



HAL
open science

Rôle potentiel des macrophytes aquatiques dans la régulation des blooms de cyanobactéries : approche allélopathique

Lucie Campillo

► **To cite this version:**

Lucie Campillo. Rôle potentiel des macrophytes aquatiques dans la régulation des blooms de cyanobactéries : approche allélopathique. Sciences de l'environnement. 2021. hal-04183772

HAL Id: hal-04183772

<https://hal.inrae.fr/hal-04183772v1>

Submitted on 21 Aug 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Master 2
mention Biodiversité, Ecologie, Evolution
parcours « Biodiversité et Suivis Environnementaux »

Année universitaire 2020-2021

Rapport de stage de :
Lucie CAMPILLO

**Rôle potentiel des macrophytes aquatiques dans la régulation des
blooms de cyanobactéries : approche allélopathique**

Structure d'accueil :

INRAE

50 avenue de Verdun
33610 CESTAS FRANCE

Maîtres de stage :

Juliette ROSEBERY

Sylvia MOREIRA

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes tutrices, Juliette Rosebery et Sylvia Moreira, pour leur encadrement, leur disponibilité, leur bienveillance et leur confiance tout au long de ces six mois de stage. Merci de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce stage si intéressant, de m'avoir accompagnée dans chaque étape, tout en me laissant une certaine liberté. Merci de votre patience, écoute et de vos précieux conseils. Je ne m'étendrai pas plus ici, mais je souhaite à tout stagiaire d'avoir un encadrement comme celui que j'ai eu, alors un grand merci à toutes les deux !

Je souhaite remercier l'équipe enseignante du master BSE, Marie-Lise Benot, Alexia Legeay et Didier Alard, pour l'ensemble de cette année de master ainsi que pour la validation de ce stage. Je remercie également les équipes pédagogiques et administratives de Bordeaux Sciences Agro, pour les trois années de formation qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici.

Ensuite, j'aimerais remercier Soizic pour sa bonne humeur, son aide et son coaching au PhytoPAM, mais aussi pour son soutien et sa confiance. Merci à Nicolas C. pour sa contribution à ce stage et son aide. Merci à Mélissa et Debora pour leur accompagnement durant les tests ELISA (et les filtrations finalement très réussies). Et merci à Aurélie pour les sorties, les runnings et les rigolades.

Je souhaite également remercier Albin pour son aide, sa patience et sa bonne humeur dans ce bureau qui a été le nôtre pour un temps. Merci pour tous les bons moments, les sauvetages et reconnaissances entomologiques.

Merci à Christophe, Jacky pour leur aide aux microscopes, leur écoute et leur gentillesse.

Merci également à Léna d'être qui elle est, bienveillante et adorable, merci pour les sessions surf passées et à venir.

Un grand merci à toute l'équipe ECOVEA et du labo biomarqueurs, permanents comme stagiaires, pour les bons moments passés et sans qui ce stage n'aurait pas été le même.

Enfin, merci à toutes les personnes que j'ai eu la chance de rencontrer durant ces 3 belles années d'études.

Présentation de la structure d'accueil

L'INRAE est un établissement public à caractère scientifique et technologique (EPST), créé le 1^{er} janvier 2020 par la fusion de l'Irstea et de l'Inra. C'est un centre appartenant à un réseau de recherche développé sur tout le territoire français. Il se découpe en 14 départements, dont le département AQUA axé sur les écosystèmes aquatiques.

Anciennement Irstea, l'INRAE de Cestas Gazinet est un site occupé par deux unités de recherche, parmi lesquelles se trouve l'unité EABX (Ecosystèmes Aquatiques et changements Globaux) qui fait partie du département AQUA. Au sein de cette unité, l'équipe ECOVEA (Ecologie des Communautés Végétales Aquatiques et impact des pressions multiples) s'intéresse à la biodiversité et au fonctionnement des communautés végétales en plan d'eau et cours d'eau (Lambert 2020). C'est au sein de cette équipe de recherche que s'est déroulé ce 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 spatiale et temporelle 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.

Ce stage est donc piloté et dirigé par Juliette Rosebery Directrice de Recherche et Sylvia Moreira Ingénieur d'Etudes, de l'équipe ECOVEA, dans le cadre du projet BECAME (Bioactive Compounds in Aquatic invasive Macrophytes : Ecological insights and potential industrial applications). 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.

Table des matières

Remerciements	ii
Présentation de la structure d'accueil	iii
Liste des figures.....	v
Liste des tableaux	vi
Liste des abréviations	vi
Introduction	1
I- Etat de l'art	2
I-A) Les espèces de macrophytes envahissantes dans le lac de Parentis-Biscarrosse	2
I-B) La problématique des blooms de cyanobactéries dans le lac de Parentis-Biscarrosse	3
I-C) La gestion des blooms de cyanobactéries : une voie de valorisation des extraits d'EEE permise par l'allélopathie ?	5
I-D) Approches méthodologiques : mise en évidence des interactions allélopathiques entre macrophytes et cyanobactéries	6
II- Matériels et méthodes	7
II-A) Matériels biologiques	7
II-B) Suivi et caractérisation des cyanobactéries et de leur croissance	8
II-B. a) Paramètres photosynthétiques	8
II-B. b) Densité cellulaire	9
II-B.c) Dosage d'un type de cyanotoxines : les microcystines (MCs)	10
II-C) Expériences mises en œuvre.....	10
II-C. a) Plan d'expérience.....	11
II-C. b) Expériences préliminaires en microplaque	11
II-C. c) Expériences en ballon	12
II-D) Analyse des données expérimentales	13
III- Résultats	13
III-A) Expériences préliminaires en microplaque	13
III-A. a) Détermination des concentrations actives en extrait de macrophytes sur la concentration en chlorophylle des cyanobactéries (microplaque)	13
III-A. b) Relation entre la densité cellulaire et la concentration en chlorophylle des cyanobactéries	15
III-B) Expériences en ballon	17
III-B. a) Détermination des concentrations actives d'extrait (<i>L.major</i>) sur la concentration en chlorophylle des cyanobactéries (ballon)	17
III-B. b) Détermination des concentrations actives d'extrait (<i>L.major</i>) sur le rendement photosynthétique des cyanobactéries (ballon)	18
III-B. c) Détermination des concentrations actives d'extrait (<i>L.major</i>) sur la production de cyanotoxines (MCs) par les cyanobactéries (ballon).....	19

IV- Discussion	20
IV-A) Mise en perspective des résultats obtenus avec la littérature existante	20
IV-B) Effet de l'atténuation lumineuse sur les performances photosynthétiques des cyanobactéries	21
IV-C) Effet des composés allélopathiques sur les cyanobactéries à l'échelle cellulaire	23
IV-D) Limites expérimentales et perspectives	24
Conclusion	25
Bibliographie	26
Annexes	32
Quatrième de couverture : Résumé.....	1

Liste des figures

Figure 1 : Photographie d'une microplaque 24 puits et schéma du plan d'expérience en microplaque : PMC 679.10 <i>M.aeruginosa</i> mise en contact avec différentes concentrations d'extrait de macrophytes	11
Figure 2 : Photographie de l'expérience en ballon dans l'enceinte thermorégulée.	13
Figure 3 : Concentration en chlorophylle corrigée ($\mu\text{g/L}$) de PMC 679.10 <i>Microcystis aeruginosa</i> mesurée par PhytoPAM en fonction du temps et des concentrations d'extrait de <i>L.major</i> (E4) - Expérience en microplaque.	14
Figure 4 : Relation linéaire entre densité cellulaire ($\text{cell}/\mu\text{L}$) et concentration en chlorophylle ($\mu\text{g/L}$) de PMC 679.10 <i>Microcystis aeruginosa</i> observée au microscope droit à contraste de phase et mesurée au PhytoPAM sur 6 échantillons (respectivement).	15
Figure 5 : Rendement photosynthétique de PMC 679.10 <i>Microcystis aeruginosa</i> mesuré au PhytoPAM en fonction du temps et par concentration d'extrait de <i>L.major</i> optimisé en rendement (E4) – Expérience en microplaque.	16
Figure 6 : Concentration en chlorophylle corrigée de PMC 679.10 <i>Microcystis aeruginosa</i> mesurée au PhytoPAM en fonction du temps et par concentration en extrait ajouté en <i>L.major</i> (E2) - Expérience en ballon..	17
Figure 7 : Rendement photosynthétique PMC 679.10 <i>Microcystis aeruginosa</i> mesuré au PhytoPAM en fonction du temps et par concentration en extrait <i>L.major</i> optimisé en concentration (E2)– Expérience en ballon.	18
Figure 8 : Concentration en chlorophylle ($\mu\text{g/L}$) de la souche PMC 679.10 <i>Microcystis aeruginosa</i> en fonction du temps et du rayonnement lumineux incident, mesurés au PhytoPAM – Expérience en microplaque	21
Figure 9 : Rendement photosynthétique de la souche PMC 679.10 <i>Microcystis aeruginosa</i> en fonction du temps et du rayonnement lumineux incident reçu dans les puits, mesuré au PhytoPAM – Expérience en microplaque	22

Liste des tableaux

Tableau 1 : Concentrations des principaux composés allélopathiques contenus dans les différents extraits de concentration de 300g/L de matière première de <i>Lagarosiphon major</i> et de <i>Egeria densa</i> , respectivement prélevés dans le lac de Parentis-Biscarrosse, entre 2018 et 2019.....	7
Tableau 2 : Concentration en MCs (en µg/L) dosée par la méthode de laboratoire ELISA pour les modalités de l'expérience en ballon. L.....	19

Liste des abréviations

L.major : *Lagarosiphon major*

E.densa : *Egeria densa*

M.aeruginosa : *Microcystis aeruginosa*

PSII : photosystème 2

MCs : Microcystines

UICN : Union Internationale pour la Conservation de la Nature

EEE : espèces exotiques envahissantes

E1 : Extrait 1 (*Egeria densa* optimisé en concentration)

E2 : Extrait 2 (*Lagarosiphon major* optimisé en concentration)

E3 : Extrait 3 (*Egeria densa* optimisé en rendement)

E4 : Extrait 4 (*Lagarosiphon major* optimisé en rendement)

MP : matière première

h. : heure(s)

PAM : Pulse Amplitude Modulation

Introduction

Les écosystèmes aquatiques sont soumis à de nombreuses pressions. Parmi elles, les espèces exotiques envahissantes (EEE) représentent un enjeu pour la stabilité des communautés végétales et animales (Bertrin *et al.* 2012). Si une large variété d'écosystèmes est touchée par cette problématique, nous focalisons ce travail sur un grand lac landais du littoral aquitain : le lac de Parentis-Biscarrosse, situé dans sud-ouest de la France (40). Il fait l'objet d'activités nautiques de pêche et de loisirs, qui sont soumises à des contraintes dues à la présence de macrophytes exotiques envahissantes comme *Egeria densa*, Planch, 1849 et *Lagarosiphon major* (Ridl) Moss 1928 (Ribaud et al. 2015). Ces plantes ont un impact non négligeable sur les cycles biogéochimiques et la biodiversité lacustre (Tamayo & Olden 2014). Afin de réguler ces populations de macrophytes, une gestion est mise en place par les acteurs locaux (arrachage des macrophytes) mais elle reste coûteuse et les biomasses récoltées ne sont pas valorisées (Fernandez & Zuazo 2013). En plus de ces problématiques, des phénomènes de blooms de cyanobactéries toxigènes s'ajoutent de manière saisonnière, provoquant des risques sanitaires et économiques supplémentaires. Leur fréquence est amenée à croître avec le changement climatique et l'eutrophisation des plans d'eau.

Cette double problématique créée par les blooms de cyanobactéries et la prolifération d'EEE macrophytiques pourrait trouver une voie de résolution dans les relations allélopathiques existantes entre cyanobactéries et macrophytes. Ces producteurs primaires de l'écosystème lacustre, essentiels et structurants (Bertrin 2018), interagiraient entre eux via la biosynthèse de composés chimiques, avec une inhibition rapportée des communautés de cyanobactéries par les composés allélopathiques macrophytiques (Kurashov *et al.* 2021). Cette solution potentielle permettrait de répondre aux enjeux écologiques, économiques et sanitaires énoncés précédemment, tout en apportant une voie de valorisation des produits de la gestion des macrophytes invasives.

La problématique de ce travail est donc de caractériser l'interaction entre deux EEE, *E.densa* et *L.major*, et la cyanobactérie toxigène *Microcystis aeruginosa*, toutes trois présentes sur le lac de Parentis-Biscarrosse, via une approche allélopathique. Il s'agit de déterminer les impacts des biomolécules produites par ces macrophytes sur la croissance des cyanobactéries et leur toxicité. Pour répondre à cette problématique, nous nous appuyons sur un état de l'art (I), avant de décrire les méthodes mises en place (II). Dans une troisième partie nous détaillerons les résultats obtenus à l'issue des expériences menées (III), avant d'apporter des éléments d'interprétation et de discussion (IV) autour de ceux-ci.

I- Etat de l'art

I-A) Les espèces de macrophytes envahissantes dans le lac de Parentis-Biscarrosse

Les espèces exotiques envahissantes (EEE) sont l'un des principaux facteurs d'érosion de biodiversité mondiale et, de ce fait, représentent un enjeu écologique majeur (Sarat *et al.* 2015). L'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) définit une EEE comme étant « une espèce introduite par l'homme en dehors de son aire de répartition naturelle, volontairement ou non, et dont l'implantation et la propagation menacent les écosystèmes, les habitats ou les espèces indigènes avec des conséquences écologiques et/ou économiques, et/ou sanitaires négatives. » (Thévenot 2013). Les problématiques associées à ces espèces concernent tous types d'écosystèmes (terrestres et aquatiques) à travers le monde (De Boutray 2017). Les lacs et les étangs littoraux aquitains ne font pas exception. Le lac de Parentis Biscarrosse (*Annexe I*) en particulier, est un lac de 3600 hectares classé zone Natura 2000 « zones humides de l'arrière-dune des pays du Born et du Buch ». C'est l'un des plus grands lacs landais avec un volume total de 250 millions de m³, sur lequel des activités nautiques, de pêche et de chasse sont bien développées (Pickhan & Dutartre 2016). Ces activités sont fortement perturbées par les EEE présentes sur ce lac.

En effet, de nombreuses espèces animales et végétales, dont certains macrophytes, sont aujourd'hui classées comme EEE, et entraînent d'importantes problématiques de gestion. (Fédération des conservatoires d'espaces naturels (France) 2010). C'est le cas de deux espèces de macrophytes : l'Elodée dense (*Egeria densa (E.densa)*) et le Grand Lagarosiphon (*Lagarosiphon major (L.major)*). Ces deux espèces, appartenant à la famille des *Hydrocharitacées*, sont invasives en France métropolitaine et dans les plans d'eau du Sud-Ouest (Bertrin *et al.* 2012; Haury *et al.* 2015). Ce sont des hydrophytes enracinées entièrement immergées se développant préférentiellement dans des eaux stagnantes et à faible courant. Elles ont été importées en France métropolitaine au début du XX^e siècle (Caffrey *et al.* 2011), et sont présentes dans le lac de Parentis-Biscarrosse depuis 1976 pour *L.major*, progressivement remplacée par l'Elodée, observée depuis les années 1990 (Ribaud *et al.* 2015). Leur processus de colonisation est semblable et se fait par reproduction asexuée, via la fragmentation des tiges principales. Des herbiers denses sont ainsi formés et peuvent rapidement recouvrir de grandes surfaces (Eau France 2013). Cette prolifération n'est pas sans conséquence, puisqu'elle entraîne une augmentation de la sédimentation et du comblement des plans d'eau, ainsi que des perturbations physico-chimiques (cycle des nutriments, impacts sur l'oxygénation et le pH, eutrophisation etc.). Une régression des macrophytes indigènes est également rapportée, ainsi

qu'une diminution et une homogénéisation de la biodiversité (Pickhan & Dutartre 2016). L'impact de la prolifération des macrophytes exotiques à caractère invasif concerne l'ensemble des communautés (ichtyofaune, phytoplancton, macroinvertébrés, macrophytes) et donc l'équilibre de l'écosystème. Les conséquences associées ne concernent pas seulement l'écologie puisqu'elles impactent aussi l'économie locale en créant des nuisances pour certains usages telles que les activités récréatives et nautiques (loisirs, pêche, etc.).

En outre, les problématiques associées au développement de ces deux espèces ont induit la mise en place d'une gestion locale spécifique. A ce jour, des campagnes de moissonnage/arrachage sont effectuées annuellement et précédées d'une étape d'échosondage par transects, afin de repérer les zones les plus envahies parmi celles à forts enjeux (Fernandez & Zuazo 2013). Lors de la moisson, la coupe et la récolte sont simultanées afin de ne pas favoriser la fragmentation et donc la colonisation des invasives. La récolte est ensuite brûlée ou épandue en parcelles forestières sèches (substrat sableux), dans l'attente de la dessiccation de la biomasse (Pickhan & Dutartre 2016). Leur régulation demeure coûteuse pour les collectivités locales, sans valorisation de la récolte (Guerreiro *et al.* 2015). Chaque année, des centaines de m³ de biomasse végétale sont ainsi récoltées dans le lac de Parentis-Biscarrosse (environ 500 m³ par an, sur le seul site de Latécoère).

Afin d'optimiser la gestion de ces espèces, de nombreuses études ont été menées afin de mieux comprendre les déterminants de leur succès compétitif. Récemment, les approches innovantes de l'écologie chimique ont permis d'avancer sur ce point : ces plantes invasives seraient en effet capables de synthétiser des biomolécules à même d'influencer de façon allélopathique différentes communautés de leur milieu (Espinosa-Rodríguez *et al.* 2016).

I-B) La problématique des blooms de cyanobactéries dans le lac de Parentis-Biscarrosse

Les cyanobactéries (bactéries photosynthétiques toxigènes), tout comme les EEE sont présentes dans les lacs aquitains. La communauté algale du lac de Parentis-Biscarrosse est surtout dominée par le groupe des cyanobactéries (Laplace-Treyture & Moreira 2016) et notamment par l'espèce coloniale toxigène *Microcystis aeruginosa* (*M.aeruginosa*) présente sur tous les continents (De Boutray 2017). Les cyanobactéries sont présentes tout au long de l'année dans ce lac, avec des biomasses et des proportions variables. La valeur maximale rapportée est d'environ 3 000 µg/L en 2016. Elles dominent fortement la communauté algale en janvier (93 %) et constituent la majeure partie de la communauté dès le mois de juin (près de 50 %) et ce jusqu'en novembre (Moreira *et al.* 2015).

Les vésicules gazeuses de *M.aeruginosa* assurent une bonne flottabilité des cellules qui se positionnent à la surface des plans d'eau. C'est un avantage compétitif car les conditions de luminosité et d'oxygène sont optimales pour la croissance des cyanobactéries et elles peuvent ainsi monopoliser les nutriments disponibles, notamment lors de phénomènes de bloom. Un bloom, ou efflorescence, est une prolifération rapide et intense de cyanobactéries, ayant lieu surtout au printemps ou en été (Sigeo, 2005, Havens 2008). Leur formation impacte la flore et la faune, notamment en raison du manque d'oxygène dissout dans l'eau (hypoxie puis anoxie pour l'ichtyofaune par exemple). De plus, les cyanobactéries sont en mesure de produire des cyanotoxines. Parmi celles-ci, les microcystines (MCs) sont les hépatotoxines les plus fréquemment rencontrées en milieu naturel. Ces heptapeptides monocycliques sont stables dans l'eau, tolérants à des changements physico-chimiques radicaux et sont synthétisés par les cellules en croissance (Carmichael 1992). La production de MCs par *M.aeruginosa* est dépendante de la présence de gènes de biosynthèse. La transcription de ceux-ci, est régulée par des facteurs environnementaux tels que la lumière, la température, les concentrations en azote et phosphore (Schatz *et al.* 2007). Les macrophytes régulent aussi l'expression génétique des bactéries en lien avec la densité de la population : le « quorum sensing » (de Mesquita *et al.* 2019). L'état physiologique des souches toxiques (Chorus 2001), la disponibilité en nutriments pour les cellules et leur taux de croissance sont également déterminants pour les étapes de transcription et traduction menant à la production de MCs (Carrabin 2011). A la suite d'un évènement de bloom, les cyanobactéries sont dégradées via deux processus : la photolyse, et la biodégradation microbienne. C'est à ce moment que les risques associés aux blooms sont les plus importants (Sigeo *et al.* 2007) car les toxines se retrouvent libérées dans le milieu et potentiellement ingérées par d'autres organismes. La lyse des cyanobactéries peut être provoquée (traitement des eaux), mais est le plus souvent naturelle et multifactorielle (sénescence cellulaire). La durée de vie des MCs peut atteindre 30 jours (Kaya *et al.* 2005; Dyble *et al.* 2008), impliquant qu'une concentration élevée peut persister dans le plan d'eau même après la disparition du bloom (Lahti *et al.* 1997). Comme évoqué précédemment, les impacts de ces blooms potentiellement nocifs sont multiples. D'un point de vue écologique d'abord, les blooms limitent l'accès aux nutriments pour les organismes et représentent un risque pour l'ensemble des communautés aquatiques. Ils menacent aussi les activités humaines de loisirs (Sigeo 2005), d'irrigation, de pêche et d'agriculture. Cela est dû à leur toxicité qui induit des problèmes de santé humaine et animale (Chen *et al.* 2016). L'ensemble de l'économie locale, bénéficiant normalement des services écosystémiques et de l'exploitation des lacs, est impacté (Islam & Beardall 2017).

I-C) La gestion des blooms de cyanobactéries : une voie de valorisation des extraits d'EEE permise par l'allélopathie ?

Le terme d'allélopathie qualifie une interaction biochimique entre deux êtres vivants, dans laquelle l'un des deux a une action inhibitrice ou stimulatrice sur l'autre. La nature des composés allélopathiques sécrétés par *L. major* et *E. densa*, et l'impact que ceux-ci exercent sur les communautés environnantes sont encore méconnus. Seule une action inhibitrice du plancton via allélopathie par *E.densa* a été mise en évidence à ce jour (Nakai *et al.* 1996; Espinosa-Rodríguez *et al.* 2016). Cependant, il a été largement rapporté que les macrophytes sont en mesure de réduire croissance et biomasse du phytoplancton par allélopathie, en parallèle de mécanismes de limitation des ressources (compétition) (Lahrouni *et al.* 2015). Les macrophytes sont même considérés comme des algicides naturels, bien que la biosynthèse de molécules allélopathiques soit dépendante des conditions locales (pH, température, nutriments) (Legrand *et al.* 2003). D'après Hilt & Gross (2008), les cyanobactéries seraient le groupe phytoplanctonique le plus sensible aux composés allélopathiques sécrétés par les macrophytes. Cette sensibilité, qui varie selon l'espèce, est attribuée à leur nature procaryote (Zhu *et al.* 2021) et aux conditions environnementales d'exposition (biotiques et abiotiques). Kurashov *et al.* (2021) font état d'une relation antagoniste entre macrophytes et cyanobactéries. Or, les stratégies actuelles de suppression des blooms incluent la réduction des nutriments dans le milieu, la régulation des conditions hydrodynamiques, la prédation ou compétition, l'ajout d'algicides chimiques (Zhu *et al.* 2021). Parmi ces techniques, la dernière citée se fait plutôt en dernier recours. En effet, si les algicides artificiels synthétiques sont efficaces pour éradiquer les blooms, ils affectent aussi l'ensemble des organismes aquatiques (Defoirdt *et al.* 2013). Le manque de spécificité de cette méthode n'en fait pas une solution durable pour la gestion des écosystèmes lacustres. La recherche de stratégies efficaces et durables a mené à porter un intérêt particulier au contrôle des blooms algaux par des composés allélopathiques. En effet, de rares effets délétères sur l'environnement ont été observés (Defoirdt *et al.* 2013), en partie car les molécules sont très sélectives, se dégradent naturellement, et les concentrations utilisées demeurent faibles (Nakai *et al.* 1996).

D'après les voies de biosynthèse des macrophytes, les composés allélopathiques inhibiteurs d'algues peuvent être regroupés en 4 catégories : les polyphénols, les composés azotés, les esters et acides gras, et les terpénoïdes. (Zhu *et al.* 2021). Les polyphénols (Zeng *et al.* 2008) et les alcaloïdes sont couramment cités comme efficaces pour le contrôle des blooms de cyanobactéries.

I-D) Approches méthodologiques : mise en évidence des interactions allélopathiques entre macrophytes et cyanobactéries

Les interactions allélopathiques entre macrophytes et cyanobactéries sont étudiées depuis les années 1980. Les études portent sur une large gamme d'espèces de macrophytes et sur les espèces de cyanobactéries les plus fréquemment problématiques, dont *M.aeruginosa*. Selon Mareková *et al.* (2021), les études mettent principalement en évidence une action neutre à inhibitrice. Les techniques d'étude des mécanismes d'allélopathie entre cyanobactéries et macrophytes décrites dans la littérature, sont diverses. Les cyanobactéries sont cultivées en milieu minéral (BG11), (Zhang *et al.* 2013; Omid *et al.* 2019), puis au contact d'extraits de macrophyte (Saito *et al.* 1989; Gross *et al.* 2003; Hu & Hong 2008) à une concentration donnée de l'ordre du g/L (Nakai *et al.* 1996; Mareková *et al.* 2021). Des exsudats de macrophytes sont parfois employés comme décrits par Mohamed (2017), ou encore des co-cultures entre cyanobactéries et macrophytes (Nakai *et al.* 1999; Hu & Hong 2008; Zhang *et al.* 2013). Les concentrations en cyanobactéries lors de l'inoculation varient entre 10^4 et 10^6 cell/mL (Nakai *et al.* 1999; Espinosa-Rodríguez *et al.* 2016; Mareková *et al.* 2021). Les expériences sont menées en microplaques de 500 μ L (Mareková *et al.* 2021) ou dans de plus grands contenants dont les volumes de culture varient de 200 μ L à 1.6L (Nakai *et al.* 1999; Espinosa-Rodríguez *et al.* 2016). Les durées d'exposition couramment fixées varient entre 3 et 15 jours (Li & Li 2012). Afin de rendre compte de l'impact des extraits de macrophytes sur les cyanobactéries, l'état de ces dernières est caractérisé par le suivi de leur croissance. Les méthodes directes comme la détermination du nombre de cellules (Dauta 1982; Li *et al.* 2013; Wu *et al.* 2013; Islam & Beardall 2017; Omid *et al.* 2019), du poids sec (Krüger *et al.* 2012) ou de la biomasse (Dauta 1982; Bouchamma *et al.* 2004; Geada *et al.* 2017; Islam & Beardall 2017), sont largement utilisées, de même que les méthodes indirectes : densité optique (Bouchamma *et al.* 2004; Islam & Beardall 2017), concentrations en pigments (Chen *et al.* 2016) protéines, ATP, carbone, azote etc. Islam et Beardall (2017) ont par exemple utilisé la mesure de la fluorescence spectrale de chlorophylle comme proxy de biomasse, ont mesuré le rendement photosynthétique pour caractériser la photosynthèse et estimé la densité cellulaire par comptage. La toxicité de *M.aeruginosa* est couramment suivie par un test de dosage immuno-enzymatique ELISA (Chen *et al.* 2016; Geada *et al.* 2017). Il semble donc pertinent, dans une première approche, de caractériser les performances photosynthétiques des cyanobactéries afin de mettre en évidence leur réponse face aux composés allélopathiques macrophytiques (concentration en chlorophylle, rendement photosynthétique). La densité cellulaire peut également être un critère pertinent de suivi des populations de cyanobactéries. Par ailleurs, l'utilisation d'extraits de

macrophytes, plutôt qu'une co-culture cyanobactéries-macrophytes, permet de concentrer les composés allélopathiques présents et de mieux caractériser leurs actions.

Ainsi, les biomolécules contenues dans les extraits de plantes invasives constituent un axe à explorer afin de pouvoir répondre au double enjeu que représentent la valorisation des produits issus de la gestion des macrophytes, et la nécessité de contrôler les blooms de cyanobactéries toxigènes.

II- Matériels et méthodes

II-A) Matériels biologiques

Afin d'étudier les interactions entre cyanobactéries et macrophytes, la souche toxique axénique *Microcystis aeruginosa* MNHN-PMC-2010-679 de la collection de cyanobactéries vivantes PMC (Paris Muséum Collection) du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris (France) a été utilisée. Cette souche sera dans la suite du rapport nommée PMC 679.10 *M.aeruginosa* ou « cyanobactéries* ». Elle a été mise au contact de deux extraits végétaux, provenant respectivement de *L.major* et *E.densa*, macrophytes prélevés dans le lac de Parentis-Biscarrosse, entre 2018 et 2019. Le CVA (Centre de Valorisation des Agroressources) a réalisé ces extraits de macrophytes, optimisés en concentration et/ou en rendement de composés allélopathiques, à partir d'une masse de matière première (MP). L'optimisation en concentration correspond à la concentration maximale de la MP et donc celle des biomolécules. La deuxième méthode (rendement), obtenue par des conditions d'extraction différentes, permet d'obtenir une plus grande diversité de composés allélopathiques, extraits à partir de la MP.

Extraits // Composés allélopathiques	Concentration en Saponine	Concentration en Polyphénols	Concentration en Glucose	Concentration en Acide Gallique
(E1) <i>E. densa</i> optimisé en concentration	938	116	7012	101
(E2) <i>L. major</i> optimisé en concentration	2629	849	7012	87,601
(E3) <i>E. densa</i> optimisé en rendement	5831	360	2012	412
(E4) <i>L. major</i> optimisé en rendement	5014	1131	3797	285,249

Tableau 1 : Concentrations des principaux composés allélopathiques contenus dans les différents extraits de concentration de 300g/L de matière première de *Lagarosiphon major* et de *Egeria densa*, respectivement prélevés dans le lac de Parentis-Biscarrosse, entre 2018 et 2019. **Les concentrations sont exprimées en mg/L.**

Le solvant d'extraction choisi est un mélange d'eau et d'éthanol à 66%. La concentration des extraits a été obtenue par évaporation sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (distillation de l'éthanol). L'objectif de ces extractions est d'obtenir des extraits concentrés en composés

allélopathiques (acide gallique, polyphénols etc.) d'une part, et des extraits présentant un panel de composés allélopathiques le plus représentatif des composés biosynthétisés par ces deux macrophytes, d'autre part. Ainsi, les principales biomolécules biosynthétisées par les macrophytes, sont présentes en concentrations décrites dans le **Tableau 1**. Pour les expériences, quatre types d'extraits, de concentration initiale en matière première de 300g/L de macrophyte, ont été utilisés :

- ❖ **E1**: *Egeria densa* optimisé en concentration;
- ❖ **E2**: *Lagarosiphon major* optimisé en concentration;
- ❖ **E3**: *Egeria densa* optimisé en rendement;
- ❖ **E4** : *Lagarosiphon major* optimisé en rendement.

PMC 679.10 *M.aeruginosa* est, quant à elle, maintenue en culture dans des ballons en verre de 100mL, équipés de bouchons en silicone pour éviter la contamination de la monoculture et maintenir les échanges gazeux. Les ballons sont disposés dans une enceinte thermorégulée à une température de 25°C et avec une luminosité de 18 μ mol.s⁻¹.m⁻², de température de couleur de 4000K (lumière naturelle), sur un cycle journalier de 16h de « lumière » et 8h « d'obscurité ». La densité cellulaire au moment des inoculations est de 3.8 \times 10⁵ cellules/mL. La souche est cultivée en milieu minéral BG11 (milieu de culture spécifique des cyanobactéries) commercialisé par la société Sigma-Aldrich ; avec ajustement hebdomadaire du volume de culture pour compenser l'évaporation. L'agitation est faite manuellement avant chaque mesure de l'état des cultures, soit 5 jours sur 7.

II-B) Suivi et caractérisation des cyanobactéries et de leur croissance

II-B. a) Paramètres photosynthétiques

Le suivi des populations de PMC 679.10 *Microcystis aeruginosa* réparties dans différents ballons de culture, est effectué par des mesures de concentration en chlorophylle, et de rendement photosynthétique des cyanobactéries. Elles sont mesurées au PhytoPAM (*Pulse Amplitude Modulation*) qui est un fluorimètre caractérisant les performances photosynthétiques et les états d'adaptation à la lumière du phytoplancton (**Annexe 2**).

Le principe du PhytoPAM est basé sur l'excitation des pigments chlorophylliens par un système de LED. Ces LED génèrent des impulsions de lumière courtes et intenses, sur quatre longueurs d'ondes différentes du spectre UV-visible : 470nm (bleue), 520nm (verte), 645nm (rouge clair), et 665nm (rouge foncé). L'application alternée de ces impulsions de lumière à haute fréquence entraîne l'excitation des pigments chlorophylliens qui donnent ainsi une

« réponse » de fluorescence. L'information de fluorescence reçue aux différentes longueurs d'ondes permet de distinguer les différents groupes phytoplanctoniques. En effet, chaque groupe possède une association particulière de pigments sur les antennes collectrices des thylakoïdes des chloroplastes. Le PhytoPAM est en mesure d'amplifier puis d'associer la fluorescence reçue pour trois groupes algaux : les algues vertes, les cyanobactéries, et le groupe composite des diatomées et dinoflagellés. Dans le cas des cyanobactéries, la fluorescence est particulièrement forte à 645nm en raison de l'absorbance de la phycocyanine et de l'allophycocyanine (Roussille 2009). La composition phytoplanctonique de l'échantillon testé au PhytoPAM peut ainsi être déterminée, de même que la concentration en chlorophylle, exprimée en µg/L. De plus, il est possible de mesurer au PhytoPAM, le rendement photosynthétique d'un échantillon de culture. Ce rendement, qui est un rapport de fluorescences, est obtenu grâce à la méthode d'analyse par flash de saturation. Une courte impulsion (0.2 secondes) de forte intensité de longueur d'onde 655nm est émise : c'est l'« impulsion de saturation ». Elle cause une réduction complète du photosystème II (PSII), induisant une augmentation de l'activité de fluorescence (F) de F=Ft à la valeur maximale (Fm). Le rendement photosynthétique d'énergie de conversion du PSII est alors calculé par l'expression (1) :

$$(1) \frac{Fm-F}{Fm} = \frac{dF}{Fm}$$

La détermination du rendement photosynthétique présente un intérêt dans la caractérisation de la capacité des cyanobactéries à réaliser la photosynthèse à un instant donné, ainsi que de quantifier son rendement. Cette mesure est donc employée ici comme indicateur de l'état des cyanobactéries et complète le suivi de concentration en chlorophylle de l'échantillon, qui elle, est reliée à la croissance des cyanobactéries. 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.

II-B. b) Densité cellulaire

Afin d'établir une correspondance entre la concentration en chlorophylle et la densité cellulaire de la culture de PMC 679.10 *M.aeruginosa*, des comptages en triplicats de cellules sont effectués. Le comptage est fait en parallèle de la mesure journalière de concentration en

chlorophylle. Le microscope utilisé est 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 40 bandes. Afin d'avoir une valeur moyennée du nombre d'individus par unité de volume, les cellules sont comptées sur 10 bandes. La densité cellulaire est ainsi obtenue (Morin *et al.* 2010). La culture a été diluée au préalable, 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).

II-B.c) Dosage d'un type de cyanotoxines : les microcystines (MCs)

Le test ELISA est un test immuno-enzymatique de détection des MCs par compétition indirecte. Il est basé sur la reconnaissance de motifs structuraux de MCs par des anticorps spécifiques et sur une réaction de biotinylation (fixation) (Laplace-Treytore 2017). La toxine (ici MCs), quand elle est présente dans l'échantillon, est immobilisée sur le site de liaison anticorps anti-MCs. Après coloration, l'intensité de la couleur observée est inversée proportionnellement à la concentration en MCs. L'absorbance est donnée par un spectrophotomètre, sur la longueur d'onde de 450nm. La concentration des échantillons en MCs est déterminée grâce à la courbe de calibration basée sur des échantillons standards. Ce test doit être précédé d'une étape de lyse (kit Quick Lyse) qui permet de quantifier les MCs totales c'est-à-dire intra et extra-cellulaires. Les étapes de lyse et du test ELISA ont été réalisées comme décrites par les notices du fabricant.

II-C) Expériences mises en œuvre

Comme détaillé précédemment, l'objectif est de placer la souche de *M.aeruginosa* au contact d'extraits contenant les composés allélopathiques synthétisés par *E.densa* et *L.major*. Des expériences préliminaires non détaillées ici en microplaque ont permis de déterminer la sensibilité du PhytoPAM, d'organiser et de préparer les manipulations (nature du diluant des extraits, volume, test d'évaporation etc.). Elles ont également permis d'étudier la dynamique de croissance de notre souche. En effet, les expériences sont systématiquement réalisées à partir d'un échantillon de la souche *PMC 679.10 M.aeruginosa* lorsque celle-ci est en phase de croissance exponentielle. Ensuite, une première phase de sélection (« screening ») a permis de déterminer la gamme de concentrations des extraits à tester. L'expérience principale est ainsi focalisée autour des concentrations repérées comme actives sur notre souche cyanobactérienne (**Annexe 4**). Afin de mener ces expérimentations, j'ai mis en place en amont un plan d'expérience standard (modalités, réplicats, témoins). Tous les protocoles que j'ai rédigés et

appliqués au cours de ce stage ont pu être intégrés aux protocoles du laboratoire en tant que document qualité pour réutilisation. De plus, toutes les microplaques utilisées dans le cadre de ce stage sont des microplaques 24 puits noires à fond transparent, permettant des lectures de fluorescence. Toutes les expériences sont réalisées dans une enceinte thermorégulée dans les mêmes conditions de culture que celles de la souche PMC 679.10 *M.aeruginosa* (cyanobactéries *) (cf II-A)).

II-C. a) Plan d'expérience

Le protocole expérimental prévoit plusieurs modalités pour chaque expérience :

- ❖ Témoin cyanobactéries* : « *témoin cyanobactéries** » ;
- ❖ Témoin extrait de macrophytes à la concentration x : « *témoin extrait x g/L* » ;
- ❖ Echantillons cyanobactéries* au contact des extraits : « *cyanobactéries* + extrait* » ;
- ❖ Echantillon de calibration du PhytoPAM, soit le milieu de culture BG11, qui constitue le « blanc » et qui est réalisé avant chaque groupe de mesures : « *Zoff* ».

Afin d'obtenir des données statistiques robustes, chaque modalité et chaque mesure sont faites en triplicat. La mise en contact des suspensions de PMC 679.10 *M.aeruginosa* avec un extrait a duré une semaine (96 heures) et les mesures au PhytoPAM, pour chaque expérience (microplaque, ballon) sont journalières. Les différentes concentrations d'extrait sont obtenues par dilutions successives de l'extrait initial (300g/L de MP) dans du BG11. L'ensemble des expérimentations s'est étendu sur une durée de 5 semaines pour les expériences en microplaque et ballon, et de 3 semaines pour les tests et comptages (*Annexe 3*).

II-C. b) Expériences préliminaires en microplaque

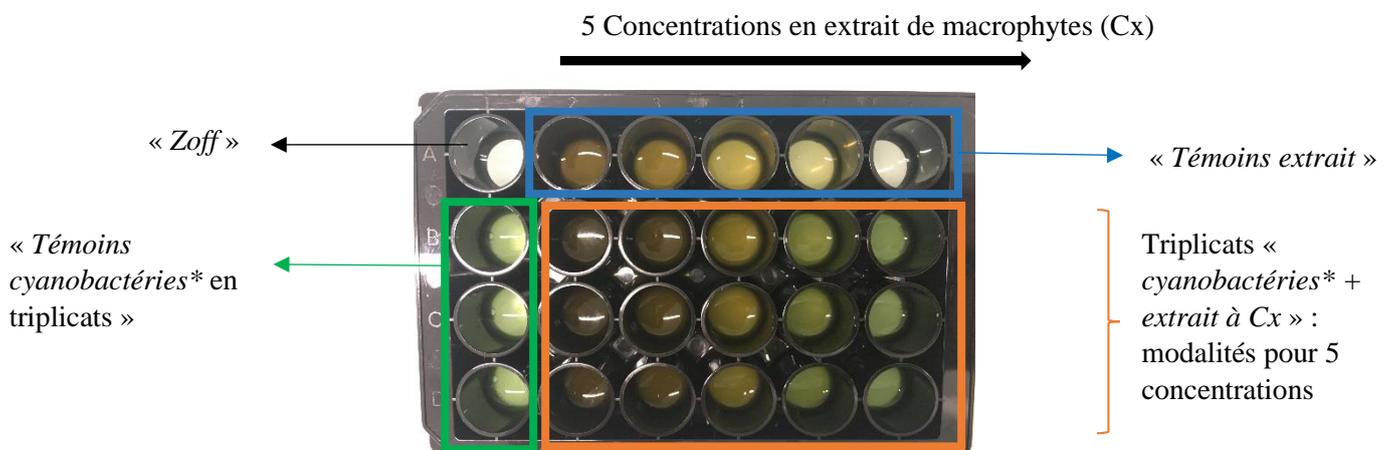


Figure 1 : Photographie d'une microplaque 24 puits et schéma du plan d'expérience en microplaque : PMC 679.10 *M.aeruginosa* mise en contact avec différentes concentrations d'extrait de macrophytes

Des premières expériences de mise en contact de PMC 679.10 *M.aeruginosa* avec les différents extraits de macrophytes sont réalisées en microplaque. Les concentrations 3mg/L, 10mg/L, 30mg/L, 100mg/L, 3g/L, ont d'abord été testées (E1 et E2), puis les concentrations : 1g/L, 10g/L, 25g/L, 50g/L, et 75g/L (E3 et E4). L'exposition dans ces conditions a duré 96 heures (h.), avec des mesures toutes les 24h. dans un volume de micropuits de 1mL : à 0h., 24h., 48h., 72h., et 96h.

Le système de microplaque n'est pas idéal pour caractériser de manière quantitative l'influence de la concentration en extrait de macrophytes sur les cyanobactéries. Cela s'explique par le faible volume contenu dans les puits (1mL), associé à un phénomène d'évaporation significatif concentrant la chlorophylle. Ces conditions sont potentiellement source de carences nutritives pour les cyanobactéries et diffèrent des conditions de culture de la souche mère (contenant et volume). Les cyanobactéries sont sensibles au changement de conditions de culture, ce qui peut engendrer des courbes de croissance différentes. Cependant, cette méthode permet de tester qualitativement et rapidement un nombre important de concentrations et de minimiser les volumes utilisés en extraits et cyanobactéries. Elle est donc pertinente en tant que méthode exploratoire, mais moins précise et plus éloignée des conditions naturelles dans lesquelles cyanobactéries et macrophytes sont amenés à interagir. Une large gamme de concentrations a été testée, afin de déterminer celles qui sont actives et pour lesquelles il est pertinent d'effectuer des expériences sur des volumes plus importants.

II-C. c) Expériences en ballon

La mise en contact de PMC 679.10 *M.aeruginosa* avec les extraits végétaux ciblés a été poursuivie en ballon pour l'étude des effets allélopathiques. Etant donné l'ampleur de l'expérimentation prévue, nous avons focalisé sur un seul extrait, optimisé en concentration, issu de *Lagarosiphon major* (E2). Ce choix a été fait en raison de l'absence de données disponibles dans la littérature pour cette espèce, ainsi que d'une coloration de l'extrait moindre par rapport à celle d'*E.densa* (cf **III-B**). Les six concentrations testées en triplicat sont les suivantes : 10mg/L, 100mg/L, 1g/L, 10g/L, 25g/L et 50g/L, dans un volume de 20mL. La durée de l'expérience pour le total de 28 ballons est de 96 heures. Les mesures de rendement photosynthétique et de concentration en chlorophylle ont donc été effectuées chaque jour à 0h., 24h., 48h., 72h. et 96h. au PhytoPAM. (*Annexe 3*).



Figure 2 : Photographie de l'expérience en ballon dans l'enceinte thermorégulée. La concentration d'extrait (E2) augmente de la gauche (« témoins cyanobactéries* ») vers la droite (« cyanobactéries* + extrait maximal 50g/L ») (Source : Campillo, 2021)

A la fin de l'expérience, 1mL de chaque ballon est prélevé en conditions stériles, puis transféré dans une microplaque. Ils sont congelés dans le but de réaliser ultérieurement des tests ELISA, afin de caractériser la concentration en microcystines (MCs) produites par les cyanobactéries, pour chaque modalité expérimentale.

II-D) Analyse des données expérimentales

Pour chaque expérience, des tests statistiques ANOVA à un facteur, sur RStudio version 4.0.3. Ils ont été effectués, à chaque pas de temps, afin de rendre compte et de valider les potentielles différences significatives entre les différentes modalités expérimentales et le « témoin cyanobactéries* ». Un test post Hoc de Tuckey a été effectué pour le dernier pas de temps (96h.) afin de comparer les modalités 2 à 2. Les concentrations issues des dosages des MCs ont été obtenues par régressions linéaires et leur équation, à partir des échantillons standards fournis dans le kit ELISA.

III- Résultats

III-A) Expériences préliminaires en microplaque

III-A. a) Détermination des concentrations actives en extrait de macrophytes sur la concentration en chlorophylle des cyanobactéries (microplaque)

Pour rappel, les premières concentrations en extraits (E1 et E2) testées l'ont été dans l'intervalle compris entre 3mg/L et 1g/L. A ces concentrations, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les modalités « cyanobactéries* + extrait » et « témoin cyanobactéries* ». Par la suite, les tests ont été reproduits sur les extraits E3 et E4, en

microplaque, mais pour des concentrations plus élevées comprises entre 1g/L et 75g/L. Les résultats obtenus de concentration en chlorophylle des cultures et de rendement photosynthétique, sont présentés dans la **Figure 3** pour l'extrait E4. Les extraits de macrophytes contenant de la chlorophylle, il a été nécessaire de corriger la valeur donnée par le PhytoPAM avec les « *témoins extrait* », de sorte que la concentration représentée ici soit uniquement attribuable à la chlorophylle des cyanobactéries. L'hypothèse émise est donc que le signal de fluorescence de la chlorophylle des cyanobactéries n'est pas perturbé par la fluorescence de la chlorophylle macrophytique, et que les deux sont bien différenciables par le PhytoPAM.

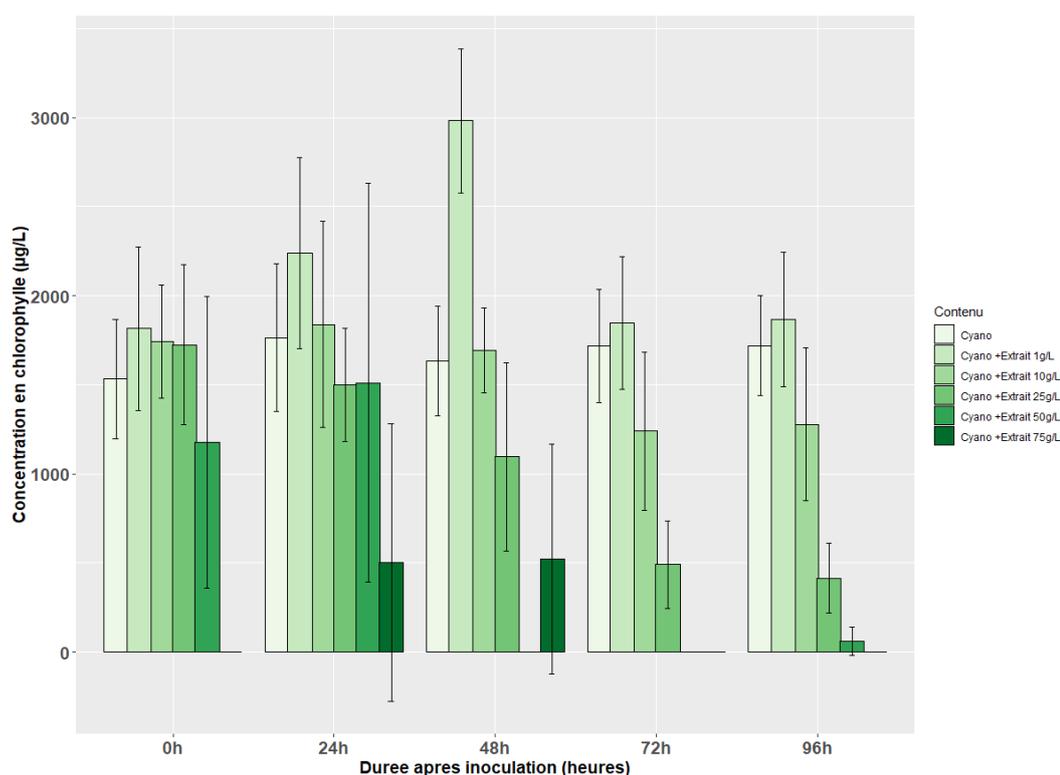


Figure 3 : Concentration en chlorophylle corrigée ($\mu\text{g/L}$) de PMC 679.10 *Microcystis aeruginosa* mesurée par PhytoPAM en fonction du temps et des concentrations d'extrait de *L.major* (E4) - Expérience en microplaque. Les « *témoins extrait* » ne sont pas représentés. Les moyennes des concentrations corrigées négatives ont été ramenées à une valeur nulle.

La concentration en chlorophylle de la modalité « *cyanobactéries** + *extrait* à 75g/L » est toujours significativement différente du « *témoin cyanobactéries** ». Elle est nulle ou inférieure à 500 $\mu\text{g/L}$, pendant toute la durée de l'expérience et ce, dès l'inoculation. La différence est significative pour la modalité « *cyanobactéries** + *extrait* » à 50g/L après 48h., et après 72h. pour celle à 25g/L. Le « *témoin cyanobactéries** » présente une valeur stable de concentration en chlorophylle, comprise entre 1500 $\mu\text{g/L}$ et 1800 $\mu\text{g/L}$. Ces valeurs de concentration correspondent aux valeurs des modalités « *cyanobactéries** + *extrait* » à 1g/L et 10g/L, et ne présentent pas de différence significative par rapport au témoin, quel que soit le pas de temps.

=>Les concentrations en extrait influant sur la concentration en chlorophylle des cyanobactéries sont strictement supérieures à 10g/L, 72h. après inoculation en microplaque.

III-A. b) Relation entre la densité cellulaire et la concentration en chlorophylle des cyanobactéries

Afin d'exprimer les résultats obtenus en densité cellulaire et de caractériser ainsi l'évolution des populations de PMC 679.10 *M.aeruginosa* en nombre de cellules par μL (cell/ μL) dans les micropuits, la qualité de la corrélation potentielle entre la concentration en chlorophylle et la densité cellulaire a été testée.

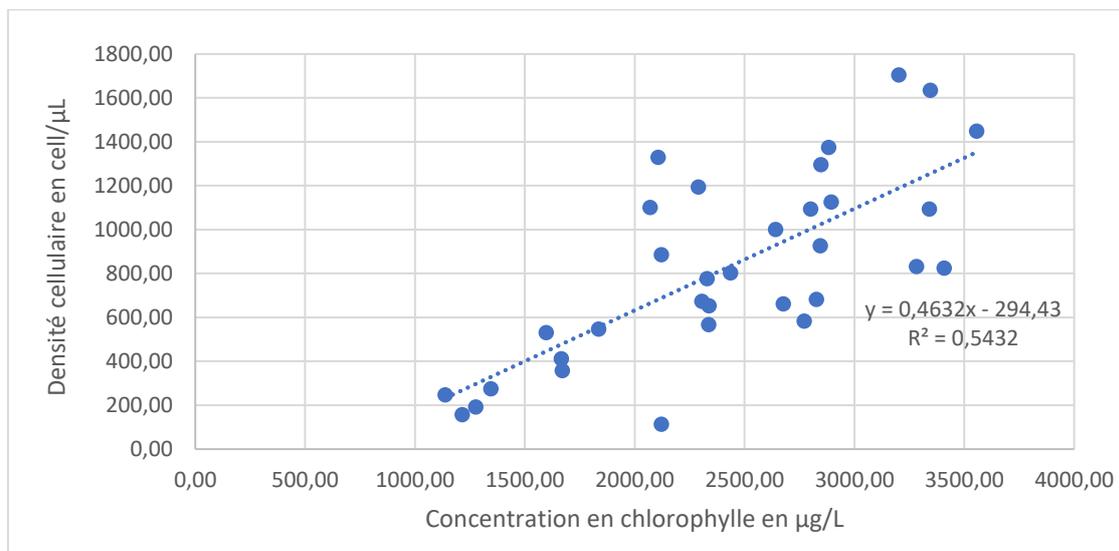


Figure 4 : Relation linéaire entre densité cellulaire (cell/ μL) et concentration en chlorophylle ($\mu\text{g/L}$) de PMC 679.10 *Microcystis aeruginosa* observée au microscope droit à contraste de phase et mesurée au PhytoPAM sur 6 échantillons (respectivement). La droite en pointillé est la droite de régression linéaire d'équation : **Densité** = $0.4632 \times \text{CHL} - 294.43$ ($n = 33$ et $p\text{-value} = 1.00e-06 < 0.01$)

Les résultats de cette relation sont à prendre avec précaution du fait d'un coefficient de corrélation bon mais insuffisant : $R^2 = 0.5432$ ($p\text{-value} < 1.00e-06$). La relation rend compte d'une hétérogénéité entre états de culture de cyanobactéries qui évoluent dans le temps. Comme cet état physiologique n'a pas été similaire au cours des différentes expériences, il a été choisi de ne pas extrapoler cette relation à l'ensemble des données obtenues. La croissance des cyanobactéries sera donc exprimée à travers leur concentration de chlorophylle et leur état grâce au rendement photosynthétique mesuré.

III-A. c) Détermination des concentrations actives en extrait de macrophytes sur le rendement photosynthétique des cyanobactéries (microplaque)

Les « témoins extrait » (non représentés sur la **Figure 5**) ne présentent aucun signal de rendement. Tout signal est donc attribuable aux cyanobactéries.

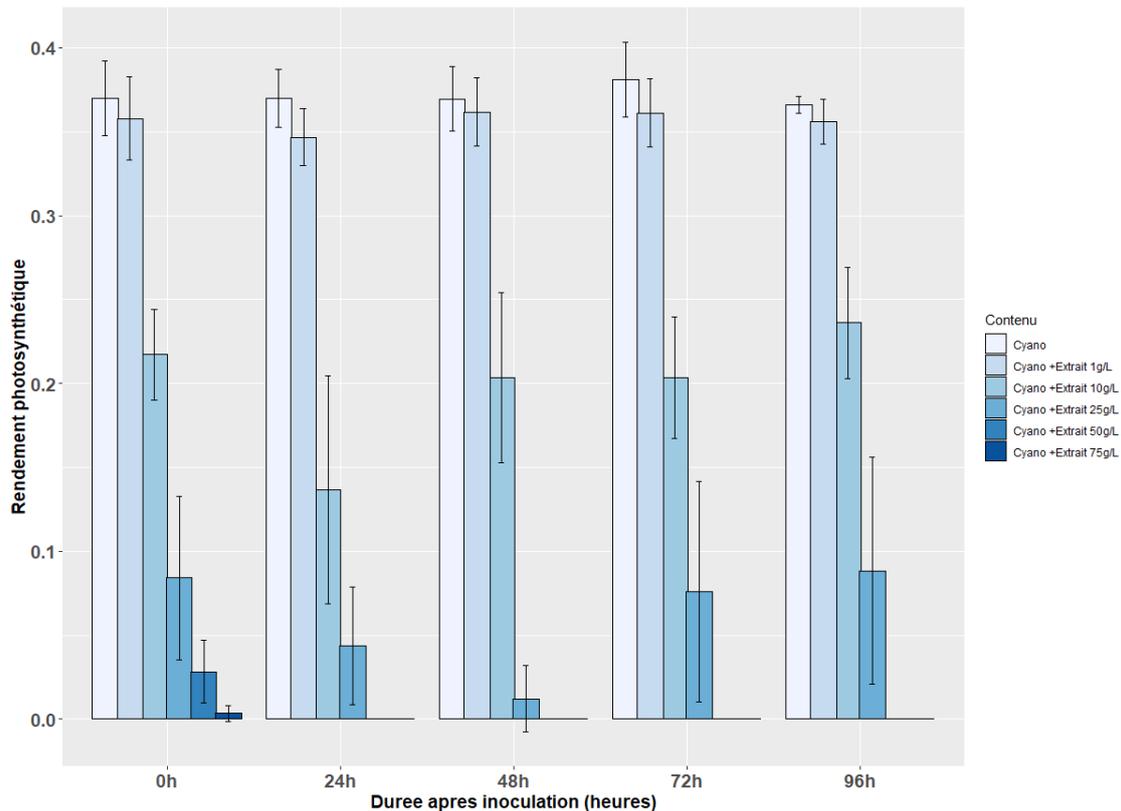


Figure 5 : Rendement photosynthétique de PMC 679.10 *Microcystis aeruginosa* mesuré au PhytoPAM en fonction du temps et par concentration d'extrait de *L.major* optimisé en rendement (E4) – Expérience en microplaque. Les « témoins extrait » ne sont pas représentés.

Quelle que soit la durée après inoculation, l'ajout d'extrait à la concentration 1g/L n'induit aucune différence significative avec le « témoin cyanobactéries* ». Une différence significative existe dès l'inoculation, pour des concentrations supérieures ou égales à 10g/L. A 10g/L, le rendement est stable, compris entre 0.14 et 0.24, sur toute la durée de l'expérience, et deux fois inférieur au rendement photosynthétique du « témoin cyanobactéries* » (0.36). Pour des concentrations supérieures à 25g/L, le rendement photosynthétique est nul après 48h.

=>La présence d'extrait induit une baisse du rendement photosynthétique des cyanobactéries pour des concentrations supérieures ou égales à 10g/L. Les concentrations actives autour desquelles il est pertinent de poursuivre les expériences pour des volumes plus importants sont donc comprises entre 1g/L et 50g/L. Il sera également nécessaire de choisir pour la suite, un intervalle de concentrations encadrant les minimales précédemment testées en microplaques (minimum à 10mg/L).

III-B) Expériences en ballon

III-B. a) Détermination des concentrations actives d'extrait (*L.major*) sur la concentration en chlorophylle des cyanobactéries (ballon)

Comme précédemment, il a été nécessaire de corriger les valeurs brutes données par le PhytoPAM avec les « *témoins extrait* », en raison de la présence de chlorophylle dans l'extrait (**Figure 6**).

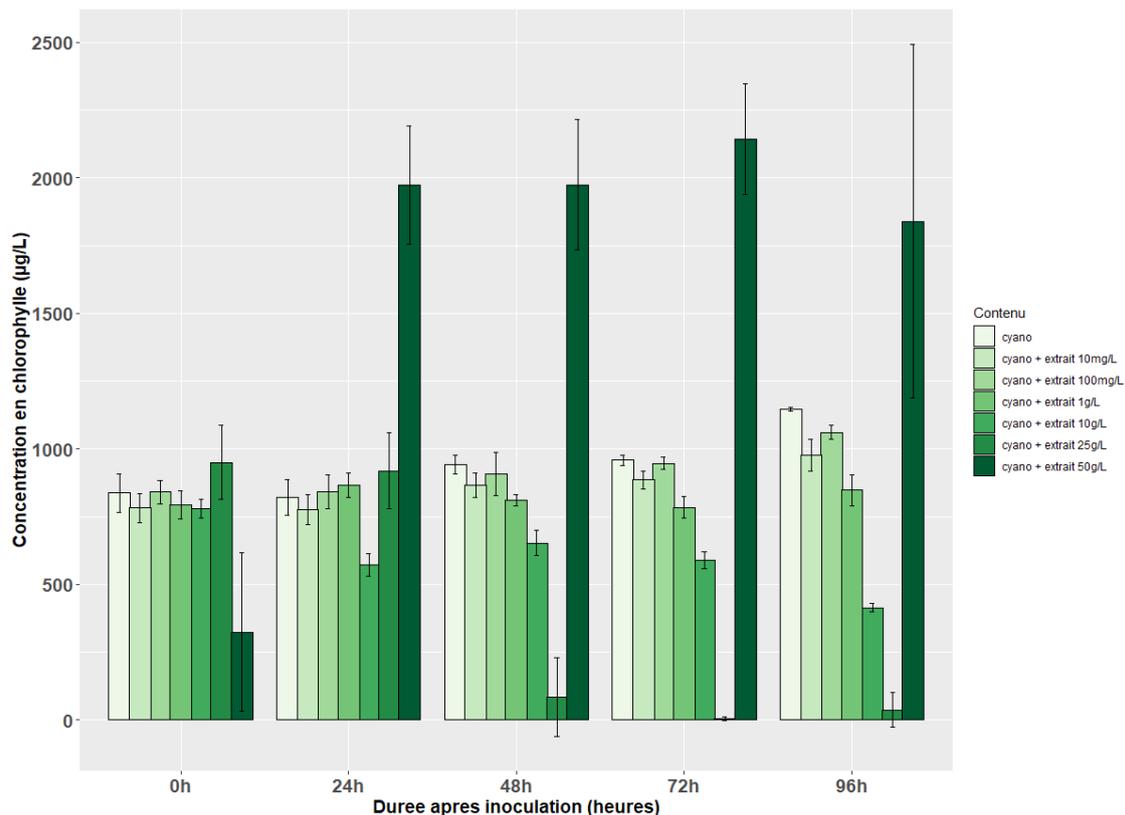


Figure 6: Concentration en chlorophylle corrigée de PMC 679.10 *Microcystis aeruginosa* mesurée au PhytoPAM en fonction du temps et par concentration en extrait ajouté en *L.major* (E2) - Expérience en ballon. Les « *témoins extrait* » ne sont pas représentés. Les données sont corrigées par soustraction des modalités « cyanobactéries+ extrait » par le « *témoin extrait* » à la concentration correspondante.

Il existe une différence significative entre le « *témoin cyanobactéries** » et les modalités « *cyanobactéries* + extrait* » de concentration comprise entre 1g/L et 25g/L après 48h. Elle est nulle après 48h. pour la modalité à 25g/L. De plus, la modalité à 50g/L est deux fois supérieure au « *témoin cyanobactéries** » après 24h. (chlorophylle stable autour de 2000µg/L). Pour des modalités « *cyanobactéries + extrait* » aux concentrations strictement inférieures à 1g/L, la différence observée avec le « *témoin cyanobactéries** » n'est pas significative. La moyenne de la concentration en chlorophylle pour ces modalités est de 900µg/L. A mesure que la durée d'expérience augmente, la concentration en chlorophylle diminue pour les modalités comprises entre 1g/L et 25g/L d'extrait, d'autant plus que celle-ci est importante.

=>Ainsi, la présence d'extrait E2 aux concentrations supérieures ou égales à 10g/L, induit une diminution de la concentration en chlorophylle des cyanobactéries dans les 48h. suivant l'inoculation. La concentration de 50g/L d'extrait fait exception car une augmentation de la concentration en chlorophylle est observée.

III-B. b) Détermination des concentrations actives d'extrait (*L.major*) sur le rendement photosynthétique des cyanobactéries (ballon)

Comme précédemment, les « *témoins extrait* » présentent des valeurs de rendement nulles : le signal représenté est celui attribuable au rendement photosynthétique des cyanobactéries.

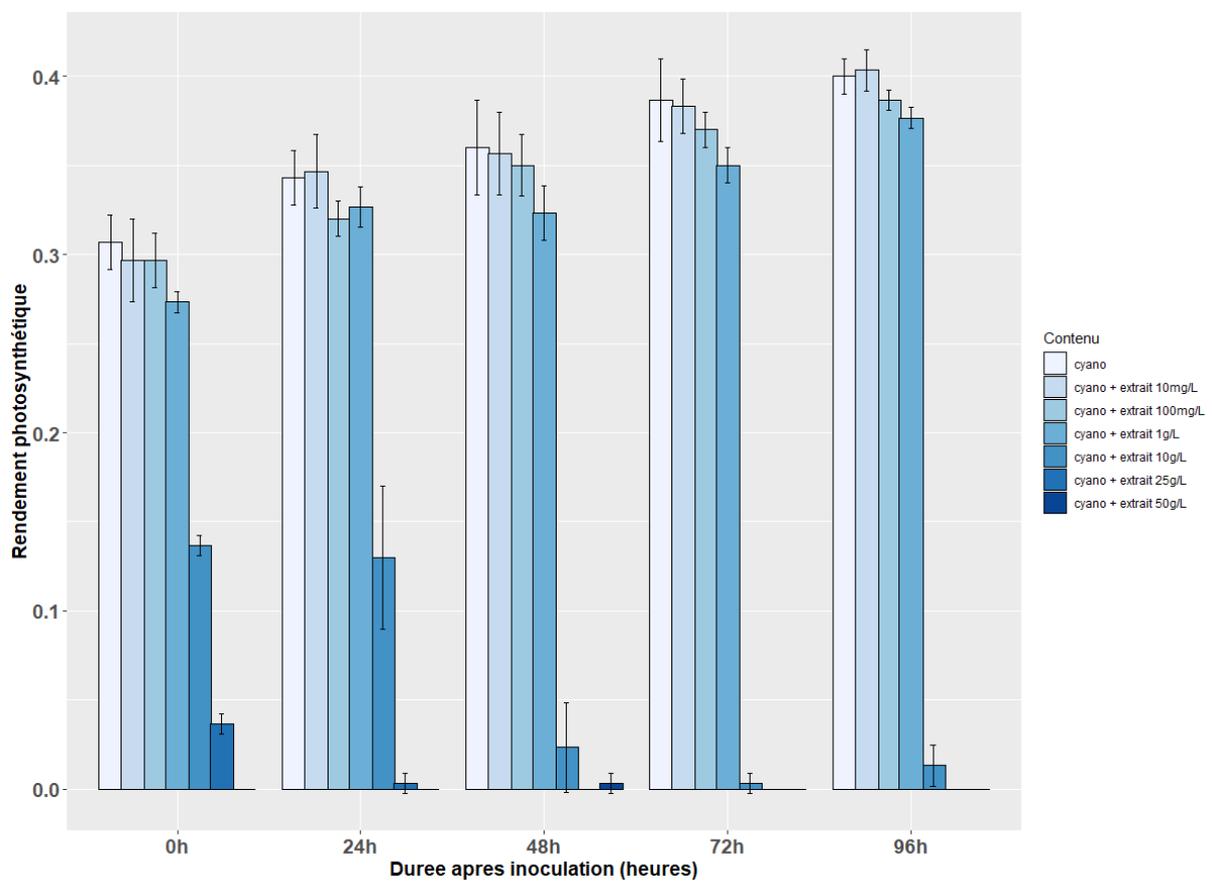


Figure 7 : Rendement photosynthétique *PMC 679.10 Microcystis aeruginosa* mesuré au *PhytoPAM* en fonction du temps et par concentration en extrait *L.major* optimisé en concentration (E2)– Expérience en ballon. Les « *témoins extrait* » ne sont pas représentés.

Dès l'inoculation, il existe une différence significative entre le « *témoin cyanobactéries** » et les modalités « *cyanobactéries*+ extrait* » pour les concentrations strictement supérieures à 1g/L de E2. La valeur de rendement photosynthétique de *M.aeruginosa* est nulle pour les modalités de concentration supérieure ou égale à 10g/L après 48h. Pour le « *témoin cyanobactéries** » comme pour les modalités à 10mg/L et 100mg/L

d'extrait, les valeurs de rendement sont croissantes dans le temps : entre 0.30 à 0h. et 0.40 à 96h. Cela indique que la souche PMC 679.10 *M.aeruginosa* n'est pas en carence de nutriments, phénomène potentiellement limitant pour la photosynthèse et pouvant interférer avec les résultats de l'expérience. Les résultats obtenus dans les expériences en microplaques sont donc à modérer, du fait des conditions de culture non optimales pour les cyanobactéries. Un effet combiné de carences nutritives et de la présence d'extrait est possible. Jusqu'à 24h., les valeurs de rendement pour la modalité à 10g/L sont deux fois inférieures à celle du témoin (0,15 en moyenne).

=>Ainsi, la présence d'extrait E2 aux concentrations supérieures ou égales à 10g/L induit une inhibition complète du rendement photosynthétique des cyanobactéries au-delà de 48h. après inoculation. Cette inhibition est partielle mais existe dès l'inoculation.

III-B. c) Détermination des concentrations actives d'extrait (*L.major*) sur la production de cyanotoxines (MCs) par les cyanobactéries (ballon)

Contenu de l'échantillon	Concentration médiane en MCs (en µg/L)	Concentration en MCs corrigée (échantillon – témoin) en µg/L
Témoin extrait 50g/L	6.24	
Témoin extrait 25g/L	5.40	
Témoin extrait 10g/L	2.72	
Témoin extrait 1g/L	0.50	
Témoin extrait 100mg/L	0.00	
Témoin extrait 10mg/L	0.16	
Cyano + extrait 50g/L	8.77	2.53
Cyano + extrait 25g/L	2.72	0
Cyano + extrait 10g/L	0.16	0
Cyano + extrait 1g/L	8.77	8.27
Cyano + extrait 100mg/L	8.79	8.79
Cyano + extrait 10mg/L	8.83	8.67
Témoin cyano	8.77	

Tableau 2: Concentration en MCs (en µg/L) dosée par la méthode de laboratoire ELISA pour les modalités de l'expérience en ballon. Les témoins extrait sont représentés en bleu ; le témoin cyanobactéries* est représenté en vert ; les faibles valeurs de concentrations corrigées en MCs sont représentées en rouge. La concentration en MCs est déterminée grâce à la courbe de calibration basée sur des échantillons standards

Les résultats de dosage des microcystines (MCs) par test ELISA indiquent plusieurs éléments (**Tableau 2**). Tout d'abord, le « témoin extraits » à 50g/L contient des MCs en concentration proche de celle du « témoin cyanobactéries* », autour de 8µg/L. Cela indique la

présence d'une contamination de MCs. Une concentration en MCs décroissante est observée à mesure que la dilution en extrait augmente (valeurs en **bleu** dans le tableau). Les concentrations en extrait décroissantes ayant été obtenues par dilution d'une solution mère d'extrait (concentration initiale de 300g/L), ces résultats indiquent que la contamination en MCs n'a pas eu lieu au cours du test ELISA, mais peut-être lors du prélèvement des macrophytes en milieu naturel (présence de *M.aeruginosa* dans le lac de Parentis-Biscarrosse). De ce fait, il faut prendre en compte cette contamination initiale, et la corriger (3^{ème} colonne du **Tableau 2**). Pour les modalités « *cyanobactéries** + *extrait* » aux concentrations 10g/L et 25g/L il n'y a pas la toxine produite par la souche PMC 679.10 *M.aeruginosa*. L'absence de MCs est probable pour la modalité à 50g/L : la concentration de 2µg/L s'explique alors par l'existence d'un aléa méthodologique. Cette inhibition au-delà de 10g/L d'extrait (valeurs en **rouge** dans le tableau), indiquerait une inhibition de la synthèse des MCs par les biomolécules présentes dans les extraits. En revanche, pour les modalités de concentration en extrait inférieures ou égales à 1g/L, les MCs sont présentes en concentration de 8µg/L, similaire à celle du « *témoin cyanobactéries** » (valeur en **vert** dans le tableau), en l'absence de contact avec l'extrait.

IV- Discussion

IV-A) Mise en perspective des résultats obtenus avec la littérature existante

Comme exprimé dans l'état de l'art (I), il existe une grande variété de méthodes d'étude de l'allélopathie entre cyanobactéries et macrophytes. De fait, les résultats obtenus sont exprimés à travers différentes mesures, et unités. De nombreuses espèces de macrophytes sont rapportées comme inhibitrices de la croissance de *M.aeruginosa* (EC₅₀). *E.densa* inhibe l'espèce à partir d'une concentration de 7.2 g/L de poids sec. Cette concentration est proche des résultats obtenus dans cette étude (10g/L cf **Annexe 4**), puisque les expériences en microplaques ont également été menées pour *E.densa* sur *M.aeruginosa*. D'autres espèces de macrophytes inhibent cette cyanobactérie : concentration de 0.7 g/L à 1g/L pour l'espèce *Myriophyllum spicatum* (Nakai *et al.* 1996) ; contre 2.5 à 25g/L pour *Chara globularis* au bout de 72h. (Mareková *et al.* 2021). Si les concentrations actives sont de l'ordre du g/L de poids sec de macrophyte, elles sont plutôt de l'ordre du mg/L lorsqu'il s'agit de concentrations de composés actifs allélopathiques (Zhu *et al.* 2021), qui se dégradent rapidement (courtes durées d'expérience). Saito *et al.* (1989) ont observé une inhibition par l'acide gallique (acide phénolique également présent dans nos extraits) pour une concentration comprise entre 1.6 et 4.2g/L de carbone organique total de l'extrait de macrophyte. Ces données coïncident avec les résultats obtenus dans nos expériences : les résultats obtenus à l'issue des expériences permettent de déterminer des

concentrations actives d'extrait de macrophytes de l'ordre du g/L de poids sec (entre 1g/L et 10g/L dans nos expériences et 7.2g/L de *E.densa* dans la littérature). Dans ces extraits, les concentrations en composés allélopathiques ont une concentration de l'ordre du mg/L (**Tableau I**). Certaines publications ont étudié l'effet des macrophytes en milieu naturel et estiment que des effets allélopathiques sont observés pour des densités de biomasse de macrophytes comprises entre 80 et 800g de poids sec par m² pour des lacs de 1m de profondeur (Nakai *et al.* 1999; Hilt & Nicklisch 2002; Mohamed & Shehri 2010). Ces densités de biomasse de *E.densa* et *L.major* sont être observées dans les lacs aquitains (Ribaud *et al.* 2015).

IV-B) Effet de l'atténuation lumineuse sur les performances photosynthétiques des cyanobactéries

L'extrait de *L.major* optimisé en concentration (E2) impacte les performances photosynthétiques de la souche PMC 679.10 *M.aeruginosa* lorsque sa concentration est supérieure ou égale à 10g/L : la concentration en chlorophylle et le rendement photosynthétique des cyanobactéries sont diminués au bout de 48h. de contact. Au-delà de 10g/L d'extrait, le rendement de la photosynthèse est nul et la concentration en chlorophylle est fortement réduite après un jour. La diminution du rendement photosynthétique dès l'inoculation peut laisser supposer que le phénomène de réponse est dû à un mécanisme physique attribuable à la couleur de l'extrait. En effet, plus la concentration en extrait est importante et plus le mélange est coloré (**Figures 1 et 2**). L'atténuation de la lumière disponible pour les *cyanobactéries** pourrait donc expliquer la diminution du rendement photosynthétique. Des tests d'atténuation de la lumière ont donc été effectués afin de confirmer ou infirmer l'hypothèse d'atténuation lumineuse.

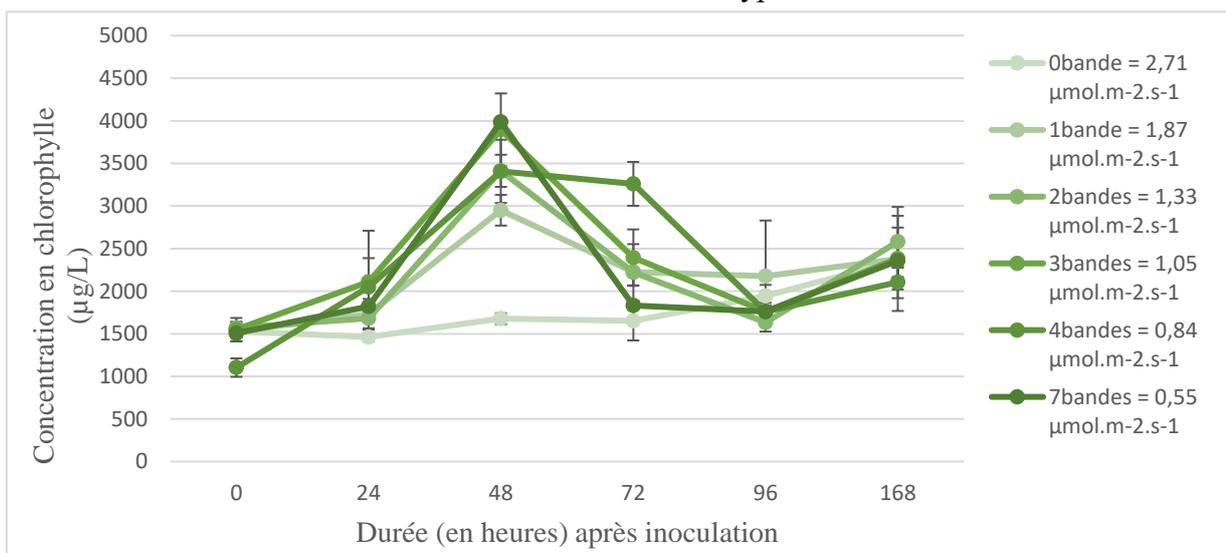


Figure 8 : Concentration en chlorophylle ($\mu\text{g/L}$) de la souche PMC 679.10 *Microcystis aeruginosa* en fonction du temps et du rayonnement lumineux incident, mesurés au PhytoPAM – Expérience en microplaque

La diminution de la lumière incidente a été reproduite par superposition de bandes de papier calque incolore au-dessus des puits. Les résultats sur la concentration en chlorophylle indiquent une variation de la concentration en fonction du temps et de la lumière reçue, par la souche PMC 679.10 *M.aeruginosa* (**Figure 8**). De 0 à 48h. après inoculation, la concentration en chlorophylle augmente pour des faibles intensités lumineuses reçues, puis diminue après 48h. Au contraire, pour les intensités lumineuses non atténuées et reçues par les cyanobactéries, la concentration en chlorophylle est stable, puis croissante après 72h. L'augmentation plus progressive après 96h. de test peut, quant à elle, traduire une évaporation du volume initial des puits (1mL), ce qui a pour effet de concentrer la chlorophylle.

En revanche, la diminution de la lumière incidente dans les puits a permis de mettre en évidence une absence de corrélation entre le rendement photosynthétique et l'intensité lumineuse incidente sous les puits (lumière reçue par les cyanobactéries*), comme suggère la **Figure 9**.

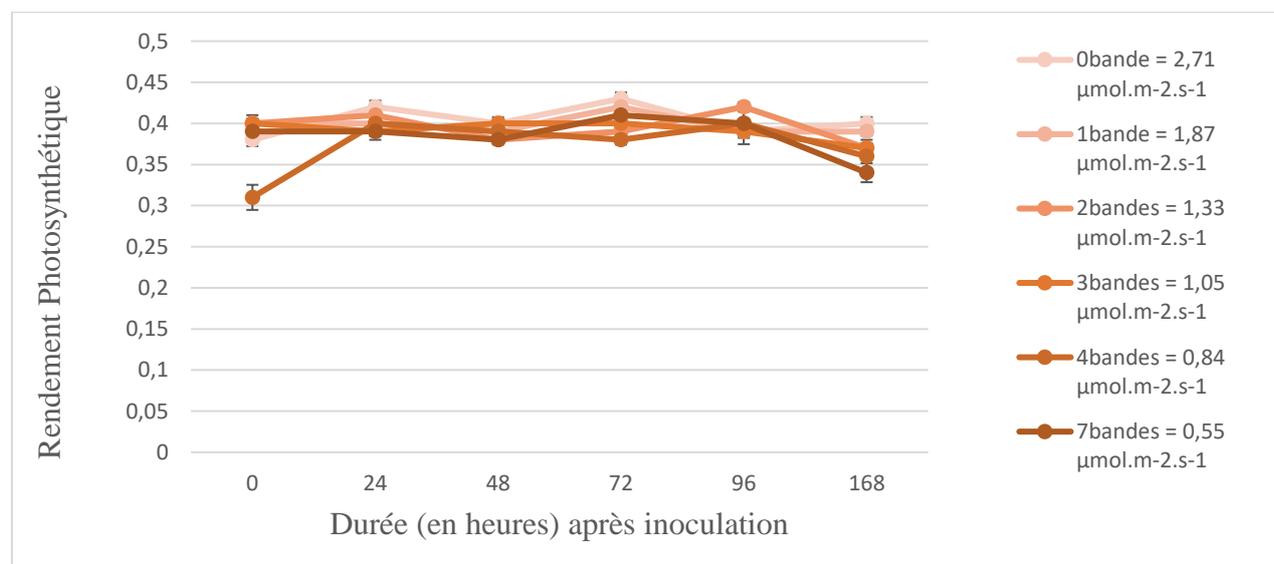


Figure 9 : Rendement photosynthétique de la souche PMC 679.10 *Microcystis aeruginosa* en fonction du temps et du rayonnement lumineux incident reçu dans les puits, mesuré au PhytoPAM – Expérience en microplaque

Les cyanobactéries maintiennent donc un rendement photosynthétique stable autour de 0.40, malgré la diminution de la ressource lumineuse. De fait, l'augmentation de la concentration en chlorophylle pour les échantillons recevant moins de lumière (**Figure 8**) peut être due à une tentative d'adaptation des cellules. Elles compensent le manque d'énergie lumineuse par la multiplication du nombre de pigments chlorophylliens afin de mieux capter tout rayonnement lumineux incident, et de maintenir un rendement photosynthétique « normal ». Cette augmentation ne se maintient pas dans la durée, suggérant un épuisement des ressources permettant cette compensation métabolique.

Les extraits étant colorés, ce test n'a pas permis de reconstruire à l'identique le phénomène se déroulant en présence d'extrait. L'absorption de certaines longueurs d'onde par l'extrait n'a pas pu être modélisée. Ceci constitue une limite : il est possible que certaines longueurs d'onde non atténuées dans ce test et nécessaires au maintien de performances photosynthétiques normales (excitation des pigments de l'antenne collectrice des thylakoïdes) ne soient pas accessibles pour les cyanobactéries en présence d'extrait. Il est possible que leur absence induise en réalité la baisse observée des performances photosynthétiques des résultats expérimentaux. L'utilisation de ces mêmes extraits non colorés, au cours du renouvellement de ces expériences, permettrait de confirmer l'hypothèse selon laquelle les composés allélopathiques sont bien responsables de l'inhibition des performances photosynthétiques de la souche PMC 679 10 *M.aeruginosa*, comme l'indique la littérature scientifique.

IV-C) Effet des composés allélopathiques sur les cyanobactéries à l'échelle cellulaire

Les mesures effectuées dans nos expériences permettent de mettre en évidence un impact des composés allélopathiques biosynthétisés par *L.major* et présents dans l'extrait (E2). Elles ne permettent cependant pas de connaître précisément leur mode d'action sur la souche cyanobactérienne utilisée ici. En effet, la concentration en chlorophylle mesurée au PhytoPAM et présentée dans cette étude, correspond à l'ensemble de la chlorophylle associée aux cyanobactéries. Il n'est donc pas possible de différencier, pour une même concentration relevée, si la chlorophylle est « normalement » concentrée dans un nombre réduit de cellules (effet allélopathique sur les cellules) ou si la densité cellulaire est « normale » avec une faible concentration en chlorophylle dans chaque cellule (effet allélopathique sur la photosynthèse). Il est cependant rapporté que les composés allélopathiques sont à l'origine de perturbations métaboliques : ralentissement de croissance (Jančula *et al.* 2010), changement de la composition en pigments photosynthétiques, impacts sur les enzymes et photosynthèse. Zhu *et al.* (2021) ont démontré que les polyphénols, dont l'acide gallique, qui est présent dans nos extraits (cf **Tableau 1**), diminuent le rendement photosynthétique de *M.aeruginosa* en inhibant l'activité du PSII et le transport d'électrons. L'expression génétique de la protéine réparatrice du PSII est également inhibée réduisant la capacité d'adaptation de la cyanobactérie face aux stress en plus d'altérer ses capacités de photosynthèse (Wu *et al.* 2013). L'effet des molécules allélopathiques porterait également sur le système de défense antioxydant (Hong *et al.* 2008; Laue *et al.* 2014), ou induirait une peroxydation des lipides membranaires, causant une variation de perméabilité, pouvant mener à la mort des cellules. Nos résultats d'inhibition de la production de MCs indiquent que la photosynthèse n'est pas la seule perturbée par des

mécanismes d'allélopathie. En effet, la production de toxines, qui représente un investissement énergétique important pour les cellules (Islam & Beardall 2017), est également affectée par les composés allélopathiques de *L. major*, avec un effet à plus de 10g/L. Pour des concentrations supérieures ou égales à 10g/L, il n'y a pas de MCs biosynthétisées. Cela s'explique soit par une diminution de la densité cellulaire (par apoptose), soit par des limitations du métabolisme des cyanobactéries. Ce dernier élément indiquerait donc que les composés allélopathiques n'ont pas une action uniquement sur les performances photosynthétiques, mais également sur la biosynthèse de certains métabolites secondaires que sont les MCs. Un taux équivalent de MCs produites en l'absence d'extrait et pour des concentrations inférieures à 1g/L, indiquent que les microalgues ne semblent pas sécréter ces métabolites secondaires en réponse à un stress biologique (compétition en présence d'extrait, même à faible concentration). Cependant il est également possible que la diminution de la ressource lumineuse, existante pour de fortes concentrations d'extrait, ait un impact sur l'énergie allouée à la production de métabolites secondaires (dont MCs) par les cyanobactéries. Le maintien de performances photosynthétiques équivalentes à 0.40 lors de la raréfaction des ressources, pourrait induire l'inhibition de voies métaboliques secondaires, qui ne sont pas directement nécessaires à la survie des cyanobactéries.

IV-D) Limites expérimentales et perspectives

Il n'est pas possible, avec les résultats de ces expériences, de différencier le cas de stress biotique et/ou mort cellulaire, induisant l'inhibition de voies métaboliques secondaires et baisse globale des capacités de photosynthèse, d'une inhibition directe de celles-ci. Il se peut d'ailleurs que les deux mécanismes soient simultanés d'où l'intérêt de poursuivre les analyses en métabolomique sur l'interaction macrophytes/cyanobactéries et caractériser plus finement les mécanismes inhibiteurs. Un projet a d'ailleurs été déposé afin de poursuivre les recherches et de préciser l'action des molécules allélopathiques responsables de l'inhibition suggérée dans cette étude. Il s'agira notamment de décrire l'altération de voies de biosynthèses des MCs et photosynthèse, ainsi que d'élucider la structure de biomolécules actives par spectrométrie de masse, classique et de haute résolution.

Par ailleurs, la comparaison des résultats obtenus dans ce projet, avec d'autres auteurs ayant étudié des interactions similaires, est à prendre avec précaution. La variabilité des méthodes de caractérisation de la croissance des microalgues ainsi que le protocole de mise en contact sont très variables d'une publication à l'autre. C'est en partie pour cette raison que

Maređová *et al.* (2021) rapportent que les résultats de l'allélopathie sur le contrôle des blooms algaux sont souvent surestimés.

Enfin, nos expériences ont porté sur l'effet individuel de deux macrophytes invasifs et exotiques sur la souche de *M.aeruginosa*, de manière indépendante. Il serait pertinent de combiner les différentes espèces de macrophytes, afin d'observer un effet inhibiteur synergique potentiel. Rojo *et al.* (2013) indiquent que l'effet allélopathique d'un assemblage de macrophytes est plus important que l'effet d'une monoculture. Cela s'explique par un plus large panel de molécules allélopathiques, dont les polyphénols, induisant une diminution de la biomasse cyanobactérienne et de leur compétition avec les macrophytes.

Conclusion

Ainsi, nous avons vu qu'il existe bien un effet inhibiteur de l'espèce de macrophyte immergé *Lagarosiphon major*, sur la cyanobactérie toxigène *Microcystis aeruginosa*. L'effet inhibiteur pourrait être dû à des composés allélopathiques tels que les polyphénols, les acides gras, biosynthétisés par les macrophytes ; qui agissent de manières variées, impactant les capacités photosynthétiques et la toxicité de la souche. Des expériences supplémentaires sur d'autres indicateurs de l'état des cellules permettraient de préciser les modes d'action des composés allélopathiques ainsi que des impacts métaboliques globaux pour les cyanobactéries : expression génétique, perméabilité cellulaire. La poursuite de l'étude (projet déposé à l'appel d'offre inter-CARNOT) autour de cette thématique permettra de préciser l'interaction biotique, en caractérisant les biomolécules actives par fractionnement des extraits, ainsi que les voies métaboliques affectées par les composés allélopathiques.

Malgré le fait que les concentrations en extrait, et donc en composés allélopathiques, induisent un effet inhibiteur marqué sur les cyanobactéries pour des concentrations qui semblent importantes, les possibilités qu'ouvre ce constat d'interaction sont nombreuses. En effet, si la présence de composés allélopathiques dans de telles concentrations n'est pas observable en milieu aquatique naturel (Mohamed 2017), l'utilisation d'extraits de macrophytes pour le biocontrôle *in situ* des cyanobactéries est envisageable. Ces expériences ouvrent donc la voie à des possibilités de valorisation des produits de gestion des EEE macrophytiques sur le lac de Parentis-Biscarrosse, permettant de maintenir voire d'améliorer le fonctionnement de l'écosystème pour plusieurs groupes trophiques.

Bibliographie

- Bertrin, V. (2018). Écologie et déterminisme physique des peuplements de macrophytes dans les lacs naturels peu profonds : application aux grands lacs du littoral aquitain de Carcans-Hourtin, Lacanau, Cazaux-Sanguinet et Parentis-Biscarrosse (Gironde, Landes). phdthesis. Université de Bordeaux, 272.
- Bertrin, V., Dutartre, A., Caro, A., Boutry, S., Moreira, S. & Jan, G. (2012). Communautés végétales aquatiques des lacs médocains. report. irstea, 54.
- 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.
- Caffrey, J., Millane, M., Evers, S. & Moran, H. (2011). Management of *Lagarosiphon major* (Ridley) Moss in lough corrib - A review. *Biol. Environ. Proc. R. Ir. Acad.*, 111B, 205–212.
- Carmichael, W.W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.*, 72, 445–459.
- Carrabin, D. (2011). *Détection et identification moléculaires de populations cyanobactériennes productrices de microcystines au Québec - Cognition*. Available at: <http://depot-e.uqtr.ca/id/eprint/2048/>. Last accessed 26 June 2021.
- 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.
- Dauta, A. (1982). Conditions de développement du phytoplancton. Etude comparative du comportement de huit espèces en culture. I. Détermination des paramètres de croissance en fonction de la lumière et de la température. *Ann. Limnol.*, 18, 217–262.
- De Boutray, M.-L. (2017). Les cyanobactéries et leurs toxines dans les sources d'eau potable. These de doctorat. Paris Est, 513.
- 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.

- Dyble, J., Fahnenstiel, G.L., Litaker, R.W., Millie, D.F. & Tester, P.A. (2008). Microcystin concentrations and genetic diversity of *Microcystis* in the lower Great Lakes. *Environ. Toxicol.*, 23, 507–516.
- Eau France. (2013). *Egeria densa*, Planch., 1849 | Sandre. <https://www.sandre.eaufrance.fr/>. Available at: <http://id.eaufrance.fr/apt/19626>. Last accessed 5 August 2021.
- 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.
- Fédération des conservatoires d'espaces naturels (France). (2010). Manuel de gestion des plantes exotiques envahissant les milieux aquatiques et les berges du bassin Loire-Bretagne. Fédération des conservatoires d'espaces naturels, Orléans, 141.
- Fernandez, S. & Zuazo, A. (2013). Intervention de gestion du Grand Lagarosiphon dans l'Etang Blanc (Rapport d'activité). Conseil Régional des Landes, Irstea, 26.
- Geadá, 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.
- Gross, E.M., Erhard, D. & Iványi, E. (2003). Allelopathic activity of *Ceratophyllum demersum* L. and *Najas marina ssp. intermedia* (Wolfgang) Casper. *Hydrobiologia*, 506–509, 583–589.
- Guerreiro, H., Bertrin, V., Coquery, M. & Boutin, C. (2015). Rôle du compartiment végétal au sein de la zone de rejet végétalisée de type « bassin » de Marguerittes (30), rapport, 36.
- Haury, J., Lambert, E. & Dutartre, A. (2015). *HYDROCHARITACÉES* 2013-2015, 93.
- Havens, K.E. (2008). Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 619, 733–747.
- Hilt, S. & Gross, E.M. (2008). Can allelopathically active submerged macrophytes stabilise clear-water states in shallow lakes? *Basic Appl. Ecol.*, 9, 422–432.
- Hilt, S. & Nicklisch, A. (2002). Allelopathic Growth Inhibition of Selected Phytoplankton Species by Submerged Macrophytes. *J. Phycol.*, 38, 862–871.

- Hong, Y., Hu, H.-Y. & Li, F.-M. (2008). Physiological and biochemical effects of allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) on cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 71, 527–534.
- Houliez, E. Contrôle de l'activité photosynthétique du phytoplancton en milieu côtier : utilisation de la fluorescence spectrale et de la fluorimétrie modulée (2012). Biodiversité et Ecologie. Université de Lille 1. tel-01084544, 366.
- Hu, H. & Hong, Y. (2008). Algal-bloom control by allelopathy of aquatic macrophytes — A review. *Front. Environ. Sci. Eng. China*, 2, 421–438.
- 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., Gregorová, J. & Maršálek, B. (2010). Algicidal and cyanocidal effects of selected isoquinoline alkaloids. *Aquac. Res.*, 41, 598–601.
- Kaya, K., Liu, Y.-D., Shen, Y.-W., Xiao, B.-D. & Sano, T. (2005). Selective control of toxic *Microcystis* water blooms using lysine and malonic acid: An enclosure experiment. *Environ. Toxicol.*, 20, 170–178.
- Krüger, T., Hölzel, N. & Luckas, B. (2012). Influence of Cultivation Parameters on Growth and Microcystin Production of *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) Isolated from Lake Chao (China). *Microb. Ecol.*, 63, 199–209.
- Kurashov, E., Krylova, J. & Protopopova, E. (2021). The Use of Allelochemicals of Aquatic Macrophytes to Suppress the Development of Cyanobacterial “Blooms.” IntechOpen, 19.
- 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.
- Lahti, K., Rapala, J., Färdig, M., Niemelä, M. & Sivonen, K. (1997). Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR in particulate material and dissolved in lake water. *Water Res.*, 31, 1005–1012.
- Lambert, G. (2020). *SITE UR EABX - ECOVEA. INRAe*. Available at: <https://www6.bordeaux-aquitaine.inrae.fr/eabx/EABX/ECOVEA>. Last accessed 17 August 2021.
- 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.

- Laplace-Treyture, C., Moreira, S., Gogin, S., Pickhahn, L., Eon, M. & Jamoneau, A. (2017). Un système opérationnel de surveillance et d’alerte des proliférations de cyanobactéries : application aux plans d’eau landais. *Sci. Eaux Territ.*, Hors série, 6 p.
- Laue, P., Bährs, H., Chakrabarti, S. & Steinberg, C.E.W. (2014). Natural xenobiotics to prevent cyanobacterial and algal growth in freshwater: Contrasting efficacy of tannic acid, gallic acid, and gramine. *Chemosphere*, 104, 212–220.
- Legrand, C., Rengefors, K., Fistarol, G.O. & Granéli, E. (2003). Allelopathy in phytoplankton - biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia*, 42, 406–419.
- 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.
- Li, Y. & Li, D. (2012). Competition between toxic *Microcystis aeruginosa* and nontoxic *Microcystis wesenbergii* with *Anabaena* PCC7120. *J. Appl. Phycol.*, 24, 69–78.
- 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.
- De Mesquita, M.M.F., Crapez, M.A.C., Teixeira, V.L. & Cavalcanti, D.N. (2019). Potential interactions bacteria-brown algae. *J. Appl. Phycol.*, 31, 867–883.
- Mohamed, Z.A. (2017). Macrophytes-cyanobacteria allelopathic interactions and their implications for water resources management—A review. *Limnologia*, 63, 122–132.
- Mohamed, Z.A. & Shehri, A.M.A. (2010). Differential Responses of Epiphytic and Planktonic Toxic Cyanobacteria to Allelopathic Substances of the Submerged Macrophyte *Stratiotes aloides*. *Int. Rev. Hydrobiol.*, 95, 224–234.
- 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.
- Morin, S., Pesce, S., Tlili, A., Coste, M. & Montuelle, B. (2010). Recovery potential of periphytic communities in a river impacted by a vineyard watershed. *Ecol. Indic.*, 10, 419–426.

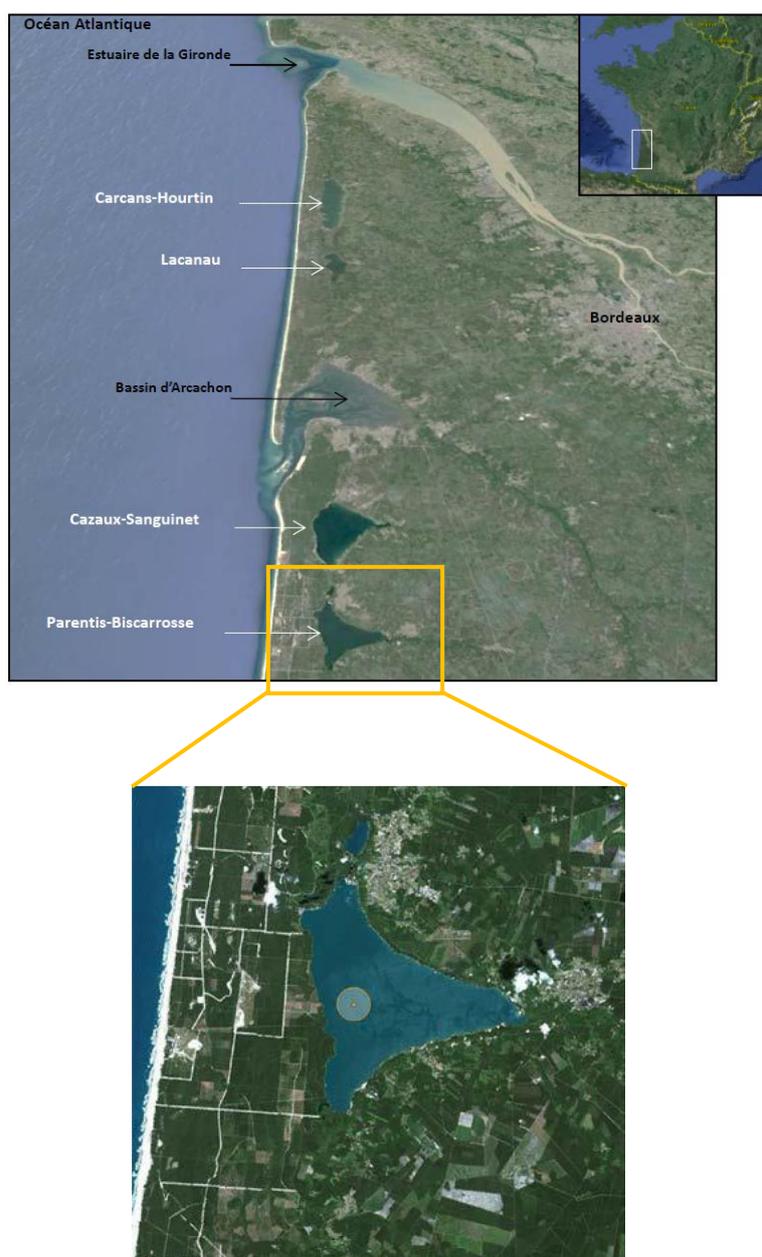
- Nakai, S., Hosomi, M., Okada, M. & Murakami, A. (1996). Control of algal growth by macrophytes and macrophyte-extracted bioactive compounds. *Water Sci. Technol., Water Quality International '96 Part 4*, 34, 227–235.
- Nakai, S., Inoue, Y., Hosomi, M. & Murakami, A. (1999). Growth inhibition of blue–green algae by allelopathic effects of macrophytes. *Water Sci. Technol.*, 39, 47–53.
- Omidi, A., Esterhuizen-Londt, M. & Pflugmacher, S. (2019). Interspecies interactions between *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 and *Desmodesmus subspicatus* SAG 86.81 in a co-cultivation system at various growth phases. *Environ. Int.*, 131, 105052.
- Pickhan, L. & Dutartre, A. (2016). Contrôle de l’Egérie dense et du Grand Lagarosiphon par pose d’écrans occultants de fond (halte nautique de Sainte-Eulalie en Born, Landes (Résumé d’expérience). GT IBMA, ONEMA, 5.
- Ribaudo, C., Jan, G. & Bertrin, V. (2015). Interactions entre macrophytes et qualité de l’eau : le cas des isoétides et des exotiques dans les lacs aquitains. *irstea, HAL*, 40.
- Rojo, C., Segura, M. & Rodrigo, M.A. (2013). The allelopathic capacity of submerged macrophytes shapes the microalgal assemblages from a recently restored coastal wetland. *Ecol. Eng.*, 58, 149–155.
- Roussille, J. (2009). Comparaison de trois méthodes analytiques (sonde fluorimétrique, spectroscopie UV-visible et HPLC) pour le dosage de la chlorophylle a dans les eaux de trois lacs. Thèse, 45.
- Saito, K., Matsumoto, M., Sekine, T., Murakoshi, I., Morisaki, N. & Iwasaki, S. (1989). Inhibitory Substances from *Myriophyllum brasiliense* on Growth of Blue-Green Algae. *J. Nat. Prod.*, 52, 1221–1226.
- 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.
- Schatz, D., Keren, Y., Vardi, A., Sukenik, A., Carmeli, S., Börner, T., *et al.* (2007). Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environ. Microbiol.*, 9, 965–970.
- Sigee, D. (2005). *Freshwater Microbiology: Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment*. John Wiley & Sons, 548.
- Sigee, D.C., Selwyn, A., Gallois, P. & Dean, A.P. (2007). Patterns of cell death in freshwater colonial cyanobacteria during the late summer bloom. *Phycologia*, 46, 284–292.

- Tamayo, M. & Olden, J.D. (2014). Forecasting the Vulnerability of Lakes to Aquatic Plant Invasions. *Invasive Plant Sci. Manag.*, 7, 32–45.
- Thévenot, J. (2013). Synthèse et réflexions sur des définitions relatives aux invasions biologiques., MNHN. Rapport SPN, 32.
- Wu, Z., Shi, J. & Yang, S. (2013). The effect of pyrogalllic acid on growth, oxidative stress, and gene expression in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Ecotoxicology*, 22, 271–278.
- Zeng, R.S., Mallik, A.U. & Luo, S. (Eds.). (2008). Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry. Springer-Verlag, New York, 117p.
- Zhang, P., Zhai, C., Wang, X., Liu, C., Jiang, J. & Xue, Y. (2013). Growth competition between *Microcystis aeruginosa* and *Quadrigula chodatii* under controlled conditions. *J. Appl. Phycol.*, 25, 555–565.
- 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.

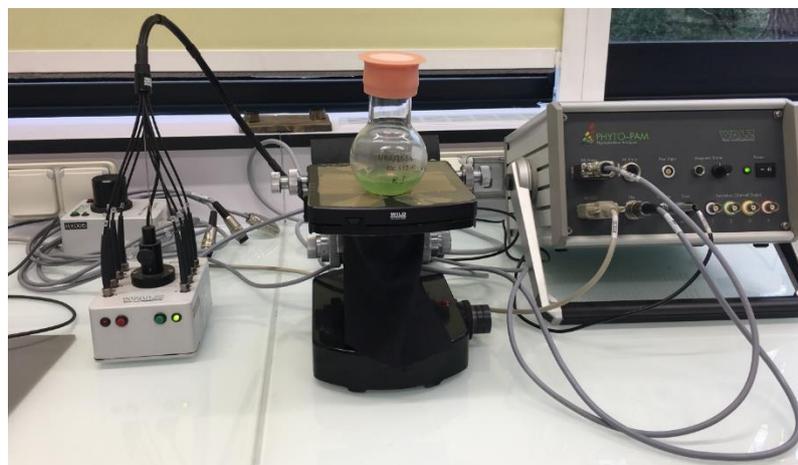
Annexes

Annexe 1 : Localisation du lac de Parentis Biscarrosse – Département des Landes (40)

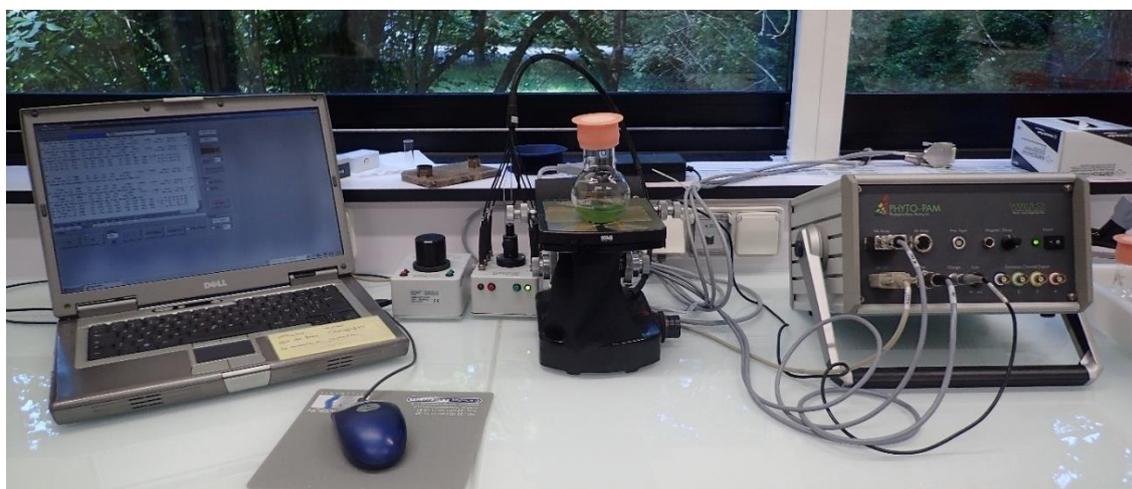
Source : S. Moreira, Christophe Laplace-Treyture, Mélissa Eon, G. Jan. *Rapport d'activité du suivi scientifique des plans d'eau de Carcans-Hourtin, Lacanau, Cazaux-Sanguinet et Parentis-Biscarrosse : Année 2015.* irstea. 2016, pp.106. hal-02606125



Annexe 2 : Photographies (a) du PhytoPAM (Source : Moreira (2) & Campillo (1), 2021)

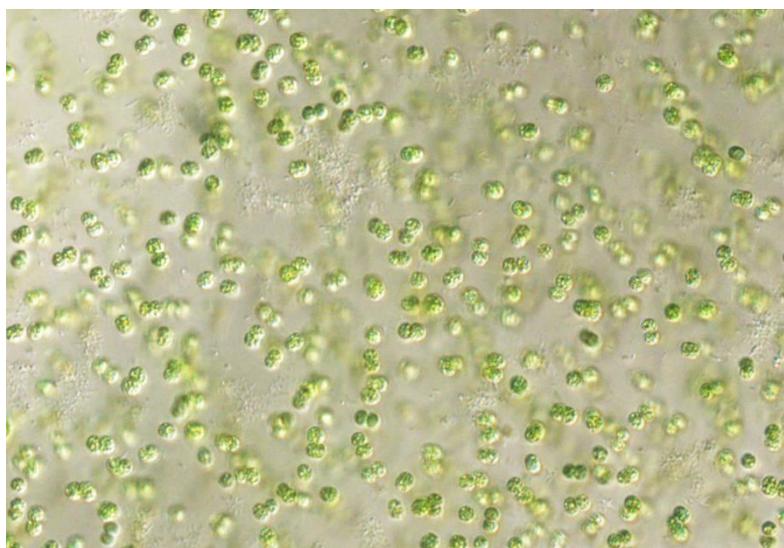


(1)



(2)

(b) de la souche PMC 679 10 *Microcystis aeruginosa* au microscope droit à contraste de phase(x400)



Annexe 3 : Plan d'expérience de l'expérience de mise en contact des cyanobactéries PMC 679 10 Microcystis aeruginosa avec l'extrait de macrophytes (E2) Lagarosiphon major optimisé en concentration dans un volume de 20mL

Légende :

- ❖ **BG11** : milieu minéral de culture des cyanobactéries
- ❖ **Extrait dilué** : extrait de *L.major* optimisé en concentration (E2) et dilué aux concentrations indiquées dans la deuxième ligne du tableau.
- ❖ **Cyano** : cyanobactéries PMC 679 10 *Microcystis aeruginosa*
- ❖ Rep : réplicats (3 ici pour chaque modalités)

		Concentration en extrait (E2)						
		10 mg/L	100 mg/L	1 g/L	10 g/L	25 g/L	50 g/L	
Zoff	20mL BG11	10 mL extrait dilué + 10mL BG11						
Cyano témoin	10mL BG11 + 10mL cyano	10mL extrait dilué + 10mL cyano	Rep 1					
	10mL BG11 + 10mL cyano	10mL extrait dilué + 10mL cyano	Rep 2					
	10mL BG11 + 10mL cyano	10mL extrait dilué + 10mL cyano	Rep 3					



Photographies de l'expérience en ballons à 0h. après inoculation des échantillons cyanobactéries et extrait de *L.major* optimisé en concentration (E2) (Source : Moreira, 2021)

Annexe 4 : Résultats résumés de l'impact de la présence d'extrait de différentes espèces de macrophytes sur le rendement photosynthétique de la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa* (souche PMC 679 10 *M.aeruginosa*) au cours du temps et pour différents volumes de mise en contact

Macrophytes	Extrait	Extraction	Méthode	Temps	Concentration extrait macrophyte									
					3mg/L	10mg/L	30mg/L	100mg/L	1g/L	10g/L	25g/L	50g/L	75g/L	150g/L
<i>Egeria densa</i>	1	Optimisé en concentration	Microplaque	0h	Neutre	Neutre	Neutre	Neutre	Neutre					
				24h	Neutre	Neutre	Neutre	Neutre	Neutre					
				48h	Neutre	Neutre	Neutre	Neutre	Neutre					
				72h	Neutre	Neutre	Neutre	Neutre	Neutre					
				96h										
<i>Lagarosiphon major</i>	2	Optimisé en concentration	Microplaque	0h	Neutre	Neutre	Neutre	Neutre	Neutre		Inhibiteur		Inhibiteur	Inhibiteur
				24h	Neutre	Neutre	Neutre	Neutre	Neutre		Inhibiteur		Inhibiteur	Inhibiteur
				48h	Neutre	Neutre	Neutre	Neutre	Neutre		Inhibiteur		Inhibiteur	Inhibiteur
				72h	Neutre	Neutre	Neutre	Neutre	Neutre		Inhibiteur		Inhibiteur	Inhibiteur
				96h										
<i>Egeria densa</i>	3	Optimisé en rendement	Microplaque	0h					Neutre	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	
				24h					Neutre	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	
				48h					Neutre	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	
				72h					Neutre	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	
				96h					Neutre	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	
<i>Lagarosiphon major</i>	4	Optimisé en rendement	Microplaque	0h					Neutre	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	
				24h					Neutre	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	
				48h					Neutre	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	
				72h					Neutre	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	
				96h					Neutre	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	
<i>Lagarosiphon major</i>	2	Optimisé en concentration	Ballon	0h		Neutre		Neutre	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur		
				24h		Neutre		Neutre	Neutre	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur		
				48h		Neutre		Neutre	Neutre	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur		
				72h		Neutre		Neutre	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur		
				96h		Neutre		Neutre	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur		

RESUME

Master 2 BEE, parcours Biodiversité et Suivis Environnementaux

Stage du 01/02/2021 au 16/07/2021

Campillo Lucie

Titre : Rôle potentiel des macrophytes aquatiques dans la régulation des blooms de cyanobactéries : approche allélopathique

Les écosystèmes lacustres aquitains dont le lac de Parentis sont soumis à différentes pressions, dont la présence d'espèces exotiques envahissantes, ou encore la prolifération de cyanobactéries toxiques sous forme de blooms. L'étude des interactions via allélopathie entre les macrophytes invasifs et les cyanobactéries locales, constitue un axe d'exploration pour la valorisation des produits de gestion des macrophytes et pour le contrôle des blooms de cyanobactéries. L'objectif de cette étude est donc de caractériser l'effet de *Lagarosiphon major* sur *Microcystis aeruginosa* par allélopathie. Pour cela, un suivi des cyanobactéries a été réalisé pendant 96 heures lors de sa mise en contact avec des extraits de *L.major*, dans lequel des composés allélopathiques biosynthétisés sont présents. Des mesures de rendement photosynthétique et de concentration en chlorophylle ont été réalisées chaque jour à l'aide d'un PhytoPAM. Une mesure de toxicité a été effectuée par test immuno-enzymatique ELISA en fin d'expérience. Le dosage a porté sur un type de toxine spécifique : les microcystines. Les résultats obtenus indiquent une inhibition des performances photosynthétiques de *M. aeruginosa* pour des concentrations supérieures ou égales à 10g/L d'extrait. Une inhibition de la production de microcystines à partir de la même concentration est aussi observée. Ces résultats constituent une première approche portant sur l'interaction biotique entre *L.major* et *M.aeruginosa*. Afin de caractériser les mécanismes et métabolites secondaires intervenants dans l'inhibition, il est pertinent de poursuivre l'étude (métabolomique, fractionnement des extraits), pour les concentrations observées comme actives.

Maitres de stage :

Rosebery Juliette juliette.rosebery@inrae.fr

Moreira Sylvia sylvia.moreira@inrae.fr

Structure d'accueil :

INRAe – Unité EABX

50 Avenue de Verdun

33610 CESTAS