



**HAL**  
open science

**Identification structurale de composés impliqués dans la relation allélopathique entre Lagarosiphon major et Microcystis aeruginosa par spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) et par résonance magnétique nucléaire (RMN)**

Sérigne Seck

► **To cite this version:**

Sérigne Seck. Identification structurale de composés impliqués dans la relation allélopathique entre Lagarosiphon major et Microcystis aeruginosa par spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) et par résonance magnétique nucléaire (RMN). Chimie. 2023. hal-04183938

**HAL Id: hal-04183938**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04183938v1>**

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.

L'Institut Agro Rennes-Angers

Site d'Angers  Site de Rennes

<p>Année universitaire : 2022-2023</p> <p>Spécialité : Amélioration, Production et Valorisation du Végétal</p> <p>Spécialisation : Phytochimie, Qualité et Valeurs d'Usages (PQVU)</p>	<p><b>Rapport de stage :</b></p> <p>De master de l'Institut Agro Rennes-Angers (Institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement)</p>
--	---

**Identification structurale de composés impliqués dans la relation allélopathique entre *Lagarosiphon major* et *Microcystis aeruginosa* par spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) et par résonance magnétique nucléaire (RMN)**

Par : SECK Serigne Bamba



**Soutenu à RENNES**

**le 22/06/2023**

**Devant le jury composé de :**

Président : CABELLO-HURTADO Francisco

Rapporteur 1 : BOUCHEREAU Alain

Maître de stage : ROSEBERY Juliette et CREUSOT Nicolas

Rapporteur 2 : GRAVOT Antoine

Enseignant référent : BOUCHEREAU Alain



## Fiche de confidentialité et de diffusion du mémoire

### Confidentialité

Non  Oui si oui :  1 an  5 ans  10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible <sup>(1)</sup>.

Date et signature du maître de stage <sup>(2)</sup> : 6/6/2023

(ou de l'étudiant-entrepreneur)



**A la fin de la période de confidentialité**, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant à renseigner).

### Droits d'auteur

L'auteur<sup>(3)</sup> **SECK Serigne Bamba**

autorise la diffusion de son travail (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

Oui  Non

Si oui, il autorise

- la diffusion papier du mémoire uniquement<sup>(4)</sup>
- la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé
- la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

(Facultatif)  accepte de placer son mémoire sous licence Creative commons CC-By-Nc-Nd (voir Guide du mémoire Chap 1.4 page 6)

Date et signature de l'auteur :

## Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

Oui    Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.

Si oui, il autorise

- la diffusion papier du mémoire uniquement(4)
- la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé
- la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'enseignant :

## **Remerciements :**

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué à la réussite de ce projet. Tout d'abord, je tiens à remercier mes maîtres de stage, Juliette Rossebry et Nicolas Creusot. Juliette Rossebry, ta disponibilité, tes encouragements, ainsi que tes échanges constructifs ont été d'une aide précieuse. Nicolas Creusot, je suis infiniment reconnaissant pour le temps que tu as consacré à mon encadrement, tes précieux conseils et tes encouragements constants. Ton expertise en métabolomique et en spectrométrie de masse à haute résolution, ainsi que dans l'analyse des données métabolomiques, a été essentielle pour atteindre les objectifs de mon stage.

Je souhaite également remercier chaleureusement Mélissa Eon pour son aide précieuse dans mes démarches administratives et pour la formation technique qu'elle m'a dispensée sur l'utilisation de la spectrométrie de masse.

Mes remerciements s'étendent également à toute l'équipe d'ECOVEA et à l'ensemble du personnel de l'INRAE CESTAS, pour l'accueil chaleureux que j'ai reçu à mon arrivée.

Enfin, je voudrais exprimer ma gratitude à mes chers parents au Sénégal. C'est grâce à leur soutien indéfectible et leurs conseils avisés que j'ai eu l'opportunité de poursuivre mes études à l'étranger. Leur confiance en moi a été un pilier essentiel tout au long de ce parcours.



## Table des matières

<b>1.Introduction</b> .....	<b>1</b>
1.1. Importance des écosystèmes aquatiques et menaces associées .....	1
1.2. Problématique des espèces invasives et des efflorescences de cyanobactéries .....	1
1.2.1. Cas d' <i>Egeria densa</i> et <i>Lagarosiphon major</i> .....	1
1.3. Efflorescences de cyanobactéries: <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	2
1.4. Vulnérabilité des lacs aquitains face à la prolifération de macrophytes invasifs et de cyanobactéries .....	3
1.5. L'allolopathie, un mécanisme à la base de nouvelles solutions de lutte ? .....	3
1.6. Métabolomique non ciblé pour l'étude des composés allélochimiques des macrophytes .....	4
1.7. Projet EXOBIO et objectifs de l'étude.....	5
<b>2. MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>6</b>
2.1. Échantillonnage .....	6
2.2. Extraction et fractionnement .....	6
2.3. Analyse métabolomique non ciblée des Fractions en HRMS .....	7
2.3.1. Stratégie Analytique .....	7
2.3.2. Analyse UPLC-HRMS .....	7
2.3.3. Traitement des données .....	8
2.3.4. Annotation .....	9
2.3.5. Définition du paysage chimique avec le violin plot .....	10
2.3.6. Identification des métabolites actives candidates avec le diagramme de Venn et le diagramme de rayon en soleil .....	10
2.3.7. Confirmation structurale des candidats .....	11
2.3.8. Stratégie de Préparation pour l'Analyse RMN: Comparaison du Paysage Chimique des Composés Inconnus avec les Chromatogrammes UV et HRMS .....	12
<b>3. RESULTATS</b> .....	<b>12</b>
3.1. Paysage Chimique des fractions actives en C18 et en HILIC à l'échelle des voies métaboliques .....	12
3.2. Paysage Chimique des fractions actives en C18 et en HILIC à l'échelle de la superclasse .....	12
3.3. Priorisation et sélection des métabolites cibles pour les fractions actives .....	13
3.4. Confirmation analytique des composés cibles .....	14
3.5. Comparaison du paysage chimique des composés inconnus avec les chromatogrammes UV et HRMS pour aller vers la RMN .....	15
<b>4. Discussion</b> .....	<b>15</b>
4.1. Paysage chimique de <i>L.major</i> et identification de composés potentiellement bio-actifs .....	15
4.2. Méthodologie d'analyse .....	17
<b>5. Conclusion</b> .....	<b>19</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>20</b>





## **1.Introduction**

### **1.1. Importance des écosystèmes aquatiques et menaces associées**

Occupant environ 71% de la surface terrestre, les écosystèmes aquatiques sont d'une importance capitale, abritant une grande diversité d'espèces et d'habitats (MEA, 2005). Ces milieux, qui englobent rivières, lacs, zones humides et océans, sont des habitats essentiels pour de nombreuses espèces, qu'elles soient terrestres ou aquatiques (Dudgeon et al., 2006).

Outre leur rôle écologique, les écosystèmes aquatiques sont également fondamentaux pour le maintien de l'équilibre hydrologique de la planète. Ils régulent le cycle de l'eau et assurent la continuité du renouvellement des ressources en eau douce (Dudgeon et al., 2006). De plus, ils sont sources de ressources précieuses pour les communautés humaines, fournissant nourriture, fibres, matériaux de construction et énergie (Barbier et al., 2011). La pêche et l'aquaculture, par exemple, offrent des sources essentielles de protéines et de revenus à des millions de personnes dans le monde, tandis que l'eau douce est un élément vital pour l'irrigation des cultures, la production d'énergie hydroélectrique et l'approvisionnement en eau potable (Barbier et al., 2011).

Cependant, ces précieux écosystèmes sont sous pression en raison de diverses activités humaines, à l'origine de pollutions chimiques, de la destruction des habitats, de la surexploitation des ressources, ou encore de l'introduction d'espèces invasives (Vitousek et al., 1997). L'un des problèmes majeurs de la dégradation de la qualité de l'eau dans ces écosystèmes est l'augmentation des concentrations de nutriments, tels que le phosphore et l'azote, qui entraînent l'eutrophisation en favorisant la prolifération de certaines espèces envahissantes, comme les macrophytes aquatiques, et la prolifération des cyanobactéries (Carpenter et al., 1998).

### **1.2. Problématique des espèces invasives**

Les espèces invasives sont des organismes non indigènes qui ont été introduits, volontairement ou involontairement, dans un nouvel environnement où ils peuvent causer des dommages écologiques, économiques et sanitaires (Hulme, 2009). Ces espèces peuvent avoir des impacts considérables sur les écosystèmes et les communautés indigènes, entraînant des perturbations des processus écologiques, des changements de composition des communautés et une réduction de la biodiversité (Sarat et al., 2015; Hulme, 2009).

Selon Sarat et al. (2015), les espèces exotiques envahissantes constituent l'un des principaux facteurs d'érosion de la biodiversité à l'échelle mondiale. Leurs impacts peuvent varier en fonction des espèces, des écosystèmes et des conditions environnementales. Elles peuvent notamment engendrer une concurrence avec les espèces indigènes pour les ressources, telles que l'eau, la nourriture et les sites de reproduction. De plus, elles sont susceptibles de modifier la dynamique des communautés, par exemple, en réduisant la densité et la diversité des espèces indigènes (Pysek et al., 2004). Ces espèces peuvent également perturber les processus écologiques, influençant par exemple la régulation de la température de l'eau et la qualité de celle-ci (Salmaso et al., 2011). Ostfeld et al. (2015) ont souligné qu'elles peuvent être vecteurs de maladies et de parasites pour les espèces indigènes. Enfin, la gestion des espèces envahissantes représente souvent une charge économique importante, illustrant une autre facette grave de cette problématique (Pimentel et al., 2005).



### 1.2.1 Cas d'*Egeria densa* et *Lagarosiphon major*

*Egeria densa* et *Lagarosiphon major* sont deux espèces de macrophytes invasives qui posent de sérieux problèmes dans les lacs et les plans d'eau à travers le monde (Cook & Urmi-König, 1984; Hussner et al., 2017). Originaires respectivement d'Amérique du Sud et d'Afrique australe, ces espèces ont été largement disséminées en raison de leur attrait esthétique en aquariophilie (Dutartre, 2002). Cependant, leur introduction hors de leur milieu naturel peut entraîner des invasions destructrices et engendrer des conséquences écologiques, économiques et sanitaires significatives (Hussner et al., 2017).

Ces plantes aquatiques possèdent des caractéristiques spécifiques qui favorisent leur propagation rapide et leur colonisation extensive. En tant qu'hydrophytes, leurs racines sont complètement immergées, ne tolérant aucune exondation (Dutartre, 2002 ; Maubert, S. 2022). De plus, leur mode de reproduction principalement asexué facilite leur dissémination et leur établissement dans de nouveaux milieux (Yarrow et al., 2009). *Egeria densa*, en particulier, présente une capacité de prolifération notable, formant des tapis de végétation denses qui peuvent supplanter les autres espèces et réduire la biodiversité locale (Cook & Urmi-König, 1984).

L'invasion par *Egeria densa* et *Lagarosiphon major* perturbe fortement les écosystèmes aquatiques et a des effets délétères à divers niveaux. Elles modifient les cycles des nutriments, la pénétration lumineuse, le pH et la concentration en oxygène dans les plans d'eau, ce qui peut altérer les interactions inter-spécifiques et l'hétérogénéité des habitats (Dutartre et al., 2008; Bickel & Gloss, 2009). De plus, leur prolifération entrave les activités humaines telles que la pêche, la navigation et les loisirs, avec des répercussions économiques potentiellement importantes (Pickhan & Dutartre, 2016). Enfin, la gestion de ces espèces invasives représente un coût élevé, nécessitant des efforts de contrôle et de suivi réguliers (Dutartre et al., 1989).

### 1.3 Efflorescences de cyanobactéries: *Microcystis aeruginosa*

Les cyanobactéries, micro-organismes photosynthétiques, peuvent proliférer massivement et rapidement lorsque les conditions environnementales leur sont favorables, formant ainsi des blooms (Huisman et al., 2018).

Les blooms de cyanobactéries peuvent avoir de graves conséquences écologiques, entraînant un déséquilibre du réseau trophique, une diminution de l'intensité lumineuse, l'induction de périodes anoxiques et la mortalité de la faune (Paerl & Otten, 2013). Les cyanobactéries représentent également un danger pour la santé humaine et l'économie, en contaminant les réservoirs d'eau potable et en perturbant les activités récréatives (Chorus et al., 2000; OMS, 2003; Backer et al., 2010).

Les cyanobactéries sont très compétitives pour les ressources alimentaires, grâce à la présence de pigments accessoires, comme la phycocyanine, et à leur flottabilité (Humbert & Fastner, 2017). La production de cyanotoxines est stimulée par différents facteurs environnementaux, comme la température, l'intensité lumineuse, le pH, la quantité en nutriments ou la présence de polluants (Chorus, 2001; Pearson et al., 2010).

Parmi toutes les cyanobactéries présentes dans les écosystèmes aquatiques, *Microcystis aeruginosa* est particulièrement préoccupante. Cette espèce a la capacité de produire des cyanotoxines, des toxines qui affectent le foie et peuvent causer des dommages écologiques, sanitaires et économiques importants (Carmichael, 1997; Meriluoto et al., 2017).



La présence de *Microcystis aeruginosa* est bien attestée dans de nombreux lacs, comme celui de Parentis-Biscarosse (Gironde, France), où elle représente une part importante de la communauté algale, atteignant jusqu'à 93 % en janvier (Moreira et al., 2015). La dominance de *Microcystis aeruginosa* peut s'expliquer par sa capacité à former des colonies et la présence de vésicules gazeuses intracellulaires, augmentant ainsi son rapport surface/volume et sa flottabilité (Walsby, 1994; Damerval, 1990).

#### **1.4. Vulnérabilité des lacs aquitains face à la prolifération de macrophytes invasifs et de cyanobactéries**

La vulnérabilité des lacs aquitains aux espèces invasives est une problématique cruciale. La notion de vulnérabilité, qui fait référence à une situation de faiblesse affectant l'intégrité d'un système (Schröter et al., 2005), s'applique pleinement à ces écosystèmes en raison de plusieurs facteurs propices à l'introduction, l'établissement et la prolifération des espèces invasives.

La faible profondeur des lacs aquitains est l'un des principaux facteurs de vulnérabilité, rendant ces écosystèmes particulièrement sensibles aux variations de température, de luminosité et de concentration en nutriments, facteurs qui peuvent favoriser la croissance des espèces invasives (Dudgeon et al., 2006; Malmqvist & Rundle, 2002). Cette faible profondeur facilite également la dispersion des graines et des fragments végétaux, contribuant à l'établissement et la propagation des espèces invasives (Malmqvist & Rundle, 2002).

L'eutrophisation, processus d'accumulation des nutriments tels que l'azote et le phosphore dans les écosystèmes aquatiques, est un autre facteur de vulnérabilité majeur des lacs aquitains. Elle favorise la croissance excessive de certaines espèces végétales envahissantes, telles que *Egeria densa* et *Lagarosiphon major*, perturbant l'équilibre des écosystèmes aquatiques et réduisant la biodiversité (Carpenter et al., 1998; Ribaudou et al., 2015). L'eutrophisation favorise également les proliférations de cyanobactéries, avec des conséquences écologiques, économiques et sanitaires importantes (Chorus & Welker, 2021; Dudgeon et al., 2006).

La gestion des espèces invasives constitue donc un enjeu majeur pour la conservation de la biodiversité et la santé des écosystèmes (Sarat et al., 2015). Cependant, les méthodes actuelles de contrôle, comme l'utilisation d'herbicides chimiques ou de méthodes mécaniques, présentent des limites, notamment en termes de toxicité, de résistance et de coût (Sculthorpe, 1967). La lutte contre les cyanobactéries est également un défi en raison de leur résistance aux traitements chimiques et de l'absence de méthodes de contrôle écologiques et durables (Paerl & Huisman, 2009).

Face à cette problématique, il est essentiel de développer de nouvelles approches pour contrôler les macrophytes envahissants et les cyanobactéries. L'étude des mécanismes d'allélopathie apparaît comme une stratégie prometteuse. L'identification des composés allélochimiques présents dans les macrophytes envahissants pourrait permettre de développer des méthodes de contrôle biologique efficaces et durables, notamment pour lutter contre les efflorescences de cyanobactéries (Gross, 2003). La mise en évidence de la présence de tels composés permettrait en retour d'orienter les stratégies de gestion des biomasses de macrophytes invasifs, en statuant sur la période de récolte la plus opportune.

#### **1.5. L'allélopathie, un mécanisme à la base de nouvelles solutions de lutte ?**



L'allélopathie est un phénomène complexe qui englobe les interactions chimiques entre les plantes, les microorganismes et d'autres organismes vivants. Ces interactions peuvent avoir des impacts aussi bien positifs que négatifs sur leur croissance et leur développement (Rice, 1984). Le concept d'allélopathie, introduit par Oborn et ses collègues en 1954, a suscité de nombreuses recherches visant à explorer son potentiel dans divers contextes (Oborn, 1954).

Plus spécifiquement dans l'environnement aquatique, les macrophytes sont reconnus pour leur capacité à limiter la croissance et la biomasse du phytoplancton, et des cyanobactéries en particulier, par le biais d'interactions allélopathiques (Xian et al., 2006; Lahrouni et al., 2015, Mohamed, 2017). De telles interactions peuvent influencer de manière significative la biodiversité et l'équilibre de l'écosystème aquatique, en modifiant la composition et l'abondance des communautés microbiennes (Nakai et al., 2012).

Certaines espèces de macrophytes aquatiques, telles que les lentilles d'eau, les cressonnières et les jacinthes d'eau, ont démontré leur capacité à libérer des composés allélopathiques qui inhibent la croissance des cyanobactéries et réduisent leur biomasse dans les eaux de surface (Lahrouni et al., 2015). Lahrouni et al. (2015) ont démontré dans leur étude que l'extrait d'*Eichhornia crassipes* (jacinthe d'eau) réduisait la croissance des cyanobactéries dans des cultures mixtes. Ils ont identifié des composés allélopathiques tels que l'acide férulique, l'acide salicylique et l'acide benzoïque comme responsables de cet effet inhibiteur.

Cependant, l'étude de l'allélopathie représente un défi en raison de la complexité des interactions chimiques entre les organismes et leur environnement. L'évaluation de l'allélopathie requiert un examen approfondi de multiples descripteurs tels que la croissance et la photosynthèse (Bais et al., 2003). Par exemple, la croissance peut être évaluée en mesurant le taux de croissance, la biomasse ou la densité de population des plantes ou des microorganismes (Weir et al., 2004). D'autre part, l'efficacité de la photosynthèse peut être compromise par la présence de composés allélopathiques, qui peuvent affecter diverses fonctions, comme l'ouverture des stomates ou l'efficacité de la chaîne de transport d'électrons (Gross, 2003). Les méthodes d'analyse et de détection des composés allélopathiques, qui peuvent varier en termes de sensibilité et de spécificité, sont également cruciales pour comprendre l'allélopathie (Cheng et al., 2020).

Pour surmonter ces défis, il est nécessaire de développer des approches sensibles et spécifiques pour améliorer notre compréhension des mécanismes sous-jacents à l'allélopathie. Des techniques modernes comme la métabolomique et la protéomique peuvent être utilisées pour identifier et caractériser les composés allélopathiques impliqués dans les interactions entre les plantes et les microorganismes (Cheng et al., 2011).

## **1.6. Métabolomique non ciblé pour l'étude des composés allélochimiques des macrophytes**

La métabolomique non ciblée est une technique puissante qui a révolutionné l'identification et la caractérisation des composés bioactifs dans les matériaux végétaux et permet d'étudier la réponse de l'organisme face à ces composés (Boccard et Rudaz, 2014). Cette approche, capable de détecter des milliers de composés dans un échantillon unique, a ouvert la voie à la découverte de nouveaux composés bioactifs et à leur valorisation (Sumner et al., 2007). La détection et la caractérisation de ces composés nécessitent l'emploi de techniques analytiques avancées, comme la chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (UHPLC-HRMS) et la spectroscopie par résonance magnétique





nucléaire (RMN), qui sont couramment utilisées dans l'étude des composés allélochimiques chez les macrophytes (Wolfender et al., 2015).

HRMS est adaptée à l'analyse des mélanges complexes de produits allélochimiques et d'autres métabolites dans les macrophytes. Cette technique, qui permet une séparation rapide et efficace des composés, associée à des mesures de masse précises et à des spectres à haute résolution, a été largement utilisée pour l'identification et la caractérisation des composés allélopathiques dans diverses plantes aquatiques. Par exemple, l'étude de Chen et al., (2016) a utilisé la GC-MS pour étudier les composés volatils allélopathiques de la plante aquatique *Eichhornia crassipes* et LC-HRMS a été aussi de composés allélopathique de macrophyte comme *Myriophyllum spicatum* (Gross et al., 1996) et *Ceratophyllum demersum* (Jüttner et al., 2010). De même, le DAD-UV a été employé pour caractériser les phénoliques dans les plantes aquatiques (Zhang et al., 2016). Dans une étude plus récente de Tazart et al., a utilisé ces trois techniques pour étudier des effets allélopathiques des macrophytes sur la croissance, la physiologie et la toxicité de la cyanobactérie toxique *microcystis aeruginosa*.

### 1.7. Projet EXOBIO et objectifs de l'étude :

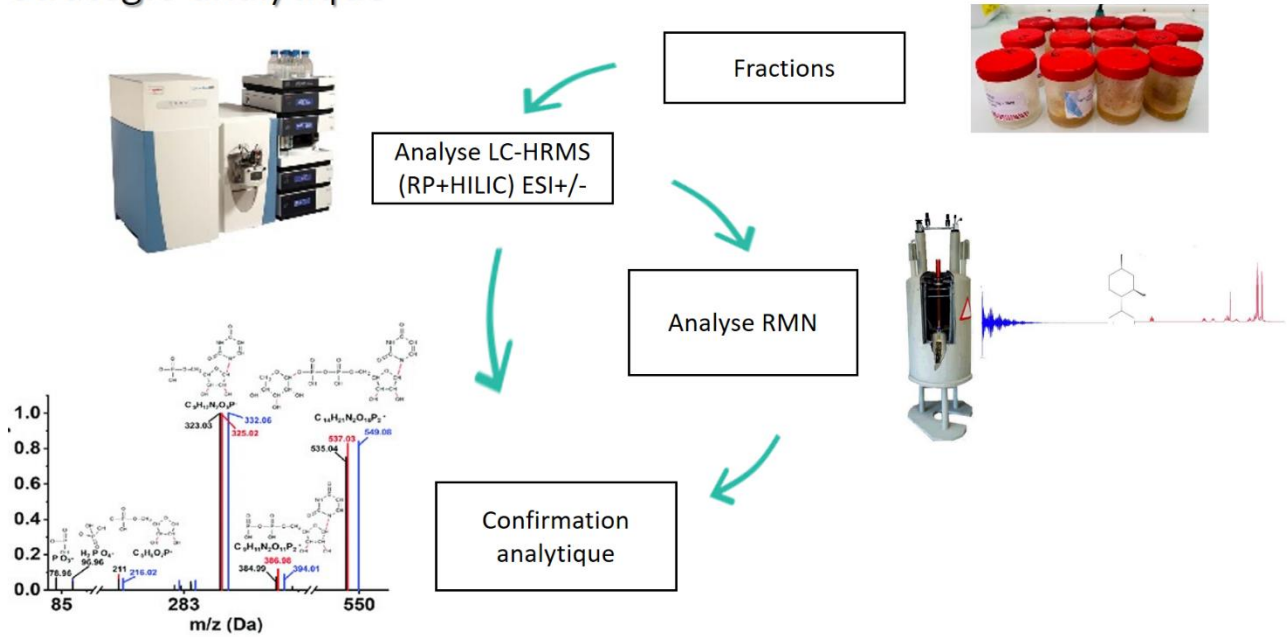
L'objectif du projet Exobio est d'étudier les relations allélopathiques entre *Lagarosiphon major* et la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa*. Ce projet a pour but de mieux comprendre les mécanismes d'action des composés allélopathiques et de contribuer à la mise au point de stratégies de contrôle biologique pour lutter contre les proliférations de cyanobactéries. Pour atteindre cet objectif, une approche combinée de métabolomique non ciblée et d'évaluation des descripteurs physiologiques a été employée.

Ce rapport de stage se concentre sur les travaux réalisés suite aux études menées par trois précédents stagiaires, Campillo, L. (2021), Maubert, S. (2022), et Juillard, L. (2022), au cours desquelles différentes fractions de l'extrait de *Lagarosiphon major* ont été obtenues et testées sur des souches de cyanobactéries (*Microcystis aeruginosa*) cultivées au laboratoire. Quatre méthodes de fractionnement ont été utilisées, ayant permis d'obtenir 13 fractions au total. Les 13 fractions ont été testées sur les cyanobactéries, et six d'entre elles ont significativement réduit le rendement photosynthétique des cyanobactéries par rapport au témoin.

Les objectifs principaux du stage sont (i) de caractériser le paysage chimique des fractions actives obtenues à partir des extraits de *Lagarosiphon major* et (ii) d'identifier les composés présents dans ces fractions qui pourraient inhiber la croissance des cyanobactéries.

La Figure 1 présente la démarche générale adoptée au cours du stage afin de répondre à ces objectifs. Cette démarche consistait en trois étapes. Tout d'abord, les fractions obtenues à partir de l'extrait de *Lagarosiphon major* étaient analysées par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse à haute résolution (HRMS) avec une source d'ionisation par électrospray en mode positif et négatif. Ensuite, les composés prioritaires issus de l'analyse HRMS, susceptibles d'être responsables de l'activité allélopathique, étaient confirmés analytiquement. Les composés inconnus identifiés lors de l'analyse HRMS étaient analysés par la résonance magnétique nucléaire (RMN). Cependant, en raison d'un manque de temps, nous n'avons pas pu approfondir l'aspect de la RMN, mais nous avons commencé à l'appréhender à travers de comparaison de paysage chimique avec les chromatogrammes UV et HRMS.

# Stratégie analytique



**Figure 1:** Schéma des principales étapes de notre stratégie analytique mises en place au cours de l'étude

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Échantillonnage

Les échantillons de *Lagarosiphon major* ont été collectés dans le lac de Parentis, en Nouvelle Aquitaine, par l'équipe INRAE dans le cadre du projet BECAME. Les plantes ont été récoltées à l'aide d'un râteau depuis une embarcation. Après le prélèvement, les feuilles et les tiges des plantes ont été lavées pour éliminer les invertébrés benthiques et le biofilm, puis séchées à l'étuve à 70°C jusqu'à l'obtention d'un poids stable (1 à 3 jours). Les plantes séchées ont ensuite été broyées à l'aide d'un broyeur à couteaux (RETSCH SM 300).

### 2.2. Extraction et fractionnement

Ces étapes ont été réalisées dans le cadre du stage de Léa Juillard.

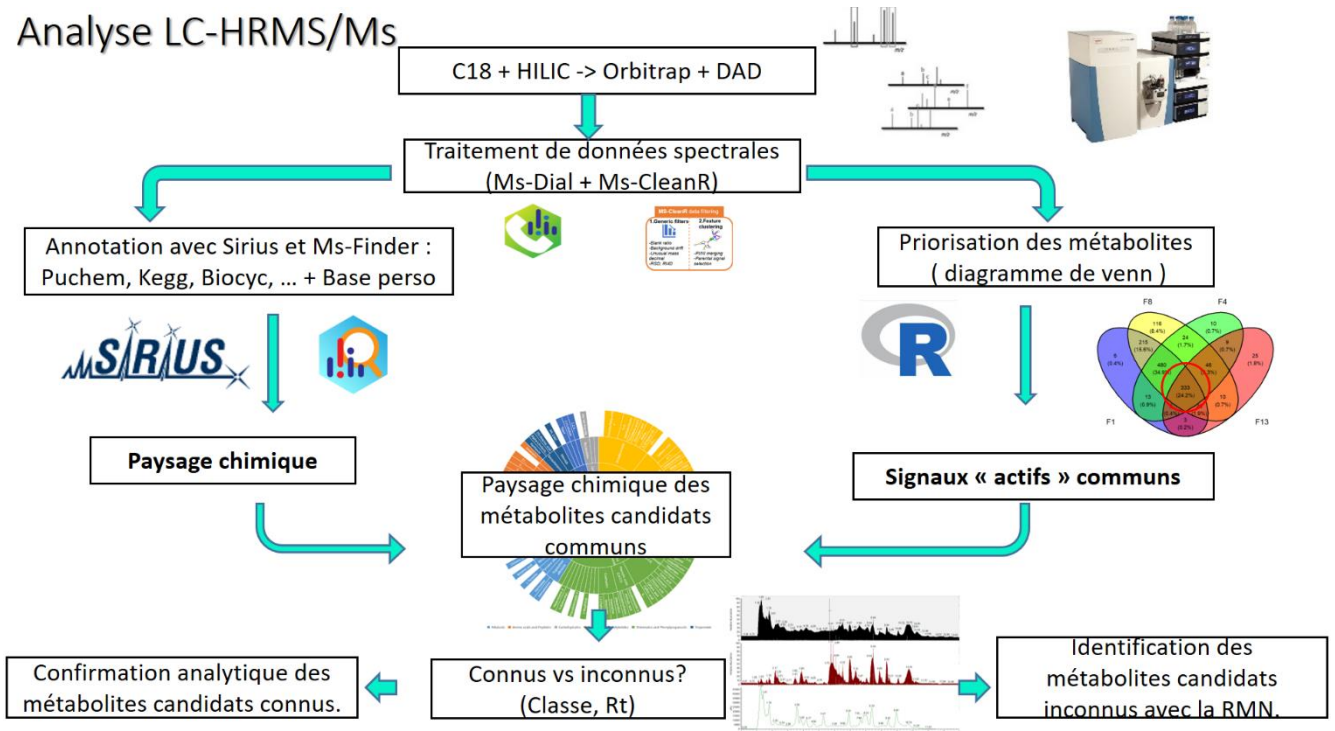
Les protocoles d'extraction en réacteur agité et thermorégulé ont été optimisés pour obtenir un rendement maximal. L'extraction a été réalisée avec de l'éthanol en échelle pilote (1,5L pour *L. major*) pour répondre aux besoins des analyses. Les réacteurs utilisés permettaient d'assurer l'homogénéité du milieu réactionnel en termes de température et de mélange des réactifs.

Après l'extraction, les échantillons ont été filtrés sous pression à l'aide de filtres lenticulaires en profondeur (40µm, 4µm, 0,4µm). Les volumes filtrés ont ensuite été concentrés à l'évaporateur rotatif Heidolph, pour obtenir une concentration finale de 300g/L en équivalent plante sèche. L'extrait obtenu a été caractérisé par des dosages de polyphénols, oses neutres et de saponines. Les saponines sont présentes en quantités significatives avec une concentration globale de 21,56%. Les polyphénols, autre groupe de composés bioactifs d'intérêt, se trouvent en abondance dans les fractions. La teneur globale en polyphénols est de 9,23%. Les flavonoïdes, une sous-catégorie de polyphénols, constituent une part importante de ces derniers, avec une proportion de 53,1% des polyphénols totaux. Par ailleurs, l'analyse a révélé une teneur élevée en oses neutres, qui atteignent environ 66,42%. Ces oses neutres pourraient être dérivés des saponines présentes dans les extraits. Les extraits bruts obtenus ont été aussi fractionnés par plusieurs méthodes : extraction liquide/liquide, ultrafiltration, résine d'adsorption XAD et chromatographie d'exclusion stérique.

**L'extraction liquide/liquide** a été réalisée avec trois solvants de polarités différentes (heptane, acétate d'éthyle et butanol) pour séparer les composés en fonction de leur affinité avec la polarité du solvant. La procédure a été répétée trois fois pour chaque solvant, avec une récupération de la phase organique contenant le solvant et la conservation de la phase aqueuse (résidu). Les fractions obtenues ont été évaporées puis reprises dans un volume de 100mL d'eau pour la caractérisation. Cette méthode a permis d'obtenir quatre fractions nommées F5, F6, F8 et F11.

**L'ultrafiltration** a été réalisée pour séparer les molécules de taille supérieure à 10 000 Da (comme les polysaccharides) des autres composés. L'ultrafiltration a été réalisée en utilisant un système de pompage d'eau pour éviter l'assèchement du réservoir et en recueillant le filtrat une fois qu'environ cinq fois le volume initial avait été obtenu. L'appareil d'ultrafiltration utilisé était équipé d'une pompe péristaltique Masterflex (modèle 7516-00) et d'une membrane VIVAFLOW 50R (modèle MWCO HY). Cette méthode a permis d'obtenir deux fractions nommées F3 et F7.

# Analyse LC-HRMS/Ms



**Figure 2:** Schéma détaillé des principales étapes de notre stratégie analytique en HRMS mises en place au cours de l'étude.

**La résine Amberlite XAD4** a été utilisée pour adsorber les composés hydrophobes, tels que les polyphénols, présents dans les extraits de plantes aquatiques. Après avoir lavé la résine, 10 g de résine ont été ajoutés à 100 mL d'extrait et agités pendant 27 heures. Des aliquotes ont été prélevées à différents moments pour vérifier la diminution de la quantité de polyphénols au fil de l'adsorption. La résine a ensuite été filtrée et mélangée à 100 mL d'éthanol pour désorber les molécules hydrophobes. Cette méthode a permis d'obtenir trois fractions nommées F2, F4 et F12.

**La chromatographie d'exclusion stérique** a été réalisée en utilisant la résine Sephadex LH 20 pour séparer les constituants du mélange par taille moléculaire décroissante. Après avoir gonflé la résine dans un excès d'éthanol à 66 % pendant environ 3 heures, la résine a été ajoutée à la colonne chromatographique et l'éthanol à 66 % a été éliminé pour tasser la résine. L'extrait à analyser a été évaporé puis repris dans un petit volume d'éthanol à 66 % (environ 5 mL) pour être déposé en tête de colonne. Environ 30 à 40 fractions ont été collectées et analysées par chromatographie sur couche mince (CCM) et spectrophotométrie pour regrouper le maximum de fractions avant de réaliser les dosages. Cette méthode a permis d'obtenir quatre fractions nommées F1, F9, F10 et F13.

Les fractions et leur méthode de purification ainsi leur quantité de matière sont résumés dans le tableau en Annexe I

## **2.3. Analyse métabolomique non ciblée des Fractions en HRMS**

### **2.3.1. Stratégie analytique**

Dans l'étude décrite à la Figure 2, nous avons analysé 13 échantillons par UHPLC-HRMS/MS en utilisant deux types de colonnes chromatographiques pour une meilleure séparation des composés. Les données brutes étaient traitées avec MS-DIAL pour la détection et l'alignement des pics, puis nettoyées avec MS-CleanR. Une annotation préliminaire des métabolites était réalisée en utilisant trois outils complémentaires : MS-DIAL, MS-Finder et SIRIUS 5, ce qui nous permettait une exploration complète du métabolome. Ensuite, nous analysons le paysage chimique de nos fractions actives, priorisons les composés pour l'identification des métabolites candidats actifs à l'aide des diagrammes de Venn et de rayon en soleil, et confirmons leur structure avec la méthode HRMS à temps de vol (TOF). Parallèlement, nous identifions les composés inconnus par RMN.

### **2.3.2. Analyse UPLC-HRMS**

L'analyse métabolomique non-ciblée a été réalisée à l'aide d'un système de chromatographie liquide à ultra haute pression (UHPLC) Ultimate 3000 couplé à un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap Elite équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI) (ThermoScientific, Brême, Allemagne) et à un détecteur à barrette diode (DAD) pour l'acquisition de spectre UV (190-800 nm). Le système était contrôlé par le logiciel Thermo XCalibur.

Pour ce faire, les échantillons ont été dilués en mélangeant 100  $\mu$ L de chaque fraction avec 100  $\mu$ L d'acétonitrile (ACN, qualité UHPLC, Biosolve) puis placés dans des vials de 1 mL. En parallèle des 13 fractions, des blancs d'analyse composés d'un mélange eau ultrapure (EUP, qualité UHPLC, Biosolve) : ACN (50:50, v/v) ont été préparés, ainsi que des échantillons de contrôle qualité (QC) obtenus en combinant 20  $\mu$ L de chaque fraction. Ces QC ont été disposés en début de séquence d'analyse pour conditionner le système puis tous les 5 échantillons afin de corriger les dérives d'intensité du signal et de temps de rétention. Le volume d'injection était de 2.5  $\mu$ L.



Deux méthodes de chromatographie liquide distinctes ont été employées pour la séparation des composés des échantillons. La séparation en phase inverse C18 pour mieux séparer les composés semi-polaires et apolaires et la séparation HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) pour séparer les composés très hydrophiles.

La séparation chromatographique en phase inverse a été effectuée à l'aide d'une colonne GEMINI UHPLC C18 (Phenomenex, LePeq, France), qui est une colonne spécifique utilisée pour la chromatographie en phase liquide à haute performance (UHPLC). Cette colonne a une dimension de 150 x 2 mm et est constituée de particules de 3 µm. La séparation a été réalisée à 35°C avec une phase mobile composée de deux éluants, l'eau ultrapure acidifiée avec de l'acide formique (0,1 %) (voie A), et l'acétonitrile acidifiée avec de l'acide formique (0,1 %) (voie B). L'élution a été réalisée à un débit de 0,35 mL/min selon le gradient suivant: initialement, 97 % de A pendant 0.5 min, puis la phase aqueuse diminue à 90 % A en 0.5 min, à 50 % A en 8 min et à 0 % A en 4 min où elle a été maintenue pendant 1 min. Enfin, une étape de rééquilibrage a été réalisée en passant de 0 % A à des conditions initiales de 95 % A en 0.5 min. Ces conditions initiales ont été conservées pendant 3 minutes. La durée totale de cette phase était de 18 min.

La séparation en HILIC a été effectuée à l'aide d'une colonne de type SeQuant® ZIC-cHILIC pour la séparation des analytes très hydrophiles. La colonne possède des dimensions de 150 mm de longueur et 2,1 mm de diamètre interne. La taille des particules du sorbant est de 5 µm et la taille des pores est de 100 Å. La séparation a été réalisée à une température de 40°C et un débit de 0,35 mL/min, avec une phase mobile composée de deux solvants, l'acétonitrile (voie A) et de l'eau ultrapure + 5% ammonium acétate (voie B). L'élution en gradient optimisée a été réalisée comme suit : initialement, 15 % de A, puis la phase aqueuse a augmenté à 75 % A en 16 min où elle a été maintenue pendant 2 min. Enfin, la phase aqueuse a baissé à 15 % A pour revenir à des conditions initiales en 0.5 min. Ces conditions initiales ont été conservées pendant 6.5 minutes, la durée totale de l'expérience étant de 27 minutes. Pour cette partie, seules les quatre fractions les plus actives ont été analysées afin d'identifier les composés qui n'ont pas pu l'être en phase inverse et augmenter nos chances d'isoler les composés susceptibles d'être responsables de la diminution du rendement photosynthétique des cyanobactéries.

L'acquisition des données en spectrométrie de masse a été effectuée en mode ESI- et ESI+ avec les paramètres de sources qui sont présentés dans le Tableau 1 ANNEXE II.

La détection des ions a été réalisée en mode « data dependant acquisition – top 5 » consistant en un balayage complet (50-1500 m/z) à résolution de 30000 (FWHM) (i.e. MS1), suivit de la fragmentation des 5 ions les plus abondants par scan et d'une acquisition en full HRMS (50-1500 m/z) sur les fragments obtenus à une résolution de 17500 (FWHM) (i.e. MS2). Le LTQ-Orbitrap a été préalablement calibré en utilisant des solutions de calibrage adaptées au mode d'ionisation.

### **2.3.3 Traitement des données**

Dans cette étude, nous avons traité les données brutes UHPLC-HRMS/MS de 13 échantillons en utilisant le logiciel MS-DIAL (<http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html>) pour la détection et l'alignement des pics. Les paramètres utilisés la détection et l'alignement des pics sont représentés dans la partie ANNEXE II tableau 2.

Les pics de tous les échantillons ont été alignés avec un QC avec seuil de tolérance pour la masse et le temps de rétention qui sont respectivement  $\pm 0,025$  Da et  $\pm 0,25$  min. Ensuite les





données ont été normalisées par la méthode de Lowess (locally weighted scatterplot smoothing) sur MS-Dial pour éliminer et réduire les variations systématiques entre les échantillons lors de l'analyse des données de spectrométrie de masse. La normalisation Lowess est basée sur une méthode de régression non paramétrique locale, qui tient compte des variations locales de l'intensité des signaux pour lisser les données et corriger les biais liés à l'échantillon et l'instrument.

En plus des 13 fractions analysées sur colonne C18, les données brutes UHPLC-HRMS/MS des quatre fractions les plus actives analysées en HILIC ont également été traitées avec le logiciel MS-Dial, en suivant les mêmes paramètres de collecte des pics, de détection et de tolérance que pour les fractions en colonne C18.

Après la détection et l'alignement des pics, un autre outil appelé MS-CleanR (<https://github.com/eMetaboHUB/MS-CleanR>) a été utilisé pour « nettoyer » les données selon différents filtres. Ces filtres incluent la soustraction du signal d'injection à blanc, l'élimination de la dérive des ions de fond, le filtrage des défauts de masse inhabituels, le seuil d'écart type relatif (RSD) basé sur la classe d'échantillon et le filtrage de la fenêtre des défauts de masse relative (RMD). Les paramètres utilisés pour nettoyer les données sont représentés dans la partie ANNEXE II Tableau 3

### 2.3.4 Annotation

Pour l'annotation des données UPLC-HRMS/MS, trois logiciels complémentaires ont été utilisés : MS-DIAL ; MS-Finder (<http://prime.psc.riken.jp/compms/msfinder/main.html>) et SIRIUS 5 (<https://boecker-lab.github.io/docs.sirius.github.io/>). Chacun de ces outils présente des spécificités pour l'analyse et l'interprétation des données de spectrométrie de masse, permettant une annotation préliminaire des métabolites présents dans les échantillons à partir des données de MS2.

**MS-DIAL** peut annoter les pics avec une recherche de correspondance de bibliothèque avec une tolérance et de temps de rétention en utilisant une base de données contenant les données MSP.

**MS-Finder**, quant à lui, est un outil d'annotation qui utilise un fragmenteur *in silico* pour générer des spectres théoriques basés sur la fragmentation des molécules. Les structures candidates sont classées en fonction de leur correspondance avec les données spectrales expérimentales et les données de référence des bases de données spectrales. Les paramètres de tolérance de masse et d'abondance relative permettent de contrôler la précision de l'appariement des fragments expérimentaux et théoriques. La tolérance de masse utilisé sur MsFinder est aussi de 5ppm. Les paramètres d'annotation avec MS-Finder sont décrits dans la section ANNEXE III pour plus de détail.

**SIRIUS 5** est un logiciel conçu pour analyser les métabolites à partir des données de spectrométrie de masse en tandem (MS et MS2). Il combine l'analyse des modèles d'isotopes dans les spectres MS avec l'analyse des modèles de fragmentation dans les spectres MS2. Sirius intègre plusieurs modules pour optimiser l'annotation et l'identification des métabolites, tels que ZODIAC, CSI:FingerID et CANOPUS. Le logiciel utilise des bases de données en ligne pour annoter les formules moléculaires et les structures, avec des paramètres personnalisables pour l'analyse, tels que la précision de masse MS2.

Le module **ZODIAC** améliore le classement des formules candidates en tenant compte des fragments et des pertes de conjoints entre les arbres de fragmentation de différents composés



dans l'ensemble des données. Le module **CSI:FingerID** basé sur du *machine learning* identifie la structure d'un composé en effectuant une recherche dans une base de données de structure moléculaire. Le score de confiance **COSMIC** attribue une confiance aux identifications de structure CSI:FingerID, facilitant l'interprétation des données en identifiant d'abord les composés les plus sûrs de l'échantillon. Le module **CANOPUS** prédit les classes de composés à partir de l'empreinte moléculaire sans aucune recherche dans la base de données, fournissant ainsi des informations structurales pour les composés pour lesquels aucune donnée de référence spectrale ou structurale n'est disponible.

Ainsi les annotations ont été réalisées à l'échelle de la classe métabolomique et de la structure (nom candidat) avec chacun des scores de confiance. L'annotation des voies métaboliques (NPC-Pathway), des superclasses (NPC-Superclass) et des classes (NPC-Class) a été réalisée à l'aide de NPClassifier du module **CANOPUS**, un outil basé sur l'apprentissage profond qui permet une classification structurale automatisée des produits naturels à partir de leurs empreintes digitales (Kim et al., 2021). Pour l'annotation de la structure, des bases de données en ligne ont été utilisées telles que PubChem, COCONUT, HMDB, KEGG, GNPS, MoNA, etc. sur Sirius et Ms-Finder, et une base de données personnelles contenant des métabolites associés à allélopathie, pour comparer les spectres expérimentaux aux spectres de référence sur Sirius. Lors de l'analyse des données avec SIRIUS, j'ai utilisé une précision de masse MS2 de 5 ppm pour assurer une identification précise des métabolites. Les paramètres d'annotation avec Sirius sont décrits dans la section ANNEXE III pour plus de détail.

De manière globale, les scores attribués aux annotations réalisées avec Sirius et MS-Finder sont basés sur la probabilité des formules et des structures candidates et sur la qualité de la correspondance entre les spectres expérimentaux et théoriques. Les scores de confiance aident à identifier les composés les plus sûrs de l'échantillon et à prioriser les résultats pour une interprétation plus rapide et plus précise.

Les bases de données en ligne utilisées et les liens vers ces bases de données et ma base de données avec les composés et leur références bibliographique sont représentés dans la section ANNEXE III).

### **2.3.5. Définition du paysage chimique avec le *violin plot***

La stratégie analytique que nous avons adoptée vise d'abord à définir le paysage chimique de nos fractions actives en utilisant une approche multivariée. Dans ce contexte, nous avons mis en œuvre une analyse basée sur les voies métaboliques (NPC-Pathway) et les superclasses (NPC-Superclass) avec l'utilisation de diagrammes de violon pour visualiser la distribution des intensités de signaux au sein de ces entités en fonction du temps de rétention. Nous avons utilisé le package "ggplot2" dans R pour générer des diagrammes de violon. Ces diagrammes nous permettent de visualiser et de comprendre la distribution des signaux pour chaque voie métabolique et superclasse en fonction du temps de rétention.

Pour assurer la qualité et la pertinence de nos données, nous avons filtré les NPC-Pathway et NPC-Superclass avec un score inférieur à 0.5 et nous avons fusionner les signaux en ESI- et l'ESI+. Cette stratégie nous a permis d'avoir un aperçu riche et détaillé du paysage chimique de nos fractions actives, facilitant ainsi la compréhension de leur complexité et l'identification de métabolites clés potentiels.

### **2.3.6. Identification des métabolites actives candidates avec le diagramme de Venn et le diagramme de rayon en soleil.**

Pour identifier les composés susceptibles de présenter des activités allélopathiques dans les



fractions actives, nous avons émis l'hypothèse que les composés qui se trouvent dans différentes fractions actives obtenues par différentes méthodes de purification pourraient être des composés bioactifs. L'idée sous-jacente à ce postulat repose sur le fait que nous pensons que les méthodes de fractionnement ne se sont pas forcément révélées optimales et que la détection d'un composé dans plusieurs des fractions produites pourrait suggérer son importance et son éventuelle activité biologique (ce point est abordé dans la section « Discussion »). Cette priorisation a été couplée avec les informations issues de la littérature scientifique (par exemple, les structures chimiques connues pour leurs propriétés allélopathiques), pour nous aider à dresser une liste finale de molécules candidates.

Il convient de noter que cette hypothèse guide notre stratégie analytique et tous les composés identifiés grâce à cette approche devront faire l'objet de tests supplémentaires sur des souches de cyanobactéries pour vérifier leur activité allélopathique potentielle.

Pour identifier les composés présents dans plusieurs fractions actives, nous avons utilisé un diagramme de Venn permettant de visualiser les relations entre les différentes fractions en utilisant le package ggvenn.

Pour mieux comprendre la diversité et la complexité des composés identifiés dans les fractions actives, nous avons d'abord fusionné les signaux annotés par Sirius et Ms-Finder. En effet, certains composés qui n'étaient ni annotés ni classés par Sirius (représentés par des NA) ont été annotés par Ms-Finder. Par la suite, nous avons également utilisé un diagramme de rayon de soleil réalisé à l'aide d'Excel. Ce diagramme, qui illustre différentes voies métaboliques, superclasses et noms spécifiques des composés, nous a permis de visualiser les interactions et les relations entre ces différentes entités.

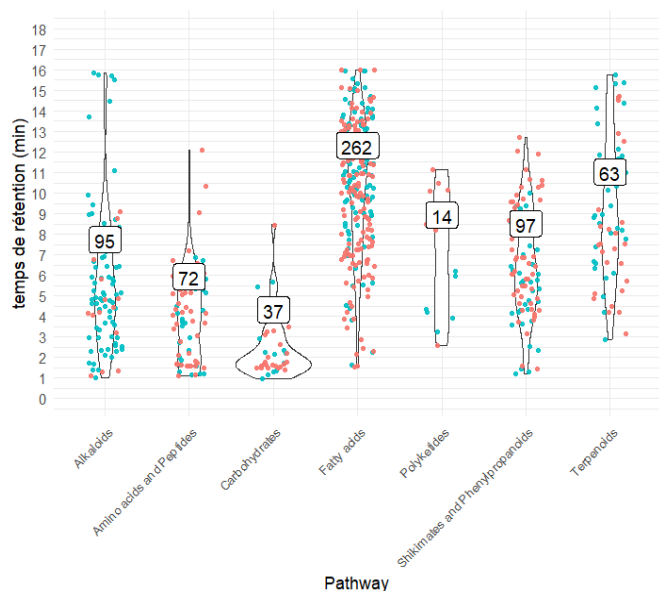
La sélection finale des molécules candidates a été réalisée en prenant en compte leur présence dans plusieurs fractions actives et leur correspondance avec notre base de données, qui contient des composés identifiés dans la littérature scientifique comme ayant un potentiel allélopathique.

### **2.6.7. Confirmation structurale des candidats**

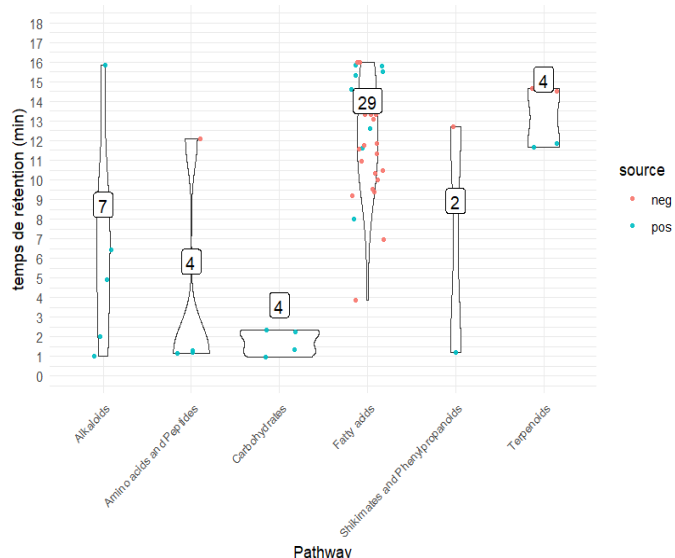
Pour la confirmation analytique des composés priorisés — les standards analytiques ont été commandés et injectés en parallèle des fractions sur un système UPLC couplé à un système HRMS à temps de vol (TOF). La méthodologie employée pour cette analyse se base sur la comparaison des profils de masses, de fragmentation et des temps de rétention de chaque composé dans les échantillons par rapport à ceux de leurs standards respectifs.

L'acquisition des données a été réalisée en mode MSe, qui consiste en l'acquisition d'un spectre de masse total (full scan) sur une plage de 50 à 1500 m/z, couplée à une fragmentation en collision à basse (6V) et haute énergie (rampe de 10 à 40V). Cette approche, appelée All Ion Fragmentation (AIF), permet la fragmentation de tous les ions, indépendamment de leur précurseur. Cependant, l'utilisation des algorithmes de déconvolution fournis par MS-DIAL permet de générer un signal en MS1 (à partir de la fragmentation basse énergie) et un signal en MS2 (à partir de la fragmentation haute énergie).

Chaque standard a été analysé individuellement, permettant d'identifier l'ion de masse correspondant à  $[M-H]^-$  et  $[M-H]^+$  dans le spectre MS1 et les fragments caractéristiques dans le spectre MS2. Par ailleurs, le temps de rétention correspondant a également été enregistré pour chaque standard. La même procédure a été appliquée à l'analyse des échantillons de

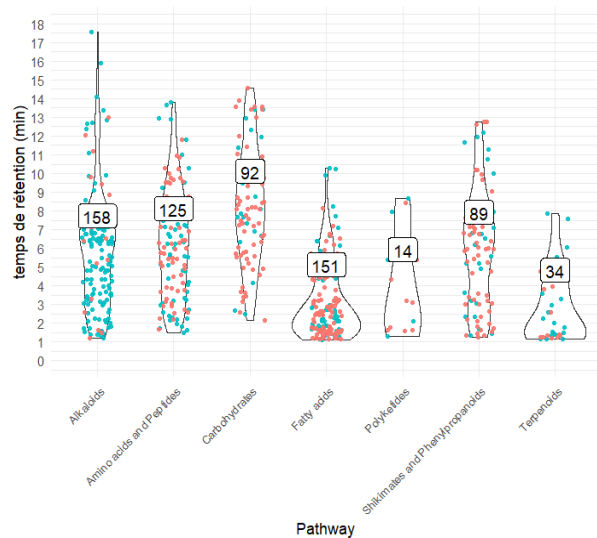


a.

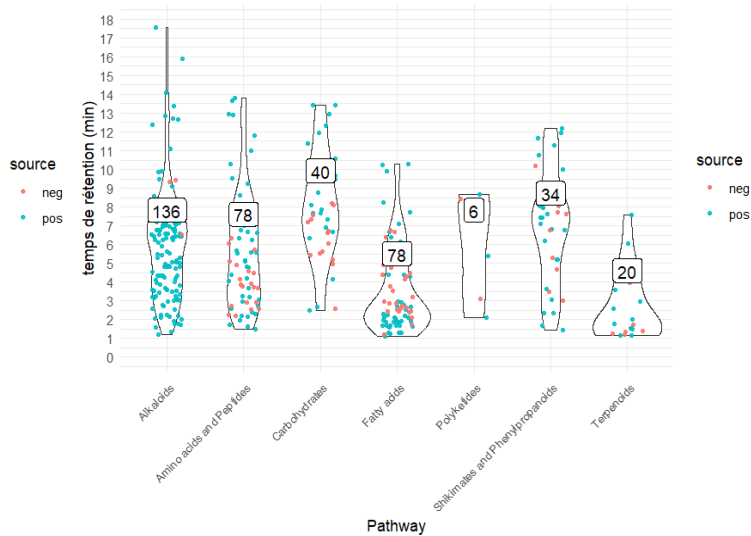


b.

Figure 3: Distribution de l'intensité des signaux selon le temps de rétention au sein des voies métaboliques dans les fractions actives F8 (a) et F12 (b) après séparation chromatographique en phase inverse (colonne C18). Les résultats sont présentés sous la forme de *violin plot* où chaque point représente un signal (en rouge, ESI-, en bleu, ESI+).



a.



b.

Figure 4: Distribution de l'intensité des signaux selon le temps de rétention au sein des voies métaboliques dans les fractions actives F8 (a) et F12 (b) après séparation chromatographique à interaction hydrophile (colonne HILIC). Les résultats sont présentés sous la forme de *violin plot* où chaque point représente un signal (en rouge, ESI-, en bleu, ESI+).

### **2.6.8. Stratégie de Préparation pour l'Analyse RMN: Comparaison du Paysage Chimique des Composés Inconnus avec les Chromatogrammes UV et HRMS**

Dans le cadre de notre stratégie préparatoire pour l'analyse par RMN, nous avons comparé la distribution des signaux inconnus en fonction du temps de rétention dans des fractions actives spécifiques avec leurs chromatogrammes UV et HRMS respectifs. Cette démarche vise à identifier les plages de temps de rétention qui pourraient être les plus enrichies en composés inconnus potentiellement intéressants. Deux fractions ont été choisies pour cette analyse : la fraction F8, sélectionnée pour son activité élevée, et la fraction F13, choisie pour son activité et sa moindre quantité de matière. Cette stratégie permet d'affiner notre approche de fractionnement en LC-Semi-Préparative en vue de l'analyse par RMN, ciblant les intervalles de temps où les composés inconnus sont le plus susceptibles d'être présents.

## **3. RESULTATS :**

### **3.1. Paysage chimique des fractions actives en C18 et en HILIC à l'échelle des voies métaboliques**

L'analyse du paysage chimique des fractions des fractions les plus active après séparation en phase inverse et en HILIC met en lumière de multiple voie métaboliques comme illustré en Figure 1 et 2 pour F8 et F12 et en ANNEXE IV pour F1, F4 et F13.

L'utilisation de la colonne C18, optimisée pour la séparation des composés semi-polaires et non polaires, a révélé une riche composition chimique pour les fractions F1, F8, F4 et F13. Plus précisément, la fraction F8, qui s'est révélée la plus active, a généré 640 signaux, avec une dominance d'acides gras (262 signaux), de shikimates et phénylpropanoïdes (97 signaux), et d'alcaloïdes (95 signaux), comme illustré dans la Figure 1a. De même, les fractions F1, F4 et F13 ont montré respectivement 566, 471 et 205 signaux, avec une prédominance d'acides gras, de shikimates et phénylpropanoïdes, et d'alcaloïdes (voir le figure 1, 2 et 3 de l'ANNEXE IV pour plus de détails). La fraction F12, bien que présentant moins de signaux (50 signaux au total) sur la colonne C18, montre néanmoins une présence notable d'acides gras (29 signaux) (Figure 3b).

L'analyse par colonne HILIC, spécifiquement adaptée pour la séparation des composés très hydrophiles, a permis d'observer une tendance distincte. En effet, la fraction F12, qui était moins diversifiée en termes de signaux sur la colonne C18, a montré une grande richesse en signaux sur la colonne HILIC, au total 479 (Figure 3b). Cela indique une présence significative de composés très hydrophiles dans cette fraction. Les alcaloïdes, acides aminés et peptides, acides gras, shikimates, phénylpropanoïdes et glucides sont bien représentés. La fractions F8, déjà riche en signaux sur la colonne C18, a également montré un grand nombre de signaux sur la colonne HILIC (762) avec une dominance des mêmes voies métaboliques (Figure 4a). En outre, les fractions F1 et F13 ont également montré une diversité importante de signaux sur la colonne HILIC, avec respectivement 663et 171 signaux, témoignant de leur composition riche en composés à la fois polaires et non polaires (voir le figure 4 et 5 de l'ANNEXE IV pour plus de détails).



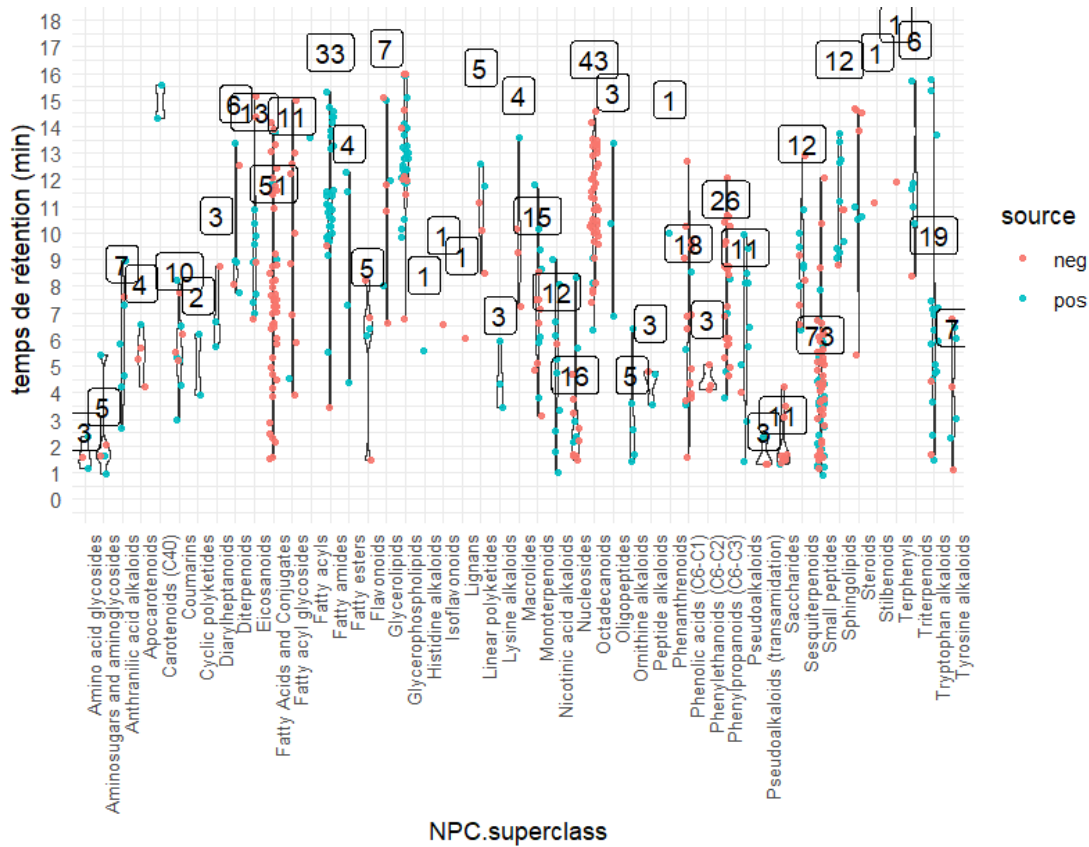


Figure 5: Distribution de l'intensité des signaux selon le temps de rétention au sein des superclasses dans la fraction actives F8 après séparation chromatographique en phase inverse (colonne C18). Les résultats sont présentés sous la forme de *violin plot* où chaque point représente un signal (en rouge, ESI-, en bleu, ESI+).

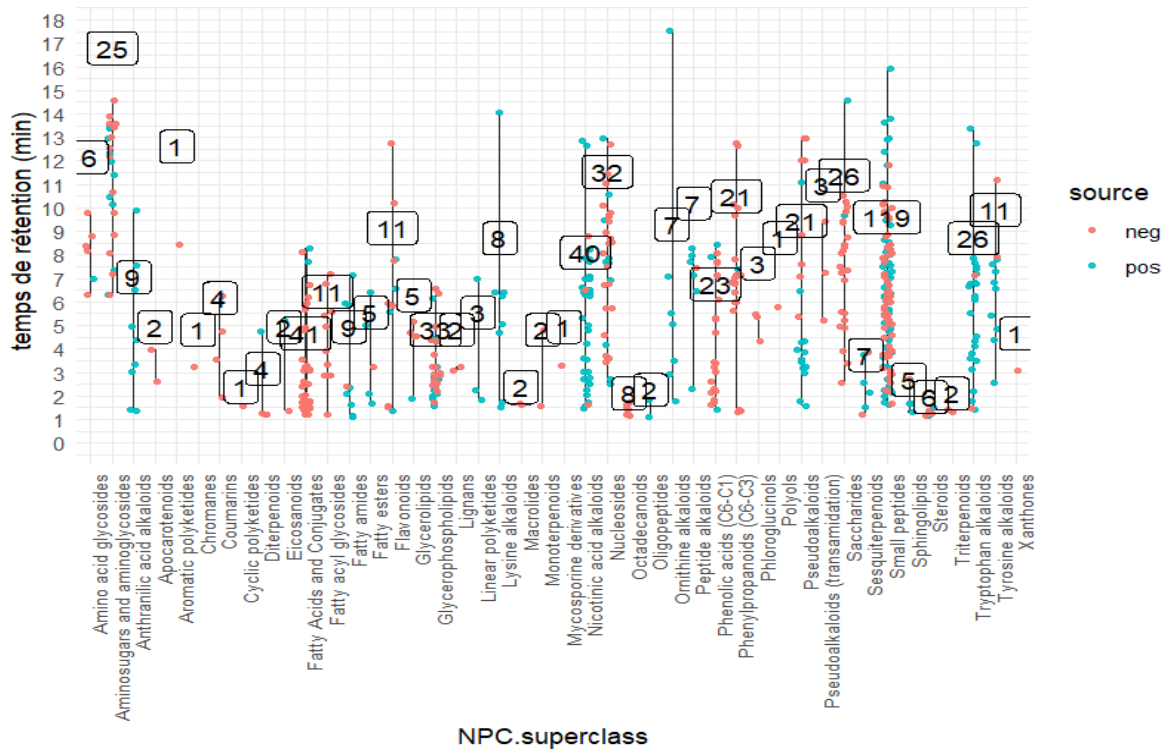


Figure 6: Distribution de l'intensité des signaux selon le temps de rétention au sein des voies superclasses dans la fractions actives F8 après séparation chromatographique à interaction hydrophile (colonne HILIC). Les résultats sont présentés sous la forme de *violin plot* où chaque point représente un signal (en rouge, ESI-, en bleu, ESI+).

### **3.2. Paysage Chimique des fractions actives en C18 et en HILIC à l'échelle de la superclasse**

Pour affiner l'analyse de notre paysage chimique, nous avons étudié les superclasses de nos fractions actives. Nous avons identifié plusieurs superclasses de métabolites prédominantes dans les fractions actives analysées par C18 et HILIC. Celles-ci comprennent les acides phénoliques, les phényléthanoïdes (C6-C2), les phénylpropanoïdes (C6-C3), les pseudoalcaloïdes et alcaloïdes de tryptophane, les acides octadécanoïdes, les petits peptides, les glycérophospholipides, les aminosucres et aminoglycosides, et les acides gras et leurs dérivés ((Figure 5, Figure 6). Ces superclasses sont connues pour regrouper des composés secondaires liés à l'allélopathie.

Dans les fractions F1, F8 et F4 analysées par C18, nous avons observé une dominance des acides gras et leurs dérivés, de l'acide octadécanoïque, des composés phénoliques et des petits peptides (Figure 5 et Figures 1 et 2 de l'ANNEXE V). En particulier, la fraction F8, qui est la plus active, présente 51 signaux d'acides gras et leurs conjugués, 33 signaux de amides gras, 43 signaux d'acides octadécanoïques, 26 signaux de phénylpropanoïdes et 76 signaux de petits peptides. Dans la fraction F13 seulement deux superclasses sont bien représentés, les acides gras et leurs dérivés ainsi que les acides phénoliques qui comptent respectivement 23 signaux et 28 signaux (Figure 4 en ANNEXE V).

Pour les fractions actives analysées en HILIC, nous avons noté une prédominance similaire, avec en outre une présence notable de nicotine et d'alcaloïdes, de nucléosides, d'acides phénoliques, d'alcaloïdes, de tryptophane et de glycérophospholipides (Figure 6 et Figures 1 et 2 de l'ANNEXE V). Par exemple, la fraction F8 compte 23 signaux d'acides phénoliques, 40 signaux d'alcaloïdes de tryptophane, 21 signaux de pseudo-alcaloïdes, 32 signaux de nucléosides et 33 signaux de glycérophospholipides.

### **3.3. Priorisation et sélection des métabolites cibles pour les fractions actives**

Dans cette partie du travail, nous nous sommes concentré sur la priorisation des signaux à annoter au sein des fractions actives, afin d'identifier les composés susceptibles de manifester des activités allélopathiques. Conformément à ce qui a été explicité dans la partie "matériel et méthodes", nous avons formulé l'hypothèse que les composés communs aux fractions actives issues de différentes méthodes de purification pourraient avoir une plus grande probabilité d'être des composés actifs.

Nous avons tout d'abord privilégié les fractions actives F1, F8 et F13 en C18, ainsi que la fraction F4, qui a été obtenue avec une méthode permettant d'isoler uniquement des composés hydrophobes. Nous avons également examiné les fractions F1, F8, F12 et F13 en mode HILIC. Dans ce cas, nous avons opté pour la F12, qui a été obtenue avec la même méthode que la F4 mais a subi une adsorption, ce qui signifie qu'elle contient des composés hydrophiles. Toutefois, la description détaillée du profil chimique des composés communs aux fractions actives, analysés en mode HILIC, n'est pas présentée dans cette partie des résultats. Vous trouverez des informations détaillées sur ces résultats dans la section ANNEXE VI.

Pour prioriser les composés, nous avons construit un diagramme de Venn en mode C18 et en HILIC, permettant d'identifier les composés partagés entre ces fractions, basé sur leur intensité de signal. Le diagramme de Venn a révélé l'existence de 333 composés communs en C18 (Figure 7) et 142 composés communs en mode HILIC (ANNEXE VI).

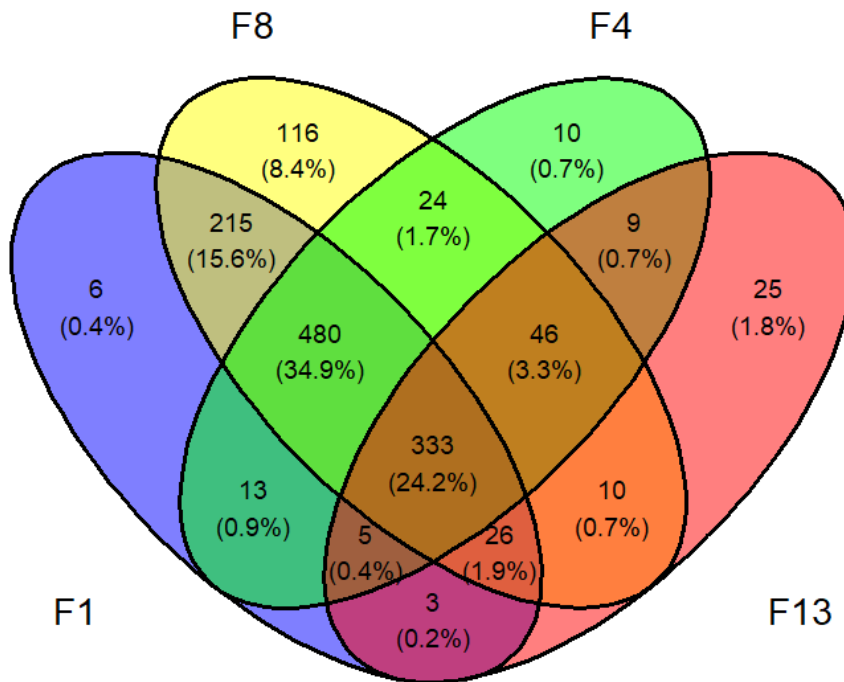


Figure 7 : Diagramme de Venn illustrant les métabolites communs identifiés au sein des fractions actives F1, F8, F4 et F13 en modes C18. La présence ou absence d'un composé dans une fraction a été définis en en fonction de son intensité de signal.

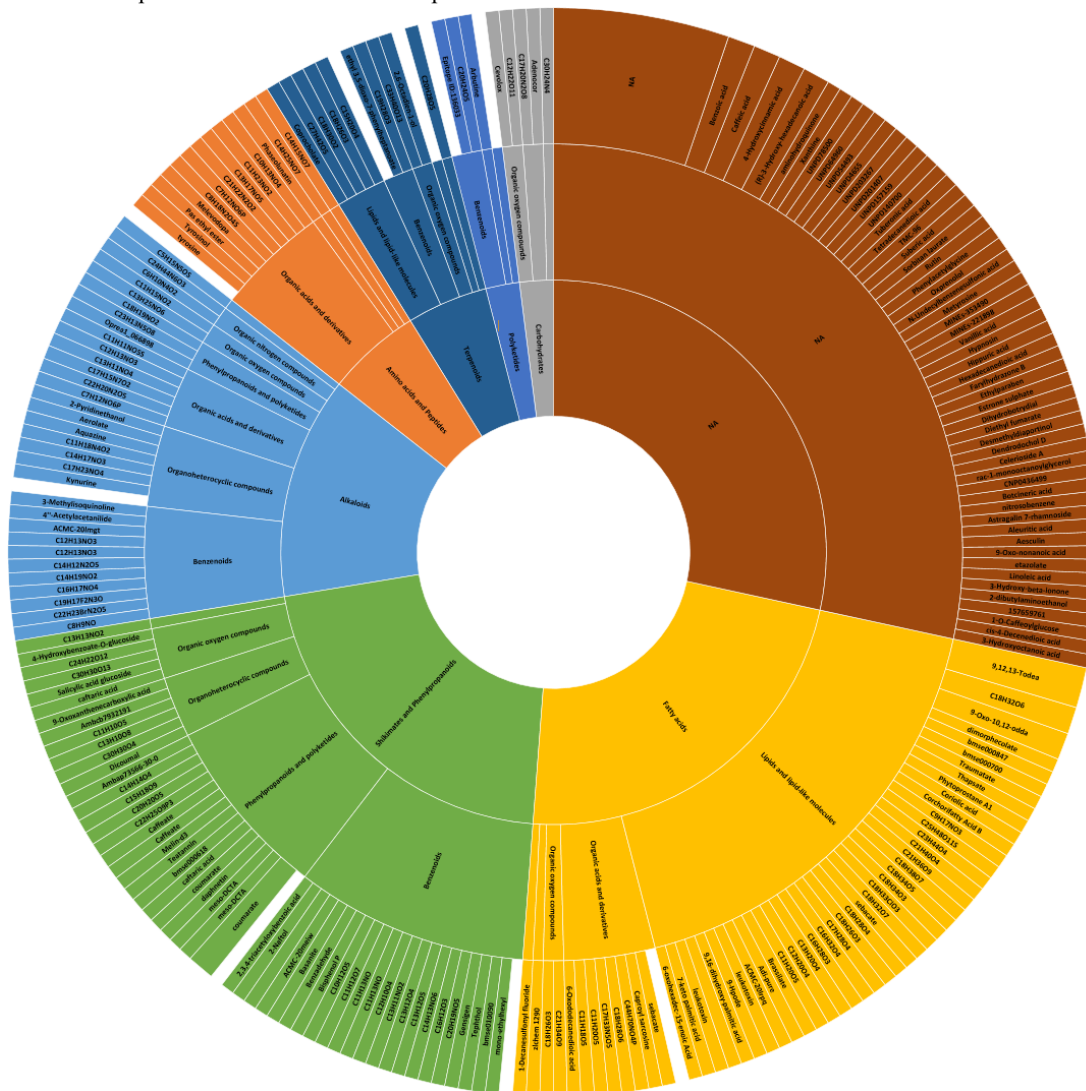


Figure 8 : Diagramme en rayon de soleil détaillant le profil chimique des métabolites communs identifiés dans les fractions actives en C18. 1<sup>er</sup> cercle représente les voies métabolomique, 2eme cercle représente les superclasses et le 3eme cercle représente les composés spécifique

Afin de mieux caractériser le profil chimique de ces composés communs, nous avons construit un diagramme de rayon en soleil permettant de visualiser le paysage chimique des composés communs aux fractions actives (Figure 8). Le premier cercle représente les voies métaboliques, le deuxième cercle représente les superclasses et le troisième représente les composés spécifiques. Ce diagramme révèle une grande diversité chimique des composés communs aux fractions actives et met en évidence la présence notable de plusieurs voies métaboliques et superclasses connues pour abriter des composés associés à l'allélopathie. Par exemple, la voie métabolique des phénylpropanoïdes est particulièrement représentée, tout comme la superclasse des composés phénoliques. De plus, les benzoides, une superclasse largement reconnue pour son potentiel allélopathique, occupent une proportion significative du diagramme (voir Figure 8)

Suite à cette analyse, nous avons identifié trois composés comme prioritaires : L'acide caféique et l'acide coumarique appartiennent aux voies métaboliques des shikimates et des phénylpropanoïdes et à la superclasse des phénylpropanoïdes et l'acide vanillique qui appartient à la superclasse des composés phénoliques (Figure 8). Les temps de rétention, les différences de masse, scores de similarité, les classifications et d'autres détails spécifiques pour ces composés relevés dans SIRIUS et MS-FINDER sont résumés dans le tableau en Annexe VII

### 3.4. Confirmation analytique des composés cibles

La confirmation des composés a été obtenue par comparaison des profils de spectres MS1 et MS2 des échantillons avec ceux des standards correspondants.

L'analyse des spectres MS1 a permis de caractériser précisément chaque standard. L'acide coumarique a présenté un ion  $[M-H]^-$  à  $m/z = 163.040$  (Figure 9), l'acide caféique à  $m/z = 179.035$  (ANNEXE VIII Figure 1) et l'acide vanillique à  $m/z = 167.035$  avec des précisions de masse qui sont inférieures à 5 ppm. Ces valeurs correspondent aux masses moléculaires attendues pour ces composés, confirmant ainsi la précision de la mesure. De même, les temps de rétention (Rt) de chaque standard ont été précisément mesurés, avec des valeurs de 8.96 minutes pour l'acide coumarique, 8.34 minutes (Figure 9) pour l'acide caféique et 8.42 minutes (ANNEXE VIII Figure 1) pour l'acide vanillique. Cette correspondance a été renforcée par l'observation des fragments caractéristiques dans les spectres MS2. Les fragments obtenus pour l'acide coumarique standard étaient  $m/z=135.0460$  Da,  $m/z=119.0495$  Da et  $m/z=117.0327$ , avec des écarts de masse inférieurs à 1.9 ppm (Figure 10). Pour l'acide caféique, les fragments étaient  $m/z=137.0243$  Da,  $m/z=135.0440$  Da,  $m/z=134.0376$  Da et  $m/z=133.0291$  Da, avec des écarts de masse inférieurs à 1.2 ppm. Pour l'acide vanillique, les fragments étaient  $m/z=166.0266$  Da,  $m/z=152.0101$  Da,  $m/z=108.0218$  Da et  $m/z=102.0104$  Da, avec des écarts de masse inférieurs à 1.4 ppm (ANNEXE VIII Figure 2)

En comparant les masses et les temps de rétention des standards avec ceux de nos échantillons, nous avons observé une correspondance pour l'acide coumarique et l'acide caféique.

Pour l'acide coumarique, des signaux ont été identifiés dans les fractions F1, F4, F8 et F13 à  $m/z=163.0395$  Da,  $m/z=163.0393$  Da,  $m/z=163.0393$  Da et  $m/z=163.0393$  Da respectivement, avec un écart de masse inférieur à 1.2 ppm. Les temps de rétention dans ces fractions (8.94 à 8.96 min) sont en adéquation avec celui du standard (ANNEXE VIII Figure 1).

En ce qui concerne l'acide caféique, les fractions F1, F4, F8 et F13 ont toutes montré un ion de  $m/z=179.0347$  Da,  $m/z=179.0345$  Da,  $m/z=179.0346$  Da et  $m/z=179.0344$  Da respectivement,

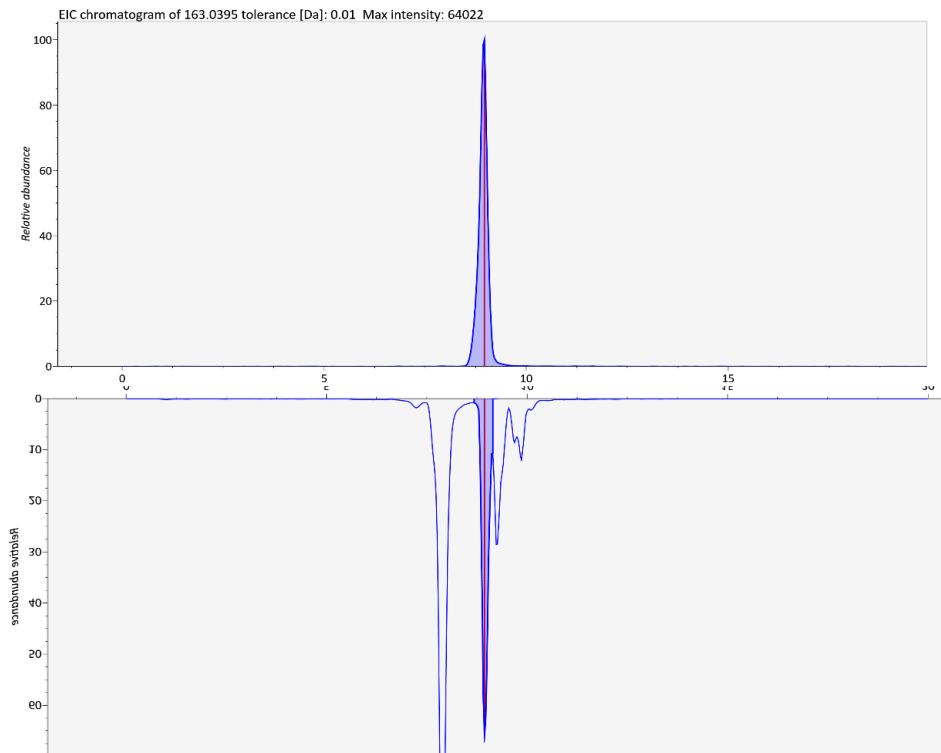


Figure 9 : Chromatogramme de l'acide coumarique utilisé pour l'analyse des fractions. En haut le standard et en bas la fraction F1

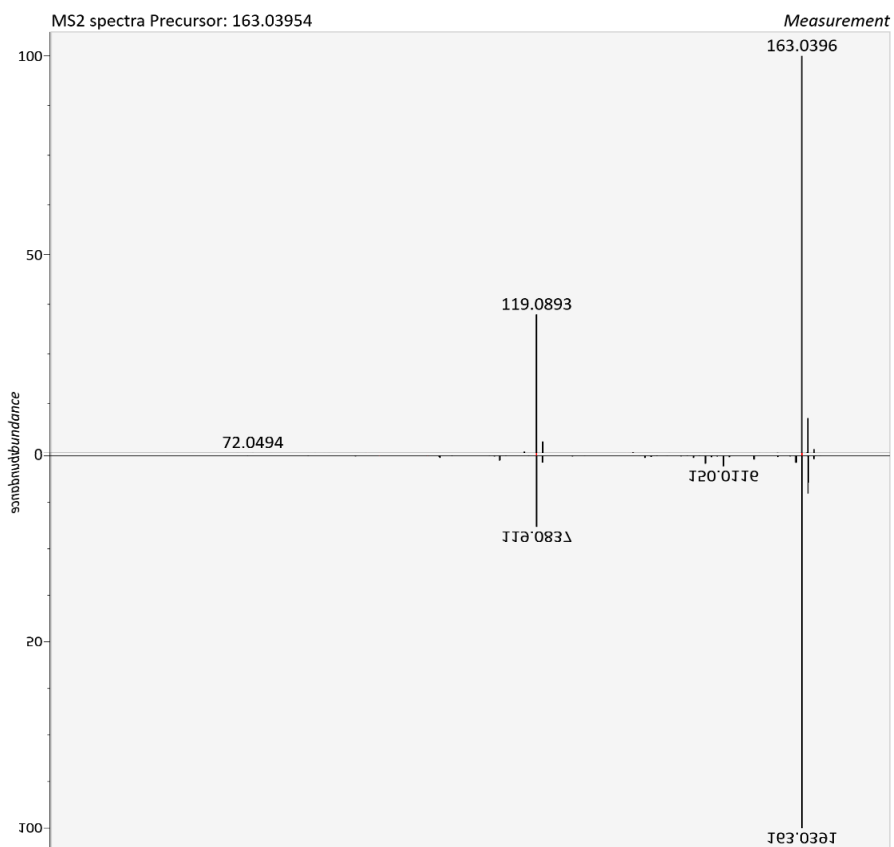


Figure 10 : le spectre MS2 de l'acide coumarique utilisé pour l'analyse des fractions. En haut le standard et en bas la fraction F1.

avec des écarts de masse inférieurs à 3.9 ppm. Le temps de rétention des fractions correspond également bien au standard, variant entre 8.36 et 8.42 min (ANNEXE VIII Figure 1).

L'acide vanillique standard qui a été détecté à  $m/z=167.0341$  Da avec un temps de rétention de 8.42 min. Cependant, aucun signal correspondant n'a été détecté dans les fractions F1, F4, F8 et F13.

### **3.5. Comparaison du paysage chimique des composés inconnus avec les chromatogrammes UV et HRMS pour aller identifier les composés à analyser en RMN.**

Dans cette section des résultats, nous nous focalisons sur la distribution des signaux inconnus en fonction du temps de rétention au sein des voies métaboliques identifiées dans les fractions actives F8 et F13, en les comparant avec leurs chromatogrammes UV et HRMS respectifs en vue de préparer l'analyse par RMN.

L'analyse de la fraction F8 révèle une distribution hétérogène des composés inconnus en fonction du temps de rétention (Figure 11). Entre 2 à 9 minutes, nous constatons une forte densité de composés inconnus. Cette plage de temps, on retrouve principalement les voies métaboliques des alcaloïdes, des acides aminés et peptides, mais aussi les voies des shikimates, des phénylpropanoïdes et des terpénoïdes (Figure 11). En examinant le chromatogramme UV, cette plage de temps correspond à une majorité des pics, indiquant une concentration importante de composés à ce temps de rétention (Figure 11). Il serait donc intéressant d'examiner ces composés inconnus lors de l'analyse par RMN.

Quant à l'analyse de la fraction F13, elle présente une densité moindre de composés inconnus. On observe surtout une distribution des composés appartenant à la voie métabolique des acides gras entre 4 et 10 minutes, correspondant également aux pics UV sur le chromatogramme (Figure 12).

Cette analyse préliminaire permet de déterminer les plages de temps de rétention à privilégier lors du fractionnement des fractions actives, dans le but d'isoler et d'identifier les composés inconnus potentiellement intéressants par RMN

## **4. Discussion :**

### **4.1 Paysage chimique de *L.major* et identification de composés potentiellement bio-actifs**

Les résultats de notre étude mettent en lumière la présence dans nos fractions actives de composés issues potentiellement d'un large éventail de **voies métaboliques**, notamment les alcaloïdes, acides aminés et peptides, glucides, acides gras, polyketides, shikimates et phénylpropanoïdes, ainsi que les terpénoïdes. Cette diversité reflète la complexité chimique présente dans ces fractions, suggérant une multitude de métabolites secondaires potentiellement impliqués dans l'activité allélopathique. Par exemple, il est montré dans des extraits de macrophytes que les alcaloïdes sont des composés capables d'inhiber la croissance de divers microorganismes, y compris les cyanobactéries (Singh et al., 2005). Il est également rapporté que les acides aminés et peptides peuvent agir en tant que facteurs allélopathiques dans des extraits de macrophytes (Zhu et al., 2021). Les shikimates, en particulier, ont été largement aussi étudiées dans des extraits de macrophyte pour leur rôle dans la production de composés phénoliques, dont certains ont des effets allélopathiques (Mohamed, 2017, Macías et al., 2019,



Zhu et al., 2021, Li et al., 2023). La voie métabolique des acides gras est également reconnue pour produire des composés ayant des propriétés allélopathiques (Mohamed, 2017, Zhu et al., 2021, Chaïb et al., 2021).

À l'échelle plus fine de la superclasse, notre étude a révélé plusieurs **superclasses** de métabolites, telles que les acides phénoliques, les phényléthanoïdes, les phénylpropanoïdes, les coumarines, les pseudoalcaloïdes et alcaloïdes de tryptophane, les acides octadécanoïdes, ainsi que les acides gras et leurs dérivés. Ces superclasses sont réputées pour regrouper des composés secondaires associés à l'allélopathie dans extraits de macrophytes, et donc pourraient jouer un rôle clé dans l'inhibition du rendement photosynthétique observée (Mohamed, 2017, Zhu et al., 2021, Macías et al., 2019). Par exemple, les acides phénoliques ont été signalés pour leur activité antimicrobienne et leur capacité à inhiber la croissance de diverses espèces de cyanobactéries (Le Rouzic et al., 2016). L'article de Li et al (2023) s'aligne avec nos résultats, renforçant l'importance des acides phénoliques dans l'inhibition de la croissance des cyanobactéries comme *Microcystis aeruginosa*. Les phénylpropanoïdes, qui ont des propriétés antifongiques et antibactériennes bien établies, ont également été rapportés comme inhibant la croissance des cyanobactéries (Kfoury et al., 2004). L'identification de ces superclasses apporte une meilleure compréhension de la nature des composés présents dans nos fractions.

Ainsi, l'identification de ces superclasses de composés dans nos fractions actives enrichit notre compréhension des mécanismes allélopathiques potentiels et offre des pistes pour l'identification et l'isolement de composés bioactifs

Dans le prolongement de notre analyse du paysage chimique, nous avons pu identifier, trois composés : l'acide vanillique, l'acide caféique et l'acide coumarique en lien avec leur activité allélopathiques connus. L'acide caféique et l'acide coumarique ont pu finalement être confirmés sur le plan structural. L'identification de ces composés n'est pas surprenante, étant donné leur présence bien documentée dans la littérature comme composés allélopathiques. Par exemple, l'acide caféique est reconnu pour son activité antimicrobienne et son rôle potentiel dans l'inhibition de la croissance des cyanobactéries (Pandey & Palni, 2007). En outre, l'étude de Li et al. (2023) fournit un aperçu précieux du mécanisme potentiel par lequel l'acide caféique exerce son effet inhibiteur. Il semble que l'acide caféique puisse perturber divers métabolismes dans *M. aeruginosa*, y compris le métabolisme des nucléotides, des acides aminés et des acides gras, conduisant à une diminution de la plupart des métabolites, y compris les toxines de microcystine LR et cyanopeptolin A. Ces perturbations métaboliques, couplées à une augmentation de la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) par l'acide caféique, pourraient entraîner une inhibition de la croissance algale.

Par ailleurs, la présence du coumarate, un autre composé de la voie métabolique des shikimates et des phénylpropanoïdes, corrobore également notre hypothèse de départ. Il a été suggéré que les composés de cette voie pourraient être impliqués dans l'activité allélopathique (Macías et al., 2019, Li et al., 2023). Le loliolide, un terpénoïde, a été rapporté pour son potentiel allélopathique dans différentes études (Singh et al., 2017).

Il convient de souligner que, bien que notre approche ait permis d'identifier ces composés, elle ne confirme pas nécessairement leur rôle dans l'activité allélopathique observée. En effet, ces composés ont été retrouvés dans certains des fractions non actives (données non montrées), ce qui met en doute leur implication dans l'activité observée des fractions actives sur la diminution du rendement photosynthétique du *M. aeruginosa*. Par conséquent, des études supplémentaires sont nécessaires pour identifier les principaux composés contribuant à l'inhibition du rendement photosynthétique. Dans cet optique il sera important de considérer l'impact de la quantité de





matière dans l'activité observée (voir ANNEXE I). En particulier, il s'agira ainsi de trouver un compromis entre la quantité de matière et l'activité afin d'isoler suffisamment du/des composé(s) actif(s) en vue de les identifier structurellement par RMN.

Ces résultats soulignent l'intérêt de notre approche pour l'identification de composés potentiellement allélopathiques. Cependant, ils mettent également en évidence les défis liés à l'identification de composés spécifiques responsables de l'activité allélopathique. La complexité du métabolome, la possible interaction entre différents composés, et le rôle potentiel de mécanismes indirects rendent cette tâche extrêmement difficile.

## 4.2. Méthodologie d'analyse

La méthodologie adoptée pour cette recherche est basée sur des pratiques bien établies dans le domaine de l'étude des métabolites et des composés bioactifs. En particulier, la séquence d'étapes de purification et d'identification décrites ici suit une approche conventionnelle, souvent appliquée dans la recherche sur les métabolites naturels.

La première partie de la méthodologie met l'accent sur la purification des composés bioactifs. Les méthodes d'extraction liquide/liquide, d'ultrafiltration, de résine d'adsorption XAD et de chromatographie d'exclusion stérique sont toutes des approches bien établies et largement utilisées pour la purification des métabolites (Jiao X., et al., 2017, Andriamasinoro, 2019, Pierra J., 2020). Chacune de ces techniques offre des avantages spécifiques qui peuvent aider à isoler efficacement les composés d'intérêt. Par exemple, l'extraction liquide/liquide est une technique simple et économique qui permet de concentrer et de purifier les composés en fonction de leur solubilité (Samuelsson, 2017). D'après la publication de Jiao X., et al., 2017, l'ultrafiltration est une technique très efficace pour la purification des polyphénols.

Cependant, il est essentiel de noter que, bien que ces techniques de purification soient largement acceptées et utilisées, elles ont aussi leurs limites. Par exemple, l'extraction liquide/liquide peut entraîner la perte de composés volatils et la co-extraction de composés non désirés. De même, l'ultrafiltration pourrait conduire à la perte de composés de bas poids moléculaire qui peuvent être d'intérêt (Hage et al., 2012). L'approche chromatographique, notamment la chromatographie d'exclusion stérique, est une technique très précise qui permet de séparer les composés en fonction de leur taille (Winzor, 2003). Néanmoins, cette technique peut être limitée par la résolution de la colonne et la possibilité de pertes de composés lors de l'adsorption non spécifique sur le matériau de la colonne.

Ces méthodologies ont généré des fractions brutes contenant encore un grand nombre de composés. Si le fractionnement avait été plus précis, cela aurait pu être plus pertinent. Cependant, cette difficulté nous a conduit à choisir une stratégie qui repose sur deux postulats. En particulier, le premier postulat, à savoir que les composés se trouvant dans différentes fractions actives obtenues par différentes méthodes de purification pourraient être bioactifs, est soutenu par la littérature. Il est en effet bien connu que la présence répétée d'un composé dans plusieurs fractions purifiées par différentes méthodes peut suggérer son importance et son potentiel biologique (Kennedy et al., 2008). Il est important de noter que ce ne sont pas seulement les composés communs aux fractions actives qui pourraient présenter une bioactivité. Cependant, la grossièreté des fractions pose des obstacles à l'identification des composés bioactifs de manière isolée. Les métabolites cibles ont été choisis en se basant sur la littérature, en sélectionnant les composés décrits comme ayant des effets allélopathiques.



La grossièreté des fractions peut poser problème pour l'identification des composés inconnus en RMN. En effet la RMN est une technique puissante pour l'identification structurale des composés organiques, mais sa précision peut être limitée par la complexité des mélanges de composés. Plus précisément, lorsque de nombreux composés sont présents dans une fraction, les spectres de RMN peuvent être surchargés par les signaux de ces différents composés, rendant l'attribution des signaux à des structures spécifiques un défi majeur (Simpson et al., 2011). De plus, la détection de composés à des concentrations plus faibles peut être masquée par ceux présents à des concentrations plus élevées (Bingol et Brüschweiler, 2015). C'est dans continuité de ce travail que les fractions F8 et F13 seront réfractionnées en LC-Semi-preparative pour une analyse plus poussée en RMN.

La combinaison de différentes techniques de séparation, telles que l'utilisation de la colonne C18 pour les composés non polaires et de la colonne HILIC pour les composés polaires, a permis de mettre en évidence une riche diversité chimique dans nos fractions. Cette approche combinée est importante car elle permet de maximiser la couverture du métabolome et d'isoler des composés de polarités différentes (Vuckovic, 2012; Guijas et al., 2018). La fraction F12 par exemple en témoigne, étant donné qu'elle présente peu de signaux en C18 mais beaucoup en HILIC.

De plus l'analyse des temps de rétention a offert un éclairage intéressant sur la polarité des différentes voies métaboliques et permis de confirmer la pertinence et la cohérence de nos analyses. Par exemple, les métabolites associés à la voie des acides gras ont présenté des temps de rétention allant jusqu'à 16 minutes sur la colonne C18, reflétant leur polarité relativement faible (Figure 1). Les alcaloïdes et les shikimates ont montré une distribution moins large des temps de rétention, avec des temps moyens de respectivement 9 et 8 minutes, suggérant une grande diversité de polarités au sein de ces classes de métabolites (figure 1). Concernant les glucides, ils ont été élués très tôt lors de l'analyse en C18 (figure 1), avec un temps de rétention moyen de 5 minutes, mais ont été retenus plus longtemps sur la colonne HILIC, avec une moyenne de 16 minutes, ce qui illustre leur nature fortement polaire (Figure 2).

Les outils utilisés pour l'analyse des données, tels que le diagramme de Venn et le diagramme de rayon de soleil, sont des moyens efficaces de visualiser et de comprendre la complexité des données métabolomiques (Chen and Boutros, 2011). En particulier, le diagramme de rayon de soleil est un outil puissant pour visualiser les relations entre les différentes classes de composés et leurs voies métaboliques, facilitant ainsi la compréhension de la diversité et de la complexité des composés (Zulficar et al., 2023). L'utilisation de ces deux outils a renforcé notre stratégie analytique en nous permettant de déterminer les composés cibles.



## CONCLUSION :

Notre étude sur le *Lagarosiphon major* représente une avancée significative et unique dans la connaissance de cette espèce de macrophyte aquatique envahissante. Il est important de souligner qu'il s'agit de la première fois que *L. major* est étudié au niveau biomoléculaire, ce qui donne à notre travail un caractère précurseur.

Au cœur de notre recherche, nous avons mis en lumière l'existence chez cette espèce de composés, mentionnés dans la littérature comme ayant des propriétés bioactives chez de nombreux autres macrophytes. Ces composés pourraient être responsables de la réduction du rendement photosynthétique de la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa*. Nous avons pu les identifier grâce à des techniques avancées de spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS).

Cependant, ceci ne représente que la première étape de notre étude. La prochaine phase de ce projet consistera à approfondir l'exploration des molécules bioactives de cette espèce en utilisant la RMN, afin de découvrir des composés spécifiques à *L. major*, et afin de mettre en évidence leur présence dans un environnement contrôlé, à travers des études en mésocosmes. Cela nous permettra d'observer et de comprendre leurs effets dans un contexte plus réaliste, se rapprochant des conditions naturelles.

Après avoir confirmé et évalué le rôle de ces composés en mésocosmes, l'étape suivante consistera en leur étude *in situ*. Cela est essentiel pour comprendre la dynamique de ces composés dans les écosystèmes aquatiques naturels, et quel rôle ils peuvent jouer dans la régulation des populations de cyanobactéries.

Au-delà de la compréhension des mécanismes écologiques, cette étude pourrait potentiellement conduire à des solutions pratiques face à certains défis environnementaux. En effet, si les composés bioactifs identifiés dans *L. major* peuvent effectivement inhiber la photosynthèse des cyanobactéries, ils pourraient être exploités pour contrôler la prolifération de ces organismes dans les eaux douces. Cela ouvrirait la voie à des stratégies de gestion plus respectueuses de l'environnement, qui utiliseraient des mécanismes naturels maintenir l'équilibre au sein des écosystèmes aquatiques.

Ce travail de recherche passionnant constituera la base d'une thèse de doctorat qui devrait commencer à l'automne. Cette thèse visera à explorer en profondeur les composés bioactifs de *L. major*, à étudier leur bioactivité et à évaluer leur potentiel allopathique en conditions *in situ*.



## Références bibliographiques :

- Backer, L. C., Manassaram-Baptiste, D., LePrell, R., & Bolton, B. (2010). Cyanobacteria and algae blooms: review of health and environmental data from the harmful algal bloom-related illness surveillance system (HABISS) 2007–2011. *Toxins*, 2(4), 1044-1060.
- Barbier, E.B., Hacker, S.D., Kennedy, C., Koch, E.W., Stier, A.C., Silliman, B.R., 2011. The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecological Monographs*, 81(2), pp.169-193.
- Bickel, T. O., & Closs, G. P. (2009). Impact of partial removal of the invasive macrophyte *Lagarosiphon major* (hydrocharitaceae) on invertebrates and fish : River research and applications 2009 v.25 no.6 pp. 734-744.
- Boccard, J., & Rudaz, S. (2014). Harnessing the complexity of metabolomic data with chemometrics. *Journal of Cheminformatics*, 6(1), 9.
- Carmichael, W.W. (1997). *Advances in botanical research. The Cyanotoxins*. Academic Press, London, 211-256.
- Carpenter, S.R., Caraco, N.F., Correll, D.L., Howarth, R.W., Sharpley, A.N., Smith, V.H., 1998. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological Applications*, 8(3), pp.559-568.
- Chaïb, S., Pistevos, J. C. A., Bertrand, C., & Bonnard, I. (2021). Allelopathy and allelochemicals from microalgae: An innovative source for bio-herbicidal compounds and biocontrol research. *Algal Research*, 54, 102213.
- Chen, H., & Boutros, P. C. (2011). VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 35.
- Chen, J., Gu, B., LeBoeuf, E.J., Pan, H., Dai, S., 2016. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere* 125, 227-232.
- Cheng, F., Ali, M., Liu, C., Deng, R., & Cheng, Z. (2020). Garlic Allelochemical Diallyl Disulfide Alleviates Autotoxicity in the Root Exudates Caused by Long-Term Continuous Cropping of Tomato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(42), 11684-11693.
- Chorus, I. (2001). Introduction : Cyanotoxins — Research for Environmental Safety and Human Health, *Cyanotoxins Occurrence, Causes, Consequences*, 19.
- Chorus, I., & Welker, M. (2021). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management* (p. 858). Taylor & Francis.
- Cook, C. D. K., & Urmi-König, K. (1984). A revision of the genus *Egeria* (Hydrocharitaceae). *Aquatic Botany*, 19(1-2), 73-96.
- Damerval T., *Différenciation cellulaire et synthèse des vésicules à gaz chez les cyanobactéries*, Paris, Thèse de doctorat en Sciences biologiques et fondamentales appliquées, 1990.
- Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z.I., Knowler, D.J., Lévêque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A.H., Soto, D., Stiassny, M.L.J., Sullivan, C.A., 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status, and conservation challenges. *Biological Reviews*, 81(2), pp.163-182.
- Dutartre, A. (2002). *Macrophytes aquatiques: biologie et gestion*. Paris: Tec & Doc Lavoisier.
- Dutartre, A., Bertrin, V., & Laplace-Treyture, C. (2008, March). *Evaluation des impacts du*





développement des plantes aquatiques exotiques envahissantes sur les communautés végétales indigènes en plans d'eau: exemples des lacs et étangs du littoral landais. In 4ème Colloque d'Ecologie des Communautés Végétales (EcoVeg4) (p. 16).

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

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

Gross, E. M., Meyer, H., & Schilling, G. (1996). Release and ecological impact of allelopathic substances by *Myriophyllum spicatum*. *Hydrobiologia*, 340(1-3), 47-53.

Guijas, C., Montenegro-Burke, J. R., Domingo-Almenara, X., Palermo, A., Warth, B., Hermann, G., ... & Aisporna, A. E. (2018). METLIN: A Technology Platform for Identifying Knowns and Unknowns. *Analytical chemistry*, 90(5), 3156-3164.

Hage, D. S., Anguizola, J. A., Bi, C., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., Pfaunmiller, E., Vargas, J., & Zheng, X. (2012). Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38(2), 210-252

Huisman, J., Codd, G. A., Paerl, H. W., Ibelings, B. W., Verspagen, J. M., & Visser, P. M. (2018). Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(8), 471-483.

Hulme, P. E. (2015). Invasion pathways at a crossroad: policy and research challenges for managing alien species introductions. *Journal of Applied Ecology*, 46(1), 1419-1424.

Hulme, P. E. (2009). Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology*, 46(1), 10-18.

MEA, 2005. *Ecosystems and Human Well-being: Wetlands and Water Synthesis*. World Resources Institute, Washington, DC.

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

Hussner, A., Stiers, I., Verhofstad, M. J. J. M., Bakker, E. S., Grutters, B. M. C., Haury, J., ... & Newman, J. (2017). Management and control methods of invasive alien freshwater aquatic plants: A review. *Aquatic Botany*, 136, 112-137.

Jiao, X., Zhang, X., & Zhang, Q. (2017). Optimization of enrichment and purification of polyphenols from blueberries (*Vaccinium* spp.) by macroporous resins XAD-7HP. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(8), 581-588.

Jüttner, F., Leonhardt, J., & Möhren, S. (2010). Environmental factors affecting the formation of mesityloxid, dimethylallylic alcohol and other volatile compounds excreted by *Anabaena cylindrica*. *Journal of General Microbiology*, 132(8), 2275-2285.

Kim, H. W., Wang, M., Leber, C. A., Nothias, L.-F., Reher, R., Kang, K. B., van der Hoof, J. J. J., Dorrestein, P. C., Gerwick, W. H., & Cottrell, G. W. (2021). NPClassifier: A Deep Neural Network-Based Structural Classification Tool for Natural Products. *Journal of Natural Products*, 84(11), 2795–2807. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00399>

Kennedy, J., Marchesi, J. R., & Dobson, A. D. W. (2008). Marine metagenomics: strategies for the discovery of novel enzymes with biotechnological applications from marine environments. *Microbial Cell Factories*, 7(1), 27.



- Kfoury, M., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Bourdon, N., Laruelle, F., Fontaine, J., Auezova, L., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2016). Solubility, photostability and antifungal activity of phenylpropanoids encapsulated in cyclodextrins. *Food Chemistry*, 196, 518-525.
- 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.
- Le Rouzic, B., Thiébaud, G., & Brient, L. (2016). Selective growth inhibition of cyanobacteria species (*Planktothrix agardhii*) by a riparian tree leaf extract. *Ecological Engineering*, 97, 74-78.
- Malmqvist, B., & Rundle, S. (2002). Threats to the running water ecosystems of the world. *Environmental Conservation*, 29(2), 134-153.
- Li, Z. H., Wang, Q. F., Ruan, X., Pan, C. D., & Jiang, D. A. (2010). Phenolics and Plant Allelopathy. *Molecules*, 15(12), 8933-8952.
- Li, M., Wang, Y., Xiao, J., Yan, X., & Liu, B. (2023). Allelopathic inhibition effects and mechanism of phenolic acids to *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Science and Pollution Research*, 30, 45388-45397.
- Macías, F. A., Molinillo, J. M. G., Varela, R. M., & Galindo, J. C. G. (2019). Recent advances in allelopathy for weed control: from knowledge to applications. *Pest management science*, 75(9), 2411-2430.
- Meriluoto, J., Spoof, L., & Codd, G. A. (Eds.). (2017). *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. John Wiley & Sons.
- Moreira, S., Laplace-Treyture, C., Eon, M. & Jan, G. (2015). Rapport d'activité du suivi scientifique des plans d'eau de Carcans-Hourtin, Lacanau, Cazaux-Sanguinet et Parentis Biscarrosse: Année 2015. Irstea, 107.
- Nakai, S., Zou, G., Okuda, T., Nishijima, W., Hosomi, M., Okada, M., 2012. Polyphenols and fatty acids responsible for anti-cyanobacterial allelopathic effects of submerged macrophyte *Myriophyllum spicatum*. *Water Sci. Technol.* 66, 993–999. Nimptsch.
- Oborn E. T., Moran W. T., Greene K. T., and Bartley T. R., 1954. Weed control investigations on some important plants which impede flow of western irrigation waters. Joint Lab. Rep. SI-2, USDA, Bur. Reclam. Eng. Lab., and USDA, ARS Field Crops Branch, pp 16- 17.
- OMS. Algae and cyanobacteria in fresh water. In : Guidelines for safe recreational water environments. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2003:136-58.
- Ostfeld, R. S., & Keesing, F. (2015). Is biodiversity bad for your health? *Ecosphere*, 6(3), 1-7.
- Paerl, H. W., & Huisman, J. (2009). Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports*, 1(1), 27-37.
- Paerl, H.W., & Otten, T.G. (2013). Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microbial ecology*, 65(4), 995-1010.
- Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., & Neilan, B. (2010). On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine Drugs*, 8(5), 1650-1680.
- Pierra, J. (2020). Analyse des saponines triterpéniques et des composés phénoliques de l'extrait



méthanolique des feuilles d'*Aralia nudicaulis* L. (Thèse de maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi).

Pimentel, D., Zuniga, R., & Morrison, D. (2004). Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics*, 52(3), 273-288.

Pyšek, P., Jarošík, V., & Kučera, T. (2003). Inclusion of native and alien species in temperate nature reserves: an historical study from Central Europe. *Conservation Biology*, 17(5), 1414-1424.

Ribaudou, C., Bertrin, V., Boutry, S., & Lambert, E. (2015). Ecology and distribution of Characeae communities in Lobelia lakes of South-West France. Paper presented at the 20th Meeting of the Group of European Charophytologists (GEC), Geneva, Switzerland.

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

Salmaso, N., Naselli-Flores, L., & Padisák, J. (2015). Functional classifications and their application in phytoplankton ecology. *Freshwater Biology*, 56(11), 2215-2230.

Samuelsson, G., & Bohlin, L. (2017). *Drugs of Natural Origin: A Treatise of Pharmacognosy* (7th ed.). Swedish Pharmaceutical Press.

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

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

Schröter, D., Cramer, W., Leemans, R., Prentice, I. C., Araújo, M. B., Arnell, N. W., Bondeau, A., Bugmann, H., Carter, T. R., Gracia, C. A., de la Vega-Leinert, A. C., Erhard, M., Ewert, F., Glendining, M., House, J. I., Kankaanpää, S., Klein, R. J. T., Lavorel, S., Lindner, M., Metzger, M. J., Meyer, J., Mitchell, T. D., Reginster, I., Rounsevell, M., Sabaté, S., Sitch, S., Smith, B., Smith, J., Smith, P., Sykes, M. T., Thonicke, K., Thuiller, W., Tuck, G., Zaehle, S., & Zierl, B. (2005). Ecosystem Service Supply and Vulnerability to Global Change in Europe. *Science*, 310(5752), 1333-1337.

Singh, S., Kate, B. N., & Banerjee, U. C. (2005). Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(3), 73-95.

Singh, A. A., Rajeswari, G., Nirmal, L. A., & Jacob, S. (2021). Synthesis and extraction routes of allelochemicals from plants and microbes: A review. *Reviews in Analytical Chemistry*.

Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A., ... & Hardy, N. W. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, 3(3), 211-221.

Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J., Melillo, J.M., 1997. Human domination of Earth's ecosystems. *Science*, 277(5325), pp.494-499.

Vuckovic, D. (2012). Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403(6), 1523-1548.

Walsby, A. E. (1994). Gas vesicles. *Microbiological reviews*, 58(1), 94-144.



Winzor, D. J. (2003). Analytical exclusion chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 56(1-3), 15-52.

Wolfender, J. L., Marti, G., Thomas, A., & Bertrand, S. (2015). Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A*, 1382, 136-164.

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

Yarrow, M., Marin, V. H., Finlayson, M., Tironi, A., Delgado, L. E., & Fischer, F. (2009). The ecology of *Egeria densa* Planchón (Liliopsida: Alismatales): A wetland ecosystem engineer? *Revista Chilena de Historia Natural*, 82(2), 299-313.

Zhang, J., Shi, H., Wang, Y., Li, X., Zhang, C., Piao, M., . . . Wang, S. (2016). Ultrasensitive determination of malondialdehyde with 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) by spectrofluorometry. *Anal. Chim. Acta*, 935, 197

### **Les rapports de stages :**

Campillo, L. (2021). « Rôle potentiel des macrophytes aquatiques dans la régulation des blooms de cyanobactéries : approche allélopathique ». Rapport de Master 2 mention Biodiversité, Ecologie, Evolution, parcours « Biodiversité et Suivis Environnementaux », Université de Bordeaux, 40p.

Maubert, S. (2022). « Caractérisation des relations allélopathiques entre macrophytes aquatiques et cyanobactéries d'eau douce par approche métabolomique non-ciblée ». Rapport de Master 2 Gestion de l'Environnement, spécialité Fonctionnement et Restauration des Milieux Aquatiques Continentaux, Université de Clermont-Auvergne, 46p.

Zulfiqar, M., Gadelha, L., Steinbeck, C., Sorokina, M., & Peters, K. (2023). MAW: the reproducible Metabolome Annotation Workflow for untargeted tandem mass spectrometry. *Journal of Cheminformatics*, 15, 32.





## ANNEXE I : Les fractions et leur méthode de purification ainsi leur quantité de matière

Fraction	Méthode de fractionnement	Quantité de matière (mg)
F1	Chromatographie d'exclusion stérique	23.24
F2	La résine Amberlite XAD4	8.127
F3	Ultrafiltration	1.581
F4	La résine Amberlite XAD4	1.605
F5	Extraction liquide/liquide	2.059
F6	Extraction liquide/liquide	3.883
F7	Ultrafiltration	18.395
F8	Extraction liquide/liquide	27.163
F9	Chromatographie d'exclusion stérique	0.295
F10	Chromatographie d'exclusion stérique	0.041
F11	Extraction liquide/liquide	1.185
F12	La résine Amberlite XAD4	19.745
F13	Chromatographie d'exclusion stérique	0.678

## ANNEXE II : Paramètres d'acquisition et de traitement de données

**Tableau 1** : les paramètres de sources ESI

Paramètre	Valeur
Tension de pulvérisation (ESI-)	2,50 kV
Courant de pulvérisation	15,92 $\mu$ A
Chauffage de la source	Avec thermocouple activé
Température du chauffage de la source	299,36 °C
Débit de gaz gaine	40,03 (arb)
Débit de gaz auxiliaire	19,99 (arb)
Débit de gaz de balayage	2,9 (arb)
Température capillaire	300,16 °C



**Tableau 2** : paramètres de collecte et d'identification des pics sur MS-DIAL.

Paramètre	Valeur
Plage de temps de rétention pour la collecte des pics	0 à 100 min
Plage de masse pour les analyses MS1 et MS2	100 à 1500 Da
Tolérance pour la collecte des pics (MS1)	±0,01 Da
Tolérance pour la collecte des pics (MS2)	±0,025 Da
Valeur minimale de la hauteur des pics (mode positif)	50 000 amplitudes
Valeur minimale de la hauteur des pics (mode négatif)	25 000 amplitudes
Largeur de tranche de masse	0,1 Da
Tolérance de masse pour la correspondance de bibliothèque (MS1)	±0,01 Da
Tolérance de masse pour la correspondance de bibliothèque (MS2)	±0,005 Da
Tolérance pour le temps de rétention	±0,1 min
Seuil de score d'identification	80%

**Tableau 3** : Paramètres MS-CLEANER pour le nettoyage des données.

Paramètre	Valeur
Ratio pour éliminer la redondance des signaux d'injection à blanc	0.8
Seuil de RSD pour éliminer les pics avec une grande variabilité	40%
Fenêtre de RMD pour filtrer les pics en fonction de leur défaut de masse relative	40 à 4000
Tolérance pour regrouper les composés similaires (masse)	0,005 Da
Tolérance pour regrouper les composés similaires (temps de rétention)	0,25 min



## ANNEXE III : Annotation

### Paramètres Sirius

**SIRIUS - Molecular Formula Identification**

**General**

Instrument: Orbitrap  
Filter by isotope pattern:   
MS2 mass accuracy (ppm): 5  
MS/MS isotope scorer: SCORE  
Candidates stored: 10  
Min candidates per ion stored: 1

**Use DB formulas only**

Allelo\_Cpds  
 Bio Database  
 Biocyc  
 CHEBI  
 COCONUT  
 EcoCyc Mine

**Possible Ionizations**

[M + Br]<sup>-</sup>  
 [M + Cl]<sup>-</sup>  
 [M - H]<sup>-</sup>

**ILP**

Tree timeout: 0  
Compound timeout: 0  
Use heuristic above m/z: 300  
Use heuristic only above m/z: 650

**Elements allowed in Molecular Formula**

H: 0 to inf, C: 0 to inf, N: 0 to inf, O: 0 to inf  
P: 0 to inf, B: 0 to auto, Si: 0 to 0, S: 0 to auto  
Cl: 0 to auto, Se: 0 to auto, Br: 0 to auto, F: 0 to 0  
I: 0 to 0

**ZODIAC - Network-based improvement of SIRIUS molecular formula ranking**

**General**

Considered candidates 300m/z: 10  
Considered candidates 800m/z: 50  
Use 2-step approach:

**Edge Filters**

Edge Threshold: 0.95  
Min Local Connections: 10

**Gibbs Sampling**

Iterations: 20 000  
Burn-In: 2 000  
Separate Runs: 10

**CSI:FingerID - Fingerprint Prediction**

**Fallback Adducts**

[M + Br]<sup>-</sup>  
 [M + Cl]<sup>-</sup>  
 [M - H]<sup>-</sup>  
 [M]<sup>-</sup>  
 [M - H + K - H]<sup>-</sup>  
 [M - H2O - H]<sup>-</sup>

**General**

Score threshold:

**CSI:FingerID - Structure Database Search**

**Search DBs**

Allelo\_Cpds  
 Bio Database  
 Biocyc  
 CHEBI  
 COCONUT  
 EcoCyc Mine

**General**

Tag Lipids:

**CANOPUS - Compound Class Prediction**

Parameter-Free! Nothing to set up here. =)

### Paramètre Ms-Finder

Method: Basic | Formula finder | Structure finder | Data source | Retention time | CCS

**Mass tolerance setting**

Mass tolerance type:  Da  ppm

Mass tolerance (MS1): 5 +-Da or ppm

Mass tolerance (MS2): 5 +-Da or ppm

**Abundance setting**

Relative abundance cut off: 1 %

**Mass range setting**

Mass range max: 2000 Da

Mass range min: 0 Da

Method: Basic | Formula finder | Structure finder | Data source | Retention time | CCS

Use predicted RT/RI values for structure elucidation

RT tolerance: 2.5 min

RT resource:  From user-library  Calculated by XLogP based equation

User-defined InChIKey-RT text library

File path:  Browse

XLogP based RT prediction and cut off setting for structure elucidation

File path:  Browse Load

Summary:

Retention time setting for spectral searching

Use experimental RT/RI values for searching

As retention index (RI)

RT(min) / RI tolerance: 0.5

Use retention time to 'exclude' candidates



## Ms-Finder

Method Basic **Formula finder** Structure finder Data source Retention time CCS

### Formula calculation setting

- LEWIS and SENIOR check:
- Isotopic ratio tolerance:  %
- Element ratio check:  covering
- Element probability check:

### Element selection

- O  N  P  S  F  Cl  Br  I  Si
- TMS-MEOX derivative compound

- Minimum TMS count:
- Minimum MEOX count:

### Options

- Maximum report number:  up to 100
- Time out (-1 means infinite):  min
- Advanced settings for AIF:

Method Basic **Formula finder** Structure finder Data source Retention time CCS

### In silico MS/MS or EI-MS fragmenter setting

- Tree depth:  [1-3]
- Use the fragmentation library for electron ionization (EI)
- Use the fragmentation library for low energy CID

### Options

- Maximum report number:  up to 100
- Time out (-1 means infinite):  min
- Cut off for structure elucidation:  0-10 (total score)
- Cut off for spectral match:  0-100 (%)









**Tableau :** Bases de données d'annotation

Biocc	<a href="#">Biocc</a>
C-EBI	<a href="#">C-EBI</a>
COCONUT	<a href="#">COCONUT</a>
EcoCyc Mine	<a href="#">EcoCyc Mine</a>
GNPS	<a href="#">GNPS</a>
HMOB	<a href="#">HMOB</a>
HSDB	<a href="#">HSDB</a>
KEGG	<a href="#">KEGG</a>
KEGG Mine	<a href="#">KEGG Mine</a>
KNAPSACK	<a href="#">KNAPSACK</a>
Maconda	<a href="#">Maconda</a>
MeSH	<a href="#">MeSH</a>
NORMAN	<a href="#">NORMAN</a>
Natural Products	<a href="#">Natural Products</a>
Plantcyc	<a href="#">Plantcyc</a>
PubChem	<a href="#">PubChem</a>
PubMed	<a href="#">PubMed</a>
YMDB Mine	<a href="#">YMDB Mine</a>
ZINC bio	<a href="#">ZINC bio</a>
YMDB	<a href="#">YMDB</a>

**ANNEXE IV : Paysage Chimique des fractions actives en C18 et en HILIC (NPC\_Pathways dans Sirius)**

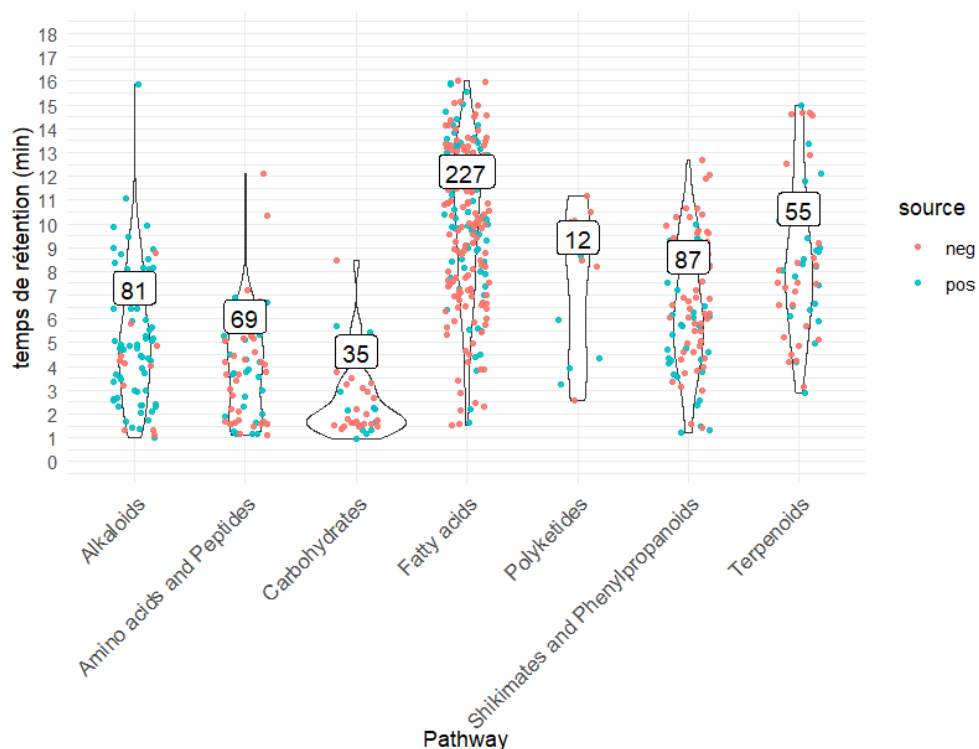


Figure 1: Distribution de l'abondance des signaux selon le temps de rétention au sein des voies métaboliques dans la fraction actives F1 après séparation chromatographique en phase inverse (colonne C18). Les résultats sont présentés sous la forme de *violin plot* où chaque point représente un signal (en rouge, ESI-, en bleu, ESI+).



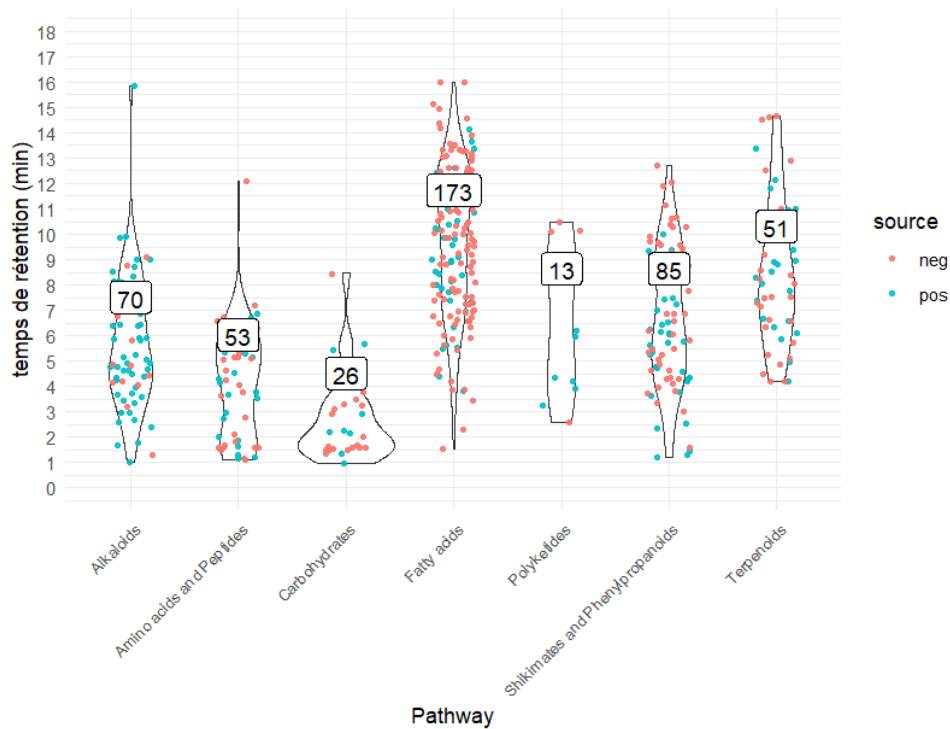


Figure 2: Distribution de l'abondance des signaux selon le temps de rétention au sein des voies métaboliques dans la fraction actives F4 après séparation chromatographique en phase inverse (colonne C18). Les résultats sont présentés sous la forme de *violin plot* où chaque point représente un signal (en rouge, ESI-, en bleu, ESI+).

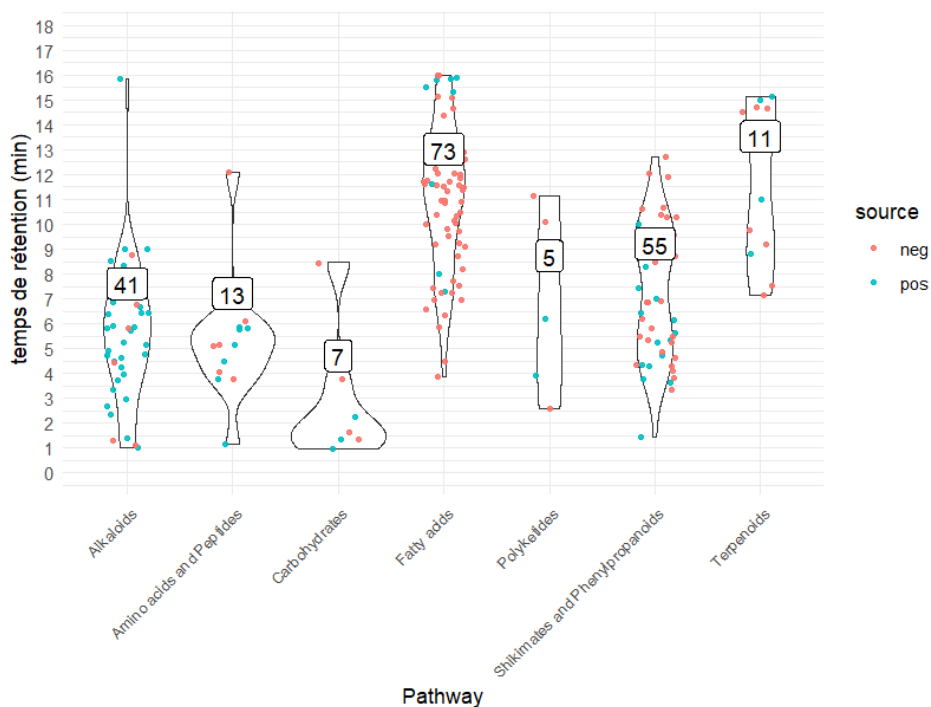


Figure 3: Distribution de l'abondance des signaux selon le temps de rétention au sein des voies métaboliques dans la fraction actives F13 après séparation chromatographique en phase inverse (colonne C18). Les résultats sont présentés sous la forme de *violin plot* où chaque point représente un signal (en rouge, ESI-, en bleu, ESI+).



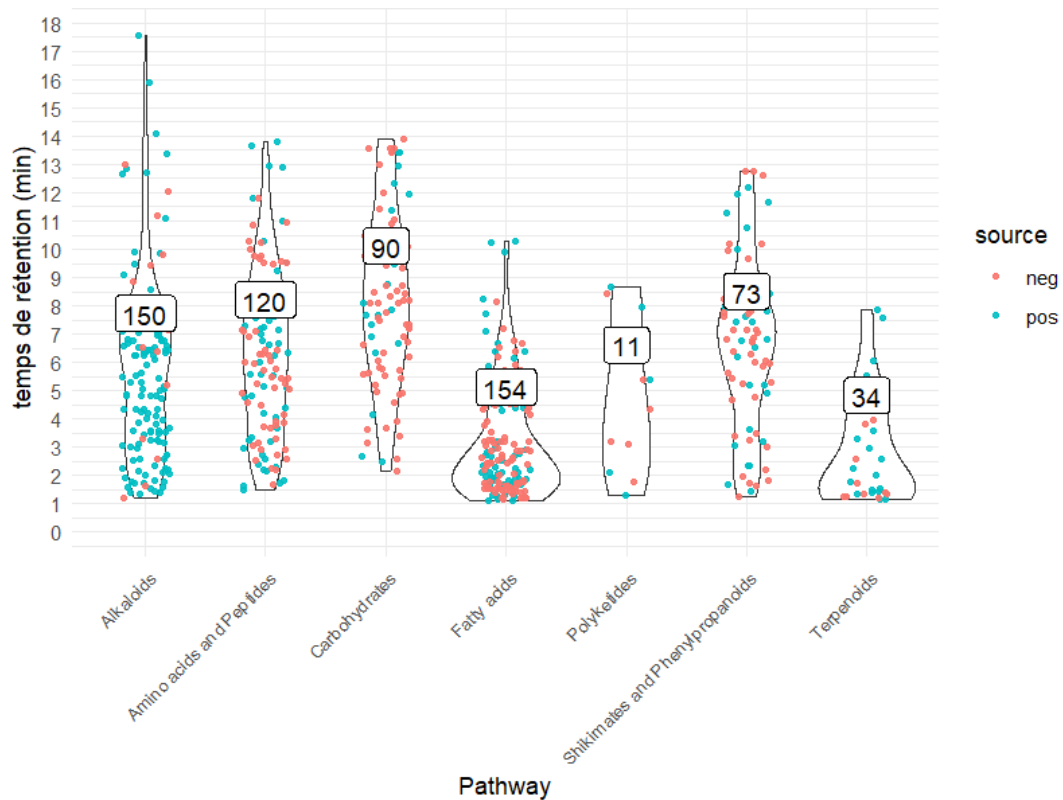


Figure 4: Distribution de l'abondance des signaux selon le temps de rétention au sein des voies métaboliques dans la fraction actives F1 après séparation chromatographique en phase inverse (colonne HILIC). Les résultats sont présentés sous la forme de *violin plot* où chaque point représente un signal (en rouge, ESI-, en bleu, ESI+).

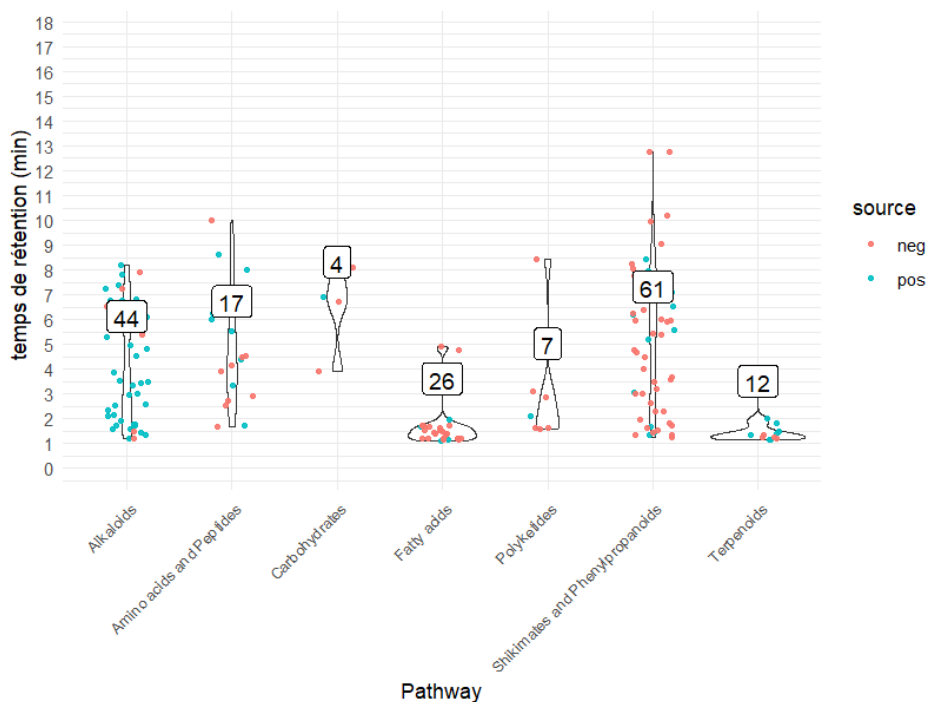


Figure 4: Distribution de l'abondance des signaux selon le temps de rétention au sein des voies métaboliques dans la fraction actives F13 après séparation chromatographique en phase inverse (colonne HILIC). Les résultats sont présentés sous la forme de *violin plot* où chaque point représente un signal (en rouge, ESI-, en bleu, ESI+).





## ANNEXE V : Paysage Chimique des fractions actives en C18 et en HILIC (NPC\_Superclass dans Sirius)

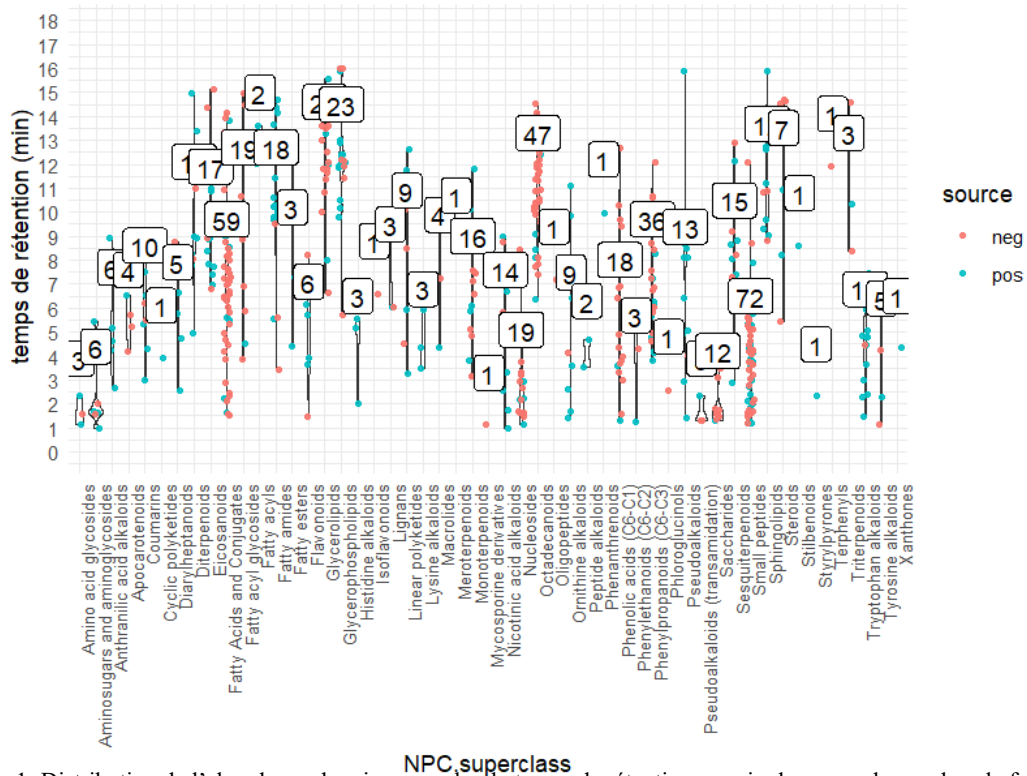


Figure 1: Distribution de l'abondance des signaux selon le temps de rétention au sein des superclasses dans la fraction actives F1 après séparation chromatographique en phase inverse (colonne C18). Les résultats sont présentés sous la forme de *violin plot* où chaque point représente un signal (en rouge, ESI-, en bleu, ESI+).

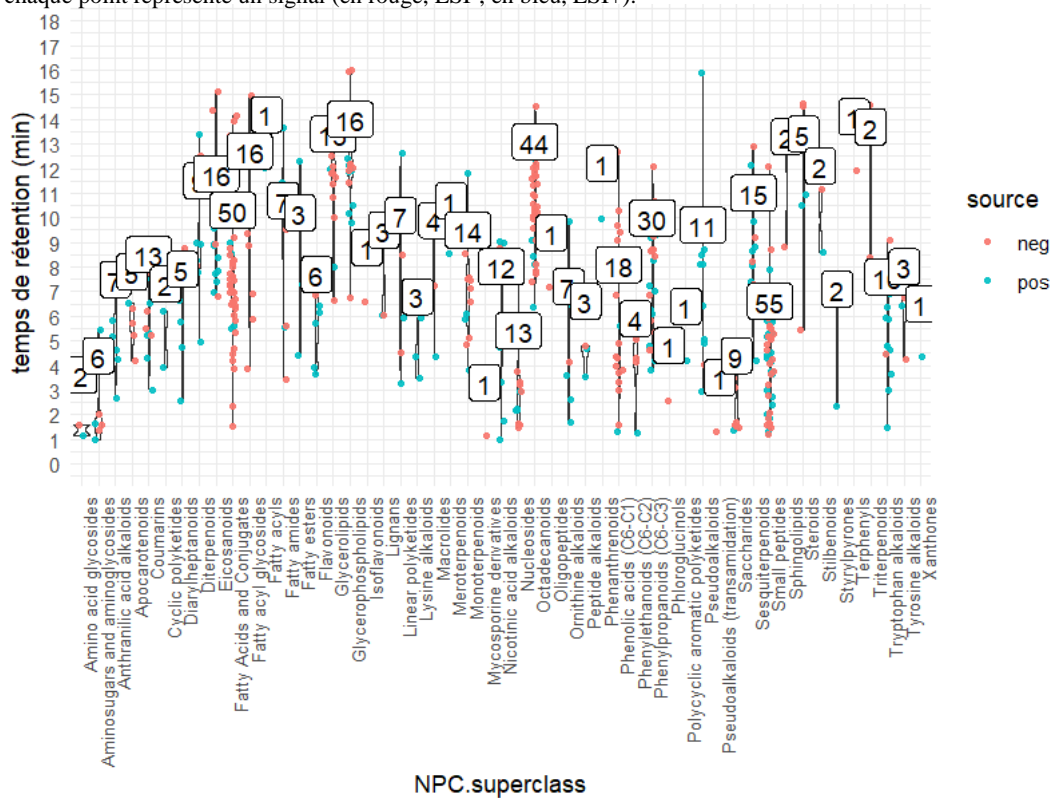


Figure 2: Distribution de l'abondance des signaux selon le temps de rétention au sein des superclasses dans la fraction actives F4 après séparation chromatographique en phase inverse (colonne C18). Les résultats sont présentés sous la forme de *violin plot* où chaque point représente un signal (en rouge, ESI-, en bleu, ESI+).



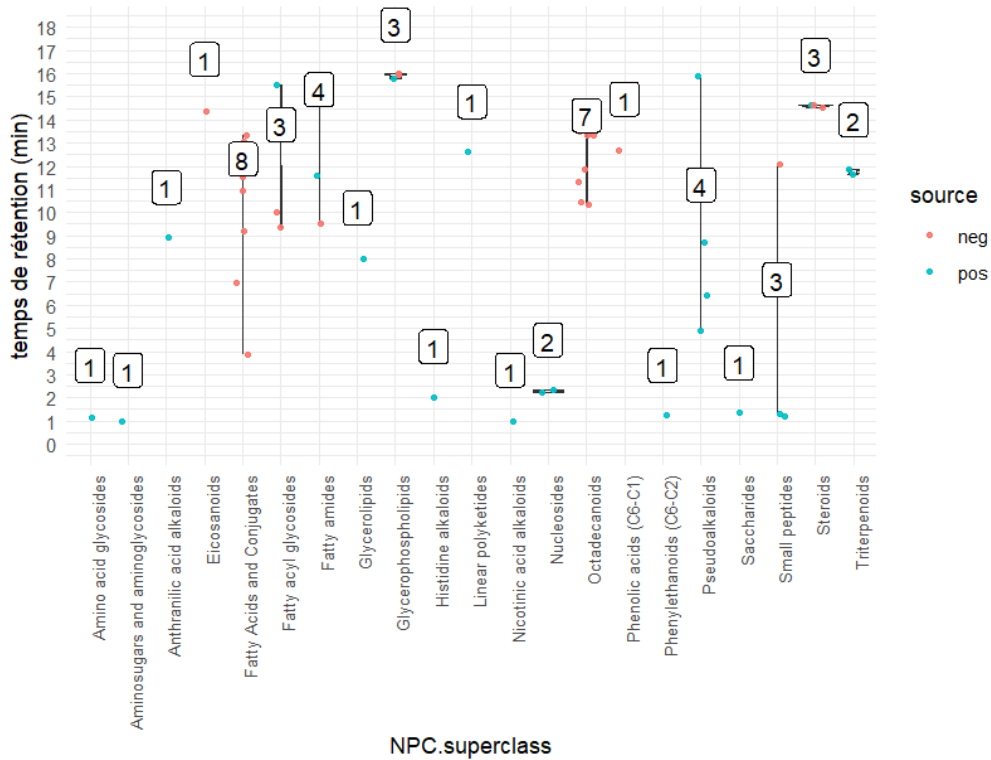


Figure 3: Distribution de l'abondance des signaux selon le temps de rétention au sein des superclasses dans la fraction actives F12 après séparation chromatographique en phase inverse (colonne C18). Les résultats sont présentés sous la forme de *violin plot* où chaque point représente un signal (en rouge, ESI-, en bleu, ESI+).

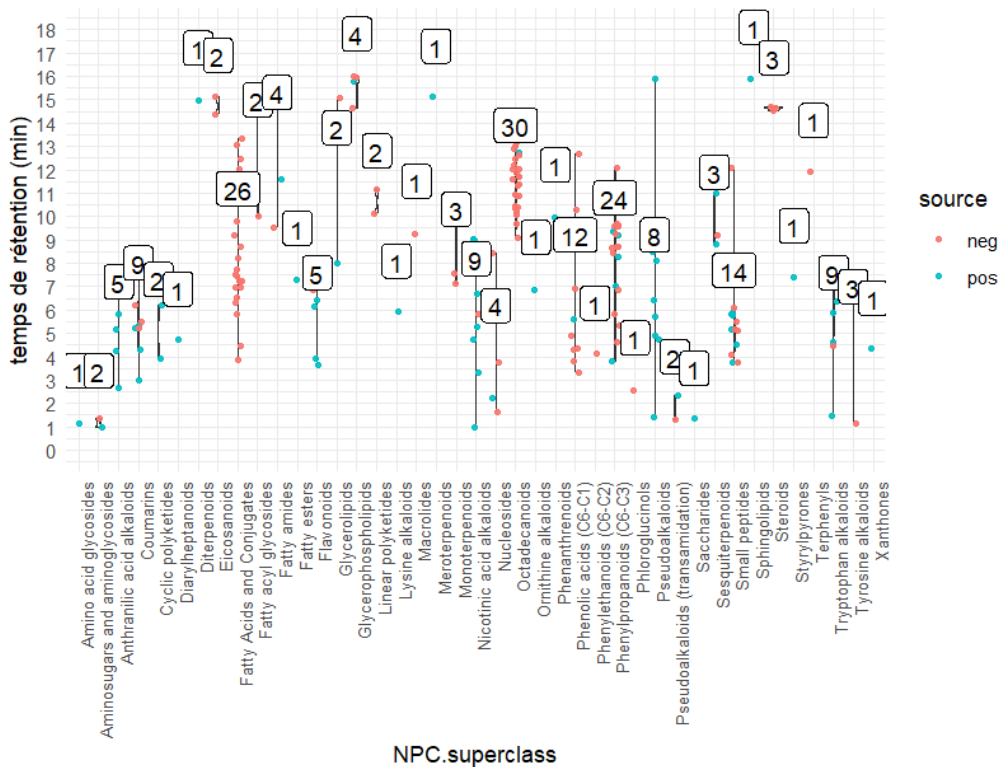


Figure 4: Distribution de l'abondance des signaux selon le temps de rétention au sein des superclasses dans la fraction actives F13 après séparation chromatographique en phase inverse (colonne C18). Les résultats sont présentés sous la forme de *violin plot* où chaque point représente un signal (en rouge, ESI-, en bleu, ESI+).



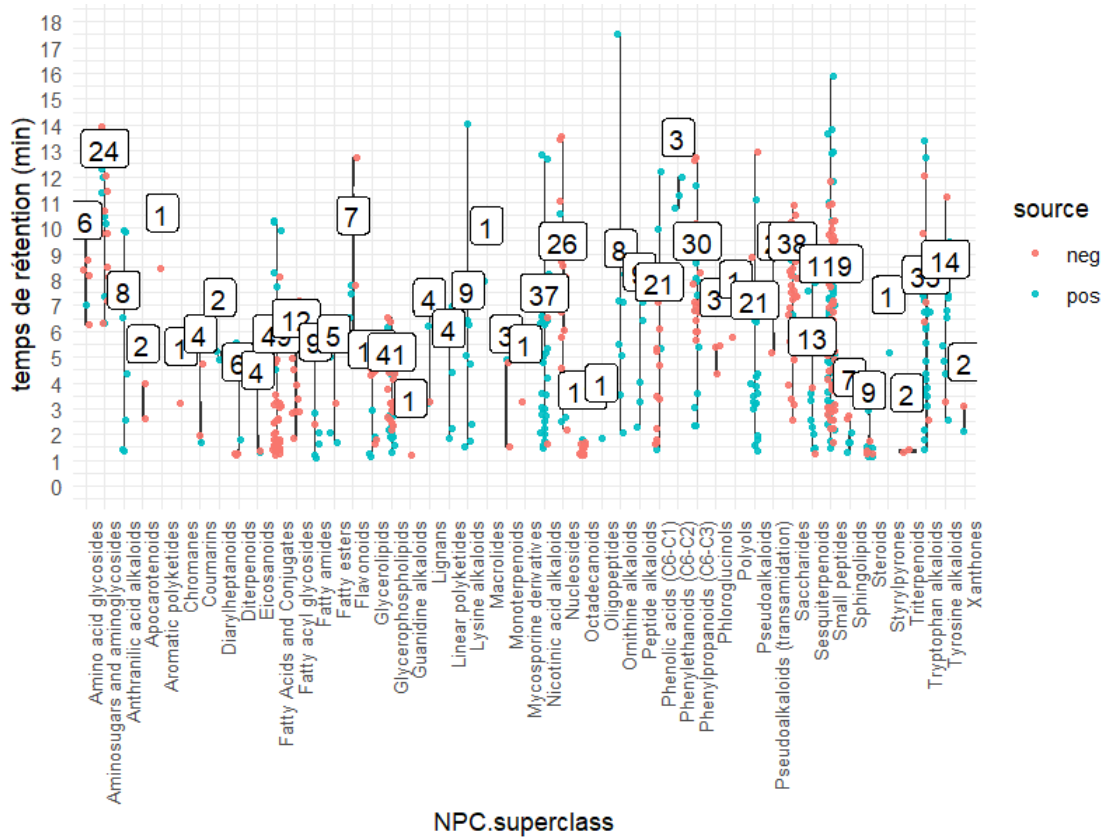


Figure 5: Distribution de l'abondance des signaux selon le temps de rétention au sein des voies superclasses dans la fractions actives F1 après séparation chromatographique à interaction hydrophile (colonne HILIC). Les résultats sont présentés sous la forme de *violin plot* où chaque point représente un signal (en rouge, ESI-, en bleu, ESI+).

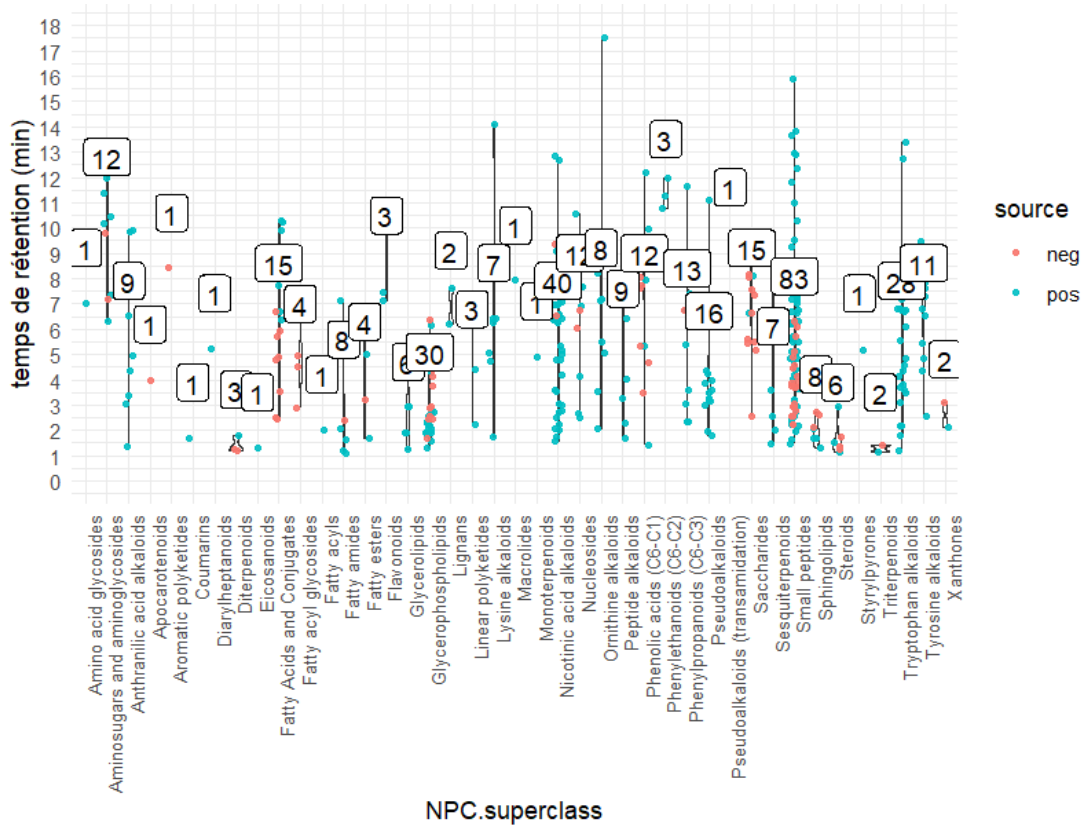


Figure 6: Distribution de l'abondance des signaux selon le temps de rétention au sein des voies superclasses dans la fractions actives F12 après séparation chromatographique à interaction hydrophile (colonne HILIC). Les résultats sont présentés sous la forme de *violin plot* où chaque point représente un signal (en rouge, ESI-, en bleu, ESI+).



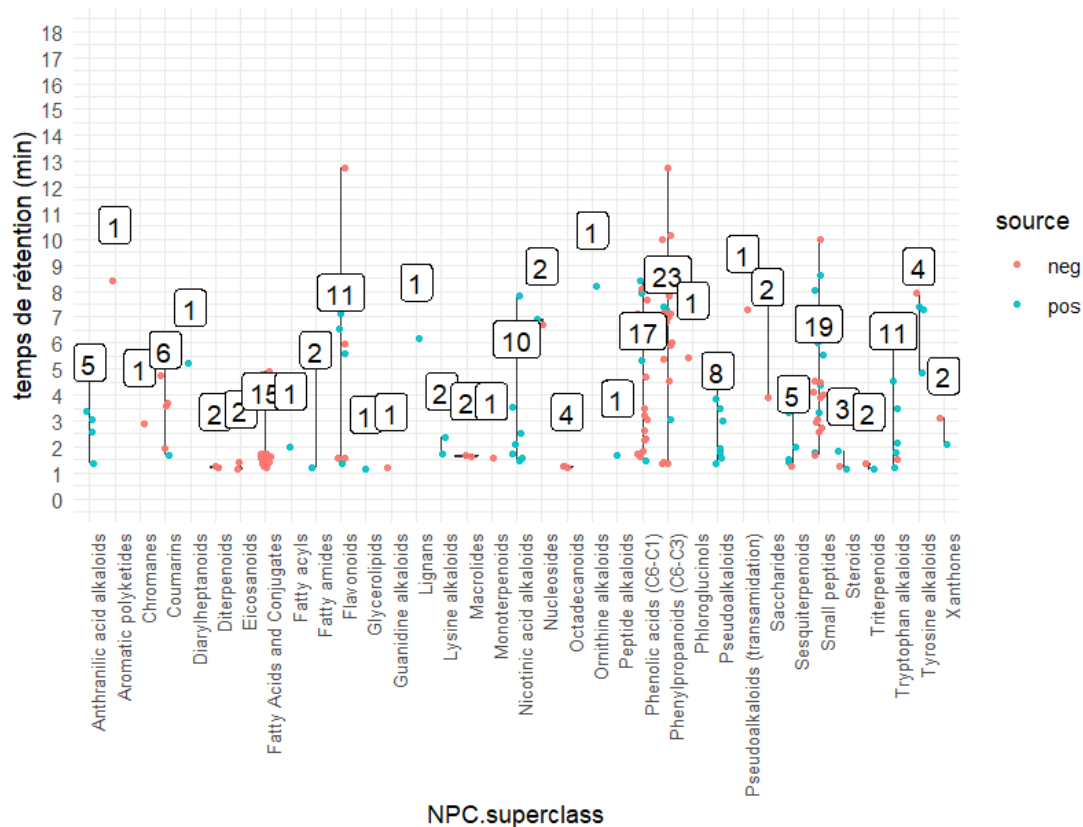


Figure 7: Distribution de l'abondance des signaux selon le temps de rétention au sein des voies superclasses dans la fractions actives F13 après séparation chromatographique à interaction hydrophile (colonne HILIC). Les résultats sont présentés sous la forme de *violin plot* où chaque point représente un signal (en rouge, ESI-, en bleu, ESI+).

### ANNEXE VI : Priorisation et sélection des métabolites cibles pour les fractions actives

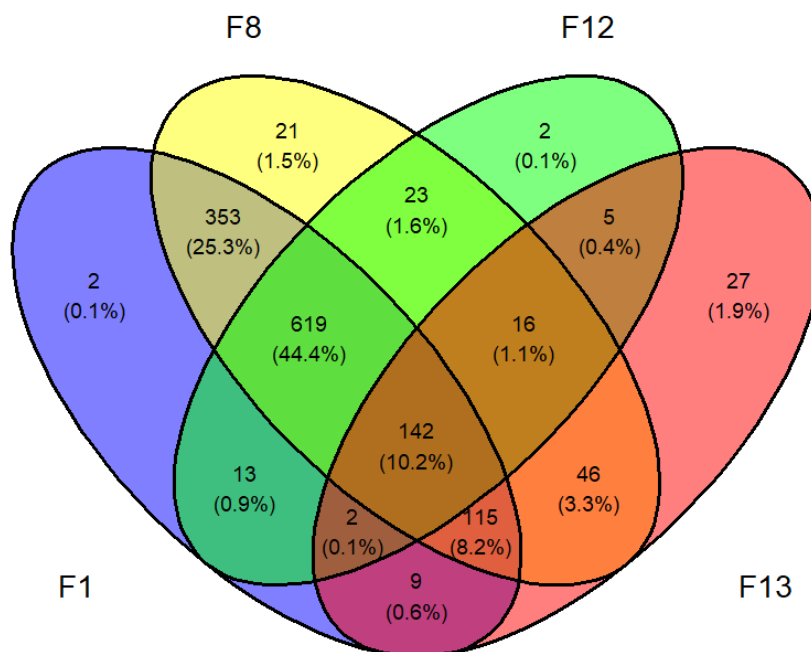


Figure 1 : Diagramme de Venn illustrant les métabolites communs identifiés au sein des fractions actives F1, F8, F12 et F13 en modes HILIC. La présence ou absence d'un composé dans une fraction a été définis en en fonction de son intensité de signal.







Figure 1 : Diagramme en rayon de soleil détaillant le profil chimique des métabolites communs identifiés dans les fractions actives en HILIC. Les différentes voies métaboliques, les superclasses et les noms spécifiques des composés sont illustrés, révélant la diversité chimique des composés d'intérêt

## ANNEXE VII : Elément de preuve de l'annotation des composés cibles (A compléter)

Tableau 1: Analyse des scores d'annotation et de classification des métabolites cibles (acide caféique, coumarate, acide vanillique et loliolide) en utilisant Sirius et MS-Finder. Les scores sont présentés en pourcentage de confiance, et les catégories de classification selon CANOPUS sont indiquées avec leurs scores respectifs. Les temps de rétention en minutes et les différences de masse en Da sont également notés. Les scores de similarité sont également inclus pour fournir une compréhension complète de la précision de l'annotation

Composes				Formule		Structure		Canopus			
Nom	Rt (min)	Plog (Sirius)	MZ (Da)	Score Sirius	Score Zodiac	Similarité(sirius)	Score Msfinder	Super Class	Score	Class	Score
Acide Caféique	5.329	0.97	135.04552	100%	100%	95.81	6.41	Phenylpropanoids	0.56	Cinnamic acids	0.57
Coumarate	6.881	1.39	163.04	100%	100%	100%	7.52	Phenylpropanoids	0.95	Cinnamic acids	0.98
Acide Vanélique	3.642	0.885	167.0353	100%	100%	52.31	7.99	Phenol	0.99	Benzenoids	0.99
Loliolide	6.227	1	197.11731	100%	100%	36.93	6.14	NA	NA	NA	NA



## ANNEXE VIII : Confirmation analytique :

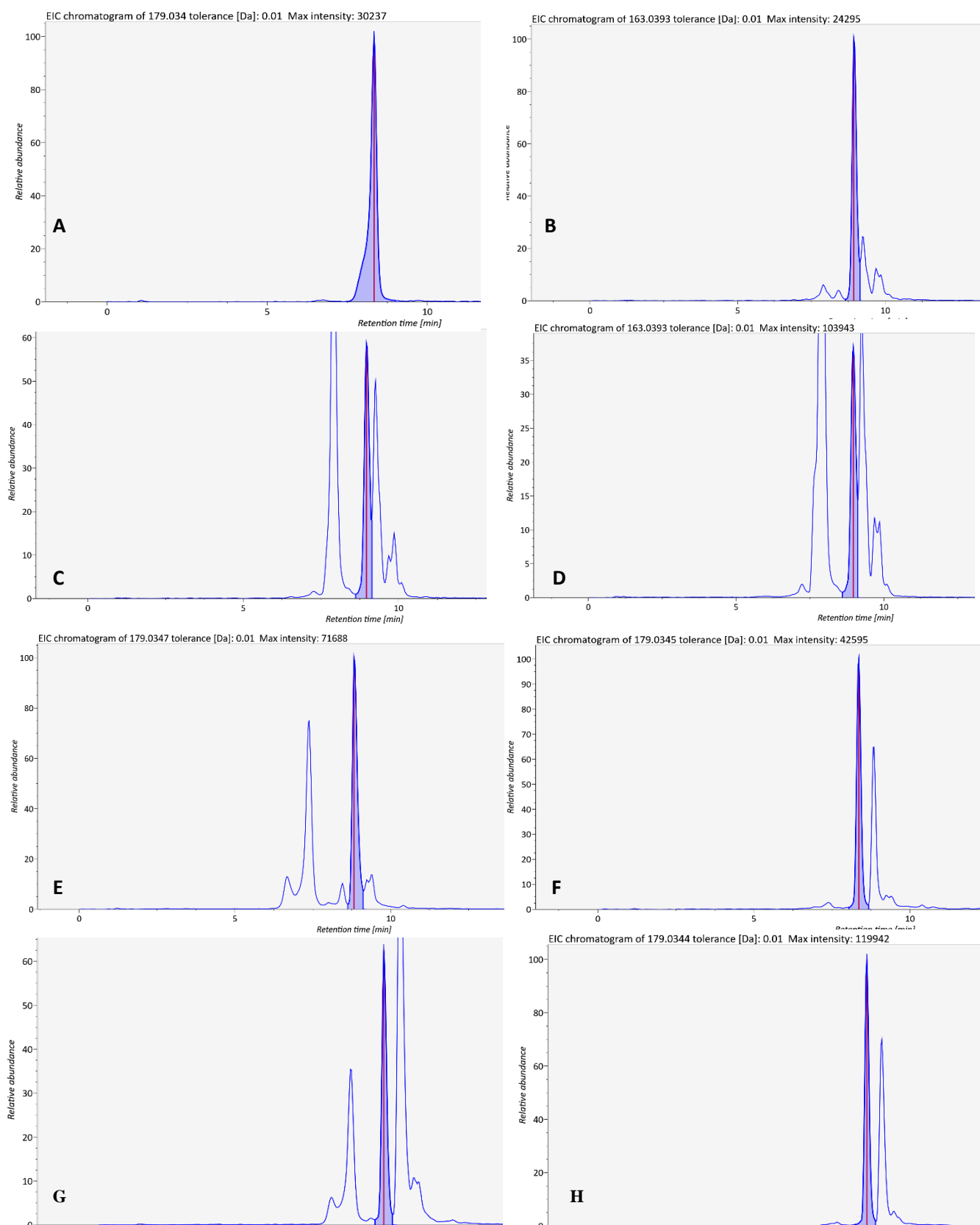


Figure 1 : Chromatogrammes de l'acide coumarique et de l'acide caféique dans les fractions F1, F4, F8 et F13. Le chromatogramme A représente le standard de l'acide caféique, B, C et D représentent respectivement l'acide coumarique dans les fractions F1, F4, F8 et F13, tandis que les chromatogrammes E, F, G et H illustrent l'acide caféique dans ces mêmes fractions.



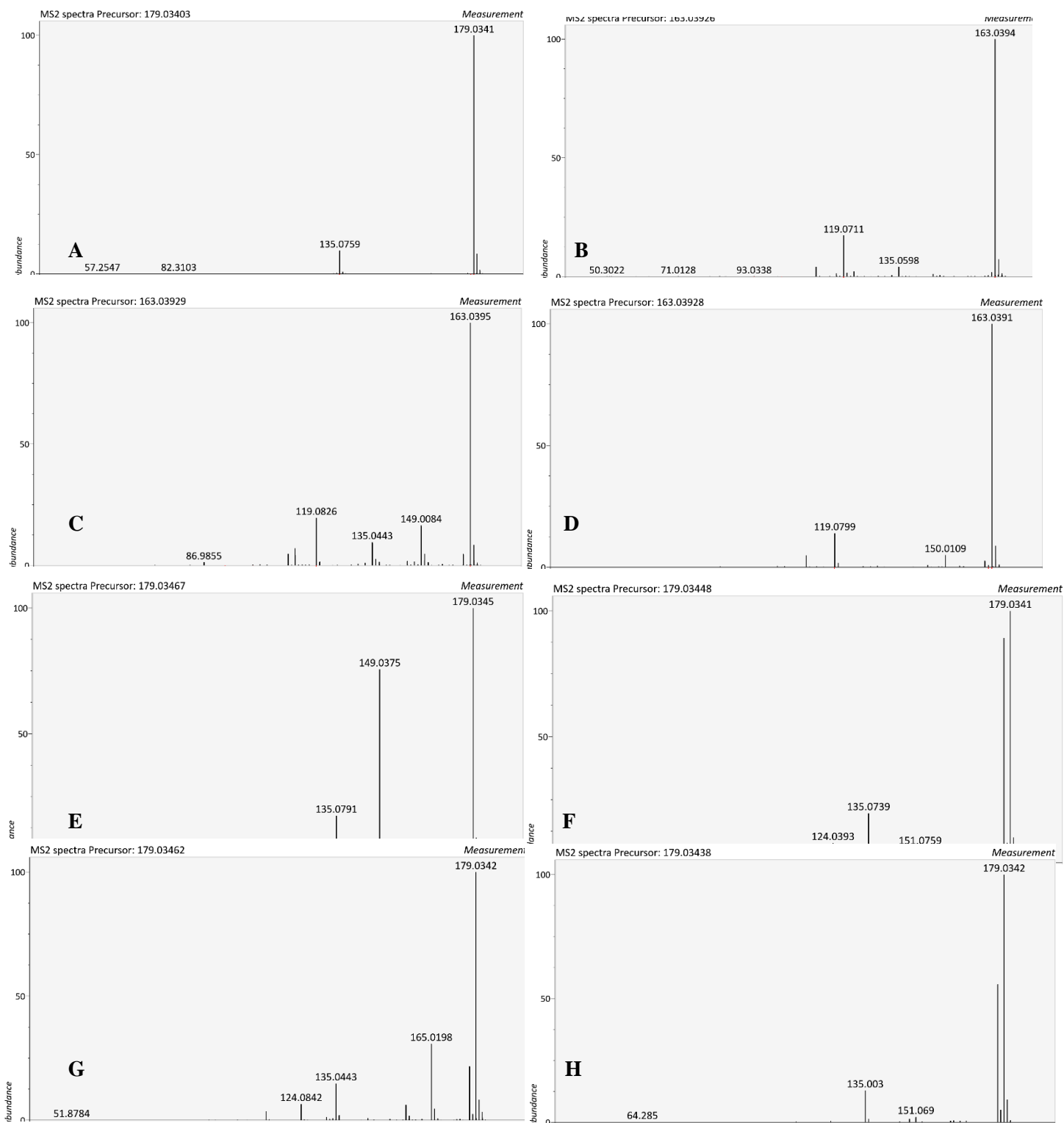


Figure 2 : Spectres MS2 de l'acide coumarique et de l'acide caféique dans les fractions F1, F4, F8 et F13. Le spectre A représente le standard de l'acide caféique, B, C et D représentent respectivement l'acide coumarique dans les fractions F1, F4, F8 et F13, tandis que les spectres E, F, G et H illustrent l'acide caféique dans ces mêmes fractions.



Diplôme et Mention : Master Biologie, Agrosociétés  
 Parcours : Amélioration, Production et Valorisation du Végétal  
 Option : Phytochimie, Qualité et Valeurs d'Usages (PQVU)  
 Responsable d'option : Alain Bouchereau

Auteur : Seck Serigne Bamba

Date de naissance : 12/11/1997

Nb pages : 24

Annexe(s) : 15

Année de soutenance : 2023

Organisme d'accueil : INRAE

Adresse :

50 Av. de Verdun,

33612 Cestas

Maître de stage : Juliette Rosebery et Nicolas Creusot

**Titre français : Identification structurale de composés impliqués dans la relation allélopathique entre *Lagarosiphon major* et *Microcystis aeruginosa* par spectrométrie de masse à haute résolution et par résonance magnétique nucléaire.**

**Titre anglais : Structural identification of compounds involved in the allelopathic relationship between *Lagarosiphon major* and *Microcystis aeruginosa* using high-resolution mass spectrometry and nuclear magnetic resonance.**

Les espèces exotiques envahissantes et les cyanobactéries représentent une menace croissante pour les écosystèmes aquatiques du monde entier, engendrant des problèmes environnementaux, économiques et sanitaires. Il est essentiel de développer de nouvelles approches pour contrôler à la fois les macrophytes envahissants et les cyanobactéries, d'où l'objectif de cette étude qui a consisté à explorer l'activité allélopathique de l'espèce aquatique *L. major* sur la cyanobactérie *M. aeruginosa*. Pour ce faire, une stratégie HRMS, associée à l'utilisation de deux types de colonnes chromatographiques (C18 et HILIC), a été mise en œuvre sur les fractions de l'extrait brut de *L. major*, dont certaines inhibaient le rendement photosynthétique de *M. aeruginosa*. Cette stratégie a permis d'identifier des voies métabolomiques et des classes chimiques de composés naturels ainsi que plusieurs métabolites. Parmi ces métabolites, trois composés, l'acide vanillique, l'acide caféique, et l'acide coumarique, connus pour leur activité allélopathique, ont été mis en évidence. Néanmoins, en dépit de ces découvertes prometteuses, la détermination des composés spécifiques responsables de l'activité allélopathique demeure un défi en raison de la complexité du métabolome. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour approfondir ces résultats, comme l'utilisation de la RMN, et aussi confirmer par des analyses biologiques l'activité de ces composés. Notre étude offre toutefois un point de départ encourageant pour le développement de nouvelles stratégies d'étude et d'identification structurale de composés impliqués dans la relation allélopathique entre macrophytes et cyanobactéries.

Invasive alien species and cyanobacteria are a growing threat to aquatic ecosystems worldwide, causing environmental, economic and health problems. It is essential to develop new approaches to control both invasive macrophytes and cyanobacteria, hence the aim of this study, which involved exploring the allelopathic activity of the aquatic species *L. major* on the cyanobacterium *M. aeruginosa*. To do this, an HRMS strategy, combined with the use of two types of chromatographic columns (C18 and HILIC), was implemented on fractions of the crude extract of *L. major*, some of which inhibited the photosynthetic yield of *M. aeruginosa*. This strategy was used to identify metabolomic pathways and chemical classes of natural compounds, as well as several metabolites. Among these metabolites, three compounds, vanillic acid, caffeic acid and coumaric acid, known for their allelopathic activity, were identified. However, despite these promising discoveries, determining the specific compounds responsible for allelopathic activity remains a challenge due to the complexity of the metabolome. Further research is needed to expand on these findings, such as the use of NMR, and also to confirm the activity of these compounds through biological analysis. However, our study provides an encouraging starting point for the development of new strategies for the study and structural identification of compounds involved in the allelopathic relationship between macrophytes and cyanobacteria.

Mots-clés : Allélopathique, *Lagarosiphon major*, *Microcystis aeruginosa*, HRMS, RMN

Key Words: Allelopathic, *Lagarosiphon major*, *Microcystis aeruginosa*, HRMS, NMR