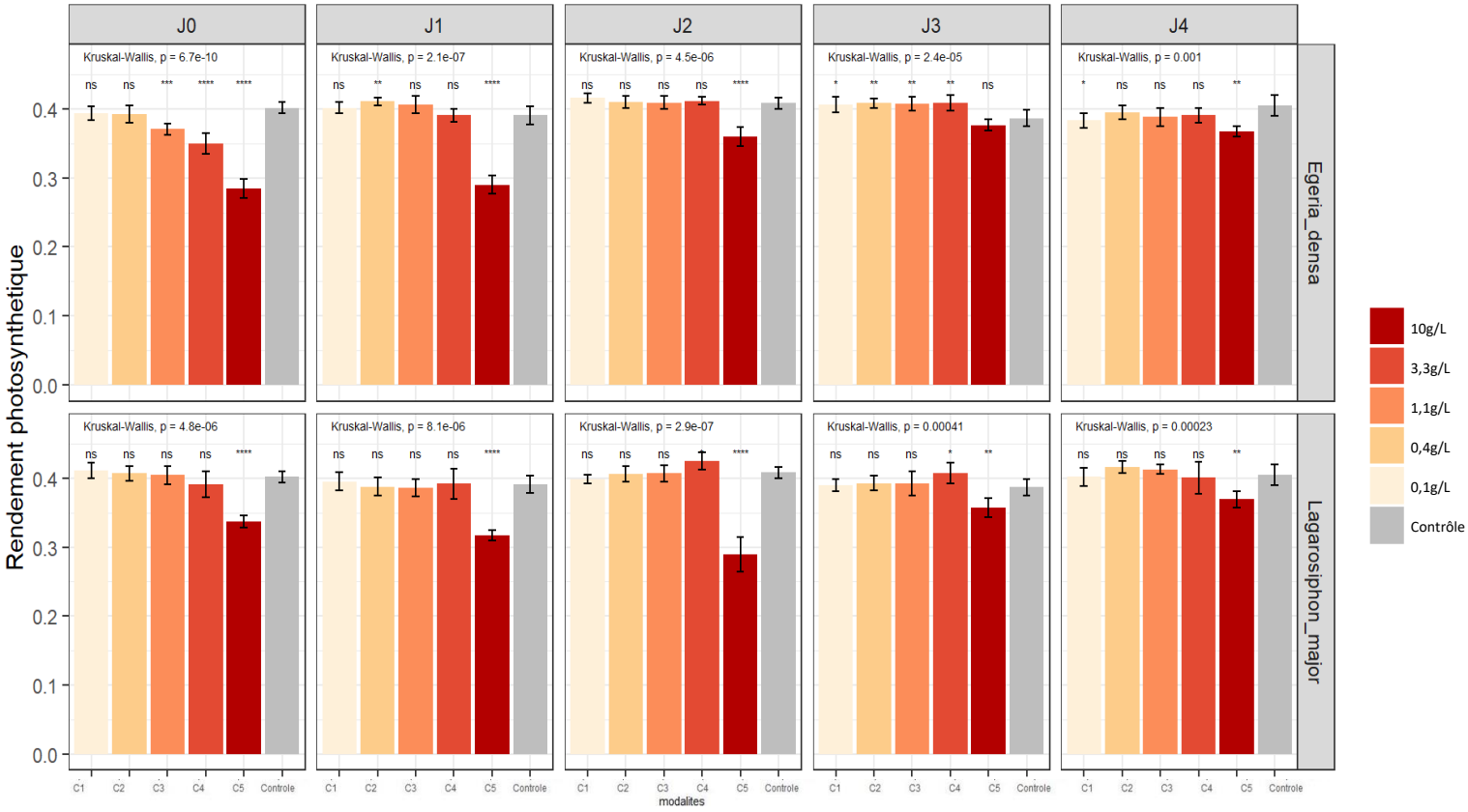
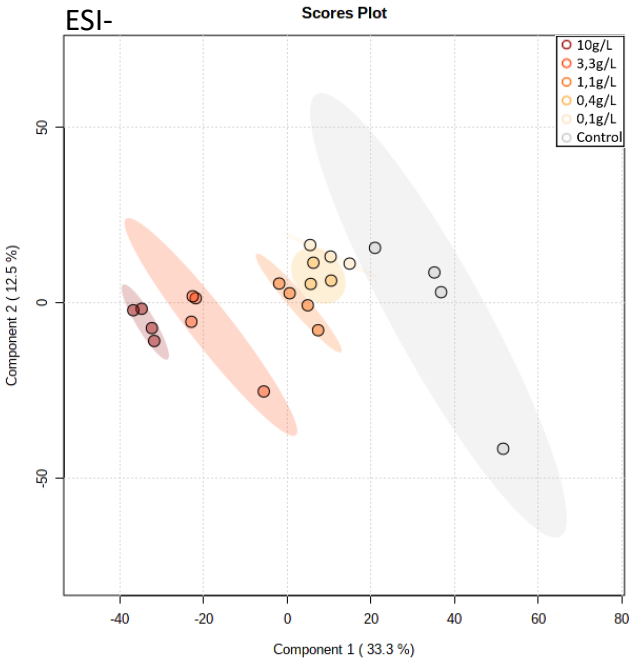


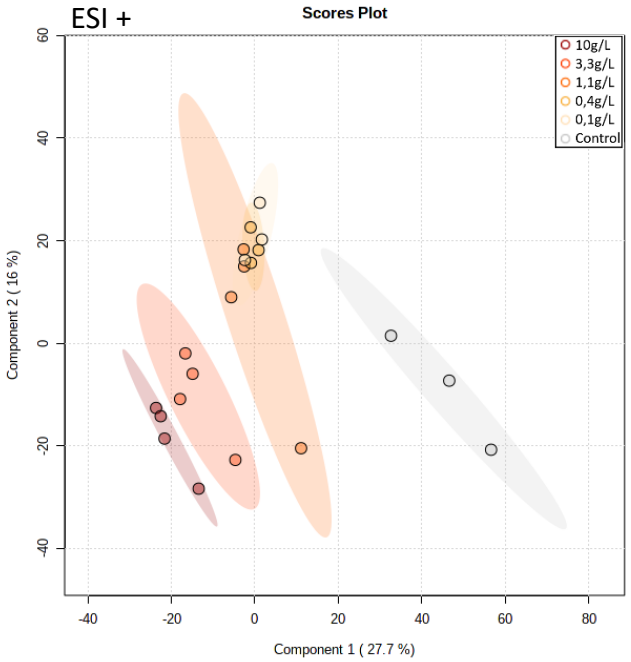
Figure 6 : *Rendement photosynthétique de la souche de M. aeruginosa mesurée à l'aide du PhytoPAM en fonction du temps et des concentrations d'extrait de L.major et d'E. densa. Les individus contrôle sont en gris et l'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en extrait.*

Tout d'abord les échantillons « contrôle » possèdent un rendement photosynthétique très stable durant toute l'expérience (0,40g/L). Pour les deux espèces de macrophytes et à la concentration en extrait la plus forte (10g/L), le rendement photosynthétique est significativement inférieur à celui des individus « contrôle ». Ce phénomène est observé dès les premières heures d'exposition et se poursuit tout le long de l'expérience pour les deux espèces de macrophytes. Il y a donc une inhibition du rendement photosynthétique *de M. aeruginosa* à pour une concentration de 10g/L de poids sec d'extraits de macrophytes. Toutefois une ré-augmentation du rendement photosynthétique de *M. aeruginosa* pour cette même concentration à partir du deuxième jour pour les deux extraits de macrophytes. Ce dernier se stabilise ensuite aux alentours de 0.37 jusqu'à la fin de l'expérience.

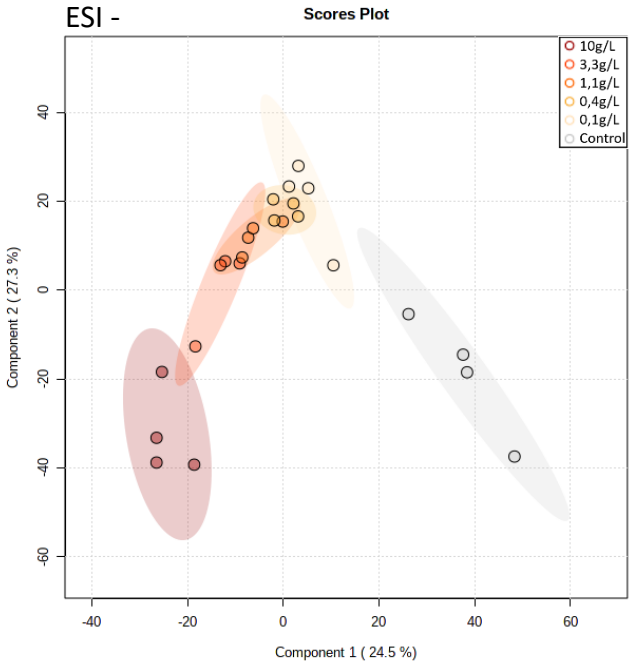
I-B) Réponse métabolomique : vision globale

Lagarosiphon major





Egeria densa



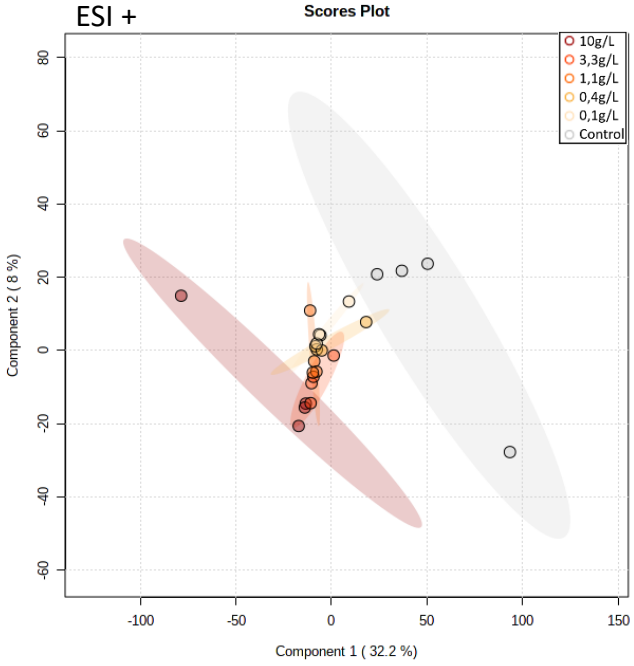


Figure 7 *: Représentation graphique des PLS-DA. Les paramètres utilisés pour l'obtention des ces graphiques sont les suivants : Normalisation par la médianne, transformation par la racine carré, Pareto. Le terme « ESI » renvoi au mode d'ionisation appliquée lors de l'injection. Les échantillons seront alors chargés positivement ou négativement selon le mode d'analyse.*

Pour chacun des extraits de macrophytes et quel que soit le mode d'ionisation, on observe une discrimination marquée entre les concentrations sur l'axe de la composante 1 (>25%). Celle-ci semble toutefois plus nette pour l'extrait *Lagarosiphon*

major. De plus, la condition correspondant aux contrôles (« Tf ») est bien différenciée des autres conditions dans tous les cas. On remarque aussi l'existence d'un gradient de concentration qui s'établit de droite à gauche : plus la concentration en extrait est élevée, plus les échantillons seront situés à gauche de l'axe 1.

I-C) Annotation préliminaire

1. *Lagarosiphon major*

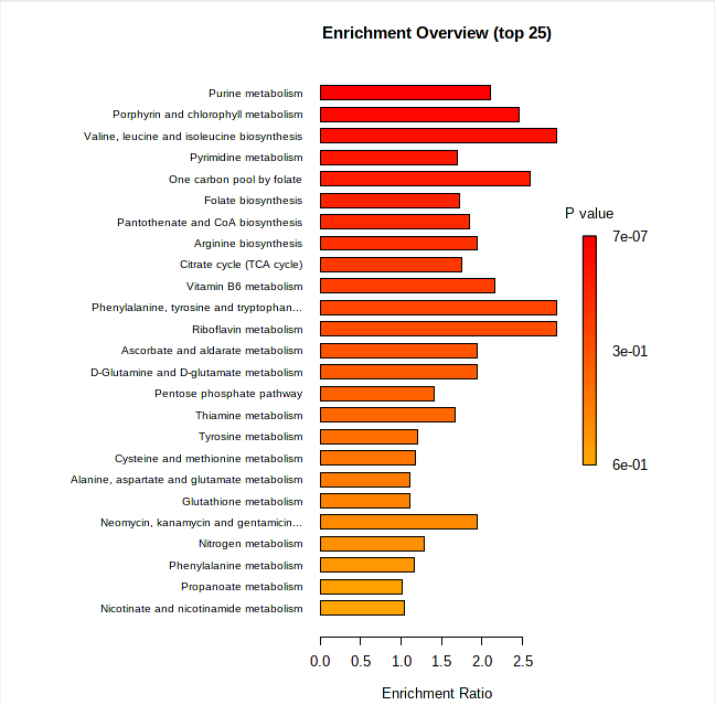


Figure 8 : *Taux d'enrichissement pour le macrophyte L. major calculé à partir de l'outil Enrichment analysis sur la plateforme MetaboAnalyst 5.0*

Cette figure représente le taux d'enrichissement des métabolites de *M. aeruginosa* exposée aux différents extraits de macrophytes. Ce dernier est défini comme étant le nombre de signaux correspondant à une voie métabolique particulière divisé par le nombre total de signaux.

Ainsi, on remarque ici que pour l'extrait de *Lagarosiphon major*, le métabolisme des purines est celui comportant le plus de signaux, suivi par celui de la porphyrine et de la chlorophylle.

Par ailleurs, la figure présentée en annexe II représentant la carte des voies du métabolisme central de notre souche de cyanobactérie exposée à l'extrait de macrophyte *Lagarosiphon major*, présente les mêmes résultats. On voit en effet que les voies métaboliques énoncées précédemment comportent de nombreux signaux. Ces signaux sont essentiellement des signaux régulés négativement (« signaux Down-régulés »).

2. *Egeria densa*

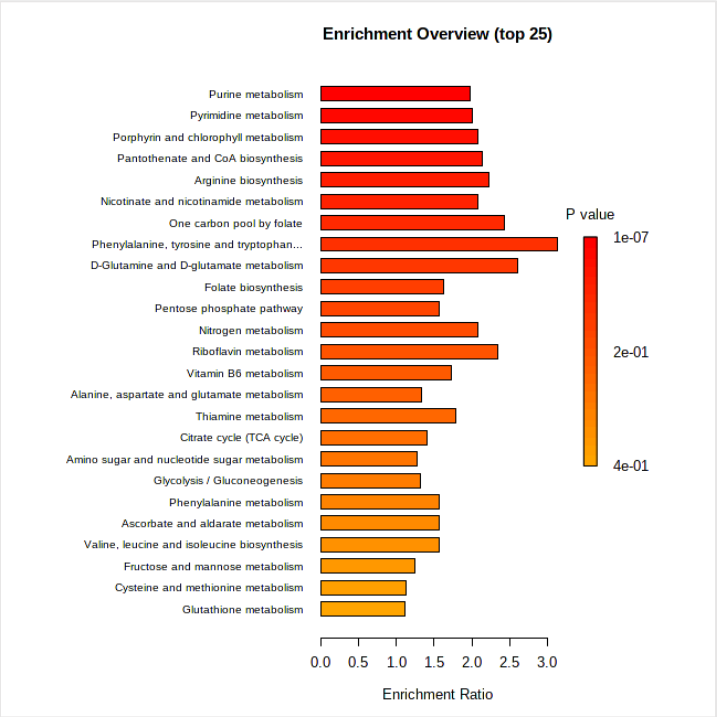


Figure 9 : *Taux d'enrichissement pour le macrophyte E. densa calculé à partir de l'outil Enrichment analysis sur la plateforme MetaboAnalyst 5.0*

Ici, avec les résultats du taux d'enrichissement des métabolites présents chez *M. aeruginosa* exposée à l'extrait d'*Egeria densa*, on se rend compte que ce sont les voies métaboliques de la purine, de la pyrimidine, de la porphyrine et de la chlorophylle qui comportent le plus de signaux.

La carte des voies métaboliques en annexe III comporte les mêmes résultats. De plus, là encore, la grande majorité des signaux sont régulés négativement.

IV. Discussion

Les résultats du rendement photosynthétique ont révélé une inhibition significative de ce dernier. Celle-ci est observée dès le début de l'expérience. Ces résultats sont en accord avec ceux observés dans le cadre du projet BECAME II en 2021. En effet, le rendement photosynthétique de *M. aeruginosa* exposée à une concentration en extrait (*Lagarosiphon major*) de 10g/L était également significativement inférieur à celui des individus contrôles. Toutefois, après 48 heures d'exposition, les cyanobactéries présentaient un rendement photosynthétique proche de zéro jusqu'à la fin de l'expérience alors que dans notre cas, à partir du second jour d'exposition, on remarque une ré-augmentation progressive de ce paramètre. Ce phénomène laisse penser à une adaptation des cellules : elles semblent compenser la baisse du rendement photosynthétique. Ce phénomène est également observé dans certaines études qui le décrive comme un ajustement de la stœchiométrie des chloroplastes pour corriger le déséquilibre d'absorption lumineuse entre les deux photosystèmes (Chow *et al.,* 1990). D'autres études estiment que cette compensation pourrait être due au fait que les cellules augmentent le nombre pigments chlorophylliens à l'intérieur des chloroplastes pour ainsi maintenir un accès convenable à la ressource lumineuse (Tandeau de Marsac & Houmard, 1993 ; Jodłowska & Latała, 2013). Ce phénomène est également mentionné Par Mary en 2003. Cet effet de compensation par le nombre de pigments chlorophylliens pourrait alors expliquer les résultats si peu significatifs et difficilement interprétables de concentration en chlorophylle a (*cf.* figure 4).

Concernant les analyses métabolomiques, elles montrent que le métabolome de *M. aeruginosa* est sensible aux extraits de macrophytes de façon dose-dépendante (*cf.* Figure 6). La discrimination des concentrations plus marquée pour *L. major* pourrait être un argument pour sa sélection lors de la suite du projet. En se penchant sur les taux d'enrichissement des métabolites identifiés chez *M. aeruginosa* en présence des extraits de macrophytes, nous avons vu que le métabolisme des purines était celui présentant le plus de signaux annotés. En effet, la plupart des taux d'enrichissement calculés sur les figures 7 et 8 correspondent aux voies de biosynthèses d'acides aminés comme les purines, pyrimidines, leucines, valines. Ces dernières sont impliquées dans un grand nombre de processus biochimiques (Stasolla *et al.,* 2003). Par exemple, la synthèse des purines et des pyrimidines est nécessaire au métabolisme primaire, au métabolisme secondaire ainsi qu'à l'expression des gènes et sous-tend la majorité des processus cellulaires et biochimiques fondamentaux nécessaires à la croissance cellulaire (Zrenner *et al.,* 2006). De plus, on remarque à l'aide des annexes II et III que les signaux identifiés sur ces voies métaboliques sont nombreux et pour la plupart régulés négativement. Il semblerait donc que la synthèse des acides nucléiques et des acides aminés cités ci-dessous puisse être perturbée. Dans la littérature, il est mentionné que ces derniers sont importants dans l'exécution du mécanisme

photosynthétique chez les autotrophes (Wixon *et al.,* 1971). La perturbation de la biosynthèse de ces composés pourrait alors engendrer une diminution de l'efficacité photosynthétique chez notre souche de cyanobactéries. On remarque toutefois que, le taux d'enrichissement de la leucine, valine et isoleucine pour *E. densa* est beaucoup plus faible que pour *L. major.* Il se pourrait alors que la synthèse de ces acides aminés soient moins affectées dans le cas de ce macrophyte.

Dans la littérature, on remarque que la photosynthèse est le mécanisme physiologique le plus ciblé par les composés allélopathiques (Korner & Nicklisch, 2002). Dans la présente étude, la chute significative du rendement photosynthétique chez *M. aeruginosa* pour les deux extraits de macrophytes indique une claire inhibition de la capacité photosynthétique de notre cyanobactérie. La conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique est donc perturbée. De nombreuses études suggèrent que les polyphénols présentent des propriétés inhibitrice de la photosynthèse en bloquant le flux électronique entre les photosystèmes (Zhu *et al.,* 2010). Ce même auteur suggère également que certains composés allélopathiques comme l'acide gallique ou la tellimagrandine II issus de macrophytes aquatiques sont capables de modifier la composition pigmentaire et enzymatique chez certains organismes phytoplanctoniques engendrant ainsi des perturbations d'ordre photochimiques (Planas *et al.,* 1981 ; Gross, 2003 ; Jančula *et al.,* 2010). Par ailleurs, on retrouve de l'acide gallique dans les extraits de macrophytes ayant été préparé par le CVA lors de cette expérience (Campillo, 2021). Enfin, une analyse préliminaire des extraits de macrophytes à permis de révéler la présence de polyphénols (flavonoides), de terpènes et de saponines, connues pour leurs propriétés allélophatiques et qui pourraient contribuer à ces perturbations (données non-montrées).

Les figures 7 et 8 nous renseignent également sur le fait que pour les deux extraits de macrophytes, on retrouve des signaux correspondant au citrate. Ce dernier est également présent sous la forme d'un signal régulé négativement sur les figures en annexe II & III. Celui-ci est le premier intermédiaire de biosynthèse de l'ATP dans le cycle de Krebs. On retrouve par ailleurs un signal régulé négativement correspondant à la molécule d'ATP sur les annexes II & III pour chaque extrait de macrophytes. Il se pourrait donc que la croissance de notre souche de cyanobactérie soit perturbée par la limitation de la production d'ATP au niveau du métabolisme énergétique.

La baisse significative du rendement photosynthétique de notre souche de cyanobactérie au cours de l'exposition aux extraits de macrophytes pourrait également s'expliquer par l'apparition d'un phénomène de stress oxydatif. Il s'agit d'un déséquilibre entre les systèmes oxydants et anti-oxydants d'un organisme. Ce stress est causé par l'accumulation de radicaux libres de l'oxygène (ROS) dans l'organisme. Ce sont les sous-produits du métabolisme énergétique. Ils s'accumulent généralement au niveau de la mitochondrie. La littérature mentionne que ce stress oxydatif serait capable de diminuer le rendement photosynthétique de certaines cyanobactéries

(Hamed *et al.,* 2019). En effet, les chloroplastes sont les principaux sites de fixations des ROS et la fixation de ces derniers peut entrainer une perturbation du flux des électrons au niveau des photosystèmes dans les thylakoides des cyanobactéries (Gan *et al.,* 2019).

Ainsi, ce genre d'expérience ouvre la voie à de nouvelles méthodes de gestion des efflorescences de cyanobactéries et l'utilisation des macrophytes aquatiques comme agents de biocontrôle des cyanobactéries semble être une approche prometteuse. En effet, les résultats de ce rapport ainsi que l'analyse de la littérature démontrent que l'utilisation des extraits de macrophytes présente bel et bien un intérêt dans la restauration de la qualité de l'eau et plus particulièrement dans des contextes d'efflorescences cyanobactériennes. Tout d'abord, l'utilisation d'extrait permet d'éviter l'implantation d'herbiers de macrophytes aquatiques directement dans le milieu. L'introduction de ce genre de végétaux, bien que naturelle, n'est pas une méthode sans conséquences pour l'environnement. On citera par exemple la perturbation des cycles de nutriments dans l'écosystème. Aussi, ces plantes sont généralement considérées comme invasives par les autorités locales et risquent de modifier le schéma d'interactions interspécifiques (Ayanda *et al.,* 2020). Les herbiers de macrophytes aquatiques modifient également les propriétés physico-chimiques de l'eau et la décomposition de cette biomasse végétale peut provoquer une pollution secondaire des masses d'eau en libérant des substances organiques et inorganiques (Nezbrytska *et al.,* 2022). Toutefois, l'utilisation d'extraits de macrophytes et non des macrophytes en eux même semble permettre d'outre passer une partie de ces inconvénients. Cependant, le développement d'une telle méthode doit encore faire l'objet de nombreuses études afin de s'assurer des potentiels effets secondaires liés à sa mise en place. Il est en effet primordial de s'assurer que les composés utilisés soit capable d'avoir une action ciblée sans pour autant affecter d'autres taxons du réseau trophique. De plus, au regard de la littérature, on remarque que les propriétés allélopathiques des macrophytes aquatiques dépendent de très nombreux facteurs *in situ,* qu'ils soient biotiques ou abiotiques (superficie de l'étendue d'eau, température, densité des plantes, hydrochimie…etc.).

L'utilisation de la métabolomique est en plein essor pour répondre à ce genre de problématique (Scognamiglio *et al.,* 2015 ; Kurashov *et al.,* 2021 ; Chen *et al.,* 2021). A la différence des autres outils comme la spectrophotométrie, elle nous a permis de gagner en compréhension sur l'atteinte des voies biochimiques de *M. aeruginosa* par les extraits.

Conclusion

Cette étude a confirmé qu'il existe bel et bien un effet inhibiteur des macrophytes aquatiques *L. major* et *E. densa* sur la croissance de la cyanobactérie *M. aeruginosa*, conformément aux résultats du projet BECAME II. Cet effet inhibiteur se traduit par une diminution significative à court terme du rendement photosynthétique de notre souche de cyanobactérie quel que soit l'extrait de macrophyte utilisé. Cet effet inhibiteur se traduit surtout au vu de nos analyses métabolomiques par une perturbation générale du métabolisme énergétique des cyanobactéries, affectant à la fois le mécanisme photosynthétique et le cycle de Krebs. De plus, nous avons vu que la synthèse de nombreux acides aminés était perturbée ce qui pouvait avoir un effet sur de nombreux processus cellulaires et biochimiques indispensables à la croissance de *M. aeruginosa.*

Durant cette étude, nous avons également vu que les analyses métabolomiques s'avèrent être une méthode beaucoup plus sensible et précise que les mesures en spectrophotométrie. Cependant nos résultats doivent être pris avec précaution car ce n'est qu'une annotation préliminaire des signaux et qu'ils ne sont basés que sur une technique de MS1. Elle permet toutefois d'avoir une vision globale de la réponse métabolique *de M. aeruginosa* en culture avec des extraits de *L. major* et *E. densa*.

La suite du projet EXOBIO consistera premièrement à améliorer l'annotation des métabolites sur la base d'une technique en MS2. A la suite de cela, il est prévu de mettre en place une expérience de fractionnement biodirigé afin d'améliorer le lien entre le métabolisme des macrophytes et les voies métaboliques de *M. aeruginosa*. De plus, il serait également intéressant d'étudier la réponse métabolique à long terme de notre souche de cyanobactérie, exposée aux mêmes extraits de macrophytes *via* une exposition plus longue.

Bibliographie

Aliotta, G., Monaco, P., Pinto, G., Pollio, A., & Previtera, L. (1991). Potential allelochemicals fromPistia stratiotes L. Journal of Chemical Ecology, 17(11), 2223-2234.

Allen, M. M., & Stanier, R. Y. (1968). Selective isolation of blue-green algae from water and soil. Microbiology, 51(2), 203-209.

Ayanda, O.I.; Ajayi, T.; Asuwaju, F.P. Eichhornia crassipes (Mart.) Solms: Uses, Challenges, Threats, and Prospects. Sci. World J. 2020, 2020, 3452172.

Bénilde Bonnefille. Evaluation de l'approche métabolomique pour l'étude de la métabolisation et des effets du diclofénac chez la moule méditerranéenne. Biologie animale. Université Montpellier, 2017.

Berghen, C. V. (1969). La végétation amphibie des rives des étangs de la Gascogne.

Bertrin, V., Dutartre, A., Caro, A., Boutry, S., Moreira, S. & Jan, G. (2012). Communautés végétales aquatiques des lacs médocains. report. irstea, 54.

Beuffe H., Bilan trophique des lacs et étangs landais : diagnostic d'eutrophisation (campagne 2001). Compte-rendu Cemagref n°133, 44p.

Beuffe H., Bilan trophique des lacs et étangs landais : diagnostic d'eutrophisation (campagne 2001). Compte-rendu Cemagref n°133, 44p.

Bickel, T.O., & Closs, G. P. (2009). Impact of partial removal of the invasive macrophyte Lagarosiphon major (Hydrocharitaceae) on invertebrates and fish. River research and applications, 25(6), 734-744.

Bormans, M., Maršálek, B., & Jančula, D. (2016). Controlling internal phosphorus loading in lakes by physical methods to reduce cyanobacterial blooms: a review. Aquatic Ecology, 50(3), 407-422.

Bouchamma, E.O., Derraz, M., Naji, B. & Dauta, A. (2004). Influence des conditions nutritionnelles sur la croissance et les capacités de stockage intracellulaire (azote et phosphore) chez Planktothrix agardhii isolée des eaux de la retenue eutrophe El Kansera (Maroc). Acta Bot. Gallica, 151, 381–392.

Breitling R, Pitt AR, Barrett MP. 2006. Precision mapping of the metabolome. Trends Biotechnol 24: 543-548.

Carmichael, W.W. (1997). Advances in botanical research. The Cyanotoxins. Academic Press, London, 211-256.

Carr, N.G., & Whitton, B.A. (Eds.). (1982). The biology of cyanobacteria (Vol. 19). Univ of California Press.

Cellamare, M., (2009) Evaluation de l'Etat Ecologique des Plans d'Eau Aquitains à partir des Communautés de Producteurs Primaires. Bordeaux 1, France, p. 328.

Chen, L., Gin, K.Y.H. & He, Y. (2016). Effects of sulfate on microcystin production, photosynthesis, and oxidative stress in Microcystis aeruginosa. Environ. Sci. Pollut. Res. Int., 23, 3586–3595.

Chorus, I. (2001). Introduction : Cyanotoxins — Research for Environmental Safety and Human Health, Cyanotoxins Occurrence, Causes, Consequences, 19.

Chorus, I., & Welker, M. (2021). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management* (p. 858). Taylor & Francis.

Chow, W. S., Melis, A., & Anderson, J. (1990). Adjustments of photosystem stoichiometry in chloroplasts improve the quantum efficiency of photosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 87(19), 7502-7506.

Cohen, Yehuda, & Gurevitz. (2006). The cyanobacteria—ecology, physiology and molecular genetics. The prokaryotes, 4, 1074-1098.

Damerval T., Différenciation cellulaire et synthèse des vésicules à gaz chez les cyanobactéries, Paris, Thèse de doctorat en Sciences biologiques et fondamentales appliquées, 1990

Dawson, R. M. (1998). The toxicology of microcystins. Toxicon, 36(7), 953-962.

De Boutray, M.-L. (2017). Les cyanobactéries et leurs toxines dans les sources d'eau potable. These de doctorat. Paris Est, 513.

de Oliveira Fernandes, V., Cavati, B., de Oliveira, L. B., & de Souza, B. D. Â. (2009). ECOLOGY OF CYANOBACTERIA: CAUSES AND CONSEQUENCES OF BLOOMS. *Oecologia Australis*, *13*(2), 247-258.

Defoirdt, T., Sasmita Julyantoro, P.G., Baruah, S.K. & Bossier, P. (2013). The apparent quorum-sensing inhibitory activity of pyrogallol is a side effect of peroxide production. Antimicrob. AGENTS Chemother., 57, 2870–2873.

Dutartre, A. (2002). Panorama des modes de gestion des plantes aquatiques: nuisances, usages, techniques et risques induits. Ingénieries eau-agriculture-territoires, (30), p-29.

Dutartre, A., Bertrin, V., & Laplace-Treyture, C. (2008, March). Evaluation des impacts du développement des plantes aquatiques exotiques envahissantes sur les communautés végétales indigènes en plans d'eau: exemples des lacs et étangs du littoral landais. In 4ème Colloque d'Ecologie des Communautés Végétales (EcoVeg4) (p. 16).

Dutartre, A., Delarche, A., & Dulong, J. (1989). Plan de gestion de la végétation aquatique des lacs et des étangs landais (Doctoral dissertation, irstea).

Dutartre, A., Peltre, M. C., Pipet, N., Fournier, L., & Menozzi, M. J. (2008). Régulation des développements de plantes aquatiques. Ingénieries-EAT, n spécial, 135-154.

Espinosa-Rodríguez, C., Rivera-De la Parra, L., Martínez-Téllez, A., Gómez-Cabral, G., Sarma, S. s. s & Nandini, S. (2016). Allelopathic interactions between the macrophyte Egeria densa and plankton (alga, Scenedesmus acutus and cladocerans, Simocephalus spp.): a laboratory study. J. Limnol., 75.

Fernandez, S. & Zuazo, A. (2013). Intervention de gestion du Grand Lagarosiphon dans l'Etang Blanc (Rapport d'activité). Conseil Régional des Landes, Irstea, 26.

Ferreira, L.; Morais, J.;Preto, M.; Silva, R.; Urbatzka, R.;Vasconcelos, V.; Reis, M. Uncoveringthe Bioactive Potential of aCyanobacterial Natural ProductsLibrary Aided by UntargetedMetabolomics.Mar. Drugs2021,19,633. https://doi.org/10.3390/md19110633

Gan, Ping; Liu, Fang; Li, Rongbai; Wang, Shaokui; Luo, Jijing (2019). Chloroplasts—Beyond Energy Capture and Carbon Fixation: Tuning of Photosynthesis in Response to Chilling Stress. International Journal of Molecular Sciences, 20(20), 5046–. doi:10.3390/ijms20205046

Geada, P., Pereira, R.N., Vasconcelos, V., Vicente, A.A. & Fernandes, B.D. (2017). Assessment of synergistic interactions between environmental factors on Microcystis aeruginosa growth and microcystin production. Algal Res., 27, 235–243.

Gopal, B., & Usha Goel. (1993). Competition and Allelopathy in Aquatic Plant Communities. Botanical Review, 59(3), 155–210. http://www.jstor.org/stable/4354209

Gross, E. M. (2003). Allelopathy of aquatic autotrophs. Critical reviews in plant sciences, 22(3-4), 313-339.

Hamed, S. M., Hassan, S. H., Selim, S., Kumar, A., Khalaf, S. M., Wadaan, M. A., ... & AbdElgawad, H. (2019). Physiological and biochemical responses to aluminum-induced oxidative stress in two cyanobacterial species. Environmental Pollution, 251, 961-969.

Haury, J., Lambert, E. & Dutartre, A. (2015). HYDROCHARITACÉES 2013-2015, 93.

Haynes, R. R. (1988). Reproductive biology of selected aquatic plants. Annals of the Missouri Botanical Garden, 805-810.

Hilt, S. & Gross, E.M. (2008). Can allelopathically active submerged macrophytes stabilise clear-water states in shallow lakes? Basic Appl. Ecol., 9, 422–432.

Hu, H.Y., Hong, Y., 2008. Algal-bloom control by allelopathy of aquatic macrophytes-a review. Front. Sci. Eng. China 2, 421–438.

Humbert, J.F., & Fastner, J. (2017). Ecology of cyanobacteria (pp. 9-18). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd..

Islam, M.A. & Beardall, J. (2017). Growth and Photosynthetic Characteristics of Toxic and Non-Toxic Strains of the Cyanobacteria Microcystis aeruginosa and Anabaena circinalis in Relation to Light. Microorganisms, 5, 45.

Jančula, D., Mikula, P., Maršálek, B., Rudolf, P., & Pochylý, F. (2014). Selective method for cyanobacterial bloom removal: hydraulic jet cavitation experience. Aquaculture International, 22(2), 509-521.

Jodłowska, S., & Latała, A. (2013). Combined effects of light and temperature on growth, photosynthesis, and pigment content in the mat-forming cyanobacterium Geitlerinema amphibium. *Photosynthetica*, *51*(2), 202-214.

Juillard-Condat L., « Mise au point d'une méthodologie de fractionnement d'extraits bruts issus de végétaux aquatiques », Mémoire de Master I Chimie parcours Substances Naturelles, sous la direction de Malpeyre C. & Rosebery J., Université de Limoges, 2022, 45p.

Körner, S., & Nicklisch, A. (2002). Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes1. Journal of phycology, 38(5), 862-871.

Kurashov, E., Krylova, J., & Protopopova, E. (2021). The Use of Allelochemicals of Aquatic Macrophytes to Suppress the Development of Cyanobacterial "Blooms".

Lahrouni, M., Oufdou, K. & Oudra, B. (2015). Occurrence of cyanobacteria producing toxins in irrigation freshwaters: Which impacts on crop quality and public health?, J. Mater. Environ. Sci, 6 p, 2986–3001.

Laplace-Treyture, C. & Moreira, S. (2016). Rapport d'activité du suivi scientifique des plans
d'eau de Carcans-Hourtin, Lacanau, Cazaux-Sanguinet et Parentis-Biscarrosse : année 2014. report. irstea, 107.

Lavoie, I., Laurion, I., Warren, A., & Vincent, W. (2007). Les fleurs d'eau de cyanobactéries: Revue de littérature.

Le Mat. A, Etude des communautés phytoplanctoniques dans les grands lacs aquitains : dynamiques temporelles et fonctionnelles. Sciences de l'environnement. 2018. hal-02607852

Li Z-H, Wang Q, Ruan X, Pan C-D, Jiang D-A. Phenolics and Plant Allelopathy. Molecules. 2010; 15(12):8933-8952. https://doi.org/10.3390/molecules15128933

Li, M., Zhu, W., Gao, L. & Lu, L. (2013). Changes in extracellular polysaccharide content and morphology of Microcystis aeruginosa at different specific growth rates. J. Appl. Phycol., 25, 1023–1030.

Maredová, N., Altman, J. & Kaštovský, J. (2021). The effects of macrophytes on the growth of bloom-forming cyanobacteria: Systematic review and experiment. Sci. Total Environ., 792, 148413

Mary, I. (2003). Mécanismes moléculaires de la réponse aux stress environnementaux chez la cyanobactérie marine *Prochlorococcus* (Doctoral dissertation, Rennes 1).

Michelsen, A., Schmidt, I. K., Jonasson, S., Dighton, J., Jones, H. E., & Callaghan, T. V. (1995). Inhibition of growth, and effects on nutrient uptake of arctic graminoids by leaf extracts—allelopathy or resource competition between plants and microbes?. *Oecologia*, *103*(4), 407-418.

Mohamed, Z.A., Al-Shehri, A.M., 2010. Differential responses of epiphytic and planktonic toxic cyanobacteria to allelopathic substances of the submerged macrophyte Stratiotes aloides. Int. Rev. Hydrobiol. 95, 224–23

Moreira, S., Laplace-Treyture, C., Eon, M. & Jan, G. (2015). Rapport d'activité du suivi scientifique des plans d'eau de Carcans-Hourtin, Lacanau, Cazaux-Sanguinet et Parentis-Biscarrosse: Année 2015. Irstea, 107.

Nakai, S., Hosomi, M., Okada, M. & Murakami, A. (1996). Control of algal growth by macrophytes and macrophyte-extracted bioactive compounds. Water Sci. Technol., Water Quality International '96 Part 4, 34, 227–235.

Nakai, S., Inoue, Y., Hosomi, M. & Murakami, A. (1999). Growth inhibition of blue–green algae by allelopathic effects of macrophytes. Water Sci. Technol., 39, 47–53.

Nakai, S., Zou, G., Okuda, T., Nishijima, W., Hosomi, M., Okada, M., 2012. Polyphenols and fatty acids responsible for anti-cyanobacterial allelopathic effects of submerged macrophyte Myriophyllum spicatum. Water Sci. Technol. 66, 993–999. Nimptsch

Oborn E. T., Moran W. T., Greene K. T., and Bartley T. R., 1954. Weed control investigations on some important plants which impede flow of western irrigation waters. Joint Lab. Rep. SI-2, USDA, Bur. Reclam. Eng. Lab., and USDA, ARS Field Crops Branch, pp 16-17.

OMS. Algae and cyanobacteria in fresh water. In : Guidelines for safe r ecreational water environments. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2003:136-58

Ostertagova, E., Ostertag, O., & Kováč, J. (2014). Methodology and application of the Kruskal-Wallis test. In *Applied Mechanics and Materials* (Vol. 611, pp. 115-120). Trans Tech Publications Ltd.

Paerl, H.W., & Otten, T.G. (2013). Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. Microbial ecology, 65(4), 995-1010.

Peltre, M. C., Dutartre, A., Barrat-Segretain, M. H., & Dandelot, S. (2008). Biologie des macrophytes à potentiel proliférant. Ingénieries Eau-Agriculture-Territoires, Numéro spécial «Plantes aquatiques d'eau douce: biologie, écologie et gestion, 109-123.

Pezzatti, J., Boccard, J., Codesido, S., Gagnebin, Y., Joshi, A., Picard, D., ... & Rudaz, S. (2020). Implementation of liquid chromatography–high resolution mass spectrometry methods for untargeted metabolomic analyses of biological samples: A tutorial. Analytica Chimica Acta, 1105, 28-44.

Pickhan, L. & Dutartre, A. (2016). Contrôle de l'Egérie dense et du Grand Lagarosiphon par pose d'écrans occultants de fond (halte nautoque de Sainte-Eulalie en Born, Landes (Résumé d'expérience). GT IBMA, ONEMA, 5.

Pieterse A.H., Murphy K.J (eds.), 1990. Aquatic Weeds. The ecology and management of nuisance aquatic vegetation. Oxford Science Publications, 593p.

Planas, D., Sarhan, F., Dube, L., and Godmaire, H. 1981. Ecological significance of phenolic compounds of Myriophyllum spicatum, Verh. Internat. Verein. Limnol. 21: 1492–1496.

Poff, N. L., Brinson, M. M., & Day, J. W. (2002). Aquatic ecosystems and global climate change. *Pew Center on Global Climate Change, Arlington, VA*, *44*, 1-36.

Ramachandra, T. V., Asulabha, K. S., & Lone, A. A. (2014). Nutrient enrichment and proliferation of invasive macrophytes in urban lakes. *Journal of Biodiversity*, *5*(1-2), 33-44.

Rice E. L. 1984. Allelopathy. Second Edition, Academic Press, 422 p

Richards, C., Johnson, L. B., & Host, G. E. (1996). Landscape-scale influences on stream habitats and biota. *Canadian Journal of Fisheries and aquatic sciences*, *53*(S1), 295-311.

Sarat, E., Mazaubert, E., Dutartre, A. & Poulet, N. (2015). Les espèces exotiques envahissantes dans les milieux aquatiques : connaissances pratiques et expériences de gestion. ONEMA, 250.

Sarat, E., Mazaubert, E., Dutartre, A., Poulet, N., & Soubeyran, Y. (2015). Les espèces exotiques envahissantes dans les milieux aquatiques. Connaissances pratiques et expériences de gestion, 1.

Schulthorpedc. , 1967 . T h e biology of aquatic vascular plants. E. A r n o l d Publ. Ltd, 660

Schultz, R., & Dibble, E. (2012). Effects of invasive macrophytes on freshwater fish and macroinvertebrate communities: the role of invasive plant traits. *Hydrobiologia*, *684*(1), 1-14.

Scognamiglio, M., D'Abrosca, B., Esposito, A., & Fiorentino, A. (2015). Metabolomics: an unexplored tool for allelopathy studies. *Journal of Allelochemical Interactions*, *1*(1), 9-23.

Segers, K., Declerck, S., Mangelings, D., Heyden, Y. V., & Eeckhaut, A. V. (2019). Analytical techniques for metabolomic studies: a review. *Bioanalysis*, *11*(24), 2297-2318.

Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. C. B. G., & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). Bacteriological reviews, 35(2), 171-205.

Stasolla, C., Katahira, R., Thorpe, T. A., & Ashihara, H. (2003). Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. Journal of plant physiology, 160(11), 1271-1295.

Tandeau de Marsac, N., & Houmard, J. (1993). Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS microbiology reviews*, *10*(1-2), 119-189.

Urbanczyk-Wochniak E, Luedemann A, Kopka J, Selbig J, Roessner-Tunali U, Willmitzer L, and Fernie AR. Parallel analysis of transcript and metabolic profiles: a new approach in systems biology. EMBO Rep 4: 989-993, 2003

Vancolen, S. (2004). The PLS regression (Doctoral dissertation, Université de Neuchâtel).

Wang, R., Hua, M., Yu, Y., Zhang, M., Xian, Q. M., & Yin, D. Q. (2016). Evaluating the effects of allelochemical ferulic acid on Microcystis aeruginosa by pulse-amplitude-modulated (PAM) fluorometry and flow cytometry. *Chemosphere*, *147*, 264-271.

Whitton, B.A., & Potts, M. (2012). Introduction to the cyanobacteria. In Ecology of Cyanobacteria II (pp. 1-13). Springer, Dordrecht.

Wilken, S., Verspagen, J. M., Naus-Wiezer, S., Van Donk, E., & Huisman, J. (2014). Biological control of toxic cyanobacteria by mixotrophic predators: an experimental test of intraguild predation theory. Ecological applications, 24(5), 1235-1249.

Wixon, R. L., Heinemann, M. A., Semeraro, R. J., & Joseph, A. A. (1971). Studies in valine biosythesis: IX. The enzymes in photosynthetic and autotrophic bacteria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 244(3), 532-546.

Wu, Z., Shi, J. & Yang, S. (2013). The effect of pyrogallic acid on growth, oxidative stress, and gene expression in Cylindrospermopsis raciborskii (Cyanobacteria). Ecotoxicology, 22, 271–278.

Xian Q., Chen H., Zou H. and Yin D., 2006. Allelopathic activity of volatile substance from submerged macrophytes on Microcystin aeruginosa. Acta Ecologica Sinica, 26(11): pp 3549-3554.

Yarrow, M., Marín, V., Finlayson, M., Tironi, A., Delgado, L., & Fischer, F. (2009). The ecology of Egeria densa Planchon (Liliopsida: Alismatales): A wetland ecosystem engineer?.

Zhang, S., Garcia-D'Angeli, A., Brennan, J. P., & Huo, Q. (2014). Predicting detection limits of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and bioanalytical techniques in general. *Analyst*, *139*(2), 439-445.

Zhu, X., Dao, G., Tao, Y., Zhan, X. & Hu, H. (2021). A review on control of harmful algal blooms by plant-derived allelochemicals. J. Hazard. Mater., 401, 123403.

Zrenner, Rita; Stitt, Mark; Sonnewald, Uwe; Boldt, Ralf (2006). PYRIMIDINE AND PURINE BIOSYNTHESIS AND DEGRADATION IN PLANTS. Annual Review of Plant Biology, 57(1), 805–836. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105421

ANNEXES

Lagarosiphon major

ESI -

PLS-DA cross validation details:

Measure	1 comps	2 comps	3 comps
Accuracy	0.31818	0.36364	0.40909
R2	0.88415	0.95406	0.97644
Q2	0.83725	0.88779	0.91451

ESI +

PLS-DA cross validation details:

Measure	1 comps	2 comps	3 comps
Accuracy	0.14286	0.19048	0.28571
R2	0.70388	0.93277	0.9748
Q2	0.51885	0.73625	0.75379

Egeria densa

ESI -

PLS-DA cross validation details:

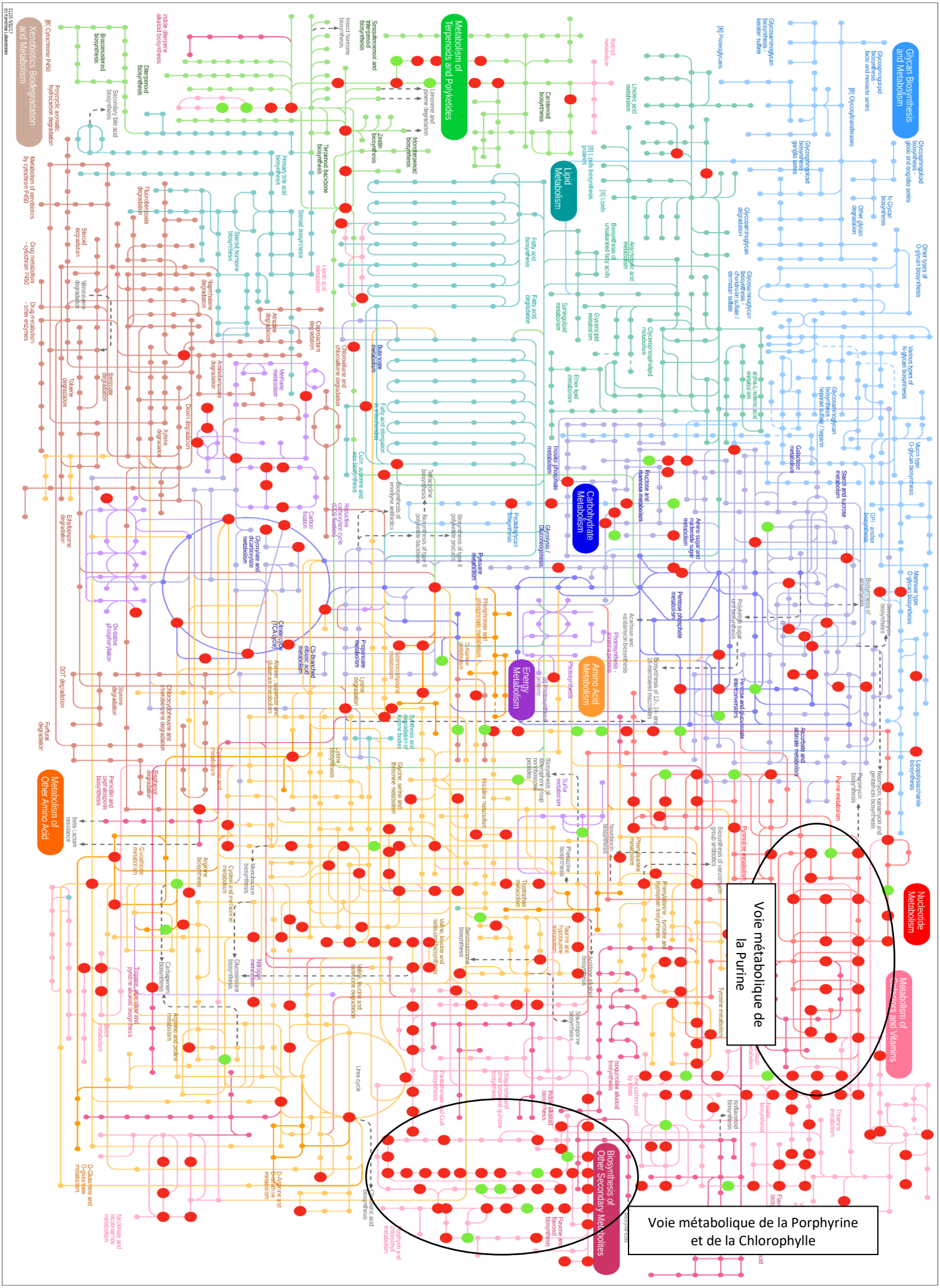
Measure	1 comps	2 comps	3 comps
Accuracy	0.125	0.33333	0.29167
R2	0.83319	0.92313	0.96441
Q2	0.71694	0.84843	0.89419

ESI +

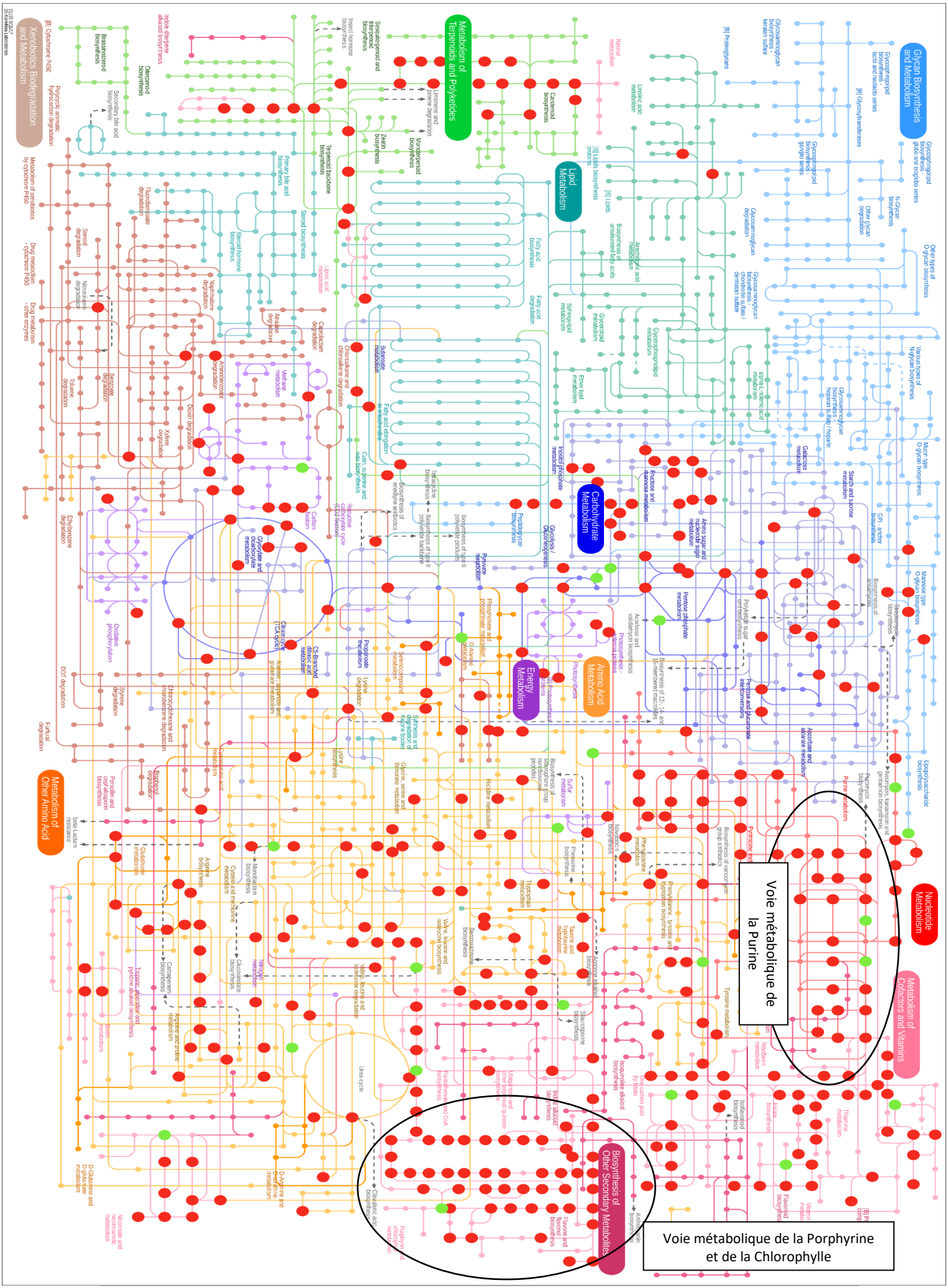
PLS-DA cross validation details:

Measure	1 comps	2 comps	3 comps
Accuracy	0.16667	0.16667	0.25
R2	0.49855	0.75996	0.89827
Q2	0.34191	0.53293	0.61667

Annexe I : *Détails de la validation statistique des PLS-DA*



Annexe II : *Carte du métabolisme central des voies métaboliques de M. aeruginosa cultivée en présence du macrophyte L. major. Obtenu via l'outil Ipath3*



Annexe III : *Carte du métabolisme central des voies métaboliques de M. aeruginosa cultivée en présence du macrophyte E. densa. Obtenu via l'outil Ipath3*