

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N°598  
*Sciences de la Mer et du littoral*  
Spécialité : « *Biologie des organismes* »

Par

**Maxime GEORGES DES AULNOIS**

**Variations de salinité chez la cyanobactérie toxique d'eau douce  
*Microcystis aeruginosa* dans un contexte de transfert en milieu  
estuarien : réponses physiologiques et métaboliques**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 10 décembre 2019  
Unité de recherche : Laboratoire Phycotoxines Ifremer Nantes  
Thèse N° :

## Rapporteurs avant soutenance :

Jean François Humbert Directeur de recherche,  
Sorbonne Université

Christophe Six Maître de Conférences,  
Sorbonne Université

## Composition du Jury :

Claudia Wiegand Professeur Université, Rennes 1

Philippe Delavault Professeur, Université de Nantes

Directeur de thèse  
Zouher Amzil HDR, Laboratoire Phycotoxines Ifremer

Co-directeur de thèse  
Myriam Bormans Directrice de Recherche, CNRS

## Invité(s)

Cécile Klein Maître de Conférences,  
Université de Bretagne Occidentale







Remerciements :

*Je tiens à remercier Christophe Six et Jean-François Humbert qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci pour vos remarques et conseils qui ont permis d'améliorer la qualité du manuscrit. Je tiens également à remercier Claudia Wiegand, Philippe Delavault et Cécile Klein qui ont accepté de faire partie du jury et d'évaluer ce travail de thèse.*

*Je tiens à remercier l'ensemble des personnes ayant participé au déroulement et à l'aboutissement de cette thèse.*

*Merci à Zouher Amzil et Amandine Caruana de m'avoir permis de réaliser ce projet de thèse et de m'avoir laissé la possibilité d'en explorer certains aspects. Merci, Zouher, d'avoir dirigé cette thèse et merci, Amandine, de l'avoir encadrée.*

*Merci également à Myriam Bormans qui a co-dirigé cette thèse. Merci Myriam pour ta bienveillance, tes conseils, tes relectures et corrections et pour cette bonne humeur qui ne te quitte jamais.*

*Je tiens également à remercier Enora Briand et Damien Réveillon qui ont participé activement à l'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse.*

*Merci Enora, pour les nombreux conseils et corrections que tu as apporté. Ce fût un plaisir de partager et d'échanger autour de cet organisme formidable qu'est *Microcystis* sp.. Un grand merci également à toi Enora, lorsque je luttais pour obtenir l'ARN de *Microcystis* dans les temps, avant de partir en Allemagne. Je n'oublie pas non plus cette joie de vivre lorsqu'il s'agit de faire la fête et de laisser la science de côté.*

*Damien, je te dois également une bonne dose de merci(s) (et peu importe le nombre de chiffres significatifs que je pourrais y mettre pour l'évaluer). Du  $BG_{110} + salts^*$  à l'identification des composés, en passant par une belle bataille avec le reviewer 3, je pense que l'on a débattu de tout au cours de cette thèse et tes remarques ont toujours permis d'améliorer et de remettre en question ma vision de la recherche, de la biologie et de la chimie. Tu n'es pas le dernier non plus, lorsqu'il s'agit de passer de la pipette à la tireuse. Encore merci.*

*Merci également à Elke Dittmann et son équipe qui ont accepté de m'accueillir pendant 3 mois dans le cadre de ma mobilité. Merci à toute l'équipe et bonne continuation à tous.*

*Merci aussi à Nicolas Chomérat, Bruno Saint-Jean, Thomas Lacour et Sabine Stachowski-Haberkorn, je n'ai jamais cessé d'en apprendre sur les microalgues et leur étude en discutant avec vous.*

*De nombreuses personnes ont également mis la main à la pâte et leur grain de sel, au cours des expériences réalisées pendant ma thèse.*

*Merci, Pauline, j'ai passé 6 bons mois avec toi pour ton stage de M2 et je suis très content de ce que l'on a réussi à accomplir ensemble. Je te souhaite le meilleur pour ta thèse et je ne me fais aucun souci pour ta future carrière de chercheuse.*

*Merci à Sylvain K, quel plaisir de t'avoir rencontré en début de parcours et d'avoir tant rigolé et refait le monde avec toi. À très vite, pour je l'espère de nouvelles aventures.*

*Merci Véronique (qu'on lui décerne une étiquette d'or pour son implication). Je commence à regretter ce sifflement incessant, qui a fini par me permettre de surmonter ma phobie de l'HPLC couplée à la spectrométrie de masse. Tu étais là pour tout régler et réparer lors de mes grosses et petites galères.*

*Parmi les gens qui m'ont permis d'aller au bout de ces expériences, il y a Florent, Elise et Michèle. Merci, Florent, tu étais toujours là quand il le fallait et avec le sourire. Je n'ai pas toujours été le plus cool des collègues, car je suis souvent (toujours) venu te voir sans prévenir et sans anticiper.*

*Michèle merci également, de m'avoir initié à la reconnaissance des cyanobactéries qui te sont si chères. Merci aussi pour ta bienveillance et ta gentillesse, nos conversations sur la vie culturelle de Nantes me manquent déjà.*

*Merci Elise également, tu m'as également permis de tout boucler dans les temps, tu es une véritable machine de guerre au laboratoire ! Tu as toujours le sourire et c'est vraiment super d'avoir pu travailler ensemble.*

*Je tiens aussi à te remercier, Korian. Outre nos débats intenses sur la société actuelle, travailler avec toi a vraiment été inspirant. Tu es véritablement le « géo-trouve-tout » que je ne serai jamais, et ce fut un plaisir de faire de la culture continue en mode « Do It Yourself ».*

*Je te remercie Fabienne pour ton aide au cours de l'analyse des solutés compatibles. Tu m'as également permis de me surmonter ma phobie de la chromatographie machin machin. Ce fut un plaisir de travailler à tes côtés et je regrette que l'on n'ait pas pu faire plus de manip ensemble. Je dois également te remercier pour cette passion*

*commune qui nous anime pour le Bingo Live. Tu m'as transmis ce virus et aujourd'hui je suis un thésard ruiné, mais heureux.*

*Je ne peux pas réaliser la rédaction du chapitre de la thèse que tout le monde va lire, sans évoquer mon homonyme et colocataire de bureau, Georges. Merci pour tout, Georges, j'ai beaucoup ri à tes côtés et aussi appris lorsque l'on a abordé la biologie. Pour le reste tu aimes donner un côté surréaliste aux conversations et cela va me manquer. Ton rire et ton sens de la fête vont également me manquer.*

*Voilà maintenant trois fois que je parle de fêtes, alors merci Mano ! Malheureusement, nous n'avons pas directement travaillé ensemble, mais par contre, quelle joie !, de t'avoir suivi lorsqu'il fallait faire sauter les bouchons de liège. Ta bonne humeur et ton esprit festif vont me manquer, mais je pars l'esprit léger, car je sais que l'on se retrouvera autour d'un bon Jagger.*

*Merci également à Philipp, Véronique Sé., Florence, Liliane, Nathalie qui avaient toujours pu répondre à mes interrogations et animer le laboratoire d'une bonne ambiance.*

*L'heure est grave car cette aventure a définitivement été marquée par mes collègues doctorants, mes raisins, mes zinzins !*

*Commençons par Pierre-Marin mon compagnon d'infortune. Du début à la fin, nous avons marché ensemble dans la bonne humeur, dans Clash Royal, dans la fête et un peu dans la science quand même. Tu as été un super partenaire et je suis fier d'avoir fait tout ce chemin avec toi. Merci Marin-Pierre.*

*Ma petite Nounou, tu es la première à avoir commencé la ruée vers le sel qui a agité Phyc. J'ai adoré discuter de nos thèses respectives avec toi, tu es un véritable exemple à suivre et je suis pressé qu'un jour nous puissions travailler ensemble.*

*Merci Soso, ma zinzin préférée, ma sœur de gastronomie ! Tu seras une grande chercheuse et je suis impatient de collaborer avec toi. Ta passion pour Perros n'a d'égale que ta bonne humeur communicative et je suis heureux d'avoir croisé ta route.*

*Merci à toi Sylvain, mon dear fellow avec lequel je partage la danse du plus grand ponton des microalgues, tu as été un formidable compagnon d'infortune pendant cette thèse. Ce fut un véritable plaisir de partager ce bureau, ces 2 vs 2 et toutes ces discussions autour des microalgues.*

*Merci Thomas pour ta bonne humeur et ton intarissable passion pour la métabolomique et les sushis.*

*Merci Seb, Maria, Francesco, Maxime, Tanguy, Charline pour votre bonne humeur et tout ces bons moments partager pendant ces trois ans.*

*Il y a du monde au laboratoire Phycotoxine et il est difficile de remercier tout le monde mais sachez que vous avez tous contribué au bon déroulement de ce projet.*

*Je terminerai par ceux qui m'ont poussé et porté jusqu'au bout. Merci, Cyrielle, tu es celle qui me connaît le mieux et qui sait toujours être là quand j'en ai besoin. Tu m'as permis d'aller au bout et je sais que tu me pousseras encore plus loin. La vie à tes côtés est merveilleuse.*

*Merci à ma famille également, je continuerai à vous bassiner avec les microalgues ! Merci d'être là et de me soutenir ! Je terminerai avec une pensée pour ma grand-mère qui a toujours été touchée par la grandeur des océans, merci d'avoir été là et de ton éternelle bienveillance.*







# Table des matières

<b>ÉTAT DE L'ART</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>2</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>5</b>
LES CYANOBACTERIES	5
FACTEURS FAVORISANT LE DEVELOPPEMENT DES CYANOBACTERIES	8
DIVERSITE ET TOXICITE DES CYANOTOXINES	12
<b>LES MICROCYSTINES</b>	<b>15</b>
CARACTERISATION DES MICROCYSTINES ET DIVERSITE	15
TOXICITE DES MC	16
ORGANISMES PRODUCTEURS	17
RISQUES ET VOIES D'EXPOSITION AUX MC PRESENTES DANS L'ENVIRONNEMENT	18
VOIE DE BIOSYNTHESE DES MC	19
FACTEURS ABIOTIQUES INFLUENÇANT LA SYNTHÈSE DES MICROCYSTINES	21
ROLE BIOLOGIQUE ET ECOLOGIQUE DES MICROCYSTINES	23
<b>LE GENRE <i>MICROCYSTIS</i> ET SON TRANSFERT VERS LES ECOSYSTEMES ESTUARIENS</b>	<b>25</b>
MORPHOLOGIE ET TAXONOMIE	25
AIRE DE REPARTITION	26
PRESENCE DES MC EN MILIEU OCEANIQUE	28
LE TRANSFERT DE <i>MICROCYSTIS</i> SP. EN ZONE ESTUARIENNE : UN PHENOMENE MONDIAL	29
LA SALINITE, LA TEMPERATURE ET LA DISPONIBILITE EN NUTRIMENTS CONDITIONNENT L'EXPANSION ET LE DEVELOPPEMENT DE <i>MICROCYSTIS</i> SP. EN ZONE ESTUARIENNE	33
<b>REPONSES PHYSIOLOGIQUES DES CYANOBACTERIES FACE AUX VARIATIONS DE LA SALINITE</b>	<b>34</b>
UNE VARIATION DE SALINITE MODIFIE L'EQUILIBRE OSMOTIQUE DES CELLULES	34
STRATEGIES DE REPONSES AUX VARIATIONS DE SALINITE	35
LES DIFFERENTES PHASES DE LA REPONSE PHYSIOLOGIQUE DES CYANOBACTERIES AU STRESS SALIN	36
DIVERSITE DES SOLUTES COMPATIBLES PRODUITS PAR LES CYANOBACTERIES	39
<b>CONTEXTE ET OBJECTIFS DE CETTE ETUDE</b>	<b>42</b>
<b>CHAPITRE 1</b>	<b>45</b>

<b>TABLE LIST</b>	<b>47</b>
<b>FIGURE LIST</b>	<b>48</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>49</b>
<b>MATERIALS AND METHODS</b>	<b>52</b>
CHEMICALS AND REAGENTS	52
UHPLC CONFIGURATION	52
MS/MS CONDITIONS	53
INTRACELLULAR MC EXTRACTION	54
COMPARISON OF SPE CARTRIDGES	54
COMPARISON OF RESINS FOR SPATT	54
DETERMINATION OF LIMITS OF DETECTION (LD) AND QUANTIFICATION (LQ)	55
METHOD CHARACTERIZATION	55
APPLICATION TO NATURAL SAMPLES	56
<b>RESULTS</b>	<b>57</b>
EFFECT OF SALT ON SPE RECOVERY	57
RECOVERY	58
SPATT RECOVERIES	62
LDS AND LQS	63
SALT STRESS EXPERIMENT ON NATURAL SAMPLES	64
<b>DISCUSSION</b>	<b>67</b>
<b>CHAPITRE 2</b>	<b>70</b>
<b>FIGURE LIST</b>	<b>72</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>73</b>
<b>MATERIALS AND METHODS</b>	<b>76</b>
ORGANISMS AND CULTURE CONDITIONS	76
ACCLIMATION	76
EXPERIMENT	77
GROWTH RATE	77
MAXIMUM PHOTOCHEMICAL EFFICIENCY OF PHOTOSYSTEM II	77
MICROCYSTIN ANALYSES	77
DMSP, GB AND PROLINE ANALYSES	79

METABOLOMIC ANALYSIS	80
STATISTICAL ANALYSES	81
<b>RESULTS</b>	<b>83</b>
GROWTH AND SALINITY TOLERANCE AT CONTRASTED SALINITIES	83
TOXIN PROFILES AND TOXIN PRODUCTION OF <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i>	86
DMSP, GB AND PROLINE CELLULAR CONCENTRATIONS	89
METABOLOMIC ANALYSES	90
<b>DISCUSSION</b>	<b>94</b>
SALINITY TOLERANCE OF <i>M. AERUGINOSA</i>	94
IMPACT OF SALINITY ON MC PRODUCTION	94
TARGETED AND NONTARGETED ANALYSES OF METABOLITES AT DIFFERENT SALINITIES	96
<b>SUPPLEMENTARY</b>	<b>100</b>
<b>ANNEXE</b>	<b>104</b>
<b>CHAPITRE 3</b>	<b>109</b>
<hr/>	
<b>TABLE LIST</b>	<b>111</b>
<b>FIGURE LIST</b>	<b>111</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>112</b>
<b>MATERIALS AND METHODS</b>	<b>115</b>
ORGANISMS AND EXPERIMENTAL DESIGN	115
CELL ENUMERATION AND PHOTOSYNTHETIC PARAMETER	115
LC-MS/MS ANALYSIS OF MCs	116
RNA ISOLATION AND RT-QPCR	116
METABOLOMIC ANALYSES	117
STATISTICAL ANALYSES	118
<b>RESULTS</b>	<b>120</b>
GROWTH OF <i>M. AERUGINOSA</i> DURING A SALT-SHOCK	120
PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY	121
RELATIVE GENE EXPRESSIONS AFTER A SHORT PERIOD OF SALT-SHOCK	122
METABOLOME DYNAMICS OF <i>M. AERUGINOSA</i> IN RESPONSE TO SALT TREATMENT	124
MC CELLULAR QUOTAS DURING SALT SHOCK	127
<b>DISCUSSION</b>	<b>131</b>

<b>SUPPLEMENTARY</b>	<b>135</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>137</b>
<b>ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE DES MC EN MILIEU SALIN</b>	<b>139</b>
ANALYSE DES MC INTRACELLULAIRES	139
ANALYSE DES MC DISSOUTES	141
<b>REPNSES PHYSIOLOGIQUES DE <i>M. AERUGINOSA</i> FACE A UNE AUGMENTATION DE LA SALINITE</b>	<b>143</b>
IMPACT DE LA SALINITE SUR LA PRODUCTION DE MC, LE PROFIL TOXINIQUE ET LA TOXICITE DES EFFLORESCENCES DE <i>M. AERUGINOSA</i>	144
TOXICITE DES EFFLORESCENCES DE <i>M. AERUGINOSA</i> DANS UN CONTEXTE DE TRANSFERT EN MILIEU ESTUARIEEN	146
LA DIVERSITE DES SOLUTES COMPATIBLES IMPLIQUES DANS LA REPONSE AU STRESS SALIN CHEZ <i>M. AERUGINOSA</i>	147
REPONSES ADAPTATIVES DE <i>M. AERUGINOSA</i> A UNE AUGMENTATION DE LA SALINITE: LES APPORTS DES EXPERIENCES DE STRESS ET D'ACCLIMATATION	149
L'INFLUENCE DE L'ORGANISATION EN COLONIES SUR LA TOLERANCE A LA SALINITE DE <i>M. AERUGINOSA</i>	151
<b>VALORISATION</b>	<b>154</b>
LISTE DES ARTICLES	155
LISTE DES PRESENTATIONS ORALES	156
LISTE DES POSTERS	156
<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>157</b>

# État de l'art



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Diversité\* chimique des cyanotoxines, des genres producteurs, des modes d'action et des symptômes décrits (d'après Meriluoto et al. 2016, Huisman et al. 2018). **p : 13**

Tableau 2 : Liste des localités dans le monde où le transfert de *Microcystis* sp. et de MC en milieu marin a été documenté. Pour une revue complète de la présence de MC en milieux saumâtre et marin, (voir Preece et al. (2017) et Vareli et al. (2013)). **p : 31**

Tableau 3 : Diversité des solutés compatibles accumulés en cas de stress salin chez les cyanobactéries. **p : 41**

## Liste des figures

Figure 1 : Images illustrant la diversité morphologique des cyanobactéries (adaptées et modifiées depuis Paerl (2014) et Huisman et al. (2018)). (A) *Microcystis* spp. (type coccoïde). (B) *Synechococcus* sp. (type coccoïde). (C) *Oscillatoria* sp. (type filamenteux sans hétérocyste). (D) *Lyngbya* sp. (type filamenteux sans hétérocyste). (E) *Dolichospermum* spp. (type filamenteux avec hétérocystes, échelle non disponible). (F) *Trichodesmium* sp. (type filamenteux avec hétérocystes, échelle non disponible). **p : 6**

Figure 2 : Représentation schématique des conséquences du changement climatique sur la dynamique des efflorescences de cyanobactéries (traduit et adapté depuis Thomas and Litchman (2016) et Huisman et al. (2018)). (A) Impact de la température sur la croissance des principaux genres de cyanobactéries toxiques. (B) Le changement climatique impacte la dynamique des efflorescences de cyanobactéries de diverses manières. (1) Une augmentation des températures moyennes des écosystèmes aquatiques favorise la stratification de la colonne d'eau. L'absence d'homogénéisation favorise l'accumulation des cyanobactéries en surface. (2) L'augmentation de la concentration atmosphérique en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) augmente le flux de dioxyde de carbone dans les eaux de surface et favorise le développement des efflorescences de cyanobactéries. (3,4) Dans un contexte de changement climatique, l'alternance des épisodes de sécheresse et de fortes précipitations pourrait favoriser les apports de nutriments et le développement des efflorescences. (5) Le changement climatique influence également la structure des réseaux trophiques, ce qui pourrait influencer la dynamique des efflorescences de cyanobactéries. **p : 10**

Figure 3 : (A) Répartition des efflorescences de cyanobactéries toxiques ayant fait l'objet d'une publication scientifique en fonction de la localisation (Am N : Amérique du Nord ; Eu : Europe ; Aus : Australie ; Afr : Afrique ; Am S : Amérique du Sud ; NA : Nature des toxines non spécifiée). (B) Répartition des différentes familles de cyanotoxines au sein des efflorescences de cyanobactéries toxiques ayant fait l'objet d'une publication scientifique. Données issues de Svirčev et al. (2019). **p : 11**

Figure 4 : Structure d'une MC-LR associée aux différentes combinaisons d'acides aminés possibles ainsi qu'à leur fréquence d'apparition (adaptée depuis Ortiz et al. 2017). **p : 15**

Figure 5 : Schéma illustrant les différentes voies d'expositions aux MC et la diversité des organismes impactés par la présence de MC dans l'environnement. **p : 18**



Figure 6 : Représentation schématique d'après Dittmann et al. (2013) de la voie de biosynthèse des MC. Le nom des enzymes caractérisées biochimiquement apparaît en rouge. Les autres réactions sont issues des prédictions formulées à partir d'approches bioinformatiques. Les acides aminés et carboxyliques incorporés ou modifiés par des protéines apparaissent en rouge. Domaines PKS : KS : kétéoacyl synthase, AT : acyltransférase, DH : déhydratase, KR : kétéoréductase, ACP : protéine porteuse d'acyle, CM : Méthyltransférase C, AMT : glutamate-semialdéhyde aminotransférase, domaine NRPS : A : domaine d'adénylation, C : domaine de condensation, E : domaine d'épimérisation, NMT : N-méthyltransférase, PCP : Protéine porteuse de peptidyle, TE : domaine thioestérase. **p : 20**

Figure 7 : Carte du monde présentant la localisation des efflorescences de *Microcystis* sp. et la présence de MC associées (mise à jour depuis Harke et al. (2016) et Preece et al. (2017)). **p : 27**

Figure 8 : Schéma illustrant le phénomène de transfert des efflorescences de *Microcystis* sp. le long du continuum eau douce – estuaire – mer. L'échelle de salinité représente la division de l'estuaire en fonction de la salinité (Mitsch et Gosselink, 2000). La couleur rouge indique la zone limite de tolérance à la salinité pour *M. aeruginosa* (Tonk et al. 2007, Georges des Aulnois et al. 2019). **p : 30**

Figure 9 : Les différentes phases de la réponse au stress salin chez les cyanobactéries décrites par Hagemann (2011). Ces dernières impliquent un changement du biovolume cellulaire, des échanges d'ions et d'eau au travers de la membrane plasmique ainsi que la synthèse et l'accumulation de solutés compatibles. **p : 37**



# Introduction générale

## Les cyanobactéries

Les cyanobactéries constituent un groupe monophylétique au sein du domaine des bactéries (Blank 2004). La date d'apparition des cyanobactéries sur Terre est aujourd'hui encore un sujet très débattu au sein de la communauté scientifique (Demoulin et al. 2019). Elle se situerait entre 3.5 et 2.7 milliards d'années (Schopf 2012, Demoulin et al. 2019). L'embranchement des cyanobactéries a longtemps été décrit comme l'ensemble des organismes ayant pour ancêtre commun un organisme procaryote réalisant la photosynthèse (Shih et al. 2017, Soo et al. 2019). Cependant, de récents travaux basés sur l'ARN ribosomal 16S ont conduit à la division de l'embranchement des cyanobactéries en trois classes se composant des *Oxyphotobacteria*, des *Melainabacteria* et des *Sericytochromatia* (Shih et al. 2017). Les cyanobactéries souvent désignées comme « algues bleues » appartiennent à la classe des *Oxyphotobacteria* (Soo et al. 2019). L'apparition de la photosynthèse oxygénique au sein des *Oxyphotobacteria* coïncide avec l'oxygénation de l'atmosphère terrestre, il y a 2,3 milliards d'années. (Soo et al. 2017).

Les cyanobactéries\* présentent une répartition mondiale et prolifèrent majoritairement au sein des écosystèmes aquatiques qu'ils soient, dulcicoles, saumâtres ou marins. Les cyanobactéries ont également colonisé les milieux « extrêmes » tels que les sources géothermales, les lacs alcalins, les milieux désertiques, la cryosphère et les zones hypersalines (Cirés et al. 2017). Elles se développent aussi en zone subaérienne à la surface de différents substrats (Whitton 2012). Les cyanobactéries sont également impliquées dans diverses relations symbiotiques décrites chez une grande diversité d'organismes. En particulier, la présence de bactéries endosymbiotiques a été décrite chez les diatomées, les éponges, les coraux, les lichens et les fougères (Rai et al. 2002). L'ubiquité des cyanobactéries s'explique par une plasticité phénotypique et génotypique qui est illustrée par une importante diversité morphologique (Whitton 2012) (Figure 1).

\*Par souci de simplification, le terme « cyanobactérie » fera référence aux organismes appartenant à la classe des *Oxyphotobacteria* se développant en milieu aquatique dans la suite de cet ouvrage.

La diversité morphologique des cyanobactéries s'explique par l'existence de divers degrés d'organisation reposant sur quatre types de cellules différenciées (Flores and Herrero 2010) :

- les cellules végétatives
- les hétérocystes : responsables de la fixation de l'azote atmosphérique
- les cellules hormogoniales : responsables de la motilité des cellules
- les akinètes : responsables de la formation de spores, formes de résistance permettant aux cyanobactéries de survivre aux conditions défavorables

Les cyanobactéries se sont diversifiées en divers organismes unicellulaires et multicellulaires (Flores and Herrero 2010). Les cellules peuvent être isolées comme chez les genres *Prochlorococcus* et *Synechococcus* (Figure 1-B), organisées en colonies comme le genre *Microcystis* (Xiao et al. 2018) (Figure 1-A) ou regroupées en filaments composés de diverses cellules différenciées comme chez les genres *Dolichospermum* ou *Trichodesmium* (Figure 1-EF).

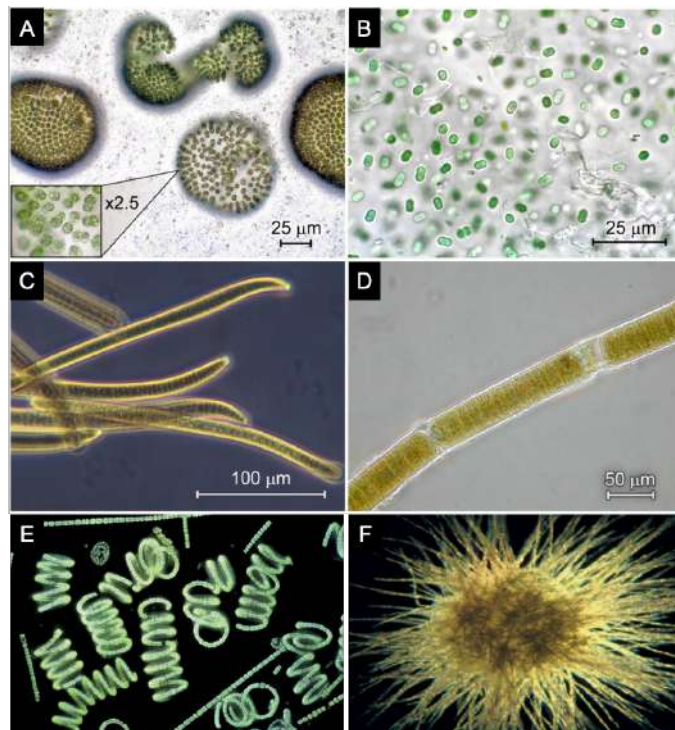


Figure 1 : Images illustrant la diversité morphologique des cyanobactéries (adaptées et modifiées depuis Paerl (2014) et Huisman et al. (2018). (A) *Microcystis* spp. (type coccoïde). (B) *Synechococcus* sp. (type coccoïde). (C) *Oscillatoria* sp. (type filamenteux sans hétérocyste). (D) *Lyngbya* sp. (type filamenteux sans hétérocyste). (E) *Dolichospermum* spp. (type filamenteux avec hétérocystes, échelle non disponible). (F) *Trichodesmium* sp. (type filamenteux avec hétérocystes, échelle non disponible).

Au sein des écosystèmes aquatiques, les cyanobactéries jouent un rôle clé parmi les différents cycles géochimiques du carbone, de l'azote et des minéraux (Huisman et al. 2018). Les cyanobactéries en fixent par le biais de la photosynthèse, le dioxyde de carbone sous forme de matière organique, ce qui représenteraient 30 % de la production primaire mondiale (Hagemann 2011). Les picocyanobactéries marines comprenant les genres *Prochlorococcus* et *Synechococcus* possèdent une large répartition au sein des océans et représenteraient près de 25 % de la production primaire nette des océans (Flombaum et al. 2013). Certaines cyanobactéries, dites diazotrophes, participent également à la fixation de l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) dans les écosystèmes aquatiques par un processus anaérobie. Dans les zones océaniques tropicales, la fixation du N<sub>2</sub> est notamment assurée par la présence de cyanobactéries du genre *Trichodesmium* (Bergman et al. 2013).

## Facteurs favorisant le développement des cyanobactéries

### L'eutrophisation des écosystèmes aquatiques favorise le développement des efflorescences de cyanobactéries

L'eutrophisation se définit par une surproduction de matière organique au sein des écosystèmes à la suite d'un apport d'azote et de phosphore d'origine anthropique (Le Moal et al. 2019). Ces apports de nutriments dans les écosystèmes aquatiques favorisent la croissance du phytoplancton, pouvant conduire à une augmentation rapide (1 à 2 semaines) de la biomasse cyanobactérienne qui aboutit à la dominance de la communauté phytoplanctonique (> 80 %) par une ou plusieurs espèces de cyanobactéries. Ce phénomène, appelé « efflorescence » (« bloom » en anglais) peut perdurer pendant plusieurs semaines et voir différents genres de cyanobactéries se succéder (Paerl and Otten 2016, Paerl et al. 2018). En eau douce, les efflorescences de cyanobactéries sont dominées par les genres *Microcystis*, *Planktothrix*, *Dolichospermum*, *Aphanizomenon* et *Raphidiopsis* (Whitton 2012).

La situation du lac Taihu en Chine est l'un des exemples emblématiques des conséquences de l'eutrophisation des lacs d'eau douce. En une trentaine d'années, la situation trophique du lac est passée de mésotrophique à hypertrophique (Paerl et al. 2011). La communauté phytoplanctonique historiquement dominée par des diatomées est aujourd'hui presque exclusivement dominée par des efflorescences de *Microcystis* spp. (Paerl et al. 2011).

La réduction et le contrôle des apports d'azote et de phosphore dans l'environnement sont aujourd'hui l'une des seules solutions durables permettant de réduire l'intensité des efflorescences de cyanobactéries toxiques au sein des différents écosystèmes (Figure 2) (Paerl 2014, Fastner et al. 2016, Paerl et al. 2018, 2019).

### L'augmentation de la quantité de CO<sub>2</sub> atmosphérique catalyse la productivité cyanobactérienne en eau douce

L'évolution des activités humaines est directement corrélée à l'augmentation de la quantité moyenne de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) présent dans l'atmosphère. Cette augmentation n'est pas sans conséquence sur le développement des efflorescences de cyanobactéries en eau douce (Visser et al. 2016). La croissance des cyanobactéries est influencée par la disponibilité en CO<sub>2</sub> qui est la source principale de carbone pour ces organismes. L'augmentation de la quantité de CO<sub>2</sub> atmosphérique intensifie le transfert du CO<sub>2</sub> de l'air aux eaux de surface (Figure 2). Cet apport de carbone est alors directement utilisable par les cyanobactéries qui prolifèrent en surface. Ainsi, l'augmentation de la quantité de CO<sub>2</sub> atmosphérique a pour conséquence de favoriser la productivité et la croissance des efflorescences de cyanobactéries en eau douce (Sandrini et al. 2015a, Visser et al. 2016).

### Effet de la température

À l'échelle mondiale, le changement climatique devrait conduire à une augmentation de la température moyenne du globe selon les conclusions du Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Évolution du Climat (GIEC - <https://www.ipcc.ch/sr15/>). Le réchauffement des eaux de surface et la stratification de la colonne d'eau qui en résulte sont deux facteurs favorisant le développement des cyanobactéries par rapport aux autres organismes phytoplanctoniques (Figure 2) (Paerl and Paul 2012). Ainsi, au sein des lacs américains, l'intensité des efflorescences phytoplanctoniques au cours de la période estivale a augmenté dans près de 68% des lacs étudiés au cours des trente dernières années (Ho et al. 2019).

De plus, l'augmentation des températures à l'échelle globale est l'un des principaux facteurs qui favorise l'expansion de l'aire de répartition des espèces invasives. En effet, l'apparition nouvelle de proliférations des genres *Cylindrospermopsis* et *Aphanizomenon* dans certaines régions de l'hémisphère Nord, est aujourd'hui considérée comme l'une des conséquences de l'augmentation des températures (Sukenik et al. 2012, Antunes et al. 2015).

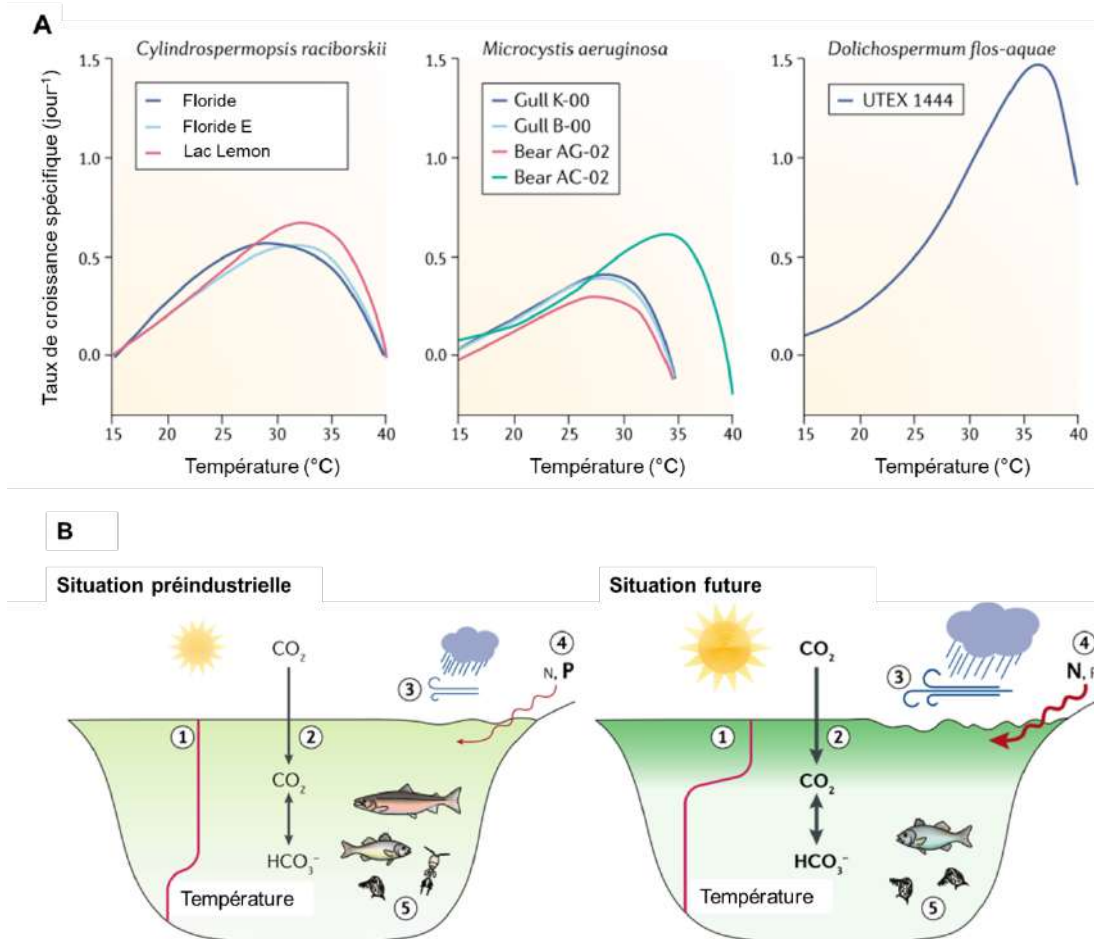


Figure 2 : Représentation schématique des conséquences du changement climatique sur la dynamique des efflorescences de cyanobactéries (traduit et adapté depuis Thomas and Litchman (2016) et Huisman et al. (2018)). **(A)** Impact de la température sur la croissance des principaux genres de cyanobactéries toxiques. **(B)** Le changement climatique impacte la dynamique des efflorescences de cyanobactéries de diverses manières. **(1)** Une augmentation des températures moyennes des écosystèmes aquatiques favorise la stratification de la colonne d'eau. L'absence d'homogénéisation favorise l'accumulation des cyanobactéries en surface. **(2)** L'augmentation de la concentration atmosphérique en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) augmente le flux de dioxyde de carbone dans les eaux de surface et favorise le développement des efflorescences de cyanobactéries. **(3,4)** Dans un contexte de changement climatique, l'alternance des épisodes de sécheresse et de fortes précipitations pourrait favoriser les apports de nutriments et le développement des efflorescences. **(5)** Le changement climatique influence également la structure des réseaux trophiques, ce qui pourrait influencer la dynamique des efflorescences de cyanobactéries.



L'ensemble de ces facteurs contribue à l'intensification des efflorescences de cyanobactéries à l'échelle globale (O'Neil et al. 2012, Michalak et al. 2013, Visser et al. 2016). En effet, l'abondance relative des cyanobactéries au sein de la communauté phytoplanctonique des lacs nord-américains et européens augmente depuis le début du XIX<sup>e</sup> siècle (Huisman et al. 2018). L'analyse de plus d'une centaine de carottes de sédiments a permis de mettre en évidence que près de 60 % des lacs étudiés présentent un accroissement de la part des cyanobactéries au sein de la communauté phytoplanctonique. Cette tendance tend à s'accélérer à partir du début de l'ère industrielle et à partir de la fin de la Seconde Guerre mondiale (Taranu et al. 2015). L'intensification des efflorescences de cyanobactéries au sein des Grands Lacs américains est la conséquence d'un enrichissement du milieu lié aux rejets agricoles et industriels et du changement climatique (Michalak et al. 2013). Ce type d'exemple illustre et confirme l'impact des activités humaines et du changement climatique sur la dynamique des efflorescences de cyanobactéries.

En eau douce, l'apparition d'efflorescences de cyanobactéries est un phénomène souvent associé à la production de composés toxiques pour l'Homme, la faune et la flore (Meriluoto et al. 2016). On désigne ainsi, comme « cyanotoxine », un composé qui présente un effet délétère sur l'activité biologique d'un organisme dans un environnement donné (Metcalf and Codd 2012).

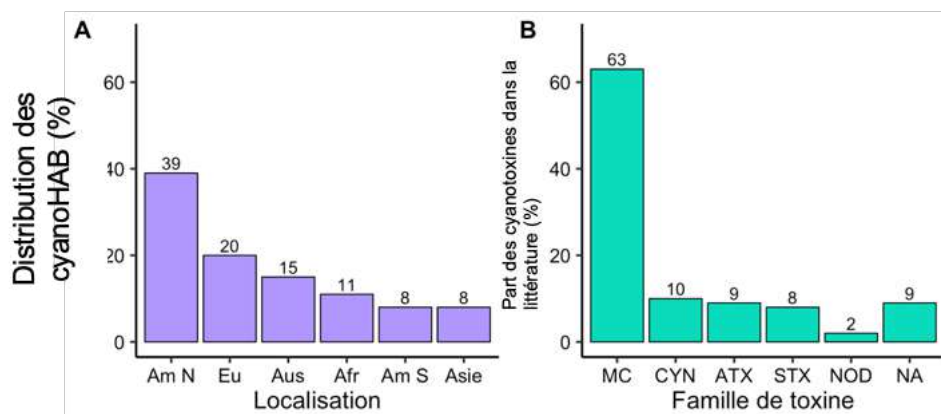


Figure 3 : **(A)** Répartition des efflorescences de cyanobactéries toxiques ayant fait l'objet d'une publication scientifique en fonction de la localisation (Am N : Amérique du Nord ; Eu : Europe ; Aus : Australie ; Afr : Afrique ; Am S : Amérique du Sud ; NA : Nature des toxines non spécifiée ; cyanobactéries : efflorescences de cyanobactéries toxiques). **(B)** Répartition des différentes familles de cyanotoxines au sein des efflorescences de cyanobactéries toxiques ayant fait l'objet d'une publication scientifique (MC : microcystines ; CYN : cylindrospermopsines ; ATX : anatoxines ; STX : saxitoxines ; NOD : nodularine ; NA : nature des toxines inconnues. Données issues de Svirčev et al. (2019).

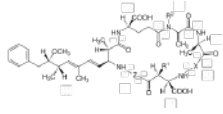
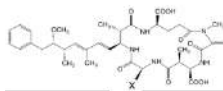
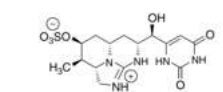
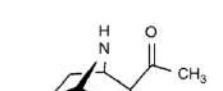
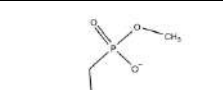
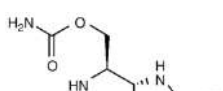
Plus de 1100 cas d'efflorescences de cyanobactéries impliquant la production de cyanotoxines ont fait l'objet de publications scientifiques (Svirčev et al. 2019). Le nombre d'articles rapportant des cas d'efflorescences de cyanobactéries toxiques a augmenté de « manière exponentielle » à partir des années 2000 (Merel et al. 2013). L'intérêt de la communauté scientifique pour les efflorescences de cyanobactéries toxiques s'explique par les conséquences parfois dramatiques qu'elles peuvent avoir pour la santé humaine et animale. Ainsi, Svirčev et al. (2019) ont mis en évidence l'existence de près de 180 cas d'empoisonnements (avec 34% d'humains et 66% d'animaux) ayant parfois conduit à la mort des organismes affectés (Figure 3). De tels épisodes d'empoisonnements ont été principalement rapportés sur le continent américain, en Europe et en Australie/Nouvelle-Zélande (Figure 3). La multiplicité des efflorescences de cyanobactéries toxiques à travers le monde s'explique par la diversité des composés identifiés et par la diversité des organismes producteurs. En effet, parmi plus de 150 genres de cyanobactéries décrites à ce jour, une quarantaine a été identifiée comme producteurs d'une ou plusieurs familles de cyanotoxines (Meriluoto et al. 2016).

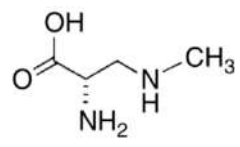
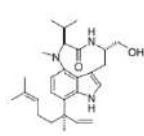
### Diversité et toxicité des cyanotoxines

Les cyanotoxines décrites à ce jour sont de natures chimiques diverses (alcaloïdes, peptides cycliques, lipopeptides et acides aminés). En conséquence, leur mode d'action et les organismes cibles sont variés (Chorus 2001, Neilan et al. 2013, Meriluoto et al. 2016, Buratti et al. 2017). On en distingue trois classes en fonction de leur mode d'action : les hépatotoxiques, les neurotoxiques et les dermatotoxiques (Tableau 1). La diversité des cyanotoxines s'exprime également au niveau de leurs potentielles fonctions physiologiques et écologiques. À ce jour, la majorité des cyanotoxines identifiées sont considérées comme des métabolites secondaires bien que ce qualificatif ne fasse pas nécessairement consensus. Ainsi, la question du rôle des cyanotoxines est encore une question scientifique majeure (Holland and Kinnear 2013, Omid et al. 2018). Parmi les différentes cyanotoxines décrites, les plus fréquemment détectées au sein des efflorescences et dans l'environnement sont les microcystines (Harke et al. 2016, Catherine et al. 2017). En effet, plus de 60% des efflorescences de cyanobactéries toxiques sont associées à la production de MC (Figure 3). Les microcystines sont une famille de peptides cycliques composée de

plusieurs centaines d'analogues dont la présence a été décrite sur l'ensemble des continents.

Tableau 1 : Diversité\* chimique des cyanotoxines, des genres producteurs, des modes d'action et des symptômes décrits (d'après Meriluoto et al. 2016, Huisman et al. 2018).

Toxines	Structures chimiques	Genres producteurs	Modes d'action	Effets toxiques
<b>Hépatotoxines</b>				
<b>Microcystine</b>		<i>Microcystis</i> <i>Anabaena</i> <i>Dolichospermum</i> <i>Leptolyngbya</i> <i>Nostoc</i> <i>Planktothrix</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Phormidium</i> <i>Synechococcus</i> (total 23 genres)	Inhibition des protéines phosphatases eucaryotes	Foie, rein, promoteur de tumeurs, gastroentérite, dommages à l'ADN, perturbateur endocrinien et immunitaire, génotoxicité
<b>Nodularine</b>		<i>Nodularia</i> <i>Nostoc</i>	Inhibition des protéines phosphatases eucaryotes	Mêmes effets que les MC, cancérigène, promoteur de tumeurs
<b>Cylindrospermopsine</b>		<i>Cylindrospermopsis</i> <i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Chrysoosporum</i> , <i>Raphidiopsis</i> <i>Umezakia</i> <i>Oscillatoria</i>	Inhibition de la synthèse des protéines, dommages à l'ADN, mort cellulaire	Dommages sur divers organes, gastroentérites et génotoxicité
<b>Neurotoxines</b>				
<b>Anatoxine</b>		<i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Cuspidothrix</i> <i>Dolichospermum</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Phormidium</i> <i>Planktothrix</i> <i>Arthrospira</i>	Agoniste des récepteurs nicotiques à acétylcholine	Perte de la coordination, tremblements musculaires, difficultés respiratoires
<b>Anatoxine-a(S)</b>		<i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Cuspidothrix</i> <i>Dolichospermum</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Phormidium</i>	Inhibiteur de l'acétylcholine estérase	Salivation, incontinence, tremblements musculaires, difficultés respiratoires
<b>Saxitoxine</b>		<i>Aphanizomenon</i> <i>Cuspidothrix</i> <i>Cylindrospermopsis</i> <i>Dolichospermum</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Raphidiopsis</i> <i>Lyngbya</i>	Inhibiteurs des canaux sodiques voltages dépendants	Paresthésies, engourdissements, difficultés et paralysies respiratoires

Toxines	Structures chimiques	Genres producteurs	Modes d'action	Effets toxiques
<b>Neurotoxines</b>				
<b>BMAA</b>		<i>Synechocystis</i> <i>Dolichospermum</i> <i>Leptolyngbya</i> <i>Nostoc</i> Diatomées Dinoflagellés	Stimulation des récepteurs du glutamate au niveau des neurones, liaisons aux protéines	Perte de coordination, atrophie musculaire, maladies neurodégénératives
<b>Dermatotoxines</b>				
<b>Lyngbyatoxine A</b>		<i>Moorea</i> , <i>Lyngbya</i>	Activation des canaux sodiques voltages dépendants	Atteinte du système nerveux
<b>Lipopolysaccharides</b>	Voir Meriluoto et al., (2016)		Inflammation et induction de la production de cytokines	Irritation de la peau, fièvre, gastroentérite

\* BMAA :  $\beta$ -N-méthylamino-L-alanine

\*Une importante diversité d'autres composés bioactifs produits par les cyanobactéries a été découverte et décrite dans l'ouvrage de Meriluoto et al. (2016) qui en présente une liste détaillée qui ne sera pas développée. En complément, Watson et al. (2016) propose une synthèse concernant les composés altérants le goût et l'odeur des eaux contaminées.

# Les microcystines

## Caractérisation des microcystines et diversité

Les premières tentatives visant à caractériser la structure des microcystines datent du début des années 1930 à la suite d'efflorescences dominées par le genre *Microcystis* (Ashworth and Mason 1946, Bishop et al. 1959). C'est au début des années 1950 que les premières souches de *M. aeruginosa* ont été isolées et cultivées en condition contrôlée afin de produire assez de biomasses permettant la caractérisation et la purification des MC. À cette époque, le peptide toxique extrait de la souche de *M. aeruginosa* NRC-1 est encore appelé « Fast Death Factor » (Bishop et al. 1959). En 1965, Konst et al. désignent pour la première fois ce peptide en employant le terme « microcystine » issu du nom de l'espèce productrice *M. aeruginosa*. Par la suite, d'autres dénominations seront utilisées dans la littérature et ce n'est qu'en 1988 que Carmichael et al. proposent l'utilisation du terme « microcystine » pour désigner cette famille de toxines.

Acide aminé (Aa)						
1	2	3	4	5	6	7
Ala (98%)	Leu (39%)	MeAspe (59%)	Arg (57%)	Adda (86%)	Glu (94%)	Mdha (56%)
Leu (1%)	Arg (14%)	Asp (41%)	Glu(Ome) (7%)	ADMAdda (9%)	Glu(OCH <sub>3</sub> ) (5%)	Dha (15%)
Ser (1%)	Tyr (12%)		Ala (6%)	(6Z)Adda (2%)	Glu(OC <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ) (1%)	Dhb (13%)
	Hty (10%)		Tyr (6%)	DMAdda (2%)		L-Ser (7%)
	Glu(OMe) (4%)		Har (4%)			L-MeSer (4%)
	Phe (4%)		Phe (4%)			(Z)-Dhb (2%)
	Glu (3%)		Trp (4%)			M-MeLan (1%)
	Hil (3%)		Leu (3%)			Mdhb (1%)
	Trp (3%)		Aba (2%)			
	(H4) Tyr (2%)		Met (2%)			
	Ala (1%)		Hty (1%)			
	HPh (1%)		Met(O) (1%)			
	Met(O) (1%)		Val (1%)			
	Val (1%)					

Figure 4 : Structure d'une MC-LR associée aux différentes combinaisons d'acides aminés possibles ainsi qu'à leur fréquence d'apparition (Adda : acide (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-diénoïque) (adaptée depuis Ortiz et al. 2017).

De nos jours, la famille des microcystines regroupe près de 248 molécules qui sont toutes des hexapeptides cycliques (Meriluoto et al. 2016). Leur structure générale est celle d'un cyclo-(D-Ala<sup>1</sup>-X<sup>2</sup>-D-MeAsp<sup>3</sup>-Z<sup>4</sup>-Adda<sup>5</sup>-D-Glu<sup>6</sup>-Mdha<sup>7</sup>) peptide (Botes et al. 1984). L'ensemble des MC partage un acide aminé commun : l'Adda (acide (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-diénoïque) (Meriluoto et al. 2016). La diversité des MC décrites dans la littérature s'explique par les différentes combinaisons d'acides aminés pouvant être méthylés en position 2 et 4 (Meriluoto et al. 2016, Buratti et al. 2017) (Figure 4). Ainsi, la dénomination des microcystines est souvent simplifiée : MC-LR où L et R désignent la présence de leucine (L) et d'arginine (R) en position 2 et 4. Les microcystines sont des molécules considérées comme relativement hydrophiles (polaires). Le caractère hydrophile des MC est dû à la présence d'acide carboxylique en position 3 et 6 et d'arginine en position 2 et 4 (Figure 4) (Meriluoto et al. 2016).

### Toxicité des MC

Les microcystines sont des inhibiteurs spécifiques des protéines phosphatases eucaryotes (PP) (1, 2A, 2B 3, 4 et 5) présentes notamment au niveau du foie chez l'Homme. Les protéines phosphatases assurent la déphosphorylation des résidus sérines et thréonines chez les plantes et les animaux (Meriluoto et al. 2016). Les microcystines sont qualifiées d'hépatotoxines, car absorbées principalement au niveau des cellules hépatiques riches en transporteurs peptidiques (Metcalf and Codd 2012). L'inhibition des PP 1 et 2A conduit à une augmentation de la phosphorylation des protéines présentes au niveau des cellules du foie. Celle-ci altère alors divers mécanismes cellulaires tels que : le transport membranaire, la contraction, la sécrétion, la division, la translation et la transcription cellulaire (Meriluoto et al. 2016). L'ensemble de ces perturbations génère des lésions au foie pouvant conduire au décès de l'individu exposé. D'autres études de toxicologie ont également démontré que l'exposition aux MC pouvait être à l'origine de perturbations endocriniennes, immunitaires et de la promotion de tumeurs. Enfin, les MC possèdent également une activité génotoxique, reprotoxique et oncogénique (Liang Chen et al. 2016, Meriluoto et al. 2016). À l'échelle cellulaire, les MC déclenchent une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) pouvant engendrer une peroxydation des lipides, une altération des protéines et de l'ADN. Diverses études suggèrent que la toxicité

engendrée par l'exposition aux MC dépend des analogues considérés et de la quantité administrée. Exposés à une dose aiguë de MC, la mort des mammifères est causée par hypovolémie (Metcalf and Codd 2012) ce qui désigne un déficit d'afflux sanguin généré par l'accumulation du sang au niveau du foie (Metcalf and Codd 2012).

### Organismes producteurs

Avec pas moins de 23 genres et 47 espèces de cyanobactéries répertoriés comme producteurs de MC (Catherine et al. 2017), la présence de MC a été décrite dans une grande variété d'écosystèmes. Parmi les espèces productrices, on rencontre aussi bien des cyanobactéries symbiotiques, benthiques, d'eau douce, marines ou encore terrestres (Whitton 2012). De par la diversité des organismes producteurs et leur prolifération au sein des zones aquatiques, il existe de nombreuses voies d'expositions aux MC pour les populations humaines (Figure 5). Bien que produites principalement de manière constitutive, les MC sont libérées dans le milieu quand survient la sénescence des cellules. Une fois libérées dans le milieu, bien que sujettes à la dilution, à la dégradation bactérienne ou à l'absorption sur la matière organique particulaire, les MC restent des molécules relativement stables et persistantes dans le milieu et les organismes (Schmidt et al. 2014, Catherine et al. 2017). Ainsi, la présence de MC dans les sédiments (Pham and Utsumi 2018), dans les prédateurs supérieurs, ou encore dans des cultures irriguées avec de l'eau contaminée témoigne de la stabilité et de la persistance de ces toxines dans l'environnement (Buratti et al. 2017).

## Risques et voies d'exposition aux MC présentes dans l'environnement

La présence des MC dans les réservoirs d'eau douce (Yang et al. 2016) constitue la voie d'exposition principale pour les populations humaines. Le décès de 52 patients dialysés avec de l'eau contenant les MC -YR, -LR et -AR au Brésil en 1996, reste à ce jour l'événement le plus tragique impliquant l'intoxication de population humaine (Azevedo et al. 2002). Une autre voie d'exposition implique l'utilisation récréative des plans d'eau où prolifèrent les cyanobactéries productrices de MC. En effet, les utilisateurs des plans d'eau sont directement exposés aux aérosols contenant la présence de MC en cas d'efflorescence (Cheng 2007, Backer et al. 2008). Les baigneurs sont particulièrement exposés comme l'illustrent les complications médicales rencontrées par un conducteur de jet-ski exposé aux MC à la suite d'une chute dans une zone touchée par une efflorescence de MC en Argentine (Giannuzzi et al. 2011).

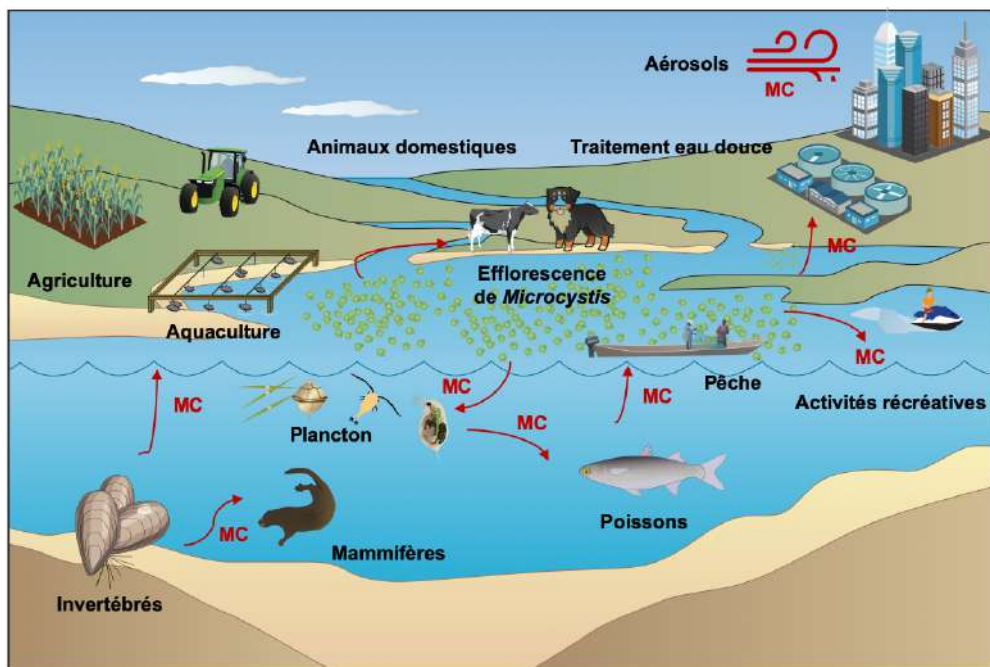


Figure 5 : Schéma illustrant la diversité des organismes et des secteurs économiques impactés par la présence de MC dans l'environnement.



La pêche est également une activité à risque au niveau des plans d'eau présentant des efflorescences de *Microcystis* spp. (Buratti et al. 2017). En effet, la présence et l'accumulation des MC au sein des réseaux trophiques sont un danger potentiel pour les consommateurs (Pham and Utsumi 2018). La littérature est riche de travaux rapportant la présence de MC dans différentes espèces de poissons et d'invertébrés d'eau douce (Poste et al. 2011, Testai et al. 2016, Buratti et al. 2017). La présence de MC dans les chairs de poissons s'explique par l'ingestion d'eau contaminée et par la consommation de proies, de végétaux, ayant accumulé des MC (Romero-Oliva et al. 2014). En effet, la présence de MC a également été décrite chez les plantes aquatiques et supérieures. La consommation de légumes et végétaux issus de l'agriculture est une autre voie d'exposition aux MC. Divers travaux conduits sur des produits issus de l'agriculture ont permis d'identifier la présence de MC à la suite d'une irrigation des cultures à l'aide d'eau contaminée (Manubolu et al. 2014, Qian et al. 2017).

### Voie de biosynthèse des MC

Les microcystines sont synthétisées par des protéines et non pas par la voie ribosomale. Les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des MC ont été décrits pour la première fois chez *M. aeruginosa* PCC 7806 et K 139 (Dittmann et al. 1997, Nishizawa et al. 1999). La voie de biosynthèse des MC implique des complexes enzymatiques codés par un cluster de 9 à 10 gènes, *mcyA-J*, d'une taille totale de 55 kb (Figure 6). Des différences sont notables entre les genres de cyanobactéries, comme la présence et l'ordre des gènes ainsi que l'orientation et le nombre d'opérons. Ces différents gènes, codent pour des peptides synthétases non ribosomiques (NRPS), des polykétides synthases (PKS), des associations NRPS/PKS et d'autres enzymes (Figure 6) (Meriluoto et al. 2016). L'assemblage des MC se fait, après acide aminé, par les complexes enzymatiques de type NRPS. Ainsi chaque module est responsable de l'activation, de la formation des liaisons thioesters, de la condensation et de la modification des acides aminés (Figure 6) (Pearson et al. 2016). Brièvement, la synthèse des MC débute par l'activation de phénylpropionate, un dérivé de la phénylalanine qui aboutit à la formation de phénylacétate. La synthèse du fragment Adda est achevée par l'activité de quatre polykétides synthases codées par *McyG*, *D* et *E* (Figure 6). Aussi, les modifications des chaînes latérales du groupement

Adda impliquent l'activité d'une O-méthyltransférase (McyJ) d'une amino transférase (McyE) (Figure 6). L'ajout des acides aminés restant est assuré par six peptides synthétases non ribosomiques (McyG, A, B, C). L'ajout du fragment d'acide D-erythro-β-méthyl-aspartique, est assuré par deux enzymes supplémentaires (McyI et McyF) qui sont respectivement la 2-hydroxy acide déshydrogénase (McyI) et l'aspartate racémase (McyF) (Figure 6). Enfin, la synthèse d'une molécule de MC se termine par la libération du complexe protéique par l'action thioesterase du domaine McyC (Dittmann et al. 2013). À noter également que le gène *mcyH* semble coder pour une protéine de type transporteur ABC (Figure 6). Ce dernier serait essentiel à la synthèse de MC chez *Microcystis* sp., mais il pourrait également être impliqué dans le transport des MC dans l'espace périplasmique (Pearson et al. 2004, Harke et al. 2016).

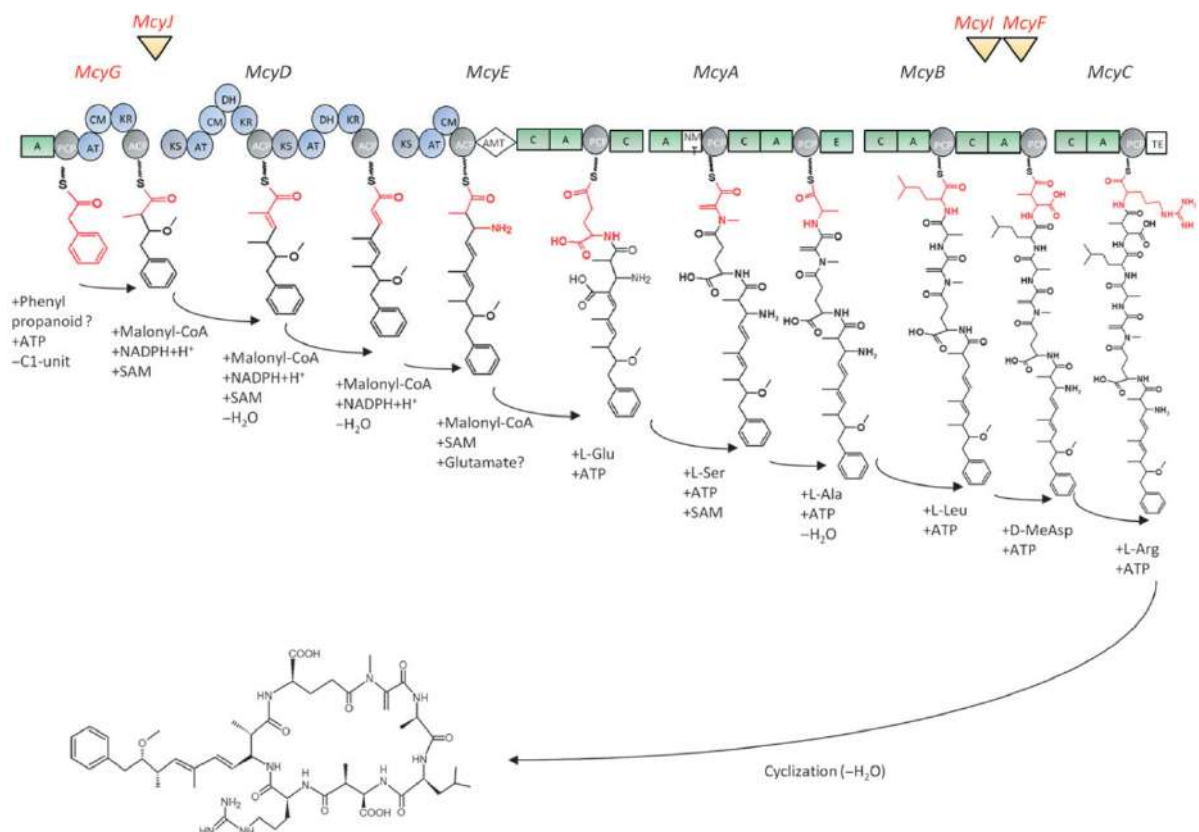


Figure 6 : Représentation schématique d'après Dittmann et al. (2013) de la voie de biosynthèse des MC. Le nom des enzymes caractérisées biochimiquement apparaît en rouge. Les autres réactions sont issues des prédictions formulées à partir d'approches bioinformatiques. Les acides aminés et carboxyliques incorporés ou modifiés par des protéines apparaissent en rouge. Domaines PKS : KS : kétoacyl synthase, AT : acyltransférase, DH : déshydrogénase, KR : kétoréductase, ACP : protéine porteuse d'acyle, CM : Méthyltransférase C, AMT : glutamate-semialdéhyde aminotransférase, domaine NRPS : A : domaine d'adénylation, C : domaine de condensation, E : domaine d'épimérisation, NMT : N-méthyltransférase, PCP : Protéine porteuse de peptidyle, TE : domaine thioestérase.

## Facteurs abiotiques influençant la synthèse des microcystines

*Ici, seule l'influence des principaux facteurs influençant la synthèse de MC chez Microcystis sp. est détaillée.*

Les effets de multiples facteurs abiotiques sur la synthèse des MC ont été étudiés et ont fait l'objet de divers travaux de synthèse (Sivonen and Jones 1999, Neilan et al. 2013, Gehringer and Wannicke 2014, Pearson et al. 2016, Omidi et al. 2018). L'influence d'une grande variété de facteurs a été testée sur la production de MC, au cours de la croissance. Ces travaux montrent qu'une corrélation entre le taux de croissance et le taux de production des MC existe, illustrant l'aspect constitutif de la synthèse des MC (Orr et al. 2018).

La disponibilité en **nutriments** est l'un des principaux facteurs influençant la dynamique des efflorescences de cyanobactéries et qui conditionne la synthèse de MC (Paerl and Otten 2016). Notamment, l'influence de l'azote sur la production de MC a largement été étudiée en raison de la richesse des MC en acides aminés azotés. Les travaux conduits par Orr and Jones (1998), confirmés plus tard par Long et al. (2001), ont permis de montrer que la production de MC est directement corrélée au taux de croissance cellulaire à partir d'expériences en chemostat. À l'échelle cellulaire, l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des MC (*mcyA-J*) est également corrélée à la disponibilité en azote en laboratoire (Harke and Gobler 2013), mais également au sein d'efflorescences naturelles (Horst et al. 2014). En condition limitée en azote, l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des MC est réprimée et la quantité de MC par cellule diminue (Horst et al. 2014, Kramer et al. 2018). À l'inverse, lorsque l'azote est en excès, la production des différents analogues de MC chez *M. aeruginosa* conduit à l'accumulation d'analogues riches en acides aminés azotés tels que la MC-RR (Van de Waal et al. 2009). Enfin, la synthèse de MC serait directement influencée par la disponibilité en azote par la fixation du facteur de transcription Ntca au promoteur des gènes *mcyA-J*. Le facteur de transcription Ntca peut se fixer sur 3 sites du cluster de gènes *mcyA-J* (Ginn et al. 2010). Le Ntca intervient dans la régulation de l'azote dans la cellule et sa synthèse est contrôlée par la quantité d'azote disponible pour la cellule (Ginn et al. 2010, Sevilla et al. 2010). La fixation de Ntca au niveau du promoteur du cluster de gènes *mcyA-J* suggère que la biosynthèse des MC est directement influencée par la disponibilité en azote. C'est ainsi

que l'azote est considéré comme l'un des principaux nutriments influençant la synthèse de MC (Pearson et al. 2016).

De même, une limitation en phosphore conduirait à une diminution de la production de MC (Oh et al. 2000, Davis et al. 2010).

Le **fer** pourrait également influencer directement la synthèse des MC chez *M. aeruginosa*. En effet, un autre type de facteur de transcription (Fur) impliqué dans la régulation du fer chez la cellule a été décrit chez *M. aeruginosa* (Martin-Luna et al. 2006). À partir d'expériences menées en chémostat, Yeung et al. (2016) ont déterminé que la quantité de MC par cellule était supérieure lors d'une limitation en fer. Une telle accumulation de MC suggère que les MC jouent un rôle protecteur pour la cellule lors d'un stress oxydatif (Alexova et al. 2011).

L'**intensité lumineuse** peut également avoir une influence sur la biosynthèse et la production de MC (Utkilen and Gjørlme 1992, Kaplan et al. 2012). La synthèse de MC et d'autres métabolites secondaires est principalement effectuée durant le jour (Straub et al. 2011). Il existe une corrélation entre taux de production de MC et le taux de croissance des cellules exposées à différentes conditions de lumière (Lyck 2004). À faible irradiance, lorsque la lumière limite la croissance cellulaire, la synthèse des MC est conditionnée par le taux de croissance (Tonk et al. 2009). Lorsque la lumière n'est plus limitante pour la croissance cellulaire, la production de MC et le taux de croissance sont découplés (Wiedner et al. 2003). En effet, la synthèse de MC est induite lorsque *M. aeruginosa* est exposée à de fortes irradiances (Meissner et al. 2013).

Parmi les différents facteurs influençant la dynamique des efflorescences de *Microcystis* spp. à l'échelle globale, les effets sur la production de MC de la disponibilité en **CO<sub>2</sub>** et de la **température** ont également été étudiés. À l'échelle moléculaire, la quantité de CO<sub>2</sub> n'influence pas l'expression des gènes *mcyA-J*, cependant la quantité de MC par cellule augmente avec la quantité de CO<sub>2</sub> dissous (Sandrini et al. 2015a). À l'inverse, la quantité de MC par cellule tend à diminuer lorsque la température augmente (Bui et al. 2018).

## Rôle biologique et écologique des microcystines

L'étude des facteurs influençant la production de MC a mis en évidence diverses fonctions potentielles pour les organismes producteurs. Cependant, le rôle biologique des microcystines demeure aujourd'hui une question scientifique majeure (Omidi et al. 2018). Les microcystines ont dans un premier temps été décrites comme des métabolites secondaires synthétisés comme mécanismes de défense face aux brouteurs. Les apports de la phylogénie ont démontré que la synthèse des MC serait un caractère présent chez l'ancêtre commun à l'ensemble des cyanobactéries (Rantala et al. 2004). Selon ce scénario, la synthèse des MC serait un caractère apparu bien avant l'apparition des métazoaires. Ainsi, le rôle de défense face au prédateur ne peut être considéré que comme une fonction secondaire (Kaplan et al. 2012). Les travaux visant à exposer *Microcystis* sp. à différents prédateurs varient dans les réponses observées (Omidi et al. 2018). Dans certains cas, l'exposition aux prédateurs aboutit à une inhibition de la synthèse de MC tandis que d'autres travaux soutiennent une tendance inverse (Holland and Kinnear 2013). Actuellement, compte tenu du coût métabolique et du caractère constitutif des MC, l'hypothèse d'un rôle de défense face aux prédateurs ne fait pas consensus (Kaplan et al. 2012, Omidi et al. 2018).

Bien que principalement accumulées à l'intérieur de la cellule, certaines études suggèrent une possible fonction à l'extérieur des cellules. L'existence d'effets allélopathiques des MC a été suggérée chez divers organismes phytoplanctoniques, chez les plantes supérieures et aquatiques (Babica et al. 2006). Les effets allélopathiques de *M. aeruginosa* ne sont pas uniquement dus à la présence de MC, mais bien à la présence d'un ensemble de composés. Ainsi, les MC pourraient agir sur les organismes cibles en interaction avec ces autres composés allélopathiques (Omidi et al. 2018).

Au niveau extracellulaire, les MC pourraient aussi jouer le rôle de messenger chimique et assurer la communication entre cellules. En effet, l'ajout de MC dissoutes induit une augmentation de la taille des colonies. À l'inverse, lorsque la quantité de MC dissoutes diminue, la taille des colonies est réduite (Gan et al. 2012). Les MC libérées au cours de la lyse cellulaire pourraient servir de messenger chimique entre les différentes colonies de *Microcystis* spp. (Gan et al. 2012). L'ajout de MC exogènes déclenche l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de glycoprotéines MrpC

et de lectines MVN impliquées dans l'adhésion cellulaire (Kaplan et al. 2012). Ce mécanisme pourrait expliquer l'augmentation de la taille des colonies lorsque la quantité de MC dissoutes augmente (Gan et al. 2012). Enfin, la présence de MC dissoutes influe positivement la biosynthèse de MC (Kaplan et al. 2012).

Des études comparatives menées sur la souche de *M. aeruginosa* PCC 7806 et son mutant PCC 7806 *mcyB*<sup>-</sup> non toxique ont permis de décrire le ou les rôles potentiels que pourraient jouer les MC au niveau cellulaire (Omidi et al. 2018). Dans le cadre d'un stress lumineux ou oxydant, la souche sauvage présente un avantage compétitif sur la souche mutante suite à l'accumulation d'une quantité plus importante de protéine et à la présence de MC liées de manière covalente à ces dernières (Zilliges et al. 2011). En effet, l'étude comparative de leur protéome a permis de démontrer des différences significatives entre les deux souches. La souche sauvage PCC 7806 présente un plus grand nombre de protéines isoformes que son homologue mutante (Zilliges et al. 2011) ce qui serait dû à la présence d'isoformes notamment chez les phycobilisomes, les réductases et chez des protéines impliquées dans le cycle de Calvin-Benson. En effet, les MC se lient aux cystéines présentes chez certaines protéines, ce qui aurait pour conséquence de favoriser leur stabilité (Meissner et al. 2013). En cas de fortes irradiances, une part non négligeable des MC se lie aux phycobilisomes et aux plus larges sous unités de la Rubisco. La présence de MC liées aux protéines les rendrait moins susceptibles à l'action d'enzymes types protéases (Kaplan et al. 2012). Le rôle des MC au niveau intracellulaire est également illustré par la localisation des MC au sein des cellules, principalement localisées au niveau des carboxysomes et des thylakoïdes (Kaplan et al. 2012). Au niveau cellulaire, les MC pourraient également agir comme agent chélateur envers le fer (Holland and Kinnear 2013). Les MC auraient donc comme fonction principale de stabiliser les protéines et de maintenir les fonctions métaboliques de la cellule en cas de stress oxydant comme l'illustrent les différents travaux conduits chez *Microcystis* sp. (Omidi et al. 2018).

# Le genre *Microcystis* et son transfert vers les écosystèmes estuariens

## Morphologie et taxonomie

Le genre *Microcystis* appartient à l'ordre des Chroococales et à la famille des Microcystaceae Elenkin 1933 (Whitton 2012). Les cellules de *Microcystis* sp. sont de formes sphériques et présentent un diamètre compris entre 1 et 9  $\mu\text{m}$ . Dans le milieu naturel, elles sont regroupées sous forme de colonies (Komárek and Komárková 2002). Lorsqu'elles sont isolées et cultivées en laboratoire, les souches de *Microcystis* sp. peuvent perdre leur organisation coloniale et se présentent comme des cellules isolées. La classification des différentes espèces de *Microcystis* spp. a dans un premier temps été fondée sur des critères morphologiques (forme de la colonie, taille des cellules, structure du mucilage (voir Komárek and Komárková 2002)). Les colonies sont caractérisées par une amplitude de taille s'étendant d'une échelle micro à macrométrique. Les cellules composant ces colonies produisent un mucilage riche en polysaccharides qui entoure la paroi cellulaire. Ces dernières synthétisent également des vésicules à gaz permettant à la cellule de réguler sa flottabilité (Komárek and Komárková 2002). À l'aide de ces critères, près d'une cinquantaine de « morpho-espèces » ont été décrites à ce jour (Pérez-Carrascal et al. 2019). Cependant, le critère morphologique est perfectible dans la mesure où la structure des colonies est influencée par les conditions de culture et l'âge des colonies. Xiao et al. (2018) mettent en évidence que la structure et la forme des colonies sont liées aux conditions physico-chimiques du milieu telles que la turbulence, le pH et la concentration en ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Le développement des approches moléculaires a permis de redéfinir et de réduire le nombre de « morpho-espèces » appartenant à ce genre (Komárek 2010). Ainsi sur la base de la similarité de leurs séquences d'ARN 16S, les espèces *M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe*, *M. novacekii*, *M. viridis* et *M. wesenbergii* devraient finalement être unifiées sous le nom d'espèce *M. aeruginosa* (Otsuka et al. 2001). De plus, en calculant l'indice ANI qui calcule la distance génétique entre deux génomes, Harke et al. (2016) ont démontré que les souches dont le génome a été séquencé appartiennent bien à l'espèce *Microcystis aeruginosa*. L'étude du génome d'une douzaine de souches de *M. aeruginosa* a notamment permis de mettre en évidence que seulement la moitié du génome d'une souche donnée faisait partie du pangénome de l'espèce

(Humbert et al. 2013). Cette caractéristique s'explique par l'existence d'un grand nombre de gènes issus de transferts horizontaux, d'un nombre important de séquences répétées et d'éléments transposables. L'ensemble de ces caractéristiques témoigne de l'importante plasticité génétique de *M. aeruginosa* (Humbert et al. 2013). Récemment, une étude comparant le génome d'une trentaine de souches de *M. aeruginosa* a démontré l'existence de 12 clusters de gènes différents suggérant que *M. aeruginosa* constitue un groupe paraphylétique. Ces travaux suggèrent l'existence de multiples sous-groupes monophylétiques présentant une structure biogéographique distincte, héritage d'une adaptation locale récente d'un point de vue évolutif (Pérez-Carrascal et al. 2019).

### Aire de répartition

Le genre *Microcystis* se compose d'organismes méroplanctoniques. Le cycle de vie du genre *Microcystis* est constitué d'une alternance de phases pélagiques et benthiques (Misson et al. 2012). Dans les milieux tempérés, le cycle annuel de *Microcystis* sp. se décompose de la manière suivante. Au cours de la période hivernale, les cellules perdurent à la surface des sédiments sous la forme de colonies (Cires et al. 2013). Les cellules sont alors en dormance et peuvent se maintenir ainsi pendant plus d'un siècle, enfouies à plus d'une trentaine de centimètres sous la surface des sédiments (Wood et al. 2009) avant de pouvoir amorcer de nouvelles efflorescences. Lorsque les conditions de température, de disponibilité en nutriments et de lumière ne suffisent plus à supporter les efflorescences de *Microcystis* sp. un nouveau cycle de vie benthique débute.



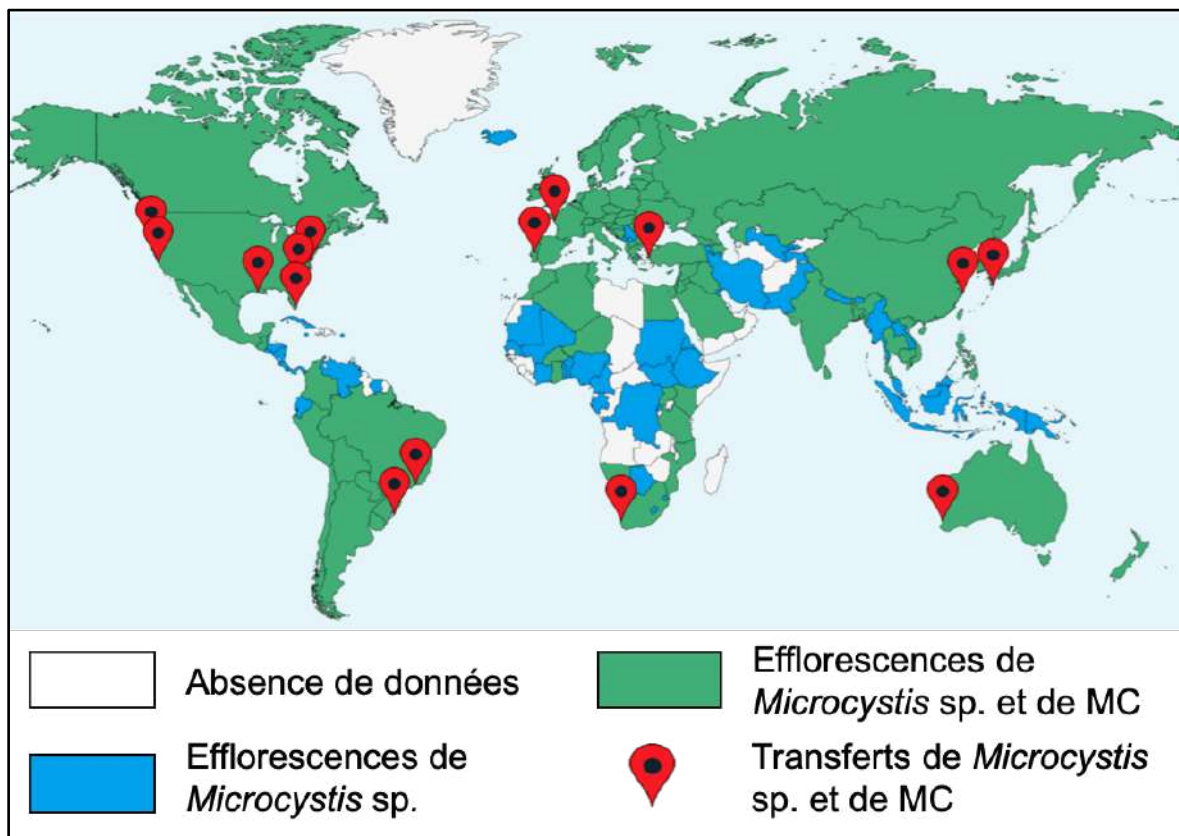


Figure 7 : Carte du monde présentant la localisation des efflorescences de *Microcystis* sp. et la présence de MC associées (mise à jour depuis Harke et al. (2016) et Preece et al. (2017)).

Le genre *Microcystis* se développe dans les écosystèmes d'eau douce sur l'ensemble des continents à l'exception des zones polaires (Figure 7). La présence d'efflorescences de *Microcystis* sp. majoritairement toxiques, a été décrite dans plus d'une centaine de pays (Harke et al. 2016). La présence de MC associée à la présence d'efflorescence de *Microcystis* sp. a été décrite dans près de 70% des pays (Figure 7) (Harke et al. 2016). Sur l'ensemble des continents, l'intensification de la fréquence et de l'intensité des efflorescences de *Microcystis* sp. est un phénomène décrit dans la littérature (Paerl and Paul 2012, Ma et al. 2014, Sandrini et al. 2015a). Ce phénomène d'intensification des efflorescences de *Microcystis* sp. tend aujourd'hui à une extension de son aire de répartition au-delà des écosystèmes d'eau douce. C'est ainsi que sur l'ensemble des continents, la présence et l'influence de *Microcystis* sp. et des MC tendent à s'étendre vers les milieux saumâtres et côtiers (Figure 7) (Preece et al. 2017).

## Présence des MC en milieu océanique

Les premières traces de MC en milieu marin ont été détectées dans les chairs de poissons et de bivalves. La présence de MC a été mise en évidence dans la chair de moules prélevées à l'est des côtes canadiennes et en Europe (Chen et al. 1993). La même année, l'augmentation du nombre de cas d'hépatites chez le saumon d'Atlantique d'élevage a été imputée à l'accumulation de MC dans le foie des poissons malades (Andersen et al. 1993). À cette époque, l'hypothèse de l'existence d'un potentiel organisme marin producteur de MC est retenue par les auteurs (Andersen et al. 1993, Chen et al. 1993). Depuis, la question d'un possible risque associé à la production de MC en milieu marin a fait l'objet d'un travail de synthèse mené par Vareli et al. (2013). En effet, seul un nombre restreint d'études a permis de démontrer l'existence d'organismes producteurs de MC en milieu marin (Vareli et al. 2013).

Aux Bahamas, la présence du gène *mcyA* dans des échantillons de biofilms cyanobactériens prélevés dans différents récifs a pu être associée à la présence de cyanobactéries du genre *Geitlerinema* et *Leptolyngbya*. Ces biofilms ont notamment été décrits comme à l'origine du phénomène de « black band disease (BBD) » qui affecte les colonies coralliennes (Richardson et al. 2007). La présence de MC, dosée par LC-MS, et du gène *mcyA* a été confirmée à la fois dans des échantillons de terrain et en culture (Richardson et al. 2007). La production de MC chez d'autres genres de cyanobactéries marines a été suggérée par test ELISA chez les genres *Spirulina*, *Leptolyngbya*, *Pseudoanabaena* et *Phormidium* majoritairement isolés au large de la Floride (Gantar et al. 2009). Plus récemment, la production de MC produites par des souches isolées en mer Rouge a été mise en évidence chez les genres *Aphanothece*, *Leptolyngbya*, *Calothrix* et *Oscillatoria* (Mohamed and Al-Shehri 2015).

Les genres *Synechococcus* et *Synechocystis* apparaissent également comme de bons candidats. En effet, la production de MC-LR et MC-YR chez des souches de *Synechococcus* sp. et d'*Oscillatoria* sp. isolées dans le lac salin « The Salton Sea » en Californie a été décrite à la suite d'un fort épisode de mortalité de grèbes huppés (*Podiceps cristatus*) (> 200 000 individus) présentant une accumulation de MC au niveau du foie et des intestins (Vareli et al. 2013). Au Portugal, la production de MC a également été détectée par kit ELISA chez des souches des genres *Synechococcus*, *Synechocystis* et *Cyanobacterium* isolées en zone côtière (Martins et al. 2005). En Méditerranée, la présence de MC-LR et de MC-YR accumulées chez la moule *Mytilus*

*galloprovincialis* et dans des échantillons d'eau de mer, contenant majoritairement les genres *Synechococcus* et *Synechocystis*, a permis de décrire la présence de marqueurs génétiques associés à la production de MC chez ces deux genres (Vareli et al. 2012). Hormis ces exemples spécifiques, le risque associé à la production de MC chez les cyanobactéries marines nécessite encore d'être approfondi. En effet, la présence de MC en milieux estuariens et marins est aujourd'hui principalement liée au transfert des cyanobactéries toxiques d'eau douce en milieu côtier (Preece et al. 2017).

#### Le transfert de *Microcystis* sp. en zone estuarienne : un phénomène mondial

La présence de MC en milieu marin est la conséquence d'efflorescences de *Microcystis* sp. (et d'autres cyanobactéries productrices de MC douce) proliférant en amont du continuum eau douce – océan (Vareli et al. 2013, Preece et al. 2017, Paerl et al. 2018). En effet, à la suite d'une efflorescence de cyanobactéries et sous l'influence de l'hydrologie, les cellules de cyanobactéries sont transférées vers l'aval via le continuum rivière-estuaire-mer (Figure 8) (Fetscher et al. 2015, Preece et al. 2017).

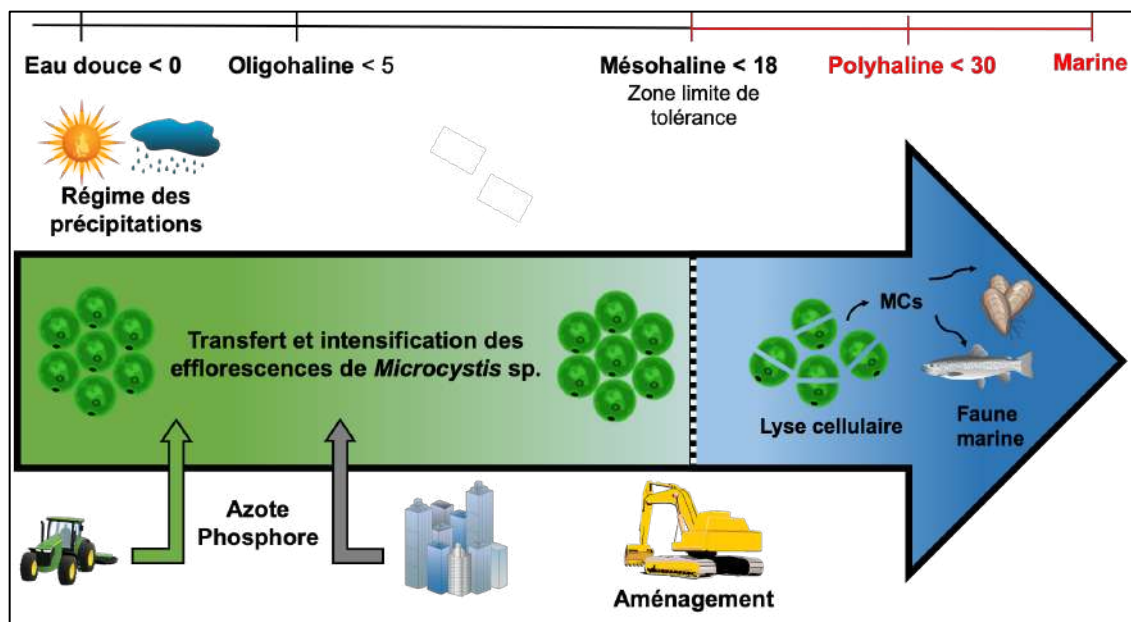


Figure 8 : Schéma illustrant le phénomène de transfert des efflorescences de *Microcystis* sp. le long du continuum eau douce – estuaire – mer. L'échelle de salinité représente la division de l'estuaire en fonction de la salinité (Mitsch and Gosselink, 2000). La couleur rouge indique la zone limite de tolérance à la salinité pour *M. aeruginosa* (Tonk et al. 2007, Georges des Aulnois et al. 2019).

Comme en eau douce, l'eutrophisation est un phénomène qui impacte les estuaires et le milieu marin (Paerl et al. 2018, Le Moal et al. 2019). L'enrichissement des cours d'eau en nutriments couplé au réchauffement global et à l'accentuation des épisodes de sécheresse et de forte pluviométrie contribuent à l'intensification et à l'expansion des efflorescences de cyanobactéries toxiques le long du continuum eau douce – estuaire (O'Neil et al. 2012, Paerl 2014, Burford et al. 2016, Visser et al. 2016, Huisman et al. 2018, Wurtsbaugh et al. 2019).

Au cours des épisodes de sécheresse, la température de l'eau augmente conduisant à la stratification de la colonne d'eau, ce qui favorise le développement des espèces proliférant en surface et capables d'ajuster leur position au sein de la colonne d'eau, comme le genre *Microcystis* (Lehman et al. 2013). Par la suite, les épisodes de fortes précipitations et de forts débits des cours d'eau, favorisent une diminution de la salinité (S) moyenne des estuaires et le transfert des efflorescences de *Microcystis* sp. vers l'aval (Figure 8) (Lehman et al. 2013).

Tableau 2 : Liste des localités dans le monde où le transfert de *Microcystis* sp. et de MC en milieu marin a été documenté. Pour une revue complète de la présence de MC en milieux saumâtre et marin (voir Preece et al. (2017) et Vareli et al. (2013)).

Localisations	Espèces impliquées	Détection	Références
	<i>M. aeruginosa</i>		
	<i>M. botrys</i>		
Étier de Pen-Mur - France	<i>M. flos aquae</i>	LC-MS/MS	(Bormans et al. 2019)
	<i>M. novacekii</i>		
	<i>M. viridis</i>		
Rivière Guadiana Portugal	<i>M. aeruginosa</i>	LC-PDA	(Sobrino et al. 2004)
Lac Volkerak - Pays-Bas	<i>Microcystis</i> sp.	LC-MS	(Verspagen et al. 2006)
Lagon Vistula - Mer Baltique	<i>M. aeruginosa</i>	LC-MS	(Mazur-Marzec et al. 2011)
Crique Bandagree - Nigeria	<i>M. aeruginosa</i>	NA	(Onyema 2018)
Lagon Kucukcekmece - Turquie	<i>M. aeruginosa</i>	LC-PDA	(Albay et al. 2005)
Rivière Swan - Australie	<i>M. aeruginosa</i>	LC-PDA	(Orr et al. 2004)
Baie d'Isahaya - Japon	<i>M. aeruginosa</i>	LC-MS	(Tanabe et al. 2018)
Baie d'Hangzhou - China	<i>Microcystis</i> sp.	N/A	(Tang et al. 2018)
Lac Puget Sound - USA	-	LC-MS	(Preece et al. 2015)
Baie de San Francisco - USA	<i>M. aeruginosa</i>	LC-PDA	(Lehman et al. 2005)
Baie de Monterey - USA	<i>M. aeruginosa</i>	LC-MS	(Miller et al. 2010)
Baie de Chesapeake - USA	<i>Microcystis</i> sp.	ELISA	(Wood et al. 2014)
Rivière St Lucie - USA	<i>Microcystis</i> sp.	LC-MS	(Kramer et al. 2018)
Rivière de la Plata - Uruguay	<i>M. aeruginosa</i>	LC-PDA	(Giannuzzi et al. 2012)
Lagon Patos - Brésil	<i>M. aeruginosa</i>	LC-PDA	(Yunes et al. 1996)
Côte ouest - Canada	-	LC-PP2A	(Andersen et al. 1993)

Ce phénomène est responsable de la présence d'efflorescence de *Microcystis* sp. en milieu estuarien à travers le monde (Figure 7 ; Tableau 2) (Paerl and Paul 2012; Preece et al. 2017). En Australie (estuaire de la rivière Swan), au Brésil (le lagon de Patos), aux États-Unis (baie de San Francisco), en Chine ou encore en mer Baltique, l'apparition d'efflorescences de *Microcystis* sp. dans les estuaires est aujourd'hui un phénomène récurrent (Yunes et al. 1996, Robson and Hamilton 2003, Baxa et al. 2010, Lehman et al. 2010, 2017, Brutemark et al. 2015, Preece et al. 2017, Tang et al. 2018).

L'aménagement par l'Homme des écosystèmes aquatiques favorise également le développement et le transfert des efflorescences de cyanobactéries toxiques. En effet, la présence de *Microcystis* sp. en milieu estuarien est parfois associée à d'importants apports d'eau douce d'origine anthropique. En Floride, en 2016, à la suite du phénomène El Niño, le niveau moyen du lac Okeechobee a dû être abaissé. En conséquence, d'importants lâchers d'eau en provenance du lac ont été réalisés. Cette régulation du niveau du lac a dû être réalisée alors que le lac présentait une prolifération de *Microcystis* spp. Par conséquent, la présence de *Microcystis* spp. et de MC en zone estuarienne et marine a été constatée dans l'ensemble des effluents du lac (Kramer et al. 2018). La présence de *Microcystis* sp et de MC a également été mis en évidence à la suite de lâchers d'eau en baie d'Isahaya au Japon (Takahashi et al. 2014, Umehara et al. 2017). En France, le transfert de MC et de *Microcystis* sp. d'un réservoir d'eau douce jusqu'au milieu marin a été récemment démontré en région Bretagne (Bormans et al. 2019).

Bien que les efflorescences de *Microcystis* sp. en milieu estuarien ne soient pas encore un phénomène bien documenté, diverses études conduites principalement aux États-Unis (Lehman et al. 2008) et en Australie (Robson and Hamilton 2003) ont décrit les principaux facteurs conditionnant l'expansion des efflorescences de *Microcystis* sp. en zone estuarienne et côtière. Parmi les facteurs étudiés, la salinité, la température et la disponibilité en nutriments apparaissent comme les facteurs principaux contrôlant le devenir de *Microcystis* sp. en milieu côtier.

## La salinité, la température et la disponibilité en nutriments conditionnent l'expansion et le développement de *Microcystis* sp. en zone estuarienne

Dans la majorité des études, une corrélation négative a été observée entre l'abondance de *Microcystis* sp. et la salinité (Sellner et al. 1988). En Australie, malgré diverses tentatives conduites pour réduire l'intensité des efflorescences de *Microcystis* sp. (déversement de bentonite et de polychlorure d'ammonium), c'est l'apport d'eau de mer par l'embouchure de l'estuaire de la rivière Swan qui est à l'origine de la sénescence des efflorescences (Atkins et al. 2001). C'est également l'évolution de la salinité qui semble expliquer la distribution des efflorescences de cyanobactéries toxiques en mer Baltique. La salinité en surface de la mer Baltique s'étend du Sud au Nord de 0 à 23 (Brutemark et al. 2015). Historiquement, la mer Baltique est connue pour d'intenses efflorescences estivales de cyanobactéries toxiques diazotrophes avec la présence des genres *Nodularia*, *Aphanizomenon* et *Dolichospermum*. La salinité est le facteur principal conditionnant l'aire de répartition des différents genres en mer Baltique (Fewer et al. 2009, Engström-Öst et al. 2011, Brutemark et al. 2015, Teikari et al. 2018). C'est la tendance inverse qui explique également l'apparition de *Microcystis* sp. à l'embouchure de la rivière Sainte-Lucie, un effluent du lac Okeechobee. En effet, c'est la diminution de la salinité de 35 à 17 suite aux lâchers d'eau effectués depuis le lac qui à l'origine de la dispersion des efflorescences de *Microcystis* sp. dans l'ensemble de la zone estuarienne située en aval du lac (Oehrle et al. 2017, Kramer et al. 2018). La salinité conditionne également l'aire de répartition des efflorescences de *Microcystis* sp. en Amérique du Sud. Au niveau de l'embouchure du Rio de la Plata et du lagon de Patos deux des plus grands estuaires d'Amérique du sud la présence d'efflorescences de *Microcystis* sp. est régulièrement constatée depuis la fin des années 90 (Yunes et al. 1996, Kruk et al. 2017). La présence des gènes *mcyB*, *mcyD*, *mcyE* et *mcyJ* comme une approximation de l'abondance de *Microcystis* sp. toxiques a été démontrée le long du continuum eau douce – océan sur plus de 800 km en Uruguay (Martínez de la Escalera et al. 2017). Ces travaux ont notamment mis en évidence que la salinité couplée à la température étaient les principaux facteurs expliquant l'abondance décroissante de ces quatre gènes à l'aval du continuum (Martínez de la Escalera et al. 2017).

Enfin, parmi les facteurs influençant la présence de *Microcystis* sp. en zone estuarienne, la disponibilité en nutriments (Figure 8) est corrélée à l'abondance de MC

dans les zones estuariennes situées en aval des bassins versants de la baie de Monterey (Californie – USA) présentant des efflorescences de *Microcystis* spp. (Gibble and Kudela 2014). Les travaux de Kramer et al. (2018) ont également permis de mettre en évidence une limitation en azote des efflorescences de *Microcystis* spp. transférées en zone estuarienne lors de la crise de 2016 qui a touché l'état de Floride.

## Réponses physiologiques des cyanobactéries face aux variations de la salinité

### Une variation de salinité modifie l'équilibre osmotique des cellules

Le terme salinité (S) a fait l'objet de multiples définitions en lien avec les multiples méthodes développées pour la mesurer (Lewis 1980). Depuis les années 80, la salinité est principalement mesurée à l'aide d'un conductimètre et exprimée sans unité (UNESCO 1985). Ici, le terme salinité fera référence à sa définition originelle qui décrit la salinité comme une mesure de la quantité totale d'ions inorganiques dissous dans un volume d'eau donné. La salinité des océans est en moyenne de 35, tandis que la salinité moyenne des eaux douces tend vers 0. Les ions majoritaires composant l'eau de mer sont le sodium ( $\text{Na}^+$ ) et l'ion chlorure ( $\text{Cl}^-$ ).

Pour une cellule, un changement de salinité se caractérise à la fois par la variation de la quantité totale d'ions dissous, mais également par un changement de proportions des différents ions. Ici, les études portant sur les variations de salinité étudiées font référence à un changement de la quantité totale d'ions dissous.

L'eau diffuse au travers des membranes cellulaires du compartiment au potentiel hydrique le plus élevé vers le compartiment au potentiel hydrique le plus faible de manière passive. Lorsque la cellule est en équilibre avec son milieu, le potentiel hydrique à l'intérieur du cytosol est légèrement inférieur à celui du milieu extérieur. Cette différence de potentiel permet d'assurer un flux d'eau vers la cellule et le maintien d'une pression de turgescence positive nécessaire à la croissance cellulaire. Lorsque la salinité du milieu extracellulaire augmente, le potentiel hydrique du milieu extérieur diminue et la cellule doit ajuster le potentiel hydrique du cytosol afin de maintenir une pression de turgescence suffisante au maintien de son activité (Hagemann 2011).



## Stratégies de réponses aux variations de salinité

Deux stratégies existent en réponse à une augmentation de la salinité chez les organismes procaryotes. La stratégie « salt-in » est principalement retrouvée chez les archées halophiles (Hagemann 2011). Cette stratégie peu coûteuse en énergie repose sur l'accumulation à l'intérieur des cellules d'une quantité importante d'ions (principalement  $K^+$  et  $Cl^-$ ). L'accumulation d'ions dans le cytosol permet de maintenir un gradient de potentiel hydrique favorable à la diffusion de l'eau vers l'intérieur de la cellule. La stratégie « salt-in » n'est pas la plus répandue chez les cyanobactéries d'eau douce.

L'accumulation d'ions à l'intérieur du cytosol est un mécanisme toxique pour la plupart des cyanobactéries. C'est pourquoi la stratégie « salt-out » est un caractère commun à la majorité des cyanobactéries se développant en milieu aqueux. Cette stratégie repose sur le maintien d'une faible concentration d'ions à l'intérieur du cytosol. La diminution du potentiel hydrique à l'intérieur des cellules résulte de l'accumulation de molécules organiques de petites tailles, non chargées. Ces composés appelés solutés compatibles possèdent la particularité de pouvoir être accumulés au sein des cellules sans perturber le fonctionnement cellulaire et l'intégrité des structures protéiques (Wood 1999). La stratégie « salt-out » se décompose en deux phases, l'accumulation ou l'import de solutés compatibles au sein de la cellule et l'expulsion active d'ions vers le milieu extérieur (Hagemann 2011).

Une grande diversité de solutés compatibles a été décrite dans la littérature regroupant des acides aminés et leurs dérivés, des sucres, des hétérosides et des polyols (Pade and Hagemann 2014). Bien que les solutés compatibles soient majoritairement synthétisés *de novo*, l'existence de différents transporteurs membranaires a été suggérée. Ces transporteurs ont été décrits chez les bactéries hétérotrophes puis chez les cyanobactéries autotrophes. Ces transporteurs membranaires sont de types ABC (ATP-binding-cassette). Les solutés compatibles ne sont pas uniquement impliqués dans la réponse au stress salin. L'accumulation de solutés compatibles est également un mécanisme de réponse associé à différents types de stress abiotiques (Hagemann 2011). En effet, les solutés compatibles protègent les protéines et les membranes de la dénaturation lors de différents stress, comme la dessiccation, le gel ou les températures extrêmes.

## Les différentes phases de la réponse physiologique des cyanobactéries au stress salin

Hagemann (2011) propose de décomposer la réponse générale d'une cyanobactérie lors d'un stress salin en cinq phases distinctes. Les différents mécanismes impliqués dans la réponse au stress salin sont déclenchés entre quelques millisecondes, 30 min, 2 heures, 12 heures et quelques jours après la perception du stress par la cellule.

*Le paragraphe suivant fait directement référence aux travaux de synthèse réalisés par Martin Hagemann sur les différents mécanismes de réponses décrits chez les cyanobactéries (pour références complètes, voir (Hagemann 2011, 2016, 2019, Pade and Hagemann 2014, Hagemann and Pade 2015).*

**Phase 1 :** Lorsque la salinité du milieu extracellulaire augmente, le gradient de potentiels hydriques entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule s'inverse. L'ajout de sel en solution diminue le potentiel hydrique extracellulaire. En quelques millisecondes, l'eau et une partie des solutés présents dans le cytosol quittent la cellule par diffusion passive. Le biovolume cellulaire diminue subitement (Figure 9).

**Phase 2 :** Le biovolume cellulaire initial est rétabli en quelques minutes à la suite d'un influx d'ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  à l'intérieur des cellules. Cet influx d'ions contribue à diminuer le potentiel hydrique intracellulaire et conduit à un afflux d'eau vers l'intérieur de la cellule. À ce stade, la présence d'une concentration élevée d'ions à l'intérieur de la cellule inhibe les mécanismes de transcription, de traduction, de photosynthèse ainsi que le métabolisme. Cette inhibition du fonctionnement cellulaire suggère que la plupart des mécanismes impliqués dans la réponse initiale au stress salin reposent sur des composés cellulaires déjà présents au sein de la cellule (Figure 9).

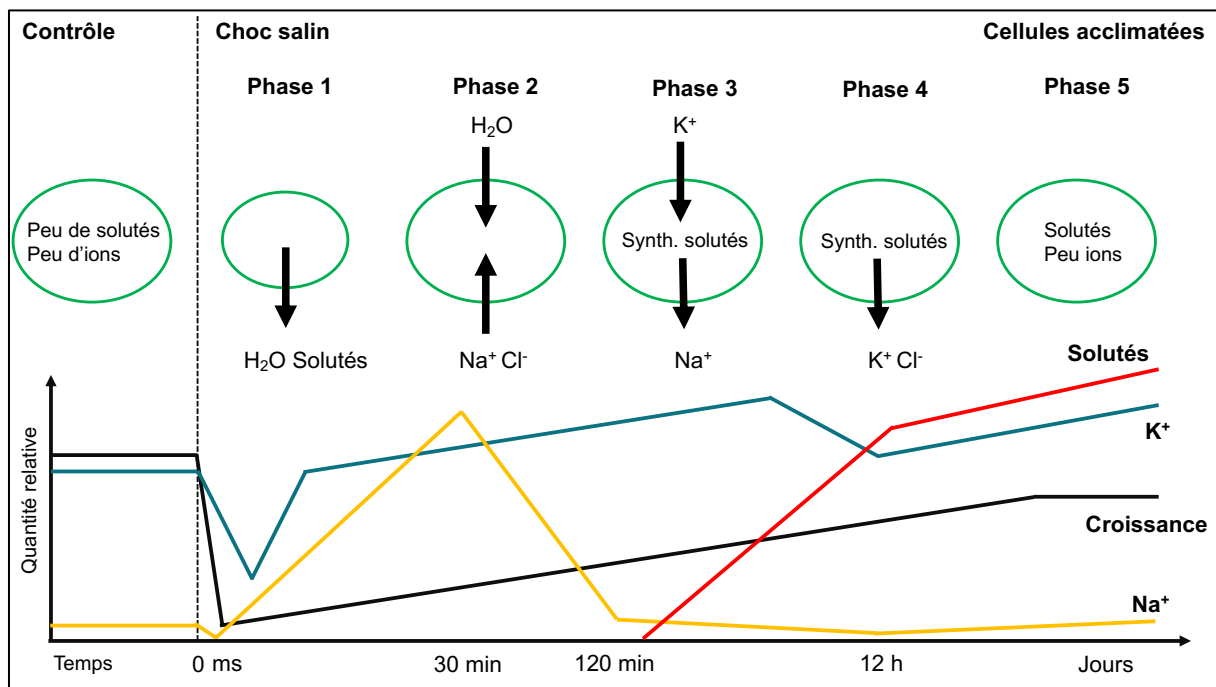


Figure 9 : Les différentes phases de la réponse au stress salin chez les cyanobactéries décrites par Hagemann (2011). Ces dernières impliquent un changement du biovolume cellulaire, des échanges d'ions et d'eau au travers de la membrane plasmique ainsi que la synthèse et l'accumulation de solutés compatibles.

**Phase 3 :** À l'intérieur des cellules, des mécanismes de rééquilibrage de la charge ionique s'opèrent, notamment un échange des ions Na<sup>+</sup> au profit d'ions K<sup>+</sup> moins toxiques pour le métabolisme cellulaire. Cet échange s'effectue par des transporteurs membranaires de types antiports Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> et des systèmes MRP (antiport de cations monovalents) et Ktr (transporteur K<sup>+</sup>) responsables de l'efflux d'ions Na<sup>+</sup> et de l'influx d'ions K<sup>+</sup>. L'expulsion active des ions Na<sup>+</sup> est donc le premier phénomène mis en place par la cellule afin de retrouver un équilibre osmotique avec le milieu externe. La balance ionique est rétablie en quelques heures, en fonction de la salinité du milieu extérieur, la composition ionique du cytosol permet alors une reprise du fonctionnement cellulaire. Les besoins énergétiques de la cellule sont assurés par la reprise de la photosynthèse ce qui permet la biosynthèse de nouvelles protéines impliquées dans la régulation de l'équilibre ionique et la biosynthèse de solutés compatibles (Figure 9).

**Phase 4 :** Un remodelage de l'expression génétique et de l'activité cellulaire se met en place. En fonction de l'importance du stress salin, la synthèse de solutés compatibles se fait en parallèle d'une extrusion des ions inorganiques et peut prendre plusieurs heures. À ce stade, l'équilibre des potentiels hydriques entre les milieux intérieur et extérieur est assuré par la présence de solutés compatibles à l'intérieur des cellules (Figure 9).

**Phase 5 :** Les cellules sont acclimatées aux nouvelles conditions de salinité du milieu. La cellule présente alors un nouvel état d'équilibre avec son milieu. À ce stade, les cellules possèdent une charge ionique interne basse, compensée par l'accumulation de solutés compatibles. La reprise de la croissance s'effectue en parallèle de la reprise de l'activité photosynthétique. En fonction du degré d'intensité du stress, la croissance et l'activité photosynthétique peuvent être réduites en comparaison avec l'activité dans des conditions normales (Figure 9).

### Diversité des solutés compatibles produits par les cyanobactéries

L'accumulation de solutés compatibles ne repose pas sur la biosynthèse et l'accumulation d'un unique soluté compatible. En effet, l'équilibre hydrique de la cellule est maintenu par l'accumulation d'un pool de solutés compatibles variés (Tableau 3). Il semble également que la tolérance à la salinité d'un organisme puisse être corrélée aux différents solutés compatibles accumulés (Hagemann 2011).

### Saccharose et tréhalose : des solutés compatibles associés à une tolérance à la salinité

Les cyanobactéries se développant en eau douce sont adaptées à un milieu relativement faible en ions. La salinité des milieux d'eau douce tend vers 0 et une partie des cyanobactéries d'eau douce ne sont pas en mesure de produire et d'accumuler des solutés compatibles. Le saccharose et le tréhalose sont des diholosides formés pour l'un d'un glucose et d'un fructose pour l'autre de deux molécules de glucose. La présence de ces deux sucres a été décrite chez divers genres de cyanobactéries tels que *Nostoc*, *Synechococcus*, *Dolichospermum*, *Microcystis*, *Rivularia* (Hagemann 2011). Le saccharose et le tréhalose sont décrits comme les solutés compatibles principalement accumulés chez les cyanobactéries sténohalines faiblement halotolérantes (Salinité < 35) (Klähn and Hagemann 2011).

### Glucosylglycerol (GG) et glucosylglycerate (GGA) : des solutés compatibles associés à une tolérance modérée à la salinité

Le GG est l'un des premiers solutés compatibles identifié chez les cyanobactéries (*Synechococcus*) (Borowitzka et al. 1980). Le GGA est un soluté compatible présentant une charge négative à pH physiologique (Hagemann 2013).

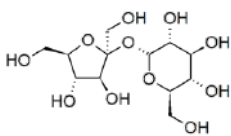
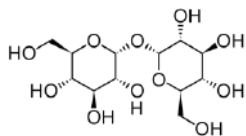
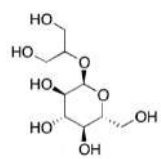
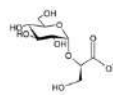
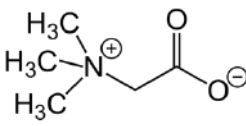
Bien que décrit par Hagemann (2011) comme des solutés compatibles accumulés par les organismes modérément halotolérants (Salinité < 99) la présence de GG et de GGA a été décrite aussi bien chez des cyanobactéries d'eau douce et marines (Hagemann 2013). Le GG a également été l'un des premiers solutés compatibles décrit chez *Microcystis firma* (Hagemann et al. 1987). Le GGA a été décrit chez des souches de cyanobactéries appartenant aux genres *Prochlorococcus* et *Synechococcus*.

La glycine bêtaïne (GB) : un soluté compatible principalement accumulé chez les organismes halotolérants

La GB est un ammonium quaternaire (N,N,N-triméthylammonioacetate) dont la présence a été décrite chez les plantes supérieures et les bactéries hétérotrophes (Hagemann 2011). Chez les cyanobactéries, la GB a été décrite pour la première fois chez le genre *Synechocystis* (Mohammad et al. 1983). La synthèse de GB est principalement détectée chez les organismes qualifiés d'halotolérants. La synthèse de GB passe par l'oxydation de la choline et d'un aldéhyde de bêtaïne (Hagemann 2011).

*\*Pour plus d'information sur l'ensemble des solutés compatibles voir Hagemann (2011).*

Tableau 3: Diversité des solutés compatibles accumulés en cas de stress salin chez les cyanobactéries.

Solutés compatibles	Structures chimiques	Genres producteurs	Gènes et voies de biosynthèse
<b>Faible tolérance (NaCl &lt; 0.6 M)</b>			
<b>Saccharose</b>		<i>Microcystis</i> <i>Anabaena</i> <i>Chroococciopsis</i> <i>Dolichospermum</i> <i>Nostoc</i> <i>Nodularia</i> <i>Phormidium</i> <i>Prochlorococcus</i> <i>Synechocystis</i> <i>Scytonema</i> <i>Synechococcus</i>	Sps : Saccharose-phosphate synthase Spp : Saccharose-phosphate phosphatase Suc : Sucrose synthase Sucrase
<b>Tréhalose</b>		<i>Arthrospira</i> <i>Crocospaera</i> <i>Chroococciopsis</i> <i>Microcoleus</i> <i>Microcystis</i> <i>Phormidium</i> <i>Nodularia</i> <i>Nostoc</i> <i>Synechococcus</i> <i>Scytonema</i>	OtsA : Tréhalose-phosphate synthase OtsB : Tréhalose-phosphate phosphatase TreY : maltoigosyl-tréhalose TreZ : maltoigosyl-tréhalose tréhalohydrolase TreA : Tréhalase
<b>Tolérance modérée (NaCl &lt; 1.7 M)</b>			
<b>Glucosylglycerol (GG)</b>		<i>Arthrospira</i> <i>Acaryochloris</i> <i>Cyanothece</i> <i>Microcystis</i> <i>Microcoleus</i> <i>Prochlorococcus</i> <i>Synechocystis</i> <i>Synechococcus</i>	GgpS : GG-phosphate synthase GgpP : GG-phosphate phosphatase ggtABCD : transporteur membranaire type ABC
<b>Glucosylglycerate (GGA)</b>		<i>Prochlorococcus</i> <i>Synechococcus</i>	GpgS : GGA-phosphate synthase GpgP : GGA-phosphate phosphatase Existence de transporteurs membranaires
<b>Halotolérante Salinité (NaCl &lt; 3.0 M)</b>			
<b>Glycine bêtaïne (GB)</b>		<i>Aphanothece</i> <i>Synechococcus</i> <i>Lyngbya</i> <i>Trichodesmium</i> <i>Prochlorococcus</i>	CDH : choline deshydrogénase BADH : betaine aldéhyde déshydrogénase GSMT : glycine/sarcosine-N-méthyltransferase DMT : diméthylglycine-N-méthyltransferase
<b>Autres solutés compatibles</b>			
<u>Acides aminés et dérivés</u> : proline, glutamate, ectoine, homoserine betaine <u>Polyols</u> : glycerol, sorbitol <u>Sucres</u> : Floridoside et isofloridoside ; galactosylglycerol ; mannosylglycerate			

## Contexte et objectifs de cette étude

Le dernier rapport du panel intergouvernemental sur les efflorescences de microalgues et de cyanobactéries toxiques de la Commission Océanographique Intergouvernemental mandatée par l'UNESCO met en évidence un accroissement des efflorescences de cyanobactéries toxiques en eau douce. Le rapport décrit une augmentation des cas de transfert de ces cyanobactéries et toxines associées aux zones estuariennes et côtières. Dans ce contexte, la présence de ces toxines représente une menace pour la santé humaine et celle des organismes évoluant dans ces zones. À ce propos, le rapport insiste sur le besoin et l'importance d'évaluer le risque que représente ce phénomène de transfert afin d'adopter les mesures de contrôle et de régulation appropriées permettant de protéger les populations humaines, face à un risque de contamination associée à la présence de ces toxines dans l'environnement.

À l'échelle mondiale, les MC sont les toxines les plus fréquemment rencontrées dans les environnements d'eau douce et associées à la présence d'efflorescence de cyanobactéries. Ces efflorescences de cyanobactéries toxiques d'eau douce sont dominées par le genre *Microcystis* (Harke et al. 2016, Svirčev et al. 2019). En conséquence, la présence de *Microcystis* et de MC en milieu estuarien et côtier est un phénomène potentiellement présent sur l'ensemble des continents et qui est encore sous-évalué (Preece et al. 2017).

**Ce projet de thèse s'inscrit dans un contexte d'extension de l'aire d'influence de *Microcystis* sp. aux zones estuariennes et côtières (Preece et al. 2017) et a pour objectif d'étudier l'impact d'une augmentation de la salinité sur la croissance, la production de MC et plus généralement la physiologie de l'espèce dominante au sein du genre, *M. aeruginosa*.**



Ce manuscrit de thèse s'articule autour trois chapitres :

**Chapitre 1 : Mise au point et application de l'extraction en phase solide et de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse pour la détection et la quantification des MC intracellulaires et dissoutes au cours d'une expérience de choc salin.**

Ce projet de thèse s'est d'abord intéressé au développement d'une méthode d'analyse des MC intracellulaires et dissoutes. La présence de quantités non négligeables de sels dissous dans l'eau de mer implique le développement de méthode d'extraction/purification des MC permettant leur analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. À la suite de cette mise au point, une étude a été menée afin d'étudier l'impact d'une augmentation de la salinité sur des échantillons naturels de *Microcystis* dans le cadre d'une expérience de choc. L'effet d'une augmentation de la salinité a notamment été étudié au travers d'un suivi de la croissance, de l'activité photosynthétique et du dosage des microcystines intracellulaires et dissoutes.

La suite de ce projet de thèse a été consacrée à l'étude de la réponse physiologique à l'augmentation de la salinité chez deux souches de *M. aeruginosa* PCC 7820 et PCC 7806.

**Chapitre 2 : Réponses physiologiques et métaboliques de deux souches de *Microcystis aeruginosa* isolées en eaux douce et saumâtre acclimatées, à un gradient de salinité.**

L'étude de l'impact d'une augmentation de la salinité chez *M. aeruginosa* a été étudiée à la suite d'une phase d'acclimatation progressive à différentes conditions de salinité. Cette acclimatation a été mise en place dans le but d'évaluer le seuil de tolérance des deux souches de *M. aeruginosa* soumise à une augmentation de la salinité. Une fois acclimatées, la réponse physiologique des souches a été étudiée par différentes approches. Les conséquences d'une augmentation de la salinité sur la croissance et la production de MC ont été étudiées. La présence et l'accumulation de solutés compatibles impliqués dans la réponse à la salinité chez les cyanobactéries ont été recherchés. Une approche métabolomique a également été réalisée afin d'identifier certains biomarqueurs d'une acclimatation à la salinité chez *M. aeruginosa*.

Enfin, une comparaison des paramètres photosynthétiques de ces deux souches acclimatées à différentes conditions de salinité a également été réalisée.

### **Chapitre 3 : Réponses physiologiques et métaboliques de deux souches de *Microcystis aeruginosa* isolées en eaux douce et saumâtre soumises à un choc salin.**

La réponse physiologique de ces deux souches a été étudiée à la suite d'une expérience de choc salin. Différents niveaux de réponse ont été étudiés. Sur une échelle de temps courte (< 2 heures), l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress salin a été étudiée par des analyses de RT-qPCR. La réponse de ces souches a également été étudiée sur 7 jours au travers d'une évaluation de la croissance, et de la production toxinique. Aussi, une approche métabolomique a été employée afin d'identifier la présence de biomarqueurs d'un stress salin chez *M. aeruginosa*.

Dans son ensemble, ce projet de thèse avait pour objectif :

- La mise au point d'une méthode d'analyse des MC intracellulaires et dissoutes par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse appliquée à la matrice eau de mer et à l'analyse de ces composés dans des cultures conduites au laboratoire.
- L'étude des limites de tolérance à la salinité chez deux souches de *M. aeruginosa* provenant de milieux présentant des salinités contrastées.
- L'étude de l'impact d'une augmentation de la salinité sur la production, la diversité et l'excrétion de différents analogues de MC produits par *M. aeruginosa*.
- La caractérisation de mécanismes impliqués lors d'une augmentation de la salinité par l'approche métabolomique.

# Chapitre 1



## Solid Phase Extraction, Liquid chromatography – Tandem Mass Spectrometry Applications, for the determination of intracellular and dissolved microcystins in salt stress experiment

Maxime Georges des Aulnois,<sup>\*a</sup> Elise Robert,<sup>a</sup> Amandine Caruana,<sup>a</sup> Damien Réveillon,<sup>a</sup> Enora Briand,<sup>a</sup> Véronique Savar,<sup>a</sup> Myriam Bormans,<sup>b</sup> Zouher Amzil<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Phycotoxins Laboratory, IFREMER, Nantes, France

<sup>b</sup>University of Rennes, CNRS, ECOBIO - UMR 6553, F-35000 Rennes, France

Citation: Georges des Aulnois, M., E., Robert, P., Caruana, A., Réveillon, D., Briand, E., Savar, V., Bormans, M., Amzil, Z.. Solid Phase Extraction, Liquid chromatography – Tandem Mass Spectrometry Applications, for the determination of intracellular and dissolved microcystins in salt stress experiment, **In preparation for a submission to Toxicon.**

## Table list

Table 1: Transitions and parameters used for the positive ion mode multiple reaction monitoring of MCs. p: 53

Table 2: Extraction recovery and ionization effects for intracellular and extracellular matrices (mean  $\pm$  SD, n = 3). p: 58

Table 3: Total recoveries for intracellular and extracellular matrices for each spiking level (mean  $\pm$  SD, n = 3). Low, Medium and High spiking levels corresponded to 4, 18 and 80 LQs for the intracellular matrix and 4, 22 and 125 LQs for the extracellular matrix. p: 59

Table 4: Intra- and interday variabilities expressed as relative standard deviation at low (intracellular: 4 LQs ; extracellular: 4 LQs ), medium (intracellular: 18 LQs ; extracellular: 22LQs) and high (intracellular: 80 LQs ; extracellular: 125 LQs) spiking levels (intraday , n = 3 ; interday, n = 9). p: 61

Table 5: Total recoveries (% , i.e., adsorption and extraction) of the HP20 and Strata-X resins (means  $\pm$  SD, n = 3) in Milli-Q water and seawater. p: 62

Table 6: Limits of detection and quantification in cellular and extracellular matrices. p: 63

## Figure list

Figure 1: Coefficient of variation between BG<sub>11</sub> and BG<sub>11</sub> + 36 g.L<sup>-1</sup> NaCl matrices for each MC variant and SPE cartridge tested (C18 and HLB). Results are expressed with recoveries in BG<sub>11</sub> as references (n = 3). p: 57

Figure 2: Effect of different salinity conditions on optical density (A) and F<sub>V</sub>/F<sub>M</sub> (B) (mean ± SD, n = 3). p: 64

Figure 3: Intracellular (A) and extracellular (B) MC profiles for each salinity condition (means ± SD, n = 3). SD were calculated on the total of each MC variant quantified. p : 65

Figure 4: Intracellular and extracellular fractions (%) of total MCs for each salinity condition over time. p: 66





## Introduction

Since the first report of microcystins (MCs) in lake samples in the 1930s in America (Bishop et al. 1959), their presence has been documented in every continent, in aquatic ecosystems from lakes to oceans as well as in terrestrial and extreme ecosystems (Buratti et al. 2017, Cirés et al. 2017). Nearly 50 MC-producer cyanobacterial species have been reported (Catherine et al. 2017) but they are mainly produced by common freshwater blooming genera such as *Microcystis*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon*, *Dolichospermum* and *Oscillatoria* (Buratti et al. 2017). These non-ribosomally synthesized heptapeptides share a common structure: cyclo-(D-A<sup>1</sup>-X<sup>2</sup>-D-MeD<sup>3</sup>-Y<sup>4</sup>-Adda<sup>5</sup>-D-E<sup>6</sup>-Mdha<sup>7</sup>) (Dittmann et al. 2013). Due to several combinations of amino acids at positions 2-4 and the occurrence of demethylations, there is a great diversity of MCs with almost 250 variants described so far (Catherine et al. 2017). Another family of cyclic pentapeptides shares the same functional properties but was first detected in the genus *Nodularia* and named nodularins accordingly (NODs). Both MCs and NODs are hepatotoxins acting as specific inhibitors of eukaryotic protein phosphatases (MacKintosh et al. 1990, Yoshizawa et al. 1990) but they also are immunotoxicants and show tumor-promoting, endocrine-disrupting and oxidative DNA damage activities (Catherine et al. 2017). Consequently, MCs and NODs are a threat for both humans and animals because of the global occurrence of toxic cyanobacterial bloom (CyanoHAB) (Huisman et al. 2018). Freshwater ecosystems and users are particularly affected while these phenomena are likely to increase as the consequences of human activities and climate changes (Paerl and Paul 2012, Visser et al. 2016).

A recent review by Svirčev et al. (2019) showed that almost 700 studies reported the detection of MCs in the environment which accounted for 63% of the cyanotoxin reports published in peer-reviewed journals until 2018. Besides, MCs were involved in most of the poisoning events worldwide with 79 over the 189 poisoning cases reported in the literature up to 2018 (Svirčev et al. 2019).

Several studies pointed out the occurrence of MCs in brackish and marine waters as a consequence of the physical transfer of cyanobacterial blooms along the freshwater-to-marine continuum (Robson and Hamilton 2003, Lehman et al. 2005, Gobble and Kudela 2014, Bormans et al. 2019). This transfer results in the increase of salinity in the surrounding medium of the cells with subsequent cell lysis when salt tolerance is overpassed (Ross et al. 2019). This phenomenon can ultimately lead to the release of MCs in the water and to MC accumulation in aquatic organisms worldwide e.g., shellfish, fishes and mammals (M. A. Miller et al. 2010, Bukaveckas et al. 2017, Lehman et al. 2017) but is frequently recorded in North America (Lehman et al. 2005, 2010, 2013, 2017, Moisander et al. 2009, Peacock et al. 2018).

In Europe, the Baltic Sea, is the main brackish water ecosystem affected by MC and NODs due to dense blooms of *Nodularia* sp., *Dolichospermum* spp. and *Microcystis* spp. (Mazur-Marzec et al. 2010, Brutemark et al. 2015, Paldavičiene et al. 2015, Teikari et al. 2018). However, Western European waters are also exposed to cyanotoxin resulting from transfers to coastal areas were recently described in Portugal and France (Lopes and Vasconcelos 2011, Churro et al. 2017, Bormans et al. 2019). Through climate changes, the transfer of toxic freshwater blooms to coastal areas is expected to increase in the future (Paerl and Paul 2012, Paerl et al. 2018).

In order to reduce the risk of human poisoning, the development of analytical methods in different matrices of interest is required (Balest et al. 2016, Turner et al. 2018). Hitherto, many approaches have been described to detect and quantify MCs and NODs in raw water and drinking water, cyanobacterial samples, vegetal and animal tissues. Fast and relatively cheap biochemical kits such as colorimetric immuno-protein phosphatase inhibition assay and fluorimetric enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are good tools for screening and semi-quantitative analyses (Carmichael and An 1999). Liquid chromatography (LC) coupled to UV detector has been widely used to distinct MC congeners. Nevertheless, this method lack of selectivity and sensibility for the analysis of several MC variants (Catherine et al. 2017). Nowadays, the most accurate and reliable methods to detect and quantify MCs are based on liquid chromatography coupled to mass spectrometry (MS) (Oehrle et al. 2010, Beltrán et al. 2012, Benke et al. 2015, Ortiz et al. 2017, Turner et al. 2018, Haddad et al. 2019).

Here, we characterized an ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS) method for the extraction and quantification of nine MC variants and NOD in different matrices, i.e., dissolved toxins in growth media and seawater as well as particulate toxins in cyanobacterial cells. A solid phase extraction (SPE) step for small volume (e.g., for lab studies on cyanobacteria in culture) was implemented and the impact of salt on SPE recovery was assessed. Also a solid phase adsorption toxin tracking (SPATT) method was developed. A direct application was conducted in a salt-stress experiment based on natural bloom samples of *Microcystis* spp. exposed to two salinities (10 and 20) in which intracellular and extracellular MCs variants were quantified.

## Materials and methods

### Chemicals and reagents

Ultra-pure water was provided by a Milli-Q integral 3 system (Millipore). HPLC grade methanol (MeOH) and acetonitrile were used for sample extraction and mobile phases (Honeywell). Reference toxin standards (MC-LR, MC-RR, MC-LY, MC-LF, MC-LA, MC-YR, MC-LW, dmMC-RR, dmMC-LR and NOD) were purchased from Novakits. Two SPE cartridges were tested for extracellular MC extraction, the Bond Elut C18 cartridge (200 mg, 10 mL; Agilent) and the Oasis HLB cartridge (200 mg, 6 mL; Waters). The polymeric sorbents HP-20 (Diaion) and Strata-X (Phenomenex) were tested for the SPATT resin. Cyanobacterial growth media BG<sub>11</sub>, and BG<sub>11</sub> + 36 g.L<sup>-1</sup> NaCl and BG<sub>11</sub> + 5 µg.mL<sup>-1</sup> Chloramphenicol were prepared according to Rippka et al. (1979) using chemical powders from Sigma-Aldrich. The first two media were used as blank matrices for the characterization of SPE extraction of MCs from small volumes. The last medium was used to cultivate *M. aeruginosa* PCC 7806 *mcyB*<sup>-</sup>. This mutant strain was provided by the Pasteur Culture Collection (PCC) and used as the blank matrix for particulate (i.e., intracellular) MCs.

### UHPLC configuration

A UHPLC device (Nexera; Shimadzu) coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (5500 QTrap; ABSciex) equipped with a TurboV electrospray ionization source were used for liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. The chromatography was conducted using a Kinetex XB C18 column (100 x 2.1 mm; 2.6 µm; Phenomenex) equipped with a suited guard column and maintained at 25 °C. The injection volume was 5 µL and the samples were kept at 4 °C. The elution gradient with water (A) and acetonitrile (B) both containing 0.1% formic acid was 30-80% B (0 to 5 min), 80% B (5 to 6 min), and 30% B (6.5 to 10.5 min). The total runtime per sample was 11 min and the flow rate 0.3 mL.min<sup>-1</sup>.

## MS/MS conditions

Detection was performed using multiple reactions monitoring (MRM). The electrospray ionization interface (ESI) was operated in positive mode using the following source settings: curtain gas at 30 psi, ion spray at 5000 V, temperature of 300 °C, gas 1 and gas 2 set at 30 and 40 psi respectively and an entrance potential of 10 V. Each toxin was identified and quantified using two transitions (Table 1). The quantification of toxins was carried out using an external 6-point calibration curve prepared with working standards. Acquisition and data processing were performed using Analyst 1.6.3 software (ABSciex).

Table 1: Transitions and parameters used for the positive ion mode multiple reaction monitoring of MCs.

Analytes	MRM transitions	DP (V)	CE (eV)	CXP (V)
dmMC-RR	512.8 > 135.0* ; 103.0	121	35 ; 89	6 ; 16
MC-RR	520.1 > 135.2* ; 213.2	76	45 ; 49	6 ; 12
MC-YR	1045.6 > 213.2* ; 375.2	221	87 ; 71	12 ; 22
MC-LR	995.6 > 213.2* ; 375.2	186	85 ; 70	14 ; 22
dmMC-LR	981.4 > 103.0* ; 135.0	101	129 ; 117	12 ; 18
MC-LA	910.7 > 375.2* ; 135.2	81	45 ; 91	8 ; 6
MC-LY	1002.6 > 135.2* ; 375.3	106	93 ; 49	6 ; 8
MC-LW	1025.6 > 135.2* ; 375.2	106	103 ; 53	12 ; 22
MC-LF	986.6 > 375.2* ; 135.2	96	47 ; 93	8 ; 6
NOD	825.5 > 227.0* ; 163.2	151	69 ; 67	12 ; 14

*DP = declustering potential; CE = collision energy; CXP = cell exit potential*

*\* quantifier transition*

### Intracellular MC extraction

Cyanobacterial cell pellets (corresponding to 5 billion cells) were obtained after centrifugation (4248 g, 15 min at room temperature), 250 mg of glass beads (0.15-0.25 mm; VWR) and 1 mL of methanol were added before mechanical grinding using a mixer mill (MM400; Retsch) for 30 min at 30 Hz (Serive et al. 2012). Tubes were centrifuged at 13 000 g and supernatants ultrafiltered (Nanosep MF 0.2  $\mu\text{m}$ ; Pall) and stored at -20 °C before UHPLC-MS/MS analysis.

### Comparison of SPE cartridges

Two types of SPE cartridges were tested: C18 and HLB. The effect of salt on SPE recoveries was assessed by comparing, in triplicate, recoveries in BG<sub>11</sub> and BG<sub>11</sub> + 36 g.L<sup>-1</sup> NaCl spiked with MCs at concentrations corresponding to 18 LQs. The same SPE procedure was applied for both C18 and HLB cartridges, according to the manufacturer information. The cartridges were conditioned with 3 mL of methanol followed by 3 mL of water. Then, 15 mL of the spiked matrix were loaded onto the cartridge before washing with 2.4 mL of MeOH/water (5:95, v/v). The elution was performed with 4 mL of MeOH. The C18 cartridge was finally selected.

### Comparison of resins for SPATT

The SPATT devices we used here have been described in Zendong et al. (2014). Two adsorbents were tested for MC concentration: the HP-20 and the Strata X polymeric resins. The effect of salts was assessed by comparing, in triplicate, MC adsorption between Milli-Q water and filtered natural seawater (0.2  $\mu\text{m}$  glass microfiber filter; Whatman) spiked with MC-RR (412 ng.L<sup>-1</sup>), MC-LR (808 ng.L<sup>-1</sup>) and MC-YR (100 ng.L<sup>-1</sup>). SPATTs were prepared with 300 mg of adsorbents and conditioned 48 h before the experiment by 24 h immersion in MeOH and stored in Milli-Q water at 4 °C. Subsequently, they were immersed in 500 mL of the spiked matrices in closed culture devices shook at 30 rpm during 7 days. The resins were carefully removed from the SPATT devices and loaded into an Empty Glass Reaction Tube for SPE (6 mL with 1 Teflon Frit; Supelco). Adsorbents were eluted in two steps with 10 mL and 5 mL of MeOH, respectively. Eluates were evaporated at room temperature under N<sub>2</sub> flux. After complete dryness, extracts were solubilized with 500  $\mu\text{L}$  of MeOH and ultrafiltered (Nanosep MF 0.2  $\mu\text{m}$ ; Pall) before UHPLC-MS/MS analysis.

## Determination of limits of detection (LD) and quantification (LQ)

Based on three injections and from chromatograms of the same two spiked matrices, the limits of detection (LD) and quantification (LQ) were determined for intracellular and extracellular MCs. LDs were defined as the lowest concentrations giving an average mean signal-to-noise (S/N) ratio of 3 for the qualifier transition. LQs were defined as the lowest concentrations giving an average signal-to-noise (S/N) ratio of 10 for the quantifier transition, while having a S/N > 3 for the qualifier transition (Vial and Jardy 1999).

## Method characterization

Ionization effects were estimated by spiking (18 and 22 LQs) the extracted matrices in triplicate before UHPLC-MS/MS analysis. Extraction recoveries corresponded to the deviation between the final concentration (i.e., matrix spiked before extraction) and the expected concentration after correction with the ionization effect.

$$Recovery = \frac{C_{spiked\ matrix\ before\ extraction}}{C_{spiked\ solvent} \times ionization\ effect}$$

The performance of both analytical methods (intracellular and extracellular) was then characterized at 3 levels of concentration prepared in triplicate (4, 18, 80 LQs and 4, 22, 125 LQs respectively for intracellular and extracellular fractions). The two matrices (i.e., toxin-free cell pellets of the *mcyB*<sup>-</sup> mutant strain *M. aeruginosa* PCC 7806 and 15 mL of BG<sub>11</sub> medium extracted with the Bond Elut C18 cartridge) were spiked before extraction and UPHLC-MS/MS analysis. Total recoveries were finally obtained after correction by both extraction recovery and ionization effect.

Intra-day variability (relative standard deviation, RSD) was evaluated with a triplicate injection while inter-day variability was evaluated by comparing three injections every two days over one week (interbatch, n = 9).

## Application to natural samples

Cyanobacterial bloom samples were collected in the freshwater reservoir of Pen Mur in France (47°33'44.4"N, 2°29'31.7"W). This reservoir is used for drinking water and undergoes recurrent intense cyanobacterial blooms dominated by MC-producing *Microcystis* spp. (Bormans et al. 2019). This site is close to the sea (< 10 km) and the level of the water in the reservoir is regulated by a flood barrier. In August 2018, a bloom sample (2 L) was collected and immediately brought back to the laboratory for salt-stress experiment. A water sample (5 L) was also retrieved one meter below the surface. Cyanobacterial identification was performed under optical microscope. The genus *Microcystis* dominated the phytoplankton community (>95%) and the morpho-species *M. aeruginosa* was dominant (Komárek and Komárková 2002). The presence of isolated colonies of *M. botrys* and *M. viridis* was also noted.

The 5 L water sample was filtered (1 µm glass microfiber filter; Whatman) to remove cyanobacterial cells. Natural filtered seawater (0.2 µm glass microfiber filter; Whatman) and reservoir water were mixed in order to constitute two salt conditions (29%, 57% of sea water) corresponding to a salinity of 10 and 20 as monitored with a conductivity meter (Cond 3110 Set 1; WTW).

Triplicate 500 mL cultures were inoculated with the same volume of scum sample and maintained for 8 days at 22±0.6 °C under a 12:12-h light:dark cycle using cool-white fluorescent tubes (Philips) with 35 µmolphoton.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> illumination.

The optical density (OD, 750 nm) was used as a proxy of cell concentration and monitored every day (Tecan Infinite® M200 plate reader). Before fluorescence analyses, samples (3 mL) were incubated in the dark for 15 min.  $F_V/F_M$  was measured (455 nm, no DCMU addition and the basal fluorescence was not subtracted) every day using an Aquapen-C 100 fluorimeter (Photon Systems Instruments) (Ogawa et al. 2017).

Every two days samples for intracellular and extracellular MC quantifications were taken and stored at -80 °C before extraction and UHPLC-MS/MS analysis as described above.



# Results

## Effect of salt on SPE recovery

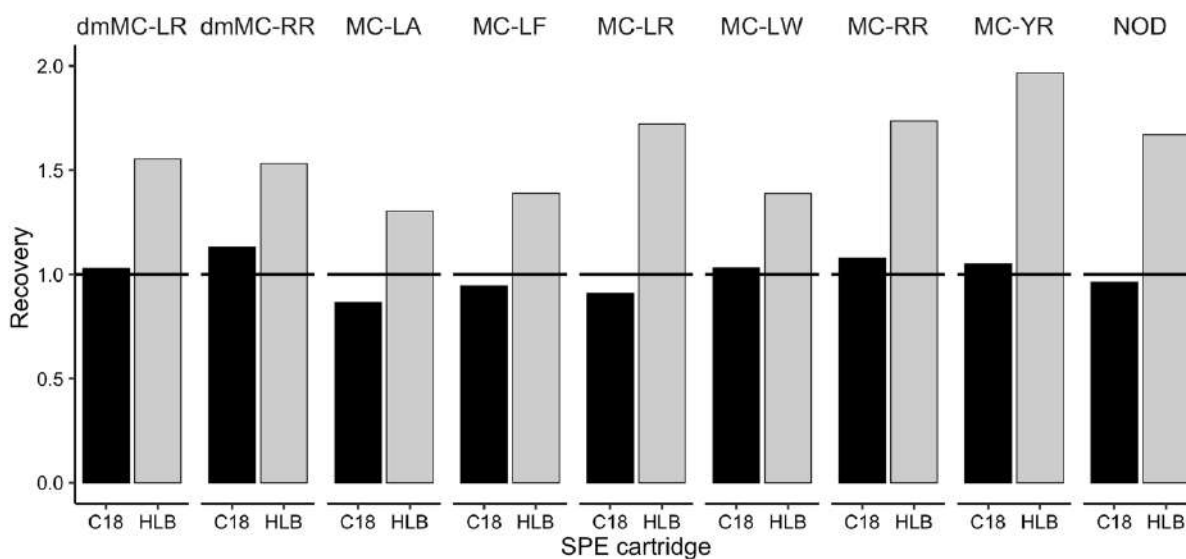


Figure 1: Coefficient of variation between BG<sub>11</sub> and BG<sub>11</sub> + 36 g.L<sup>-1</sup> NaCl matrices for each MC variant and SPE cartridge tested (C18 and HLB). Results are expressed with recoveries in BG<sub>11</sub> as references (n = 3).

SPE recoveries were consistent between the two matrices tested for the C18 cartridge (i.e., coefficient of variations ranged from 3% to 14%) (Figure 1). However, a strong positive effect of salt was noted for the HLB cartridge, with an increase ranging from 31 to 97% compared to BG<sub>11</sub> (Figure 1). The C18 cartridge was thus selected as it showed negligible salt-derived matrix effects compared to HLB.

## Recovery

Matrix effects on ionization were evaluated for the medium spiking level for both matrices (Table 2). Generally, low matrix effects were observed for the great majority of the MC variants, except for MC-LF ( $120 \pm 3.6\%$ ) and dmMC-RR ( $132 \pm 4.0\%$ ) for the intracellular matrix and for dmMC-RR ( $152 \pm 11\%$ ) and MC-RR ( $228 \pm 4.6\%$ ) for the extracellular matrix (Table 2).

Extraction recovery for intra- and extracellular matrices were provided in table X. Overall, extraction recoveries ranged between  $89 \pm 4\%$  and  $121 \pm 4\%$  for the intracellular matrix while SPE extraction recoveries ranged between  $73 \pm 1\%$  and  $102 \pm 5\%$  (Table 2). Only, MC-RR and dmMC-RR showed poor SPE extraction recoveries of  $30 \pm 2\%$  and  $42 \pm 8\%$  respectively (Table 2).

Table 2: Extraction recovery and ionization effects for intracellular and extracellular matrices (mean  $\pm$  SD, n = 3).

Analytes	Intracellular				Extracellular			
	Extraction Recovery (%)	SD	Ionization Effect (%)	SD	Extraction Recovery (%)	SD	Ionization Effect (%)	SD
dmMC-RR	89	4	132	4.0	30	2	228	4.6
MC-RR	90	3	111	3.3	43	8	152	11
MC-YR	116	5	101	1.0	73	1	103	1.0
MC-LR	121	4	100	1.0	77	2	102	1.0
dmMC-LR	108	6	96	1.9	83	3	102	1.0
MC-LA	96	2	98	3.9	102	5	98	2.9
MC-LY	93	4	104	4.1	99	4	100	1.0
MC-LW	95	3	112	3.3	81	3	103	2.1
MC-LF	100	3	120	3.6	77	3	100	1.0
NOD	96	4	98	3.0	95	1	101	2.0

*SD = standard deviation*

Table 3: Total recoveries for intracellular and extracellular matrices for each spiking level (mean  $\pm$  SD, n = 3). Low, Medium and High spiking levels corresponded to 4, 18 and 80 LQs for the intracellular matrix and 4, 22 and 125 LQs for the extracellular matrix.

Analytes	Spiking Level	Intracellular		Extracellular	
		Total recovery (%)	SD	Total recovery (%)	SD
dmMC-RR	Low	97	4.9	91	29
	Medium	100	3.8	81	5.0
	High	100	3.5	99	9.3
MC-RR	Low	98	4.1	81	9.8
	Medium	100	5.0	84	5.5
	High	100	2.7	99	9.2
MC-YR	Low	116	4.7	134	6.4
	Medium	77	2.4	109	3.0
	High	99	3.8	105	2.6
MC-LR	Low	89	4.6	139	13
	Medium	73	3.1	112	4.2
	High	98	3.3	105	3.4
dmMC-LR	Low	117	8.1	97	14
	Medium	83	3.5	94	2.9
	High	99	4.9	101	4.9
MC-LA	Low	102	7.4	96	31
	Medium	96	4.2	92	6.7
	High	100	2.1	99	3.6
MC-LY	Low	106	10	105	26
	Medium	100	4.1	92	4.3
	High	100	4.3	100	3.6
MC-LW	Low	99	6.0	109	55
	Medium	98	2.4	83	9.5
	High	100	3.1	99	2.9
MC-LF	Low	99	6.9	112	44
	Medium	96	2.7	108	5.9
	High	100	2.9	103	5.5
NOD	Low	96	4.3	101	8.1
	Medium	95	3.6	94	6.6
	High	99	3.9	100	4.0

*SD = standard deviation*

Total recoveries were calculated for each MC variant and NOD at each of the three levels of the spiked, extracted and analyzed matrices. They are presented as means and standard deviations for intra- and extracellular matrices based on triplicate of spiked samples (Table 3). Overall, total recoveries ranged between  $73 \pm 3.1\%$  and  $117 \pm 8.1\%$  for the intracellular matrix. Excellent recoveries closed to 100% (i.e., 95-102%) for each spiking level were noted for dmMC-RR, MC-RR, -LA, -LY, -LW, -LF and NOD (Table 3). For MC-YR, MC-LR and dmMC-LR, total recoveries were variable around 100% depending on the spiking level considered (Table 3).

Total extracellular recoveries ranged between  $81 \pm 9.8\%$  and  $139 \pm 13\%$  (Table 3). Depending on the spiking level, the total extracellular recoveries did not vary more than 20 percent points for 7 out of the 10 toxins (i.e., MC-RR, -LA, -LY, -LF, dmMC-RR, dmMC-LR and NOD) (Table 3). Wider dispersion was found for MC-LW, MC-YR and MC-LR with respectively 26, 29 and 34 points (Table 3).

Intra- and interday variabilities were low for both intracellular samples for the whole MC variants (RSD < 7.5%, Table 4). These variabilities were also low for medium and high concentrations in the extracellular samples (RSD < 11%). At a low level of spiking the intra- and interday variabilities were more important (RSD < 33%, Table 4).

Table 4: Intra- and interday variabilities expressed as relative standard deviation at low (intracellular: 4 LQs ; extracellular: 4 LQs ), medium (intracellular: 18 LQs ; extracellular: 22LQs) and high (intracellular: 80 LQs ; extracellular: 125 LQs) spiking levels (intraday , n = 3 ; interday, n = 9).

Analytes	Spiking Level	Intracellular		Extracellular	
		Intradays (%)	Interdays (%)	Intradays (%)	Interdays (%)
dmMC-RR	Low	3.0	5.0	3.3	32
	Medium	2.8	3.8	5.1	6.2
	High	2	3.5	11.5	9.4
MC-RR	Low	1.6	4.2	16.4	12
	Medium	4.4	5.0	3.5	6.6
	High	0.4	2.7	9.4	9.3
MC-YR	Low	4.5	4.1	8.4	5.4
	Medium	0.3	3.1	2.2	2.8
	High	1.1	3.8	1.7	2.5
MC-LR	Low	5.4	5.1	1.8	6.4
	Medium	3.6	4.2	2.0	3.8
	High	1.0	3.4	3.4	3.3
dmMC-LR	Low	2.4	6.9	4.6	7.8
	Medium	3.0	4.3	2.4	3.1
	High	0.5	5.0	7.5	4.8
MC-LA	Low	4.3	7.2	17	33
	Medium	1.4	4.4	8.3	7.3
	High	1.7	2.1	2.8	3.7
MC-LY	Low	3.0	10	2.7	25
	Medium	2.7	4.1	4.7	4.6
	High	3.5	4.3	4.2	3.6
MC-LW	Low	7.5	6.1	6.9	51
	Medium	0.9	2.5	2.8	11
	High	2.0	3.1	0.7	3.0
MC-LF	Low	2.6	6.9	3.6	17
	Medium	1.6	2.9	3.3	5.4
	High	0.9	2.9	4.1	5.4
NOD	Low	4.0	4.4	6.0	8.1
	Medium	0.5	3.8	1.1	6.9
	High	1.6	4.0	3.7	3.7

## SPATT recoveries

After 7 days of immersion, recoveries for the HP20 resin were between  $18 \pm 2\%$  and  $76 \pm 3\%$  and highest for MC-LR (Table 5). For all MC variants recoveries were higher in Milli-Q water than in seawater. In both matrices, the highest recovery was obtained for MC-LR (Table 5). Concerning the Strata-X resins, recoveries ranged between  $17 \pm 5\%$  and  $47 \pm 6\%$ . Similar recoveries were obtained for both matrices (e.g., 17-47% in Milli-Q water vs. 29-40% in seawater) except for MC-RR which showed a 1.7-fold increase in seawater (Table 5). Salt-derived matrix effects were less pronounced with the Strata-X adsorbent but HP20 gave the best recoveries.

Table 5: Total recoveries (%; i.e., adsorption and extraction) of the HP20 and Strata-X resins (means  $\pm$  SD, n = 3) in Milli-Q water and seawater.

Analytes	HP20				Strata-X			
	Milli-Q water		Sea water		Milli-Q water		Sea water	
	Extraction Recovery (%)	SD	Extraction Recovery (%)	SD	Extraction Recovery (%)	SD	Extraction Recovery (%)	SD
MC-LR	76	3	39	2	47	6	40	1
MC-YR	62	10	29	2	34	5	38	0.5
MC-RR	30	6	18	2	17	5	29	3

## LDs and LQs

Limits of detection and quantification were calculated for intracellular and extracellular matrices (Table 6). In cyanobacterial cell matrix, LDs and LQs ranged from 0.06 to 0.57 ng spiked and from 0.17 to 3.7 ng spiked respectively (Table 6). They were lower in the extracellular matrix (i.e. for a 15 mL sample) and spanned from 0.03 to 0.61 ng.mL<sup>-1</sup> and from 0.09 to 1.82 ng.mL<sup>-1</sup>, respectively (Table 6).

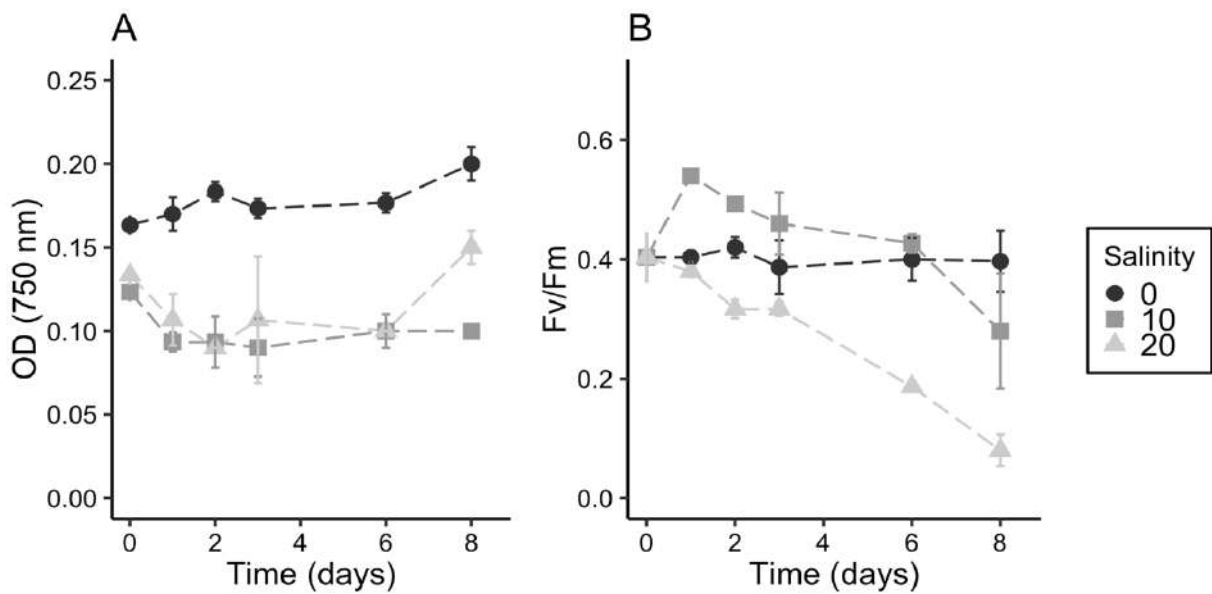
Table 6: Limits of detection and quantification in cellular and extracellular matrices.

Analytes	Intracellular		Extracellular	
	LD (ng spiked)	LQ (ng spiked)	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)
dmMC-RR	0.06	0.17	0.03	0.09
MC-RR	0.18	0.42	0.05	0.10
MC-YR	1.3	1.8	0.07	0.22
MC-LR	1.3	3.7	0.61	1.82
dmMC-LR	0.18	0.32	0.42	1.27
MC-LA	0.42	0.66	0.09	0.28
MC-LY	0.24	0.57	0.04	0.13
MC-LW	0.18	1.0	0.04	0.11
MC-LF	0.57	1.4	0.05	0.15
NOD	0.21	0.75	0.04	0.12

LD = Limit of detection; LQ = Limit of quantification

### Salt stress experiment on natural samples

Over the 8-day experiment, OD increased only in the control condition from  $0.16 \pm 0.01$  to  $0.20 \pm 0.01$  (Figure 2-A). At a salinity of 10, OD remained stable between  $0.12 \pm 0.01$  and  $0.10 \pm 0.01$ . The same trend was obtained at a salinity of 20 except between days 6 and 8 with an increase from  $0.10 \pm 0.02$  to  $0.15 \pm 0.01$  (Figure 2-A). The maximum quantum yield of photosystem II ( $F_v/F_m$ ) remained stable over the 8 days in the control condition between  $0.39 \pm 0.03$  and  $0.42 \pm 0.01$  (Figure 2-B). At a salinity of 10,  $F_v/F_m$  values increased from  $0.40 \pm 0.04$  to  $0.54 \pm 0.01$  between days 0 and 1, before a decrease down to  $0.28 \pm 0.11$  at the end of the experiment. At a salinity of 20, a linear decrease from  $0.40 \pm 0.04$  to  $0.08 \pm 0.03$  was observed (Figure 2-B).



**Figure 2: Effect of different salinity conditions on optical density (A) and  $F_v/F_m$  (B) (mean  $\pm$  SD, n = 3).**



In cyanobacteria, 5 MC variants were detected (MC-LR, MC-YR, MC-RR, dmMC-LR and dmMC-RR) (Figure 3-A). Irrespective of salinity and time, MC variant proportions represented 45/29/20/2/1% for MC-LR/MC-YR/MC-RR/dmMC-LR/dmMC-RR (Figure 3-A). The total amounts of intracellular MCs were in a close range and remained stable over time, irrespective of salinity (Figure 3-A). NODs were below the detection limit in natural samples and no producing genera were identified under a light microscope.

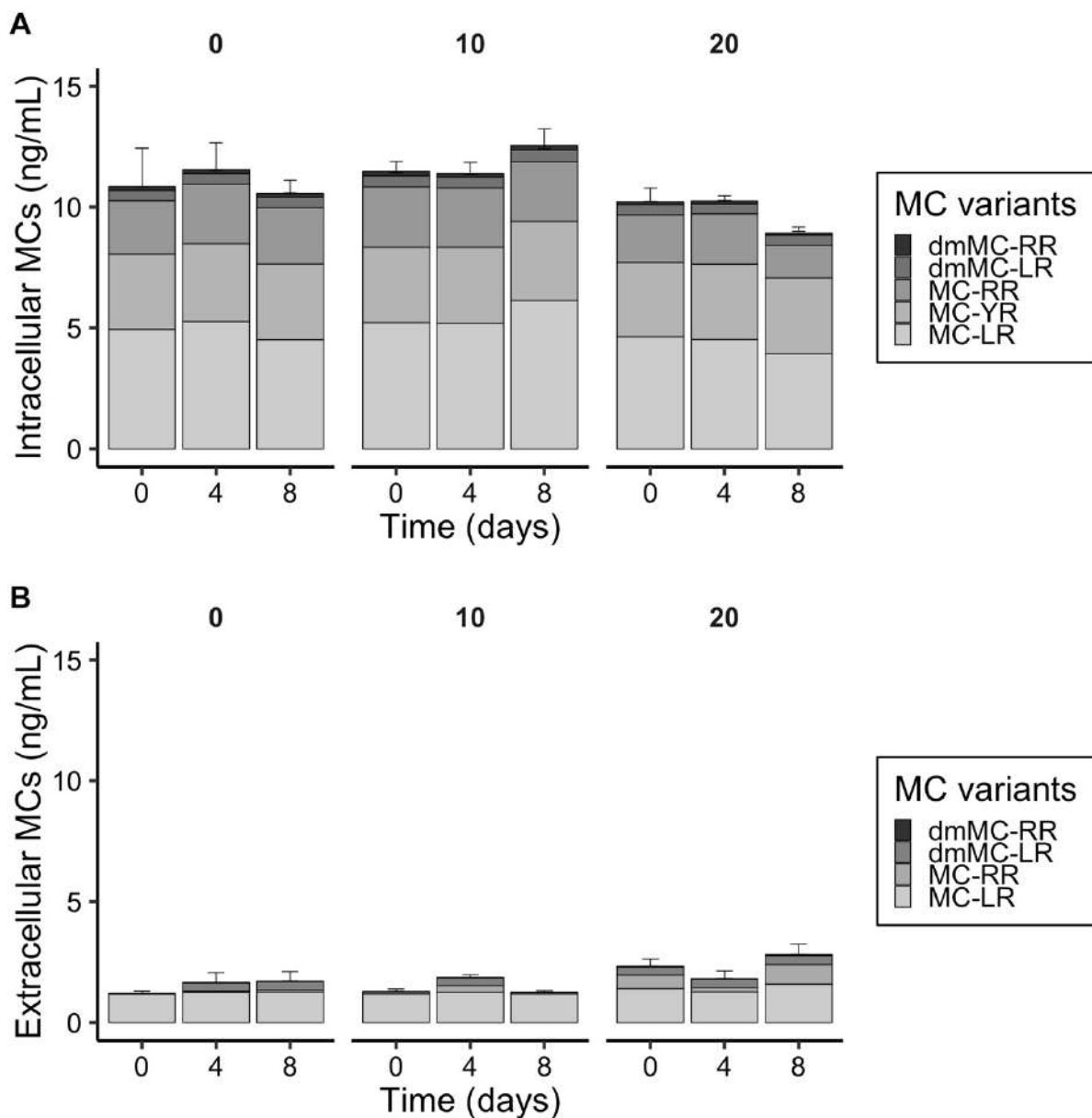


Figure 3: Intracellular (A) and extracellular (B) MC profiles for each salinity condition (means  $\pm$  SD, n = 3). SD were calculated on the total of each MC variant quantified.

In the extracellular MC fraction, only four MC variants were quantified as MC-YR was detected but below the limit of quantification (Figure 3-B). At salinities 0 and 10, the extracellular fraction represented 10-14% of the total amount of MCs and 9-14% over time. At a salinity of 20, this proportion is slightly higher 15-24% (Figure 4). Proportions of extracellular MCs tend to increase with salinity and time (Figure 4).

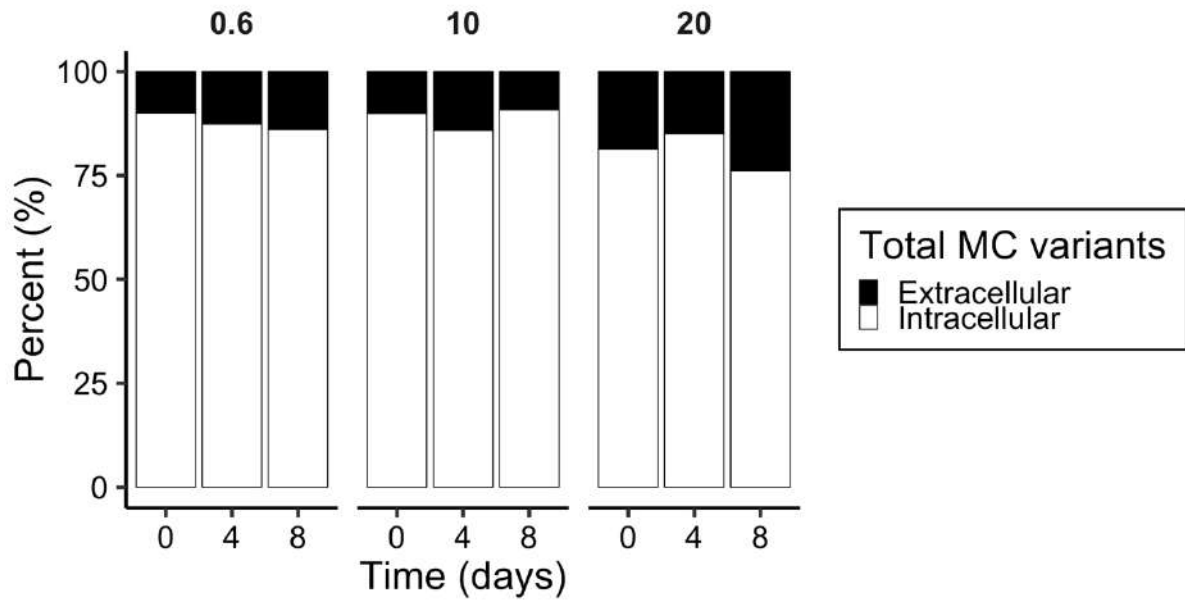


Figure 4: Intracellular and extracellular fractions (%) of total MCs for each salinity condition over time.

## Discussion

A UHPLC-MS/MS method for detection and quantification of MCs and NOD in intracellular and extracellular matrices was developed. For both matrices, the extraction procedures demonstrated excellent recoveries (between 80% and 120%) of 100% methanolic extracts. Recoveries were similar to those found with methanolic (Fayad et al. 2015) or water-methanolic extraction (70-80% MeOH) (Lawton et al. 1994, Mekebri et al. 2009, Kaloudis et al. 2013, Balest et al. 2016, Turner et al. 2018). Method sensitivity was assessed through the determination of LDs and LQs. These limits were in the same range of previous results involving similar protocol of extraction and analysis (Turner et al. 2018). Intra- and interday variabilities were good (RSD < 11%) except for some variants in extracellular matrices at low concentration. Thus, this method is suitable for the analysis of several samples on daily and weekly period. Further investigations should be conducted to determine the long-term stability of the samples and reproducibility of the analysis. This rapid, sensitive and accurate method was successfully applied on natural samples exposed to salt stress experiments. LDs was below the WHO guidelines for MC-LR at 1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (World Health Organization, 2003).

Comparisons of sorbent recoveries with fresh and seawater matrices were conducted for the analysis of dissolved MCs and NOD. The two polymeric Strata-X and HP20 resins were compared for passive sampling while the polymeric sorbent Oasis HLB was compared to the Bond Elute C-18 for solid phase extraction. Our SPE process was developed for the analysis of dissolved MCs in small volumes, e.g., for lab studies. An UPLC-MS/MS method was also implemented and characterized for the detection of intracellular and dissolved MCs and NOD. Finally, our methods were applied to test the effect of salinity on *Microcystis* spp. colonies and MC production by exposing natural bloom to a sudden salt increase.

Contrary to freshwater samples (Gibble and Kudela 2014, Turner et al. 2018), a direct injection of seawater samples in LC-MS devices is not recommended due to high concentration of dissolved salts possibly resulting in interferences during the electrospray ionization process. To overcome this matrix effect on ionization, we implemented a SPE purification step of extracellular MCs. The two main SPE types used for this purpose are C-18 and HLB cartridges (Mashile and Nomngongo 2016). These two sorbents were compared and the salt effect on both the SPE recovery and

the remaining matrix effects were assessed. Our results showed that the C-18 cartridge is less affected by NaCl addition compared to HLB cartridges while having good recoveries (81-139%). Therefore, the C18 SPE appeared to be a suitable extraction step to both remove salts and concentrate extracellular MCs for small volume laboratory experiments. This is of particular importance as the interest for freshwater cyanotoxin transfer across the freshwater-marine continuum (Paerl et al. 2018) is increasing. SPE is non-invasive and an easy-to-use method to extract MCs in culture samples compared to SPATT devices introduced in culture flasks (Zhao et al. 2013). Passive sampling as SPATT technique has been used for the passive sampling of several cyanotoxins such as MCs, nodularins, saxitoxins and anatoxin-a with variable recoveries (Kudela 2011, Wood et al. 2011, 2012, Zhao et al. 2013, Roué et al. 2018). As far as we know only two studies provided technical and quantitative information about MC adsorption and desorption onto SPATT HP-20 resin (Kudela 2011, Zhao et al. 2013). The two studies both reported between 60% and 100% recoveries for MC-LR, dmMC-LR, MC-RR, MC-YR and MC-LA variants with an HP20 sorbent. Zhao et al. (2013) showed that elution with MeOH 75% led to extraction recovery of 90% for MC-LR and dmMC-LR while 100% MeOH decreased the recoveries down to 75-85%. Kudela (2011) even obtained better extraction recoveries (i.e. 95 -115%) for MC-LR and three other variants of different polarities (MC-RR, -YR and -LA) by eluting with MeOH 50%. However, the elution volume had to be adjusted to obtain these recoveries, especially for MC-RR which required a 2.5 higher volume (250 vs. 100 mL of MeOH 50% for 3 g SPATTs). As MC adsorption appeared to reach 100% in less than an hour (Kudela 2011, Zhao et al. 2013), we only quantified the total recovery (i.e., adsorption and desorption during 7 days and elution). In contrast to these studies, here recoveries for HP20 and Strata-X resins were lower, between 17% and 76% depending on the matrix. Surprisingly, recoveries in natural seawater were significantly lower than in Milli-Q water for HP20. Previous finding showed no differences between freshwater and seawater with HP20 sorbents (Kudela 2011). On the opposite, the Strata-X resin was less affected by seawater but showed lower recoveries. Optimization of the extraction procedure should be performed in future studies to improve the total recoveries.

The UHPLC-MS/MS methods were also applied on natural samples subjected to distinct salt conditions. A sudden increase in salinity inhibited the growth of *M. aeruginosa*. A growth inhibition was also linked to a decrease in the maximum quantum efficiency of photosystem II in response to salt stress. Similar inhibition of growth and photosynthetic activity in response to salt stress have previously been reported on isolated strains of *M. aeruginosa* (Tonk et al. 2007, Allakhverdiev and Murata 2008, Ross et al. 2019). The range of salt tolerance of *M. aeruginosa* corresponds to the mesohaline condition (i.e., 0-18) (Georges des Aulnois et al. 2019). Orr et al. (2004) with a similar experiment found a salt tolerance of up to salinity 9.8 with natural samples of *M. aeruginosa*. In agreement with previous findings, a decrease in optical density in the first 48 hours after the two salt treatments suggested that some genotypes of *M. aeruginosa* are more sensitive to salt stress (Tanabe et al. 2018). The MC profile showed that five MC variants were detected and quantified (MC-LR, MC-YR, MC-RR, dmMC-LR and dmMC-RR). Over the eight days of exposure, the intracellular MCs did not vary and remained similar between salinity conditions as previously observed with isolated strains (Georges des Aulnois et al. 2019). Below a salinity of 10, the proportion of extracellular MCs remained stable over time which suggested that cell integrity was conserved contrary to higher salinity where this proportion increased indicating the beginning of a cell lysis (Ross et al. 2019). Unfortunately, the bloom samples were dominated by the morpho-species *M. aeruginosa* so it was not possible to compare the responses of distinct morpho-species in response to salt increase. Indeed, Kruk et al. (2017) found that total biomass and, specific and morphological richness decreased with salinity. Our results suggested that *M. aeruginosa* and MCs could survive and remained several days at salinities corresponding to the estuarine zone of the Pen Mur effluents (Bormans et al. 2019). Evidence of the transfer of cyanotoxins to estuarine zone coupled to laboratory experiments suggesting relative tolerance of *M. aeruginosa* to estuarine salinity conditions. These results pointed out the necessity to characterize analytical methods based on seawater matrices to better assess the risk for human health and the contamination of brackish ecosystems.



# Chapitre 2





## Physiological and metabolic responses of freshwater and brackish strains of *Microcystis aeruginosa* acclimated to a salinity gradient: insight into salt tolerance

Maxime Georges des Aulnois,\*<sup>a</sup> Pauline Roux,<sup>a</sup> Amandine Caruana,<sup>a</sup> Damien Réveillon,<sup>a</sup> Enora Briand,<sup>a</sup> Fabienne Hervé,<sup>a</sup> Véronique Savar,<sup>a</sup> Myriam Bormans<sup>b</sup>  
Zouher Amzil<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Phycotoxins Laboratory, IFREMER, Nantes, France

<sup>b</sup>Univ Rennes, CNRS, ECOBIO - UMR 6553, F-35000 Rennes, France

Citation: Georges des Aulnois, M., Roux, P., Caruana, A., Réveillon, D., Briand, E., Hervé, F., Savar, V., Bormans, M., Amzil, Z., 2019. Physiological and Metabolic Responses of Freshwater and Brackish-Water Strains of *Microcystis aeruginosa* Acclimated to a Salinity Gradient: Insight into Salt Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology* 85, 1–15. <https://doi.org/10.1128/AEM.01614-19>

## Figure list

Figure 1: Cell concentrations over time for both strains at each salinity condition. (A) *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 and (B) *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Circles represent means and errors bars represent the standard deviations from triplicate cultures.

**p: 83**

Figure 2: Mean growth rate obtained during the exponential-growth phase, calculated for each salinity and on each triplicate of culture. (A) *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 and (B) *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. \*, Significantly different to the control condition (salinity, 0.6), p-values < 0.05 (Dunnett test). Black circles represent means and error bars represent the standard deviations. **p: 84**

Figure 3: (A) Microcystin cellular quotas (including MC-LR, MC-LW, MC-LF, MC-LY, and dmMC-LR) over time and salinities for *M. aeruginosa* PCC 7820 and (B) for *M. aeruginosa* PCC 7806 (MC-LR and dmMC-LR). Error bars represent the standard deviations (n = 3).

**p: 86**

Figure 4: (A) Proportions of intracellular and extracellular MCs over time and salinities for *M. aeruginosa* PCC 7820 and (B) for *M. aeruginosa* PCC 7806. **p: 88**

Figure 5: (A) GB and proline cellular quotas over time and salinities for *M. aeruginosa* PCC 7820 and (B) for PCC 7806. Error bars represent the standard deviations (n = 3). A lack of histogram bar means that the amount of compounds was below the detection limit. **p: 89**

Figure 6: PCA score plot obtained from UPLC-HRMS profiles for both strains and all tested salinities. **p: 91**

Figure 7: Details about the VIPs detected for PCC 7820 (A) and PCC 7806 (B). For each VIP, the VIP score, the ratio m/z, the retention time on HPLC column, the putative identification (ID), and the relative cellular quotas as a heatmap representation are presented. NA, compound not identified, A green color represented a relative lower cellular quota of a compound per sample. Levels 1 and 2 refer to Sumner et al. (2007) and provide a confidence level for the ID of the VIP. **p: 92**

## Introduction

Due to anthropogenic activities and climate change, many freshwater ecosystems are expected to experience an increase in salinity (S) (O'Neil et al. 2012). This phenomenon, exacerbated by drought, hydrologic alterations, land use and sea level rise (Nielsen et al. 2003, Verspagen et al. 2006, White and Kaplan 2017, Huisman et al. 2018), is predicted to favor the development and expansion of freshwater cyanobacteria versus other freshwater phytoplankton (Paerl and Huisman 2009, Paerl 2014). As many freshwater cyanobacteria produce a variety of toxins affecting both animal and human health (Funari et al. 2017), this expansion is particularly problematic, especially concerning the genus *Microcystis*.

Indeed, *Microcystis* sp. is currently recognized as one of the most pervasive toxic cyanobacteria in freshwater ecosystems, as blooms have been reported on all continents but Antarctica (Harke et al. 2016). This global occurrence is explained by high genomic and phenotypic plasticity (Humbert et al. 2013, Harke et al. 2016). Therefore, the biotic and abiotic factors influencing blooms of toxic *Microcystis* sp. have been well-studied in freshwater ecosystems (Harke et al. 2016).

However, the influence of salinity on their development was overlooked despite the observation of *Microcystis* sp. and the hepatotoxic MCs in many coastal areas (Preece et al. 2017). In most reported studies, the records of *Microcystis* sp. in coastal areas were due to the transfer of a *Microcystis* sp. bloom across the freshwater-to-marine continuum (Robson and Hamilton 2003, Takahashi et al. 2014, Preece et al. 2015, Lehman et al. 2017, Martínez de la Escalera et al. 2017, Bormans et al. 2019). This transfer to high salinity conditions resulted in cell lysis and the release of soluble MCs in the water (Paerl et al. 2018, Bormans et al. 2019, Ross et al. 2019). Such occurrences of *Microcystis* sp. in coastal areas resulted ultimately in MC accumulation in marine organisms and represented a potential new foodborne route of exposure to human health.

As a result, most experimental studies conducted on the impact of salinity on *Microcystis* sp. focused on salt stress experiments (Otsuka et al. 1999, Orr et al. 2004, Bartolomé et al. 2009, Black et al. 2011, Martín-Luna et al. 2015, Ross et al. 2019), especially on *Microcystis aeruginosa* as the main bloom-forming species among this genus. Those studies defined *M. aeruginosa* salinity tolerance between freshwater ecosystems to the upper limit of the oligohaline areas ( $5 < S < 18$ ) (Reed and Walsby

1985, Otsuka et al. 1999, Mitsch and Gosselink 2000, Orr et al. 2004, Bartolomé et al. 2009, Zhang et al. 2013, Martín-Luna et al. 2015).

However, salt stress experiments did not allow to determine the potential of *Microcystis* sp. to form blooms in brackish waters. Less frequently, blooms of *Microcystis* sp. have also been reported in brackish waters (Preece et al. 2017, Tanabe et al. 2018). The first experimental study on the physiology of *M. aeruginosa* PCC 7806 acclimated to distinct salinities (0 to 17.5) was conducted by Tonk et al. (2007). This study concluded that growth and MC cellular quota of *M. aeruginosa* decreased above a salinity of 10. In contrast, after acclimation of isolated strains of *M. aeruginosa*, Mazur Marzec et al. (2010) did not find any effect of salinity (0 to 14) on the total biomass of acclimated *M. aeruginosa* isolates after 3 weeks of culture in controlled conditions, but they also observed a decrease in MC cellular quotas above a salinity of 7.

The salinity tolerance of cyanobacteria is mainly conditioned by the ability of cells to regulate their internal osmosis through the regulation of the intracellular ionic balance and the accumulation of compatible solutes (Hagemann 2011). So far, several compounds were clearly identified as compatible solutes in cyanobacteria, namely, sucrose, trehalose, glucosylglycerol, glucosylglycerate, glycine betaine (GB), glutamate betaine and proline (Hagemann 2011). In addition, dimethylsulfoniopropionate (DMSP) has been described as a putative compatible solute in certain microalgae (Stefels 2000, Oren 2007). DMSP or its by-product DMS were more rarely detected in cyanobacteria. As far as we know, DMSP was reported in the marine species *Microcoleus lyngbyaceus* and *M. chthonoplastes*, *Lyngbya aestuarii*, *Trichodesmium erythraeum*; the brackish water genus *Synechocystis* sp.; and the freshwater species *Aphanizomenon flos-aquae* (Oren 2007, Bucciarelli et al. 2013, Steinke et al. 2018). In the genus *Microcystis*, the glucosylglycerol was the first-identified compatible solute in *M. firma* (Hagemann et al. 1987).

Concerning *M. aeruginosa* PCC 7806 strain specifically, Kolman et al. (2012) identified the compatible solute sucrose as the main metabolite explaining its salt tolerance, and Sandrini et al. (2015b) showed that this strain and its non MC-producing mutant were less sensitive to cationic stress than other freshwater isolates. The strain *M. aeruginosa* PCC 7806 was indeed isolated in brackish water and possesses genes involved in osmotic stress response, which are not present in the other freshwater isolates (Kolman et al. 2012, Sandrini et al. 2015b). Recently, Tanabe et al. (2018)

confirmed that the salt tolerance of *Microcystis* sp. strains isolated from brackish water may be attributable to the presence of sucrose genes that were absent in freshwater isolates.

Altogether, those studies led us to hypothesize that discrepancies in salinity tolerance between strains isolated from freshwater and brackish water could be explained by distinct physiological mechanisms involving the synthesis of compatible solutes. Based on strains acclimated to different salinities, this study used a quantitative analysis of MCs and potential compatible solutes and a nontargeted metabolomic approach to provide new insights about the potential mechanisms involved in salt tolerance to better understand the occurrence of *M. aeruginosa* in brackish waters.

## Materials and methods

### Organisms and culture conditions

Two axenic and toxic *M. aeruginosa* strains, available from the Pasteur Culture collection of Cyanobacteria (PCC; <https://webext.pasteur.fr/cyanobacteria/>), were studied, namely, the PCC 7820 and PCC 7806 strains. Both strains were isolated from contrasting environment, namely, the freshwater lake Balgaries (Scotland) and the brackish water of Braakman reservoir (Netherlands), for PCC 7820 and PCC 7806, respectively. Cells were routinely grown in BG11<sub>0</sub><sup>\*</sup>, which is a BG11<sub>0</sub> medium (Rippka et al. 1979) supplemented with NaNO<sub>3</sub> (2 mM) and NaHCO<sub>3</sub> (10 mM), at constant temperature of 22 ± 0.6°C under a 12:12-h light:dark cycle using cool-white fluorescent tubes (Philips) with 35 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> illumination. Artificial seawater was made with the addition of NaCl (450 mM), KCl (10 mM), CaCl<sub>2</sub> (9 mM), MgCl<sub>2</sub> (6H<sub>2</sub>O) (30mM) and MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O) (16mM) before nutrient enrichment to achieve the BG11<sub>0</sub> + salts<sup>\*</sup> preparation (Bail and Charrier 2013). Hence, the different salinities used in this study were obtained by mixing both medium BG11<sub>0</sub><sup>\*</sup> and salt enriched BG11<sub>0</sub> + salts<sup>\*</sup>. Salinity was checked using a conductivity meter Cond 3110 Set 1 (WTW).

### Acclimation

Before starting the experiment, strains were progressively acclimated to different salinities by transferring the culture after 20 days of growth (i.e., during the exponential-growth phase) into fresh medium of higher salinity. After each new transfer, the salinity was increased by 2 units. This process was repeated until reaching the likely maximal salinity tolerance of the two strains. At the end of the acclimation process, cultures were maintained between 25 and 50 generations at each salinity. At least three constant growth rates confirmed the acclimation of the strains, in agreement with MacIntyre and Cullen (2005). Hence, *M. aeruginosa* PCC 7820 and PCC 7806 were acclimated respectively to 3 salinities (3.7, 6.4 and 7.5) and 7 salinities (3.6, 6.0, 8.4, 10.7, 12.2, 14.8 and 16.9), respectively, in addition to the control culture condition in BG11<sub>0</sub><sup>\*</sup> (S, 0.6).

## Experiment

Once acclimated to each salinity, both strains were maintained in batch culture and transferred to new fresh medium during exponential-growth phase. Therefore, triplicate batch cultures in 300-mL flasks were inoculated at  $1 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup> with exponential growing cells and maintained under temperature and light conditions described above for 30 days.

## Growth rate

Cell concentration was monitored every 2 days. Samples (2 mL) were fixed with glutaraldehyde (0.1%) (Sigma-Aldrich) and stored at -80°C until analyzed on an Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson) (Marie et al. 2005). Growth rate ( $\mu$ ) was calculated during exponential growth using the least-squares regression method (Wood et al. 2005). Furthermore, the forward scatter fluorescence (FSC) was used to compare the mean relative cell size between salinities on sampling day 14 only (i.e., during mid-exponential-growth phase).

## Maximum photochemical efficiency of photosystem II

Maximum quantum efficiency of the photosystem II ( $F_V/F_M$ ) was measured after 4, 10, 14 and 24 days using an Aquapen-C 100 fluorimeter (Photon Systems Instruments). Before fluorescence analyses, samples (3 mL) were incubated in the dark for 15 min.  $F_V/F_M$  was measured (455 nm, no DCMU addition and the basal fluorescence was not subtracted) every day using an Aquapen-C 100 fluorimeter (Photon Systems Instruments) (Ogawa et al. 2017).

## Microcystin analyses

To determine the intra- and extracellular toxin contents after 4, 10, 14 and 24 days, samples (15 mL) were harvested and centrifuged at 4248 g for 15 min at 4°C. The supernatant was directly stored at -80°C and the remaining cell pellet was quenched in liquid nitrogen and stored at -80°C until extraction. For the extraction of intracellular toxins, 250 mg of glass beads (0.15 - 0.25 mm, VWR) and 1 mL of MeOH (Honeywell) were added to the pellet before mechanical grinding using a mixer mill (MM400; Retsch) during 30 min at 30 Hz. Tubes were centrifuged at 13000 g and supernatants were filtered through 0.2  $\mu$ m filter (Nanosep MF; Pall). Extracellular MCs were

extracted by solid-phase extraction (200 mg; Bond Elut C18 cartridges; Agilent) to remove salts and concentrate the MCs. After conditioning with 3 mL of MeOH and 3 mL of Milli-Q water, 15 mL of cell-free medium were loaded, rinsed with 2.4 mL of MeOH/Milli-Q water (5:95, vol/vol) and eluted with 4 mL of MeOH. Subsequently, intracellular and extracellular MC analyses were performed by ultrafast liquid chromatography (Nexera, Shimadzu), coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (5500 QTrap; ABSciex) equipped with a TurboV electrospray ionization source (LC-MS/MS). The analytical chromatographic column was a Kinetex XB C18 (100 x 2.1 mm; 2.6  $\mu$ m; Phenomenex) equipped with a suited guard column. The column and sample temperatures were 25°C and 4°C. The flow rate was 0.3 mL min<sup>-1</sup> and the volume of injection 5  $\mu$ L. The binary gradient consisted of water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1% formic acid (vol/vol). The elution gradient was: 30 to 80% B (0 to 5 min), 80% B (5 to 6 min), and 30% B (6.5 to 10.5 min). MS/MS detection was performed in positive ionization mode using multiple reaction monitoring (MRM) with two transitions per toxin (see Table S1 in the supplemental material). Nine certified MC standards (Novakits) were used to quantify MC content in both intracellular and extracellular fractions, using an external 6-point calibration curve. Acquisition and data processing were performed using Analyst 1.6.3 (ABSciex) software. Total recoveries (i.e., combining extraction recovery and remaining matrix effect when spiking before extraction) were evaluated for intracellular and extracellular MC quantifications (see Table S3 and S4 in the supplemental material). Intracellular MC recoveries were higher than 93%, and extracellular MC recoveries were similar between a medium with and without salt (with differences of 3 to 9%) (Tables S3 and S4). Therefore, no corrective factor was applied. The net production rate of each MC variant was calculated according to the method described by Orr et al. (2018) by application of first-order rate kinetics.



### DMSP, GB and proline analyses

DMSP, GB and proline quantifications were measured by LC-MS/MS on intracellular cell extracts prepared for toxin analysis on a LC System (model UFLC XR, Shimadzu) coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (4000 QTrap; ABSciex). Chromatography was performed with a Hypersil GOLD HILIC column (150 × 3.0 mm; 3 μm; ThermoScientific) with a suited guard column, based on Curson et al. (2018). The binary gradient consisted of water-acetonitril (90:10; vol/vol) containing 4.5 mM ammonium formate (A) and water (5:95; vol/vol) containing 5 mM ammonium formate (B). The flow rate was 0.4 mL min<sup>-1</sup> and injection volume was 5 μL. The column and sample temperatures were 30°C and 4°C, respectively. The elution gradient was 90% B (0 to 1 min), 90 to 45% B (1 to 8 min), 45% B (8 to 12 min), 90% B (12 to 15 min). The LC-MS/MS system was used in positive ionization mode and MRM, with two transitions per compounds (see Table S2 in the supplemental material). Compounds were quantified using an external 5-point calibration curves of standards (Sigma Aldrich) solubilized in methanol, with concentrations from 50 nM to 5000 nM. Acquisition and data processing were performed using Analyst 1.6.3 (ABSciex) software. Total extraction recoveries were evaluated between strains and salt conditions (see Table S5 in the supplemental material). As total recoveries did not vary more than 20% between control condition (S, 0.6) and maximum conditions for both strains (S, 7.5 and 16.9), the quantification results were not corrected (Table S5).

## Metabolomic analysis

### Data acquisition

Metabolomic analysis was only conducted on intracellular extracts prepared for toxin analysis at day 14 (i.e., during mid-exponential growth phase). Metabolomic profiles were acquired by Ultra-performance Liquid Chromatography – High Resolution Mass Spectrometry (UPLC-HRMS). The instrumentation consisted of a UHPLC system (1290 Infinity II; Agilent) coupled to a quadrupole-time of flight mass spectrometer (QTOF 6550; Agilent) equipped with a Dual Jet Stream electrospray ionization interface (ESI). Analyses were carried out using an analytical core-shell Phenyl-hexyl column (150 x 2.1 mm; 1.7  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex) with a suited guard column. The column and sample temperatures were 40°C and 4°C, respectively. The flow rate was 0.5 mL min<sup>-1</sup>, and the injection volume was 5  $\mu\text{L}$ . Mobile phases consisted of water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1 formic acid (vol/vol). The following elution gradient was used: 5% B (0 to 2 min), 5 to 100% B (2 to 10 min), 100% B (10 to 14 min), 5% B (14 to 18 min). Mass spectra were recorded in full-scan mode from  $m/z$  100 to 1700 (500 ms scan time) at a mass resolving power of 25000 full width at half-maximum (fwhm;  $m/z$ , 922.0099) and an acquisition rate of 2 spectra.s<sup>-1</sup>. A calibration-check was performed continuously over the entire run time using reference masses  $m/z$  121.0509 (purine) and  $m/z$  922.0099 (hexakis phosphazene). Samples were randomly injected. Qualitative control samples (QC) were prepared and injected 10 times at the beginning of the batch sequence and then every 4 samples (including blank). Blanks were prepared as cell pellets (i.e., MeOH and glass beads in a polypropylene tube). To identify specific compounds of interest, tandem mass spectrometry analyses were carried out at an acquisition rate of 5 spectra.s<sup>-1</sup> for MS ( $m/z$  100 – 1700; 200 ms scan time) and 15 spectra s<sup>-1</sup> for MS/MS ( $m/z$  50 – 1700; 66.7 ms scan time). Collision-induced dissociation was performed on the 3 most intense ions above an absolute threshold of 2000 counts. A collision energy value proportional to the  $m/z$  of the selected precursor ion, an isolation window of 1.3 amu and a dynamic exclusion time of 30 s were used. Annotation was conducted firstly with exact masses and freely available databases (e.g., HMDB, LipidMaps, Metlin, KEGG, and CEU Mass Mediator <http://ceumass.eps.uspceu.es/>), Gil-de-la-Fuente et al. 2019)), then with fragmentation patterns, and using a molecular networking approach

(<https://gnps.ucsd.edu/>, (Wang et al. (2016))). Acquisition and data processing were performed using Mass Hunter Workstation softwares (version B.06.01 and B.07, Agilent).

### Data pre-processing and filtering

LC-MS raw data (.d) were converted to .mzXML format using MS-Convert (Proteowizard 3.0) (Chambers et al. 2012) and processed with the XCMS package (Smith et al. 2006) under R 3.2.3 environment. Peak picking was performed with the “centWave” algorithm, retention time correction with the “obiwarp” algorithm, peak grouping with “bw” = 5 and “mzwid” = 0.015 and peak filling with the default parameters.

Three successive filtering steps using in-house scripts on R were applied to remove (i) variables with low intensities (exclusion of variables with S/N <10 compared to a blank), (ii) signals showing high variability (exclusion of variables with a coefficient of variation >20% in QC samples) and (iii) to suppress redundancy (exclusion of all variables but the most intense one when the coefficient of autocorrelation >80% at the same retention time). Pre-processing led to 298 variables, and 83 variables remained after the filtrations on which statistical analyses were performed.

### Statistical analyses

Statistical analyses of the data were performed using R software (R core team). Data are presented as mean and standard deviation (SD). After checking the homoscedasticity and normal distribution of residuals using Bartlett and Shapiro-Wilk tests, the effect of salinity on growth was tested using one-way analysis of variance (ANOVA) and the *post hoc* Dunnett’s test was applied to check a difference between growth rates (in comparison to the control). Otherwise, if the hypothesis of normal distribution and homoscedasticity of residuals were not verified, a non-parametric Kruskal-Wallis test was performed. The impact of salinity and time on the individual MC congener quotas were checked by performing two-way ANOVA. Two-way ANOVA on repeated measures with time as the within subjects factor and the salinity as the between subjects factor were conducted. The Pearson’s correlation coefficient was calculated between growth rates and net production rates of MCs. For metabolomics, multivariate statistical analyses were performed using MetaboAnalyst 4.0. (Chong et al. 2018). First, as different amount of cells were extracted depending on salinity

conditions, the data were normalized to cell concentration as a sample-specific normalization. Then, data were log transformed and Pareto-scaled based on the recommendation of van den Berg et al. (2006). Principal-component analysis (PCA) and partial least-square discriminant analysis (PLS-DA) were used. The PLS-DA models were validated using a permutation test (measuring group separation distance using the sum-of-squares-between/sum-of-squares-within ratio; 1000 class-assignment permutations, p-value < 0.007) and allowed us to highlight discriminant metabolites using the variable importance in projection (VIP) score commonly used for biomarker selection, assuming that a VIP score >1 corresponded to a biomarker.

Metabolomics data were deposited on DATAREF (<https://doi.org/10.12770/414f1f4c-5f1c-4e98-a187-c66216393d6e>).

# Results

## Growth and salinity tolerance at contrasted salinities

After acclimation, *M. aeruginosa* PCC 7820 displayed positive growth at salinities between 0.6 and 7.5, while *M. aeruginosa* PCC 7806 grew over a wider range of salinities up to 16.9. Only at the lowest salinity (S, 0.6), the growth of both strains reached a stationary phase after an exponential-growth phase (4 to 28 days for PCC 7820; 4 to 24 days for PCC 7806) (Figure 1-AB). During the exponential-growth phase at salinity control, the cell concentration increased from  $3.9 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup> ( $\pm 3.5 \times 10^4$ ) to  $5.8 \times 10^7$  cells.mL<sup>-1</sup> ( $\pm 1.3 \times 10^6$ ) for PCC 7820 and  $2.2 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup> ( $\pm 9.7 \times 10^4$ ) to  $4.7 \times 10^7$  cells.mL<sup>-1</sup> ( $\pm 4.1 \times 10^6$ ) for PCC 7820. The cell concentrations of both strains increased more slowly than the control at higher salinities (Figure 1-AB).

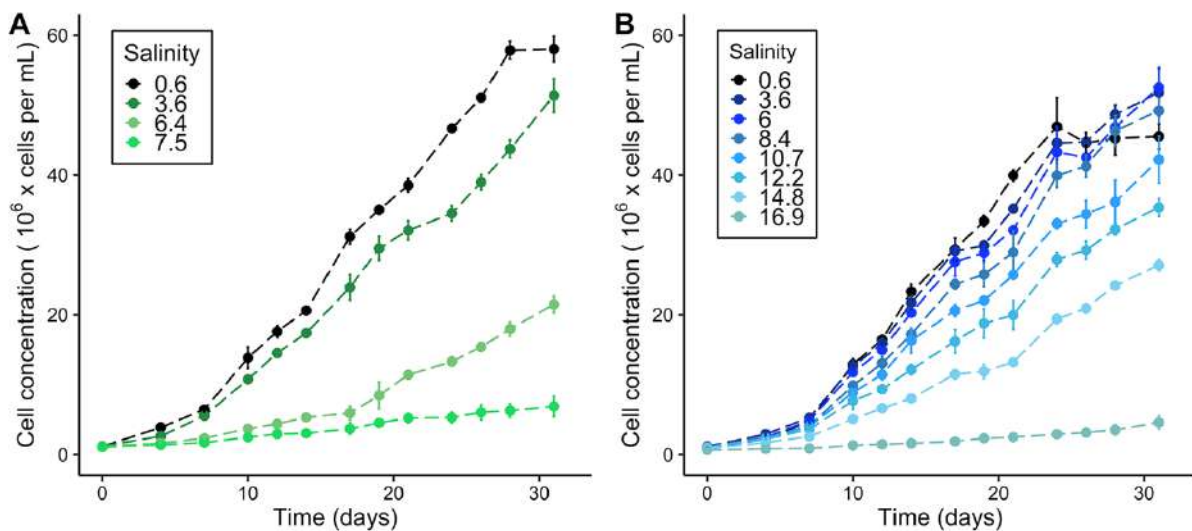


Figure 1: Cell concentrations over time for both strains at each salinity condition. (A) *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 and (B) *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Circles represent means and errors bars represent the standard deviations from triplicate cultures.

Indeed, the growth rates of *M. aeruginosa* PCC 7820 and PCC 7806 (Figure 2) differed significantly with increasing salinities (ANOVA, PCC 7820: p-value < 0.05; PCC 7806: p-value < 0.05). For the strain *M. aeruginosa* PCC 7820, no statistical difference was observed between control salinity at 0.6 and 3.7, but a significant decrease with control was obtained at 6.4 and 7.5. Between salinity 0.6 ( $\mu = 0.37 \pm 0.03 \text{ day}^{-1}$ ) and salinity 7.5 ( $\mu = 0.16 \pm 0.03 \text{ day}^{-1}$ ), the growth rate of this strain differed by 2.3. No significant statistical difference was observed between growth rates of *M. aeruginosa* PCC 7806 up to salinity 8.4. At a salinity of 10.7 and at higher salinities, the growth rate of *M. aeruginosa* was significantly lower than that of the control (Dunnett's test, p-values < 0.05). The growth rate of *M. aeruginosa* PCC 7806 differed by 2.6 between the control condition ( $\mu = 0.42 \pm 0.02 \text{ day}^{-1}$ ) and the highest salinity, namely, 16.9 ( $\mu = 0.16 \pm 0.02 \text{ day}^{-1}$ ) (Figure 2).

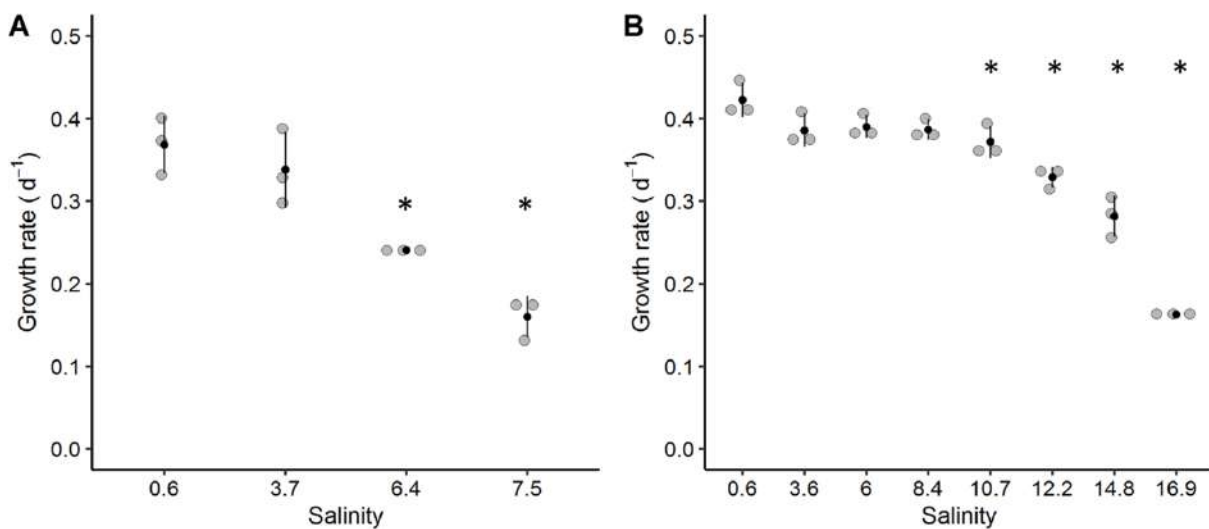


Figure 2: Mean growth rate obtained during the exponential-growth phase, calculated for each salinity and on each triplicate of culture. (A) *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 and (B) *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. \*, Significantly different to the control condition (salinity, 0.6), p-values < 0.05 (Dunnett test). Black circles represent means and error bars represent the standard deviations.

Although salinity affected the growth rate of both strains, it did not affect the maximum quantum yield of the photosystem II. The  $F_V/F_M$  values recorded from cultures of *M. aeruginosa* PCC 7820 remained in a restricted range between 0.43 and 0.55 for all salinity conditions and sampling times. The values for *M. aeruginosa* PCC 7806 were also stable at each salinity between 0.29 and 0.59 (see Figure S1 in the supplemental material). The lowest values of  $F_V/F_M$  were recorded for both strains at the lowest salinity (S, 0.6).

A comparison of the relative cell size at day 14 expressed as FSC fluorescence intensity was conducted. For the strain PCC 7820, the FSC value was  $6.1 \times 10^5 \pm 0.2 \times 10^5$  at salinity control and  $4.8 \times 10^5 \pm 0.1 \times 10^5$  at the highest salinity of 7.5. Similarly, for the strain PCC 7806, the FSC value was  $8.3 \times 10^5 \pm 0.4 \times 10^5$  at salinity control and  $3.7 \times 10^5 \pm 0.04 \times 10^5$  at the highest salinity of 16.9. Relative cell size on day 14 at each salinity significantly decreased compared with the control for both strains, with smaller cells at higher salinities (ANOVA; Dunnett's test; p-values < 0.05) (see Figure S2 in the supplemental material).

### Toxin profiles and toxin production of *Microcystis aeruginosa*

Five different MC variants were quantified in *M. aeruginosa* PCC 7820 (MC-LR, MC-LY, MC-LW, MC-LF and dmMC-LR) (Figure 3-A) and two variants in PCC 7806 (MC-LR and dmMC-LR) (Figure 3-B). Cellular quotas for each MC variant of *M. aeruginosa* PCC 7820 increased during the exponential growth at low and intermediate salinities (S, 0.6 to 6.4), whereas this pattern was not observed at the highest salinity (S, 7.5) where MC quotas decreased over time (Figure 3-A).

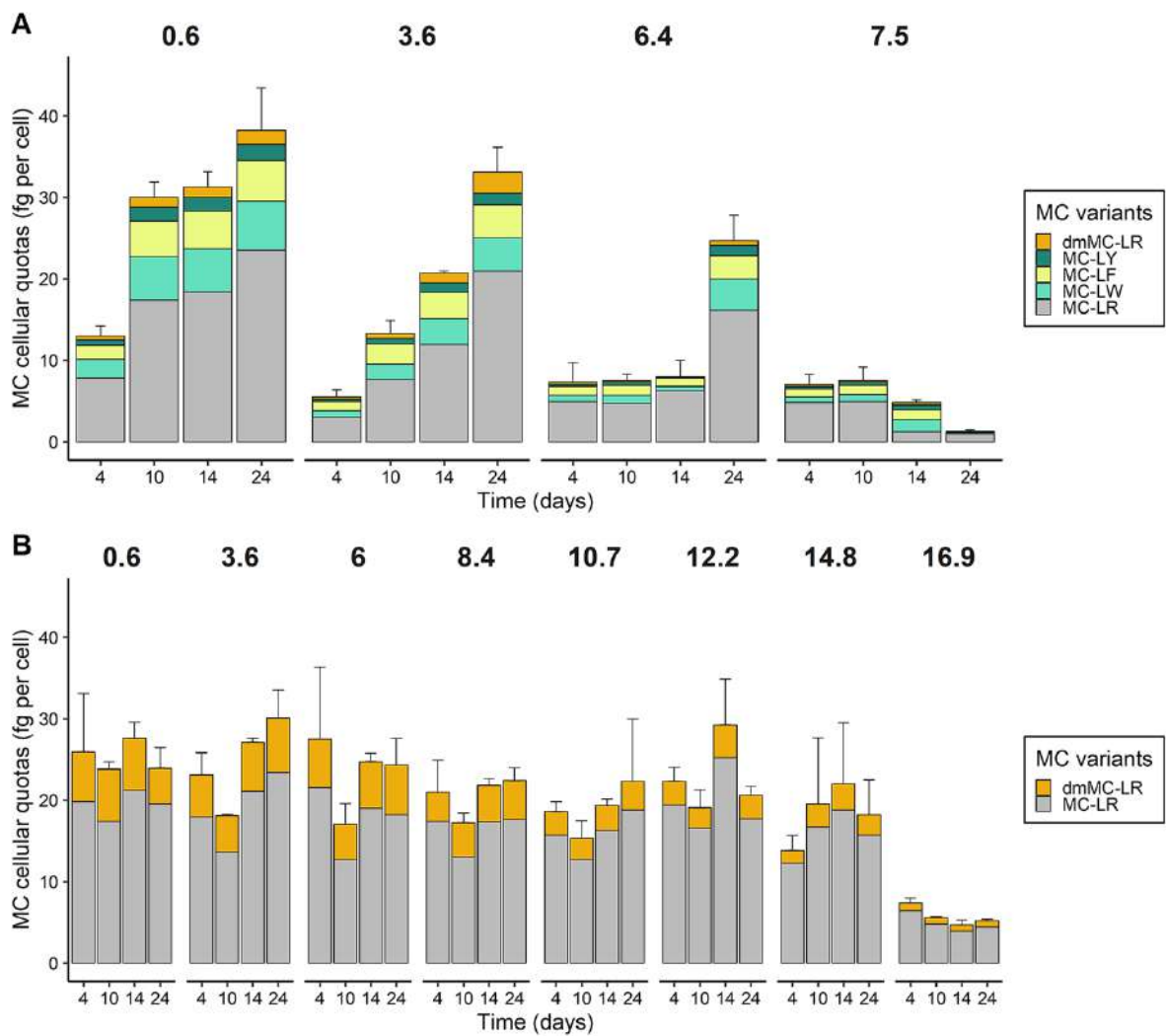


Figure 3: **(A)** Microcystin cellular quotas (including MC-LR, MC-LW, MC-LF, MC-LY, and dmMC-LR) over time and salinities for *M. aeruginosa* PCC 7820 and **(B)** for *M. aeruginosa* PCC 7806 (MC-LR and dmMC-LR). Error bars represent the standard deviations (n = 3).



The MC-LR and dmMC-LR cellular quotas of *M. aeruginosa* PCC 7806 remained globally constant during the entire monitoring period at all salinities except at the highest one (S, 16.9). On average for all sampling days at salinity 16.9, the MC-LR and dmMC-LR quotas differed by 2.3 and 2.5, respectively, compared with the control (Figure 3-B). For both strains, MC cellular quotas were significantly affected by salinity, time and their interaction (two-way ANOVA: p-values < 0.05). The proportion of each variant in total MCs for PCC 7820 changed between 1.3- and 2.7-fold over time and as salinity increased. The same range was obtained in PCC 7806 where MC-LR and dmMC-LR proportions changed by 1.2 and 2.5-fold (data not shown).

Extracellular MCs for *M. aeruginosa* PCC 7820 cultures on day 4 represented 11% ( $\pm 1.3\%$ ) of the total MC quantified for the control salinity but increased sharply with salinity (44, 48 and 65% at salinity 3.6, 6.4 and 7.5) (Figure 4-A). For all salinities but 7.5, the proportion of total extracellular MC variants decreased with time and the accumulation of biomass. At salinities 0.6, 3.6 and 6.4, this proportion was reduced respectively to 1.6% ( $\pm 0.3\%$ ), 3.1% ( $\pm 1.1\%$ ), and 11% ( $\pm 1.7\%$ ), respectively, by day 24. However, at salinity 7.5, an increase in the proportion of extracellular MC variants occurred between days 14 and 24, from 42% ( $\pm 3.1\%$ ) to 86% ( $\pm 2.3\%$ ) (Figure 4-A). For *M. aeruginosa* PCC 7806, the proportion of MC retrieved in the culture medium was maximum 4 days after the inoculation between 16% ( $\pm 2.7\%$ ) and 68% ( $\pm 2.3\%$ ). This proportion decreased over time at all salinities (Figure 4-B).

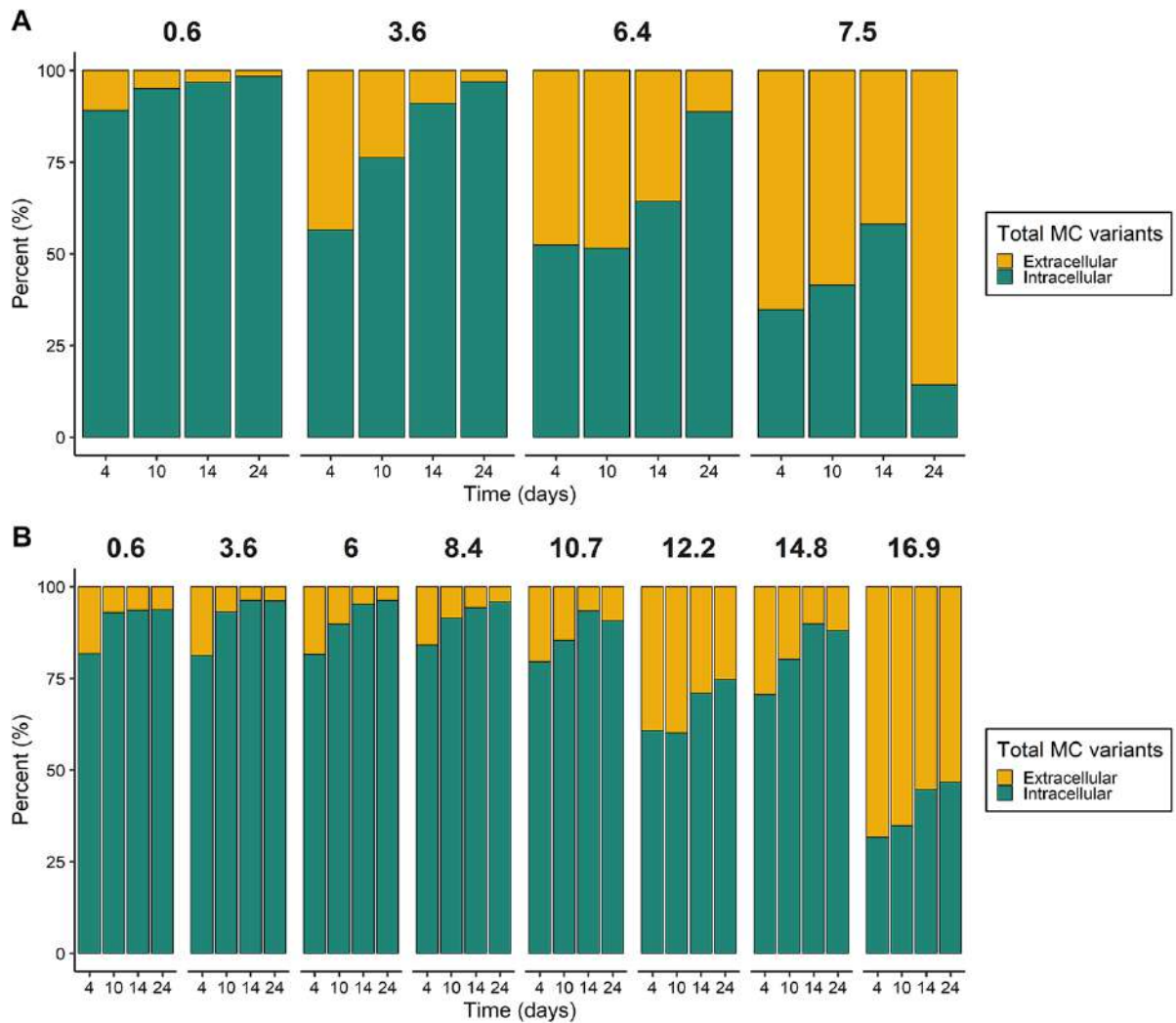


Figure 4: (A) Proportions of intracellular and extracellular MCs over time and salinities for *M. aeruginosa* PCC 7820 and (B) for *M. aeruginosa* PCC 7806.

The net production rate of total MCs in both strains decreased significantly at higher salinities (PCC 7820: ANOVA one-way: p-value < 0.05, PCC 7806: Kruskal-Wallis test p-value < 0.05, data not shown). For both strains and salinities, growth rate and net MC production rate were linearly correlated according to Pearson correlation test (PCC 7820 p-value < 0.05, PCC 7806 p-value < 0.05, data not shown).

### DMSP, GB and proline cellular concentrations

In all of the samples, the quantity of DMSP was below the detection limit (50 nM). When detected, GB and proline were quantified in both strains of *M. aeruginosa* (Figure 5). In *M. aeruginosa* PCC 7820, GB cellular quota increased with the salinity but decreased over time (Figure 5-A). At each sampling time, GB cellular quotas were higher at salinity 7.5 than the control concentrations, ranging from  $1.2 \times 10^{-3}$  to  $4.4 \times 10^{-3}$  fmol.cell<sup>-1</sup> and  $2.0 \times 10^{-4}$  to  $2.4 \times 10^{-3}$  fmol.cell<sup>-1</sup>, respectively (Figure 5-A). Similar results were obtained for PCC 7806 but with lower GB concentrations (Figure 5-B). At the salinity control and 3.6, the cellular quota of GB was below the detection limit (50 nM), while GB was quantified at salinities between 10.7 and 16.9 (Figure 5-B).

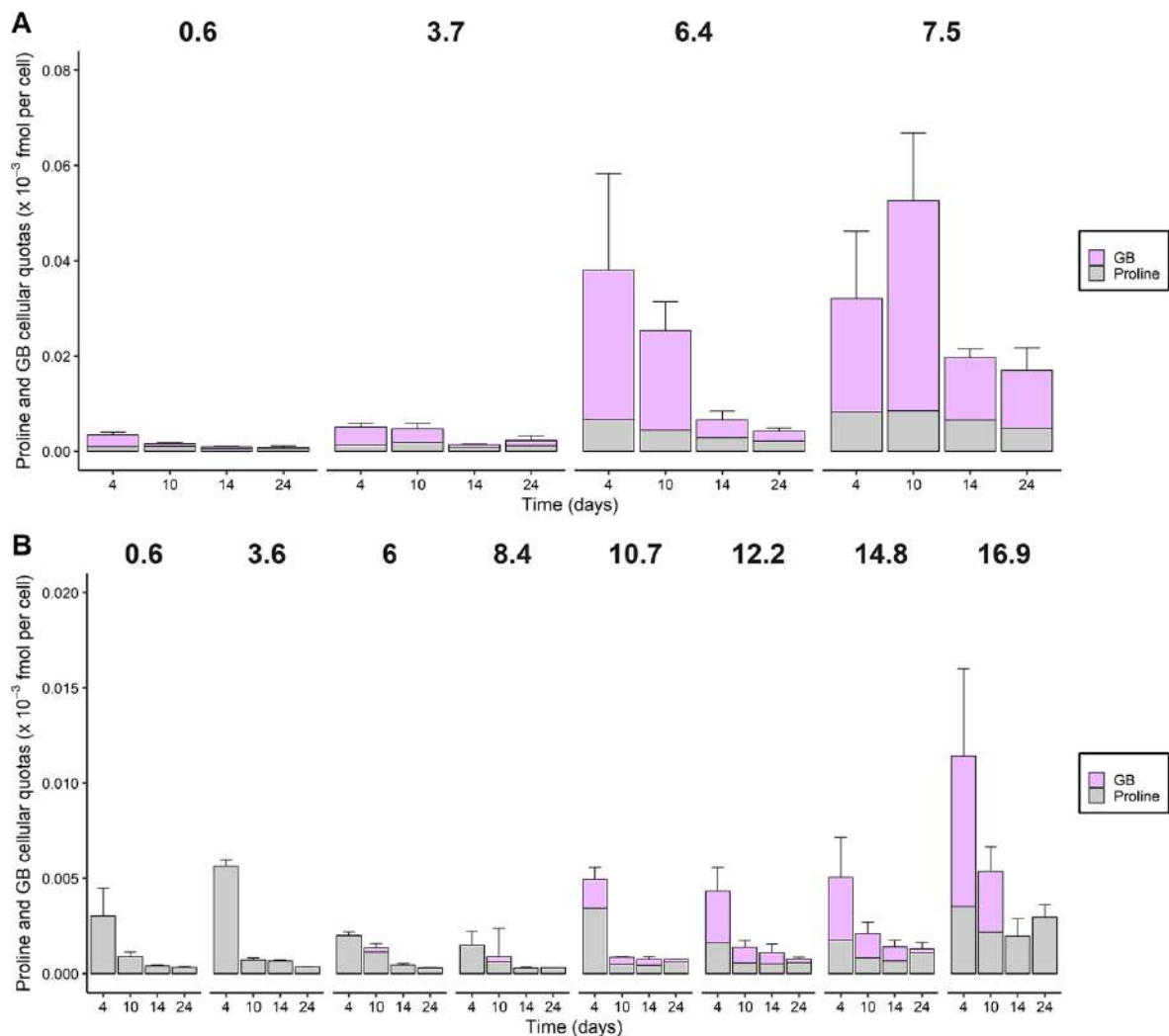


Figure 5: (A) GB and proline cellular quotas over time and salinities for *M. aeruginosa* PCC 7820 and (B) for PCC 7806. Error bars represent the standard deviations (n = 3). A lack of histogram bar means that the amount of compounds was below the detection limit.

On average, over the salinities and sampling times, the cellular quota of proline in *M. aeruginosa* PCC 7820 was three times greater than for the strain *M. aeruginosa* PCC 7806 (Figure 5-AB). For both strains, cellular quotas of proline increased with salinity, but this pattern appeared to be more intense in *M. aeruginosa* PCC 7820 (Figure 5A).

### Metabolomic analyses

Metabolomic analyses were performed to evaluate the impact of an increase in salinity on the metabolomes of *M. aeruginosa* PCC 7820 and PCC 7806 and to highlight putative biomarkers of salinity acclimation for both strains. Based on a matrix of 83 compounds after data filtrations, the resulting PCA score plot was represented in Figure 6 and the total variance due to the two main axes accounted for 81.3%. The first principal component represented the distinction between the two strains and illustrated the intraspecific variability of *M. aeruginosa* (59.3%), while the second (22%) allowed for a clustering depending on salinity (Figure 6). Hence, for each strain, after an acclimation period, the salinity of the medium induced an evolution of the metabolome of the two *M. aeruginosa* strains. For each strain, two groups of salinity were noted. For *M. aeruginosa* PCC 7806, only the highest salinity (i.e., S,16.9) formed a distinct cluster, while the two lowest and the two highest salinities were separately grouped for *M. aeruginosa* PCC 7820.

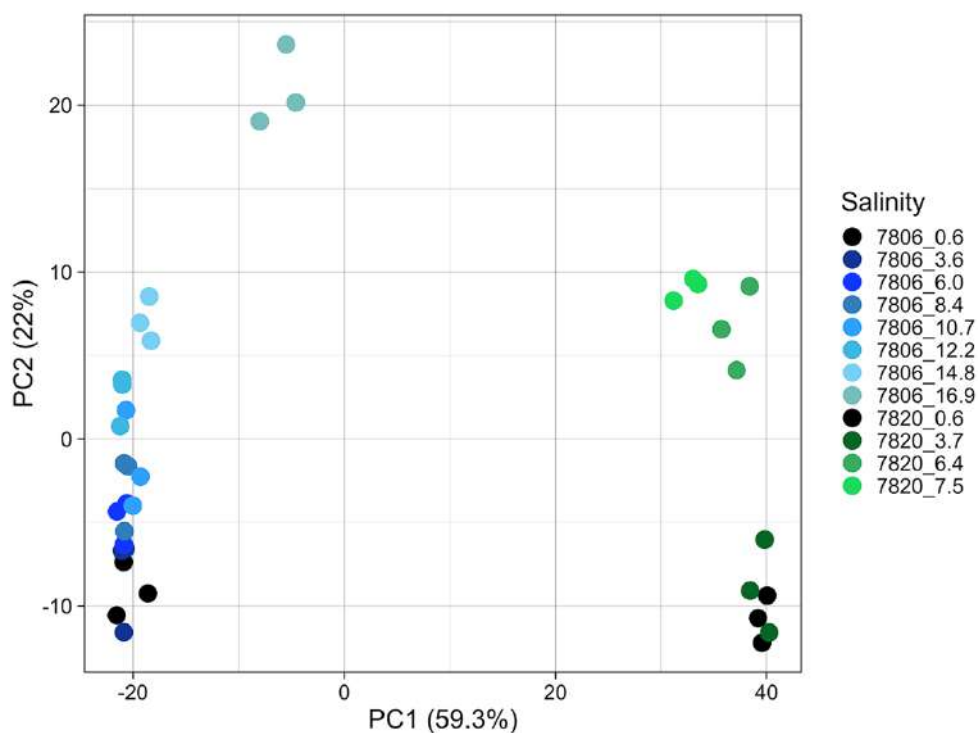


Figure 6: PCA score plot obtained from UPLC-HRMS profiles for both strains and all tested salinities.

In order to pinpoint metabolites that were differently expressed, we used PLS-DA, which is a well-known dimension reduction method for biomarker discovery in metabolomics (Szymańska et al. 2012, Favre et al. 2018). It constructs a set of orthogonal components that maximize the sample covariance between the response and the linear combination of the predictor variables, thus focusing on class separation (Lê Cao et al. 2011). Using a PLS-DA and VIP scores, it was possible to highlight 35 and 31 compounds that significantly contributed to the discrimination of the different salinity classes for *M. aeruginosa* PCC 7820 and PCC 7806, respectively. Among these potential biomarkers, 16 were common (i.e., for variables having VIP scores of > 1) to both strains, while 19 were specific to *M. aeruginosa* PCC 7820 and 15 to *M. aeruginosa* PCC 7806.

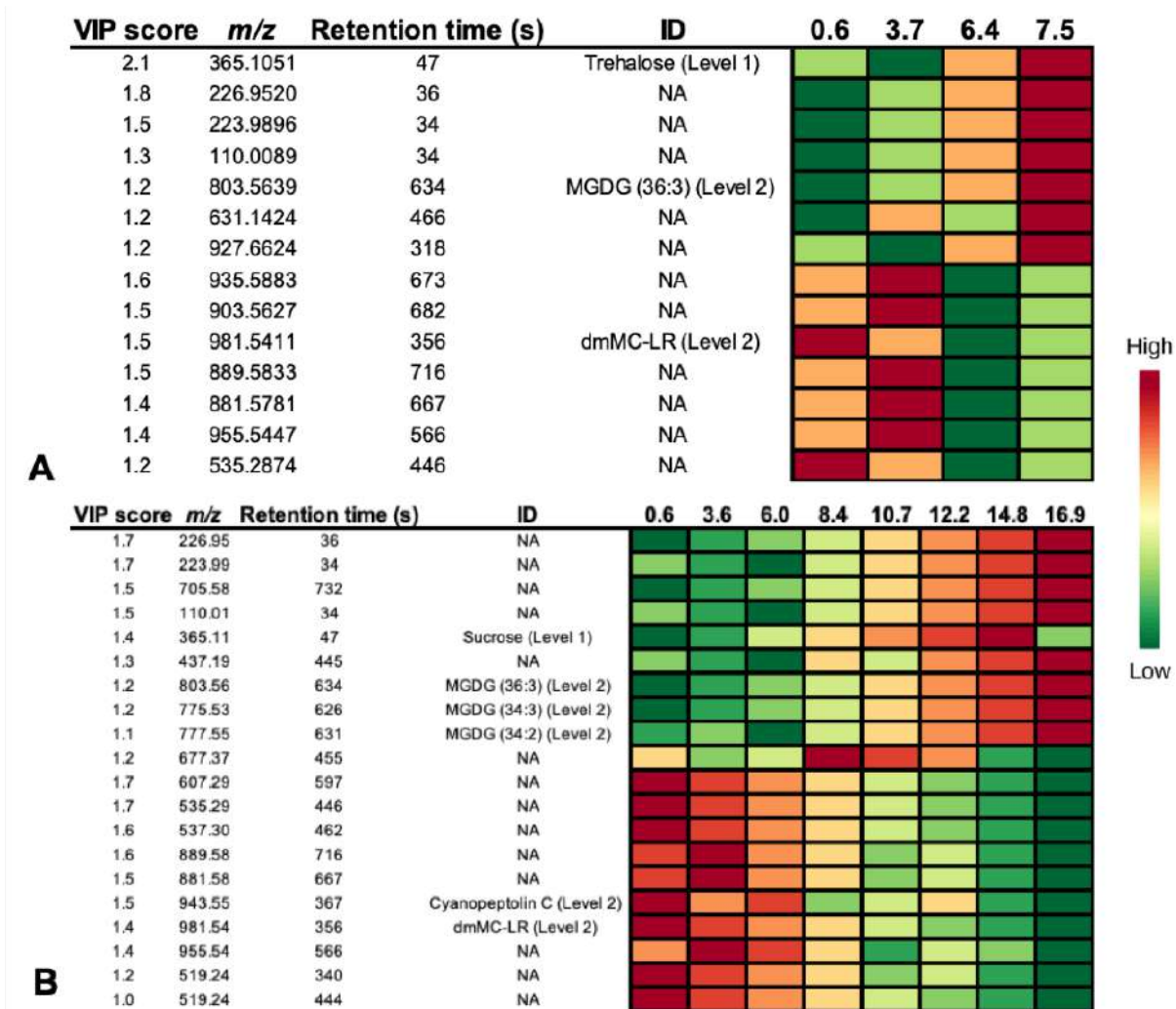


Figure 7: Details about the VIPs detected for PCC 7820 (A) and PCC 7806 (B). For each VIP, the VIP score, the ratio m/z, the retention time on HPLC column, the putative identification (ID), and the relative cellular quotas as a heatmap representation are presented. NA, compound not identified, A green color represented a relative lower cellular quota of a compound per sample. Levels 1 and 2 refer to Sumner et al. (2007) and provide a confidence level for the ID of the VIP.

Only some VIPs could be identified (Figure 7). Among those showing a decreased relative expression with increasing salinity, we observed dmMC-LR for both strains (i.e., expression pattern in agreement with targeted analysis) (Figure 7-AB) and cyanopeptolin C but only in PCC 7806 (Figure 7-A). Concerning the biomarkers having an increased relative expression with increasing salinity, we notably confidently identified the second most important VIP in *M. aeruginosa* PCC 7820 as trehalose (Figure 7-B). However, the VIP corresponding to the same exact mass and retention time in *M. aeruginosa* PCC 7806 was sucrose. Trehalose and sucrose, having the

same exact mass, were discriminated by their fragmentation patterns when compared with pure standards. Indeed, they yielded the specific ion ratios 365.1/203.05, 365.1/183.04 and 203.05/183.04 which equaled 0.8, 2.3 and 2.7 for sucrose and 4.5, 102 and 23 for trehalose, and spectra for PCC 7806 and 7820 matched accordingly (i.e., ratios 0.7, 1.9 and 2.7 vs. 3.9, 99 and 25, respectively). However, trace presence of trehalose in PCC 7806 and sucrose in PCC 7820 cannot be totally excluded. In addition, several monogalactosyldiacylglycerols (MGDGs) were putatively identified, namely, MGDGs (34:2 and 34:3) in PCC 7806 and MGDG (36:3) in both strains. MS/MS spectra were characteristic of galactolipids (e.g., galactose-derived neutral loss of 162 or 179, acylium ions, and neutral losses corresponding to fatty acid moieties). The relative cellular abundance of the VIPs was in general proportional to the salinities in both strains (Figure 7).

## Discussion

### Salinity tolerance of *M. aeruginosa*

As *M. aeruginosa* has been reported to form blooms in brackish waters (Preece et al. 2017, Tanabe et al. 2018), studying the response of acclimated strains of *M. aeruginosa* to higher salt concentrations allowed us to better assess the salinity tolerance of *M. aeruginosa*. After acclimation, the two strains presented distinct salinity tolerance up to 7.5 and 16.9 for *M. aeruginosa* PCC 7820 and PCC 7806, respectively, with these salinities corresponding to freshwater environments up to mesohaline zones ( $5 < S < 18$ ) (Mitsch and Gosselink 2000). The strain PCC 7806 presented a wider range of tolerance in our culture conditions than the strain PCC 7820. This result could be explained by the origin of the strain (Sandrini et al. 2015b, Tanabe et al. 2018).

Our results are in agreement with field studies on the salinity tolerance of *Microcystis* sp. (Otsuka et al. 1999, Atkins et al. 2001, Orr et al. 2004, Verspagen et al. 2006, Mazur-Marzec et al. 2010). In our experiment, an increase in salinity led to a decrease of the growth rate for both strains, as well as a reduced cell size. Such a biovolume decrease has already been reported as a response to both gradually increasing salinity (Tonk et al. 2007) and salt stress (Hagemann 2011) for cyanobacteria. Tonk et al. (2007) considered this phenomenon a consequence of the plasmolysis during their acclimation process. However, in our case, the biovolume decrease was observed even after acclimation. It was a long-term response compared to plasmolysis.

### Impact of salinity on MC production

Factors influencing MC production as well as the inherent role of MCs are still under debate (Omidi et al. 2018). With the exception of one study (Chen et al. 2015), reports on the impact of salinity variation concluded that there was a decrease of MC cellular quotas under higher salinity conditions (Tonk et al. 2007, Mazur-Marzec et al. 2010, Black et al. 2011, Martín-Luna et al. 2015). A decrease in MC cellular quota is frequently associated with an increase in dissolved MC because of cell lysis (Tonk et al. 2007, Black et al. 2011, Ross et al. 2019). Our study also showed that the MC cellular quota was decreased with increasing salinity for both strains. In addition, a linear correlation was found between growth rate and net production rate of MCs. This



relation shows that MC cellular quotas in both strains are strongly coupled to cell division, as already evidenced by Orr et al. (2018). Furthermore, as explained by Orr and Jones (1998), this correlation illustrates that salinity only indirectly influences the production of MCs through its effect on growth. Also, as a comparison, Amé and Wunderlin (2005) and Van de Waal et al. (2009) showed that temperature and nutrients changed the MC congener ratios by up to an 82-fold change. Our results suggested that salinity did not seem to alter the MC ratios in *M. aeruginosa* in the same order of range. The extracellular MC fractions decreased with time, indicating no significant cell lysis phenomenon. At high salinities, the higher proportion of extracellular MCs resulted from the larger volume of inoculum. These results suggest that no active excretion of MCs occurred in response to higher salinities. Thus, the growth conditions were convenient for cell membrane integrity as well, as shown by the stability of the maximum photochemical efficiency of photosystem II over time. As a comparison, an active release of saxitoxin and gonyautoxins 2 and 3 can be induced by sodium and potassium increase in *Raphidiopsis* sp., another toxic-bloom-forming cyanobacteria (Soto-Liebe et al. 2012). Based on previous studies (Tonk et al. 2007, Sevilla et al. 2012) and our results, the MCs did not appear to be accumulated in *M. aeruginosa* cells in response to higher salinity. Overall, the growth of the two *M. aeruginosa* strains was not restricted to freshwater conditions after acclimation. Therefore, our results confirm that this genus could be considered as a salt-tolerant cyanobacterium (Paerl and Huisman 2009). Based on laboratory experiments, our results also support the recommendation that the intensification of *M. aeruginosa* blooms in brackish waters should be considered by the cyanobacteria harmful algal bloom monitoring programs worldwide (Paerl and Huisman 2009, Tanabe et al. 2018).

### Targeted and nontargeted analyses of metabolites at different salinities

Using a metabolomic approach, this study describes the potential metabolites involved in sustaining *M. aeruginosa* growth at high salinities. *M. aeruginosa* is considered as an organism using the “salt-out” strategy in response to an osmolarity of the external medium (Galinski E A 1995). The “salt-out” strategy requires energy and organic matter for the accumulation of compatible solutes, which are used instead of inorganic ions to balance the osmotic potential and to maintain turgor (Hagemann 2013). Compatible solutes can be accumulated in high molar amounts in the cells without negative impacts on the metabolism (Brown 1976) and have a protective action on macromolecules (Hagemann 2013). Here, the metabolomic approach was applied to follow the evolution of the metabolome and identify biomarkers of salt acclimation. Firstly, both targeted and untargeted approaches showed that *M. aeruginosa* PCC 7820 and PCC 7806 possessed distinct metabolic profiles. Despite a nonnegligible strain-specificity, it was possible to point out an evolution of metabolite profiles in response to the acclimation to distinct salinities. The consequences of the “salt-out” strategy as an energy-costing strategy were illustrated in this study by a lower growth rate and a distinct metabolic profile at higher salinity than the control.

Among the diversity of metabolites detected in our experiment, the relative cellular quota of some compounds was overexpressed at higher salinity, suggesting that these compounds could be assimilated to compatible solutes. Two compounds identified in the literature as cyanobacterial osmolytes were detected, namely, sucrose (mainly produced in PCC 7806) and trehalose (mainly produced in PCC 7820) (Hagemann 2011). Kolman et al. (2012) found sucrose and the respective genes involved in its biosynthesis in *M. aeruginosa* PCC 7806. A sucrose accumulation in the cells was noticed after a hypoxic or a salt stress in PCC 7806 (Kolman et al. 2012). After a recent work with new isolates of *M. aeruginosa* strains from brackish water, Tanabe et al. (2018) confirmed the importance of sucrose synthesis in the brackish strains, compared with the lack of sucrose genes and synthesis in the freshwater isolates. We identified sucrose as a VIP in *M. aeruginosa* PCC 7806, but we cannot exclude the presence of trehalose based on our LC-HRMS method (i.e, same retention time and mass). Indeed, only one study did report the accumulation of trehalose in this strain in response to light intensity stress (Meissner et al. 2015). On the other hand, trehalose but not sucrose (or only trace) was identified as a VIP in the less salt tolerant strain *M.*

*aeruginosa* PCC 7820. Occurrence of trehalose is poorly documented in *M. aeruginosa*. Here, we pointed out a distinct response of these *M. aeruginosa* strains in response to salt acclimation. As reviewed by Hagemann (2011) for several other genera, the discrepancies in salt tolerance of *M. aeruginosa* strains could be partly explained by the accumulation of trehalose or sucrose.

As far as we know, a restricted number of studies reported the analyses of other identified compatible solutes using targeted analyses in *Microcystis* sp. (Hagemann et al. 1987). DMSP is described as a constitutive compatible solute in some microalgae (Stefels 2000) and was found in low amounts in a few genera of cyanobacteria (Oren 2007). Based on our analyses, DMSP was not detected in *M. aeruginosa*, corroborating the absence of potentially released by-product DMS observed by Steinke et al. (2018). Targeted analyses of GB and proline led us to quantify these compounds in *M. aeruginosa* PCC 7820 and PCC 7806. GB and proline have been described as compatible solutes in other genera of cyanobacteria (Hagemann 2011). Salt stress-induced proline is described for *E. coli*, diatoms and plants (Hagemann 2016), while GB accumulation has long been described in response to salt increase in heterotrophic bacteria, cyanobacteria, and plants (Hagemann 2016). Our results confirmed that GB acts as a compatible solute for *M. aeruginosa*. Both strains exhibited a decline of GB after 10 days, but this may be compensated by other compatible solutes as GB in *Microcystis* belongs to a larger pool of compatible solutes. Nevertheless, the accumulation of GB appeared to be specific to more halotolerant species than *M. aeruginosa*, e.g., species living in hypersaline environment (Klähn and Hagemann 2011).

Metabolomic analyses led us to putatively identify cyanopeptolin C as a VIP of low salinity in PCC 7806, while no trace of this compound was found in PCC 7820. Cyanopeptolin C is a secondary metabolite already reported to be produced by PCC 7806 (Martin et al. 1993, Briand et al. 2016). Besides evidence of inhibition activity on diverse human enzymes and toxicity for grazers (Janssen 2019), limited data are available about the physiological role of cyanopeptolin C in *Microcystis* cells. Abiotic factors such as temperature, light intensity and phosphorus limitation influenced the amount of cyanopeptolin C per cell in *M. aeruginosa* (Tonk et al. 2009) but our experiment suggested that salinity could also be an influencing factor. Using untargeted analyses led us to putatively identify polyunsaturated glycolipids as VIP in

both strains. MGDG (36:3) in PCC 7820 and MGDGs (34:2 and 34:3) in PCC 7806 were relatively overexpressed with increasing salinity compared with the control conditions. MGDGs are prevalent lipids in cyanobacterial cell and thylakoid membranes (Wada and Murata 1998). As one of the major glycerolipids found in cyanobacteria (Wada and Murata 1998), MGDGs play an important role in structural stabilization and the function of membranes. Membrane fluidity is strongly dependent of the lipid unsaturation degree and composition, and its evolution is recognized as one of the mechanisms involved in response to environmental fluctuation (Mikami and Murata 2003). Allakhverdiev et al. (1999) studied the salt tolerance of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by comparing wild and mutant strains, and the latter did not contain polyunsaturated lipids. They concluded that the degree of unsaturation of fatty acids is involved in the tolerance of the photosynthetic machinery to salt stress. Moreover, this study pointed out that the activity and synthesis of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter system might be suppressed under salt stress conditions. This effect appeared to be counteracted by the accumulation of unsaturated lipids (Allakhverdiev et al. 1999). Until now, the presence of genes coding for Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *M. aeruginosa* genomes appeared to be strain-dependent and correlated to salt tolerance (Sandrini et al. 2015b), but no data are available about the lipid composition of *M. aeruginosa* in response to salt stress. Identification of MGDGs as VIP in *M. aeruginosa* in salt-acclimated strains suggested that these glycerolipids could be considered as salt-acclimated biomarkers and involved in the tolerance of *M. aeruginosa* to elevated salinity. Besides the different VIP identified in this experiment, several others presented an expression pattern close to the definition of compatible solutes. However, exhaustive identification of the detected compounds in the metabolomic analyses remains challenging. Hence, this study pointed out a potential diversity of compatible solutes in the genus *Microcystis* which could explained the discrepancies observed in salt tolerance among the two strains.

Here, we showed that salinity only affected MC production indirectly through a decrease in growth rate of both strains. Intraspecific variability in salinity tolerances is reflected in metabolite profiles changes between the two strains. It was possible to identify different metabolites overexpressed in response to an increase in salinity. These two strains did not rely on the same mechanisms in response to elevated salinity, which illustrates the plasticity of *Microcystis aeruginosa* in long term adaptation

to brackish conditions. Our data provide new insights about the metabolites involved in *Microcystis* sp. acclimation to higher salinity. Also, short-term experiments at higher salinity would precise whether similar mechanisms are involved in *M. aeruginosa*.

Further experiments based on genetic approach and specific quantification of supplementary osmolytes in several strains of *Microcystis* spp. are needed to better understand the diversity of osmolytes in this genus. At last, further investigations are required to confirm another hypothesis made by Orr et al. (2004) suggesting that toxic phenotypes could survive longer at higher salinities compared to the nontoxic ones.

## Supplementary

Table S1: Detection parameters for MC analyses.

Source parameters	Curtain Gas	IonSpray Voltage	Temperature	Ion Source Gas 1	Ion Source Gas 1
	25 psi	5500 V	550 °C	30 psi	70 psi
Targeted molecules parameters	Scan mode	Multiple Reaction Monitoring (MRM)			
	Polarity	Positive			
	Dwell time	40 msec			
	Q1 Mass (m/z)	Q3 Mass (m/z)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
dmMC-RR	512.8	135.0	121	35	6
		103.0	121	89	16
MC-RR	520.1	135.2	76	45	6
		213.2	76	49	12
MC-YR	1045.6	213.2	221	87	12
		375.2	221	71	22
MC-LR	995.6	213.2	186	85	14
		375.4	186	70	22
dmMC-LR	981.4	103.0	101	129	12
		135.0	101	117	18
MC-LA	910.7	375.2	81	45	8
		135.2	81	91	6
MC-LY	1002.6	135.2	106	93	6
		375.3	106	49	8
MC-LW	1025.6	135.2	106	103	12
		375.2	106	53	22
MC-LF	986.6	375.2	96	47	8
		135.2	96	93	6

Table S2: Detection parameters for DMSP, GB and proline analyses.

Source parameters	Curtain Gas	IonSpray Voltage	Temperature	Ion Source Gas 1	Ion Source Gas 1
	25 psi	5500 V	550 °C	50 psi	55 psi
Targeted molecules parameters	Scan mode	Multiple Reaction Monitoring (MRM)			
	Polarity	Positive			
	Dwell time	90 msec			
	Q1 Mass (m/z)	Q3 Mass (m/z)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
DMSP	134.9	73.1	55	21	14
		63.1	55	19	8
GB	118.1	58.0	60	45	8
		59.0	60	29	9
Proline	116.1	70.0	60	23	10
		68.0	60	39	10

Table S3: Total recoveries of 4 MC variants (dmMC-LR was not available) were determined by spiking a marine non-MC producing strain (*Nostoc* sp. CCMP 2511, cultivated in L1 medium) before extraction with MeOH 75% using glass beads and the mixer mill.

Variant	Total recovery (mean $\pm$ SD)
MC-LR	100 $\pm$ 3
MC-LW	94 $\pm$ 4
MC-LF	93 $\pm$ 4
MC-LY	99 $\pm$ 2

Table S4: Total recoveries of 4 MC variants (MC-LY was not available) were determined by spiking either BG11 medium or BG11 medium supplemented with NaCl (35 g.L<sup>-1</sup>) before SPE extraction as defined in the materials and methods section.

Variant	Total recovery (mean $\pm$ SD)	
	BG11	BG11 + 35 g/L NaCl
MC-LR	146 $\pm$ 6	133 $\pm$ 24
MC-LW	94 $\pm$ 13	97 $\pm$ 9
MC-LF	64 $\pm$ 3	60 $\pm$ 6
dmMC-LR	144 $\pm$ 7	149 $\pm$ 36

Table S5: Total recoveries of DMSP, GB and proline were determined by spiking before extraction either PCC 7806 and PCC 7820 cell pellets of cultures acclimated at salinities of 0.6 (control condition) and 16.9 and 7.5, respectively. Extraction was performed as defined in the materials and methods section. Total recoveries were expressed relative to standards spiked in methanol.

Matrix	Total extraction recovery (%)		
	DMSP	GB	Proline
PCC 7806-0,6	86 $\pm$ 4	78 $\pm$ 2	61 $\pm$ 1
PCC 7806-16,9	74 $\pm$ 1	65 $\pm$ 1	50 $\pm$ 3
PCC 7820-0,6	99 $\pm$ 5	76 $\pm$ 3	71 $\pm$ 5
PCC 7820-7,5	82 $\pm$ 4	67 $\pm$ 5	65 $\pm$ 5



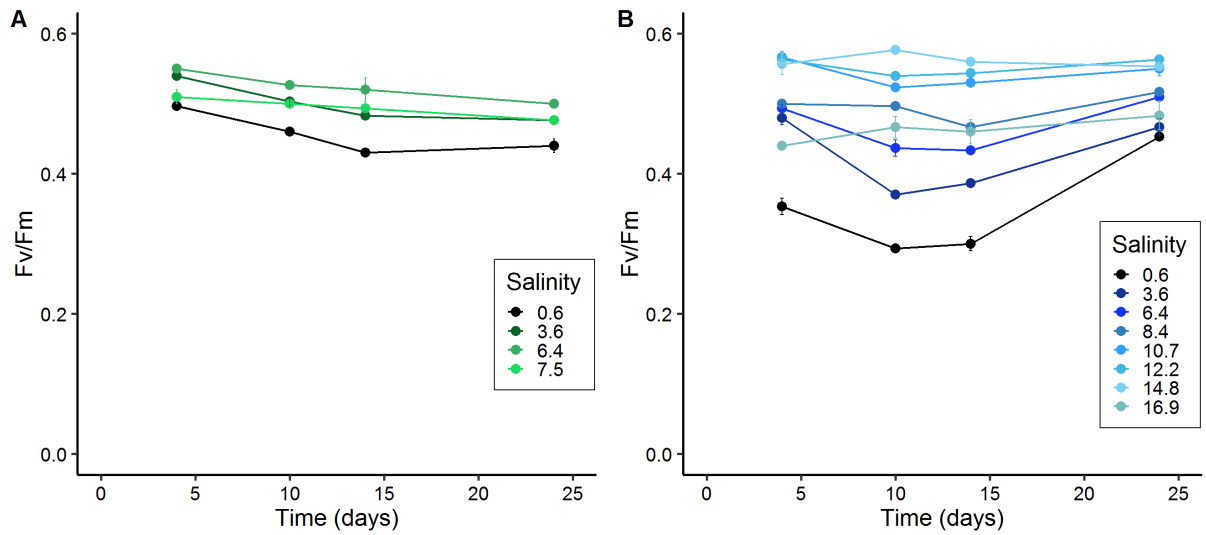


Figure S1: Maximum quantum yield of photosystem II over time for both strains at each salinity condition (A) *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, (B) *Microcystis aeruginosa* PCC 7806). Circles represent means and error bars represent the standard deviations from triplicate cultures.

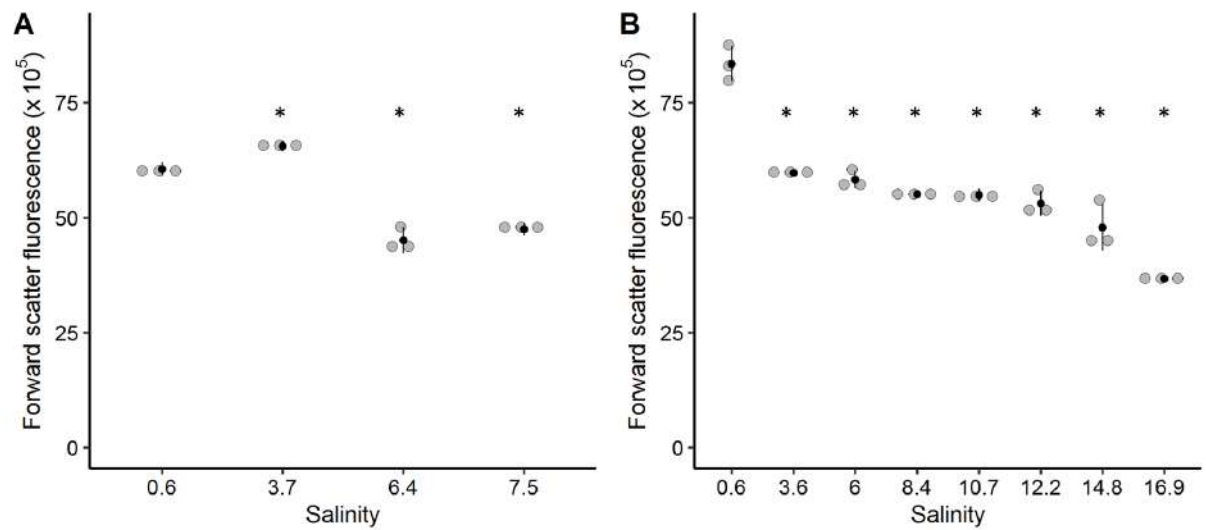


Figure S2: Forward scatter as a proxy of relative biovolume on day 14 for both strains and salinities (A) *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, (B) *Microcystis aeruginosa* PCC 7806). Black circles represent means and error bars represent the standard deviations from triplicate cultures.

## Annexe

*Le stage de M2 de Pauline Roux a permis la réalisation des expériences présentées dans ce chapitre 2. Parmi les expériences menées en complément, des cultures en semi-continues ont été réalisées afin d'étudier différents paramètres photosynthétiques. Les résultats obtenus sont ici brièvement développés bien qu'ils n'aient pas pu être approfondis davantage.*

Une expérience a été réalisée en cultures semi-continues, en maintenant les cellules en phase exponentielle de croissance par une dilution manuelle régulière des cultures. Des triplicats de cultures acclimatées en batch puis repiquées en mode semi-continu ont été suivis pendant 18 jours afin de les maintenir en conditions non limitantes de croissance. Cette expérience a été réalisée pour trois conditions de salinité par souches. Pour la souche PCC 7806, les salinités de 0,6 ; 8,4 et 12,2 ont été choisies tandis que, pour la souche PCC 7820, les salinités de 0,6 ; 3,6 et 6,4 ont été retenues. Les triplicats de cultures semi-continues ont été repiqués tous les 2 jours de façon à maintenir les souches entre 4 et 6 millions cell.mL<sup>-1</sup> sauf pour la souche PCC 7820 à 6,4 de salinité qui a été maintenue entre 2,7 et 4 millions cell.mL<sup>-1</sup> en raison de son plus faible taux de croissance. Les cultures ont été maintenues dans les mêmes conditions d'irradiance et de température que celles de l'expérience précédente. Afin de déterminer le taux de croissance des cultures et la dilution à appliquer, des prélèvements pour les comptages cellulaires au cytomètre en flux ont été réalisés tous les 2 jours (1 mL). L'ensemble des prélèvements pour l'étude des paramètres photosynthétiques (3 mL), le biovolume (1 mL), et la proportion de cellules vivantes/mortes (1 mL) ont été réalisés uniquement au jour 18, lorsque le taux de croissance entre les repiquages s'est stabilisé.

### Courbes de croissance

Les cultures des deux souches ont été maintenues entre 4 et 6 millions de cellules.mL<sup>-1</sup>, c'est-à-dire en phase exponentielle de croissance tout au long du suivi (Figure Annexe 1). Seule la culture de *M. aeruginosa* PCC 7820 à 6,4 de salinité a été maintenue entre 2,7 et 4 millions de cellules.mL<sup>-1</sup> en raison de son plus faible taux de croissance. Pour ces deux souches, la croissance a été maintenue constante pendant 5 repiquages consécutifs avant de réaliser les différents prélèvements.

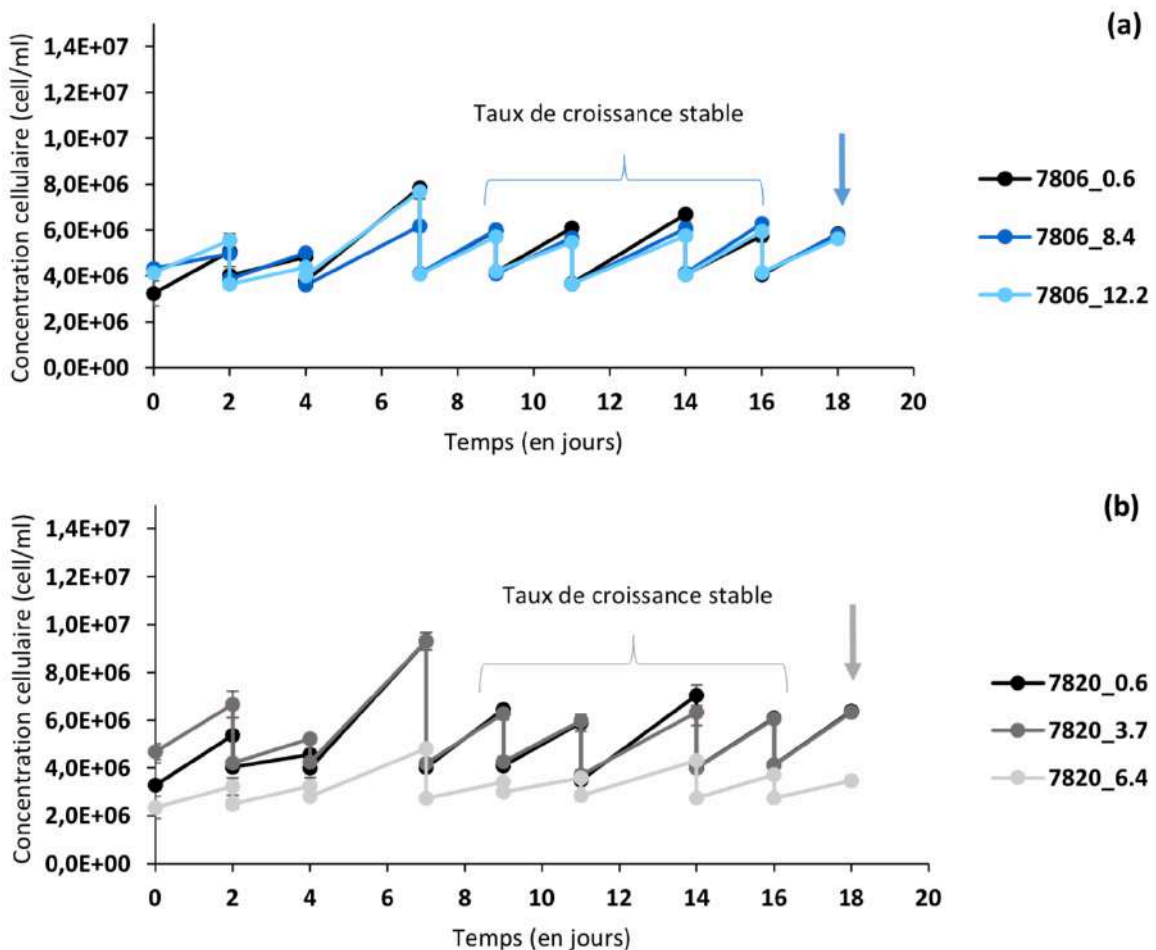


Figure Annexe 1 : Courbes de croissance en culture semi-continue des souches de *M. aeruginosa* PCC 7806 (a) et PCC 7820 (b). Les points représentent la moyenne obtenue et les barres d'erreur représentent les écart-types (n = 3).

### Proportions de cellules vivantes/mortes

Pour l'ensemble des conditions de cultures, la proportion de cellules marquées par le SytoxGreen n'a jamais excédé 3% (Données non représentées).

### Détermination du biovolume cellulaire

Le biovolume cellulaire a été estimé à partir de mesures du diamètre des cellules, assimilées à des objets de forme sphérique (Sun and Liu 2003). Trente cellules par échantillon (soit 90 cellules par condition) ont été photographiées à l'aide d'un microscope optique équipé d'une caméra et du logiciel Leica Application V3.1.0. Le biovolume cellulaire a ensuite été calculé selon la formule ci-dessous (Sun and Liu 2003) et exprimé en  $\mu\text{m}^3$  :

$$\text{biovolume cellulaire} = \frac{4}{3} * \pi * \text{rayon}^3$$

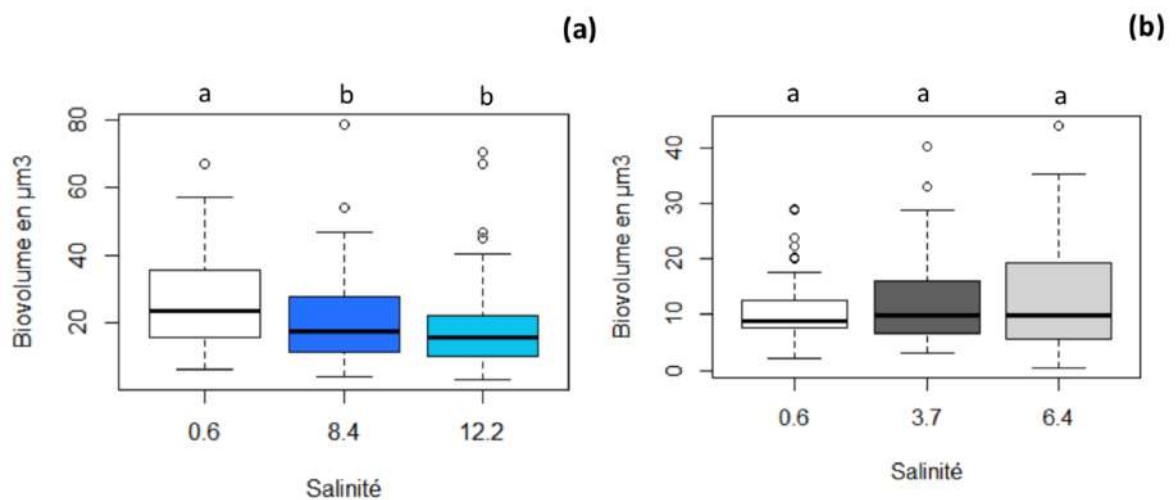


Figure Annexe 2 : Boxplots représentant le biovolume cellulaire des souches de *M. aeruginosa* PCC 7806 (ANOVA-Tukey, p-value < 0,05) (a) et PCC 7820 (ANOVA, p-value > 0,05) (b) en fonction des différentes conditions de salinité.

Une réduction significative (ANOVA-Tukey, p-value < 0,05) du biovolume cellulaire a été observée pour la souche de *M. aeruginosa* PCC 7806 à 12,2 de salinité (Figure Annexe 2-a). En effet, un biovolume moyen de  $18,2 \mu\text{m}^3$  (SD = 12,3 ; n = 90) a été calculé à 12,2 de salinité alors qu'il était de  $27,2 \mu\text{m}^3$  (SD = 13,9 ; n = 90) pour le contrôle à 0,6 de salinité. La souche de *M. aeruginosa* PCC 7820 n'a pas présenté de différence significative de biovolume cellulaire avec l'élévation de salinité (Figure Annexe 2-b). De plus, son biovolume a été globalement inférieur à celui de la souche de *M. aeruginosa* PCC 7806.

### Paramètres photosynthétiques

Le taux de transport d'électron (ou ETR, Electron Transport Rate) lors de la photosynthèse dépend de la quantité de lumière absorbée par l'antenne pigmentaire des photosystèmes II et de l'efficacité avec laquelle cette lumière est utilisée par les centres réactionnels II pour réaliser la séparation de charge (Perkins and Kromkamp 2010). La construction de la courbe de réponse à la lumière consiste à soumettre les cellules à des paliers de lumière d'intensités croissantes et à mesurer pour chacun de ces paliers le taux de transport d'électrons. La courbe obtenue se caractérise par trois régions principales : la région limitée par la lumière, la région de saturation par la lumière et la région de photorégulation (Schreiber 2004) (Annexe 3). Après incubation au noir pendant 15 min, l'analyse a été réalisée avec l'AquaPen prenant en compte 7 paliers d'intensité lumineuse (10 ; 20 ; 50 ; 100 ; 300 ; 500 et 1000  $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Le modèle d'Eilers and Peeters (1988) a été ajusté aux données pour décrire la relation photosynthèse-lumière sous le logiciel R version 3.4.1. Ce modèle a été choisi, car il tient compte du phénomène de photo-inhibition. Il a ainsi été possible de déterminer les paramètres photosynthétiques des deux souches étudiées. La pente aux faibles éclaircissements ( $\alpha$ ) correspond à l'efficacité maximale d'utilisation de la lumière. Le plateau atteint à saturation lumineuse mesure la capacité photosynthétique soit le taux de transport maximum des électrons (rETR<sub>m</sub>).

Pour les deux souches, le  $F_v/F_M$  est resté stable entre 0,3 et 0,6, ce qui est équivalent aux valeurs obtenues lors de la première expérience (voir chapitre 2) réalisée en batch (Figure Annexe 3-ab). L'efficacité maximale d'utilisation de la lumière ( $\alpha$ ) est restée comprise entre 0,2 et 0,3 (Figure Annexe 3-cd). Le taux de transport maximum des électrons (rETRmax) est également resté stable entre 55 et 65 (Figure Annexe 3-ef). Pour l'ensemble des paramètres photosynthétiques, une augmentation a été mise en évidence entre les conditions de salinité contrôle et maximale excepté pour le paramètre  $\alpha$  de la souche PCC 7820.

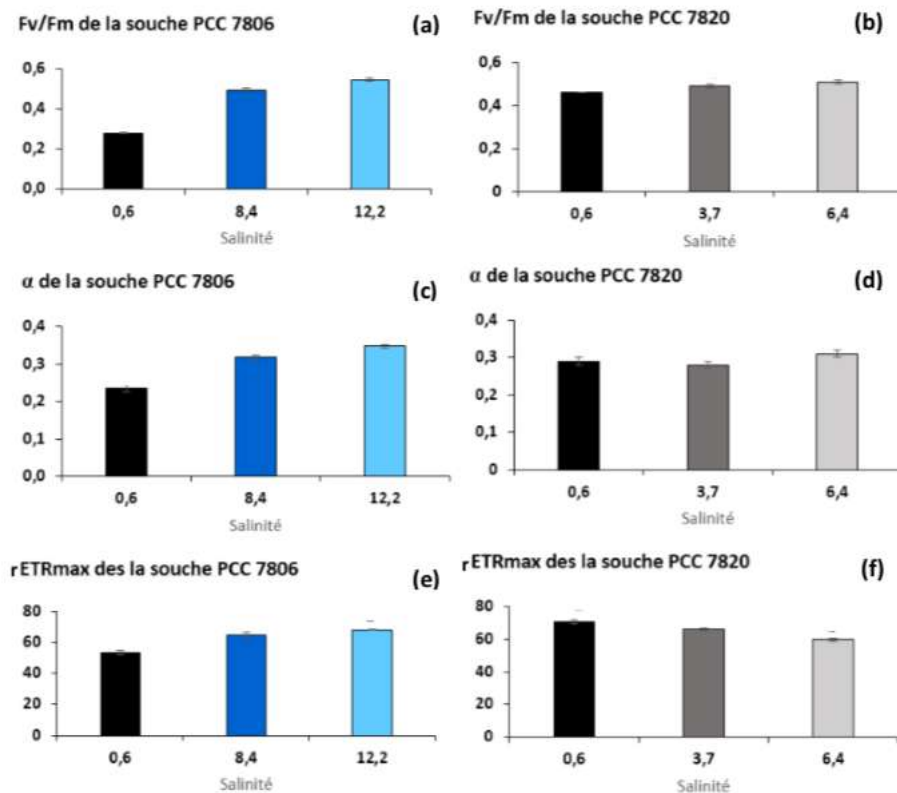


Figure Annexe 3 : Paramètres photosynthétiques  $F_v/F_M$ ,  $\alpha$  et rETRmax (sans unités) des souches de *M. aeruginosa* PCC 7806 (a, c, e) et PCC 7820 (b, d, f) en fonction des différentes conditions de salinité. L'histogramme représente la moyenne obtenue et les barres d'erreur présentent les écart-types (n = 3).

# Chapitre 3





## Salt shock responses of *M. aeruginosa* strains from fresh- and brackish waters

Maxime Georges des Aulnois,<sup>\*a</sup> Elise Robert,<sup>a</sup> Amandine Caruana,<sup>a</sup> Damien Réveillon,<sup>a</sup> Enora Briand,<sup>a</sup> Véronique Savar,<sup>a</sup> Myriam Bormans,<sup>b</sup> Zouher Amzil<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Phycotoxins Laboratory, IFREMER, Nantes, France

<sup>b</sup>University of Rennes, CNRS, ECOBIO - UMR 6553, F-35000 Rennes, France

Citation: Georges des Aulnois, M., E., Robert, P., Caruana, A., Réveillon, D., Briand, E., Savar, V., Guljamow, A., Dittmann E., Amzil, Z., Bormans, M.. Salt shock responses of *M. aeruginosa* strains from fresh- and brackish waters, **In preparation for a submission to Toxins.**

## Table list

Table 1: Primer sequences used for RT-qPCR reactions. p: 117

## Figure list

Figure 1: Growth rates calculated for *M. aeruginosa* PCC 7820 (A) and PCC 7806 (B) for each salt treatment. The lack of data represents negative growth rates. Blue points represent the mean and blue error bars represent the standard deviation (n = 3). p: 120

Figure 2: Maximum quantum yield of the PSII ( $F_V/F_M$ ) over time after salt addition for *M. aeruginosa* PCC 7820 (A) and PCC 7806 (B). Triplicate of culture are represented as a mean and error bars represent the standard deviations (n = 3). p: 121

Figure 3: Effect of salt addition on the relative gene expressions expressed as  $\text{Log}_2(\text{Fold change})$ . (A) Relative *sod* and *groEL* expressions in *M. aeruginosa* PCC 7820. (B) Relative *sod* and *groEL* expressions in *M. aeruginosa* PCC 7806. (C) Relative *psaA* and *psbC* expressions in *M. aeruginosa* PCC 7820. (D) Relative *psaA* and *psbC* expressions in *M. aeruginosa* PCC 7806. (E) Relative *spsA* and *sppA* expressions in *M. aeruginosa* PCC 7806. Gene expressions were normalized to the control condition for each sampling time. Triplicate of culture are represented as a mean and error bars represent the standard deviations (n = 3). p: 123

Figure 4: Heatmap of significantly salt-affected (salt and salt-time interaction) metabolites of *M. aeruginosa* PCC 7820. Data represented are means of triplicate. (M: mass; T: retention time). p: 125

Figure 5: Heatmap of significantly salt-affected (salt and salt-time interaction) metabolites of *M. aeruginosa* PCC 7806. Data represented are means of triplicate. (M: mass; T: retention time). p: 126

Figure 6: Microcystin cellular quotas over time and salinities for *M. aeruginosa* PCC 7820 (A) and PCC 7806 (B). Error bars represent the standard deviations (n = 3). Letters indicate significant differences between each salt treatment and the control condition (one-way ANOVA and Dunnett's test on salinity treatments at each respective time point). p: 127

Figure 7: MC cellular quotas over time and salinities expressed as the percentage of each variant relative to the total amount of MCs per cell for *M. aeruginosa* PCC 7820 (A) and PCC 7806 (B). p: 128

Figure 8: Intracellular and extracellular MC proportions over time for each salinity for *M. aeruginosa* PCC 7820 (A) and PCC 7806 (B). p: 129

## Introduction

The cyanobacterial bloom-forming genus *Microcystis* is described as one of the most widespread genera in freshwater ecosystems (Harke et al. 2016). In addition, *Microcystis* has been particularly well studied because of its ability to produce the hepatotoxin microcystin (MC). Indeed, with nearly 250 MC variants described in the literature (Catherine et al. 2017), the occurrence of MCs in aquatic ecosystems represents a threat to both human and animal health (Buratti et al. 2017). Within the *Microcystis* genus, the species *M. aeruginosa* has received a particular attention as being the dominant species in blooms worldwide (Harke et al. 2016, Svirčev et al. 2019).

Several studies have shown that *M. aeruginosa* influence is extending to coastal ecosystems (Preece et al. 2017). The first occurrence of MCs in coastal environment was revealed by the detection of MCs in marine mussels but no MC-producing organism was identified (Chen et al. 1993). Although some marine and estuarine cyanobacteria such as *Leptolyngbya*, *Oscillatoria* and *Synechococcus* have been described as MC producers (Vareli et al. 2013), the occurrence of MCs in coastal environment is mostly derived from the transfer of MC-producing cyanobacteria through the freshwater-to-marine continuum (Preece et al. 2017, Paerl et al. 2018). As a consequence, the accumulation of transferred MCs was described in marine fauna such as sea otters and shellfish (Miller et al. 2010, Gibble et al. 2016, Umehara et al. 2017). The occurrence of *M. aeruginosa* and MCs in brackish waters was reported in many locations in the United States, South America, Australia, Europe including France, Japan or India (Atkins et al. 2001, Robson and Hamilton 2003, Lehman et al. 2008, Preece et al. 2015, Kramer et al. 2018, Tanabe et al. 2018, Bormans et al. 2019) and even became recurrent in San Francisco Bay, USA (Kurobe et al. 2018) and in the Patos lagoon, Brazil (Yunes et al. 1996). Long-term survey and model predictions pointed out the positive impact of climate change on the intensity and frequency of this phenomenon through the intensification of precipitation and longer drought periods (Robson and Hamilton 2003, Lehman et al. 2008, 2017, Paerl and Paul 2012). Fate of *M. aeruginosa* and MC production during this transfer raised the question of how *M. aeruginosa* cells would deal with sudden salt variations.

In 1985, Reed and Walsby defined *Microcystis* as a very salt-sensitive genus. Subsequently, several studies showed that *Microcystis* growth rate remained unaffected by salt addition up to a salinity of 10 (Otsuka et al. 1999, Tonk et al. 2007). Based on field and laboratory experiments, the *M. aeruginosa* salt tolerance now ranges between 0 and 18 (Mitsch and Gosselink 2000, Orr et al. 2004, Tonk et al. 2007, Georges des Aulnois et al. 2019, Ross et al. 2019). Salinity variation may affect cyanobacteria physiology through osmotic and ionic stresses, thus disturbing the cellular osmotic balance (Hagemann 2011). When salt stress overcomes cell salt tolerance, salt stress enhances the production of reactive oxygen species and programs cell death in *M. aeruginosa* resulting ultimately into cell lysis (Ross et al. 2006, 2019). Within the range of salt tolerance of freshwater cyanobacteria, salt shock may decrease growth rate (Tonk et al. 2007) and impact the photosynthetic activity of photosystem II (Lu and Vonshak 2002, Ross et al. 2019).

The impact of salt variation on MC production in *M. aeruginosa* conducted to contrasting results such as an increase in MC cellular quotas (Chen et al. 2015) or decrease in intracellular MC content and MC production (Tonk et al. 2007, Black et al. 2011), whereas other studies reported no effect (Tanabe et al. 2018). When the salt tolerance of the cell was exceeded, cell lysis occurred resulting in MC release in the surrounding medium (Orr et al. 2004, Ross et al. 2019). Release of MCs mainly appeared through cell lysis instead of the alteration of the membrane permeability (Orr et al. 2004, Ross et al. 2019). Also, the majority of these studies quantified the production of MCs as MC-LR equivalent and did not study the response of several variants to salinity stress.

The main physiological response of cyanobacteria to cope with salinity variation is the accumulation of compatible solutes to sustain turgor pressure and the osmotic balance of cells (Hagemann 2011). This physiological trait in *M. aeruginosa* is still overlooked despite its presence in estuaries and its apparent tolerance up to the mesohaline zone. After the report of glucosylglycerol accumulation (Hagemann et al. 1987), sucrose was identified in a particular salt tolerant *M. aeruginosa* PCC 7806 strain (Kolman and Salerno 2016) and further confirmed in the field where the occurrence of the “sucrose” gene was correlated with the brackish origin of *M. aeruginosa* (Tanabe et al. 2018). The accumulation of several compatible solutes could

explain the differences in salt tolerance among *M. aeruginosa* strains (Kolman et al. 2015, Tanabe et al. 2018, Georges des Aulnois et al. 2019).

This work investigates the effect of a salt shock on two strains of *M. aeruginosa* PCC 7820 and 7806 that were isolated from fresh and brackish waters exposed to a salt shock through photosynthetic activity, growth, targeted transcripts and metabolic responses in order to better characterize the salt stress responses at different time scales.

The short term stress (< 2 hours) was investigated by RT-qPCR targeting two genes coding for a superoxide dismutase (*sod*) and a chaperonine (*groEL*). Both genes were described as salt stress markers in *Synechocystis*. Also two genes coding for proteins belonging to photosystem I (PSI) and photosystem II (PSII) (*psaA* and *psbC*) as well as two genes involved in sucrose synthesis (*sppA* and *spsA*) were targeted.

In addition, the physiological responses over 7 days were studied through photosynthetic activity, growth, and metabolic responses. The production of several MC variants (both intracellular and extracellular) was investigated by a targeted analysis based on liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Untargeted metabolomic analysis was also conducted in order to study the dynamic of the metabolome and to identify putative biomarkers of salt stress in the two *M. aeruginosa* strains.

## Materials and Methods

### Organisms and experimental design

Two axenic toxic strains of *Microcystis aeruginosa* from the Pasteur Culture collection of Cyanobacteria (PCC; <https://webext.pasteur.fr/cyanobacteria/>) were studied, the PCC 7820 and PCC 7806. *M. aeruginosa* PCC 7820 was isolated in a freshwater lake in Scotland while *M. aeruginosa* PCC 7806 was isolated in the brackish water of Braakmann reservoir in Netherlands. Cells were routinely grown in modified BG11<sub>0</sub> (Rippka et al. 1979) supplemented with NaNO<sub>3</sub> (2 mM) and NaHCO<sub>3</sub> (10 mM), at constant temperature of 22 °C under a 12:12 h light:dark cycle using cool-white fluorescent tubes (Philips) with 35 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> illumination. Growth media with elevated salinities were prepared with the addition of NaCl (450 mM), KCl (10 mM), CaCl<sub>2</sub> (9 mM), MgCl<sub>2</sub> (6H<sub>2</sub>O) (30mM) and MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O) (16mM) before nutrient enrichment (Bail and Charrier 2013). Salinity was checked using a conductivity meter Cond 3110 Set 1 (WTW). Exponentially growing cells were transferred from BG11<sub>0</sub> to fresh media in order to conduct salt-shock experiments at five different salinities (3.4, 6.7, 8.4, 10.8 and 14.4) with a control condition in BG11<sub>0</sub> at 0.6. Samples for cell enumeration and photosynthetic parameters were taken every days. Samples for MC and metabolomic analyses were taken at days (0, 2, 4 and 7).

Another set of experiments was conducted at salinities 0.6, 6.7 and 10.8 in the same conditions described above. After 5 min, 30 min, and 120 min, cell samples were collected for RNA extraction and transcript analyses of targeted genes.

### Cell enumeration and photosynthetic parameter

Cell enumeration was conducted daily by cytometry on fresh samples using an Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson). Mean growth rate over seven days were calculated using least-squares regression method according to Wood et al. (2005). Maximum quantum efficiency of the photosystem II ( $F_V/F_M$ ) was measured everyday using an Aquapen-C 100 fluorimeter (Photon Systems Instruments). Before fluorescence analyses, samples (3 mL) were incubated in the dark for 15 min.  $F_V/F_M$  was measured (455 nm, no DCMU addition and the basal fluorescence was not subtracted) every day using an Aquapen-C 100 fluorimeter (Photon Systems Instruments) (Ogawa et al. 2017).

### LC-MS/MS analysis of MCs

Every two days, subsamples (15 mL) were obtained by centrifugation at 4248 g for 15 min at 4 °C. The supernatant was stored immediately at -80 °C and the remaining cell pellet was quenched in liquid nitrogen and stored at -80°C until extraction. Cells and supernatants were extracted and analyzed as in Georges des Aulnois et al. (2019). Briefly, cells were extracted with MeOH using a mixer mill while extracellular MCs were concentrated by solid phase extraction on a C-18 cartridge. MC quantification was conducted by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using an external calibration curve made with 9 standards. The net production rate of each MC variant was calculated over seven days according to Orr et al. (2018).

### RNA isolation and RT-qPCR

RNA extraction was performed by adding 1 mL Trizol (Life Technologies) and 200 µL chloroform to the cell pellets. Samples were then purified with RNA Clean-up XS MN kit (Macherey-Nagel) following the manufacturers instruction. RNA purity and concentration were checked using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific) at 260 and 280 nm. Purified extracts of RNA were treated with DNase (RNase-Free DNase Set Quiagen). RNA quality was checked on gel before reverse transcription using qScript Supermix (QuantaBio). For RT-qPCR, a LightCycler 480 (Roche Applied Science) in combination with a Sybr green-based detection system (DyNamo ColorFlash SYBR green qPCR Kit, Thermo Fischer Scientific) were used. Specific primer pairs for *mnpB*, *sod*, *groEL*, *psaA*, *psbC*, *sppA*, *spsA* genes were designed (Table 1) and tested in PCRs prior to RT-qPCR. The RNase P encoding gene *mnpB* was used as housekeeping gene for standardization, as described previously by Makower et al. (2015). Each RT-qPCR was carried out in three technical replicates. Raw data were converted using the software LC480Converter and primer efficiencies were calculated using LinRegPCR. Relative expression of targeted genes were calculated following the Pfaffl (2001) method and expressed as  $\text{Log}_2(\text{Fold Change})$ . This method considers corrections for actual PCR efficiencies for each gene normalized to *mnpB* expression level. Each expression level was normalized to the gene expression found in the control condition for each sampling time.

Table 1: Primer sequences used for RT-qPCR reactions.

Primer	Forward Sequence (5' – 3')	Reverse Sequence (5' – 3')
<i>rnpB</i>	TACCTCAAGCGGTTCTAA	CTGATACCTGATAACTGATTGGG
<i>sod</i>	AGAAGCATCACCAGCAACCT	GCCTTAGAGCCTTGCATCAC
<i>groEL</i>	CTTGGACCCAAAGGTCGTAA	CCGCTACATCGTTGGTTTTT
<i>psaA</i>	CGGATTTCTCACCTTCAA	TTCGAGGATTTCTTCATGC
<i>psbC</i>	TCTTCGGCTGTACTCGGTTT	GCACCACAACCCAAGAGAAT
<i>spsA</i>	ATCATTCCCTTGCTGCAATC	GCAGATTTTCTGCCTCTTGG
<i>sppA</i>	GTGGGCGATAGTCTGGCTAC	CCGACGGAGGTAATCCAGTA

### Metabolomic analyses

Metabolomic analyses were conducted on intracellular extracts prepared for MC analyses by Ultra-performance Liquid Chromatography – High Resolution Mass Spectrometry (UPLC-HRMS) as described in Georges des Aulnois et al. (2019). Pool samples (QC) were prepared and injected ten times at the beginning of the batch sequence and then every ten samples (including blank). Blanks were prepared as cell pellets (i.e. MeOH and glass beads in a polypropylene tube). Data were deposited on DATAREF (<https://doi.org/10.12770/b8a87122-4e4b-4d8a-9c24-a9059f6b49e3>). To identify specific compounds of interest, tandem mass spectrometry analyses were carried out as in Georges des Aulnois et al. (2019). Annotation was conducted firstly with exact masses and freely available databases (e.g. HMDB, LipidMaps, Metlin, KEGG, <http://ceumass.eps.uspceu.es/>, Gil-de-la-Fuente et al. 2019), then with fragmentation patterns and using a molecular networking approach (<https://gnps.ucsd.edu/>, Wang et al. 2016). Acquisition and data processing were performed using Mass Hunter Workstation softwares (version B.06.01 and B.07, Agilent).

LC-HRMS raw data (.d) were converted to .mzXML format using MS-Convert (Proteowizard 3.0, (Chambers et al. 2012) and pre-processed with the Workflow4Metabolomics (W4M; <http://workflow4metabolomics.org>) e-infrastructure (Guitton et al. 2017).

Peak picking, grouping, retention time correction and peak filling were performed with the “centWave”, “density”, “obiwarp” and “chrom” methods. Annotation (isotopes, adducts) was conducted with the “CAMERA” algorithm (Kuhl et al. 2012). Intra-batch signal intensity drift was corrected by fitting a locally quadratic (loess) regression model to the QC values (van der Kloet et al. 2009, Dunn et al. 2011).



Three successive filtering steps using in-house scripts on R were applied to remove (i) variables with low intensities (exclusion of variables with S/N <10 compared to a blank), (ii) signals showing high variability (exclusion of variables with a coefficient of variation >25% in QC samples) and (iii) to suppress redundancy (exclusion of all variables but the most intense one when the coefficient of autocorrelation >80% at the same retention time). Pre-processing led to 2313 variables and 382 variables remained after the filtrations on which statistical analyses were performed.

To confirm the identification of sucrose in metabolomics and provide quantitative data, a GC-FID method (gas chromatography coupled to flame ionization detector) was implemented, after derivatization procedures described by Adams et al. (1999).

### Statistical analyses

Statistical analyses were performed using R software (R core team). Data are presented as mean and standard deviation (SD). Homoscedasticity and normal distribution of residuals were checked using Bartlett and Shapiro-Wilk tests. Then, the effect of salinity on growth was tested using one-way analysis of variance (ANOVA) and the post-hoc Dunnett's test was applied to check difference between growth rates compared to the control. As the experimental design involved repeated measures on the same cultures in response to salt treatments, the statistical analyses on metabolomic data were performed using the "Time-series / Two-factor" module provided by MetaboAnalyst 4.0 (Chong et al. 2018). Before statistical analysis, data were filtered as described above, and normalized to the cell concentration and log transformed. A Pareto scaling was applied as suggested by van den Berg et al. (2006). Effects of time, salinity and their interaction were tested by applying an ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA). ASCA is a generalization of ANOVA for univariate data to the multivariate case and adapted for omics data (i.e the number of variables exceeds the number of experiments) (Smilde et al. 2005). Briefly, ASCA approach decomposes the overall data variance into individual variances induced by salinity, time, as well as by their interaction for all metabolites. It then applies a principal component analysis (PCA) for each factor to summarize major variations as described in Nueda et al. (2007). According to Nueda et al. (2007), selection of metabolites that are closely following the detected trend as well as those that clearly diverge from the trend was conducted by the use of two statistics, the leverage and the squared

prediction error (SPE). The leverage is a measure of the importance of the metabolites in the PCA model and SPE is a measure of the goodness of fit of the model for that specific metabolite. Then, metabolites with high leverage and low SPE are considered a well-modelled compound in the PCA model while those with a high leverage and high SPE were considered as outliers (Nueda et al. 2007). Both well-modelled and outliers metabolites were then tentatively identified as they represent putative biomarkers that respond to each factor. ASCA model validation was performed using a permutation test (100 permutations) according to Vis et al. (2007).

# Results

## Growth of *M. aeruginosa* during a salt-shock

For the strain *M. aeruginosa* PCC 7820, cell concentrations increased for salinities up to 6.7 while for higher salinities, a steady decrease was observed over the 7-day exposure (Figure S1-A). Inversely, cell concentrations increased for all salinity treatments for *M. aeruginosa* PCC 7806 (Figure S1-B). For both strains, the calculated growth rates significantly decreased when salinity increased (one-way ANOVA,  $p$ -value  $< 0.05$ ) (Figure 1). Indeed, at salinities 6.7 and higher, growth rates of PCC 7820 significantly decreased compared to the control (Dunnett's test,  $p$ -values  $< 0.05$ ) (Figure 1-A). Concerning, PCC 7806 the growth rate significantly decreased only for salinities of 10.8 and 14.4 compared to the control (Dunnett's test,  $p$ -values  $< 0.05$ ) (Figure 1-B).

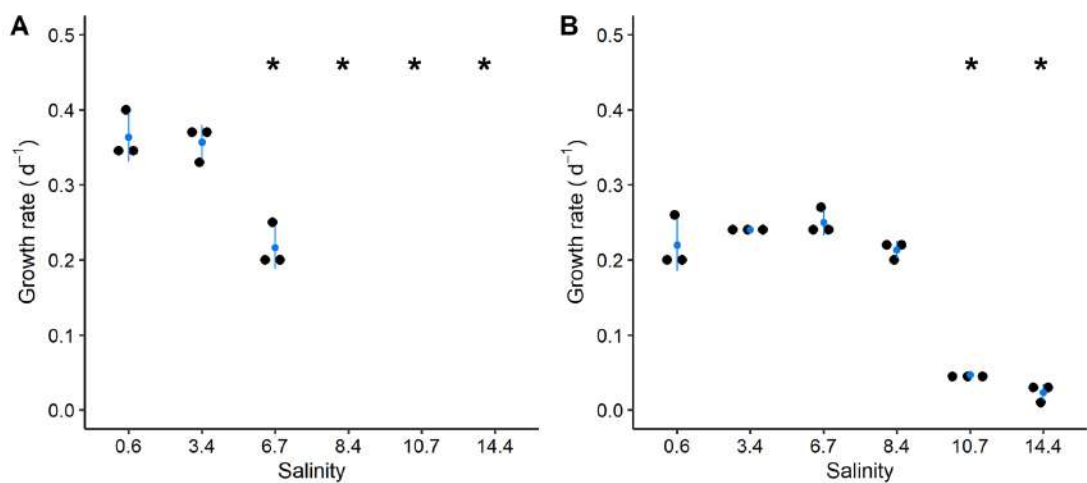


Figure 1: Growth rates calculated for *M. aeruginosa* PCC 7820 (A) and PCC 7806 (B) for each salt treatment. The lack of data represents negative growth rates. Blue points represent the mean and blue error bars represent the standard deviation (n = 3).

## Photosynthetic activity

For both strains, the  $F_V/F_M$  values remained quite stable in the control condition around 0.47 and 0.37 respectively (Figure 2-AB). For all salt-treated cultures, an increase of the  $F_V/F_M$  values was obtained within the first 24 hours after the salt addition (Figure 2-AB). Afterwards, the  $F_V/F_M$  values remained stable for salinities between 3.4 and 8.4 at ca. 0.48 and 0.55 for PCC 7820 and PCC 7806 respectively. However,  $F_V/F_M$  values decreased from day 2 to day 7 for the highest salinities of 10.8 and 14.4. At the end of the experiment, the  $F_V/F_M$  for PCC 7820 and PCC 7806 were 0.15 and 0.06 respectively (Figure 2-AB).

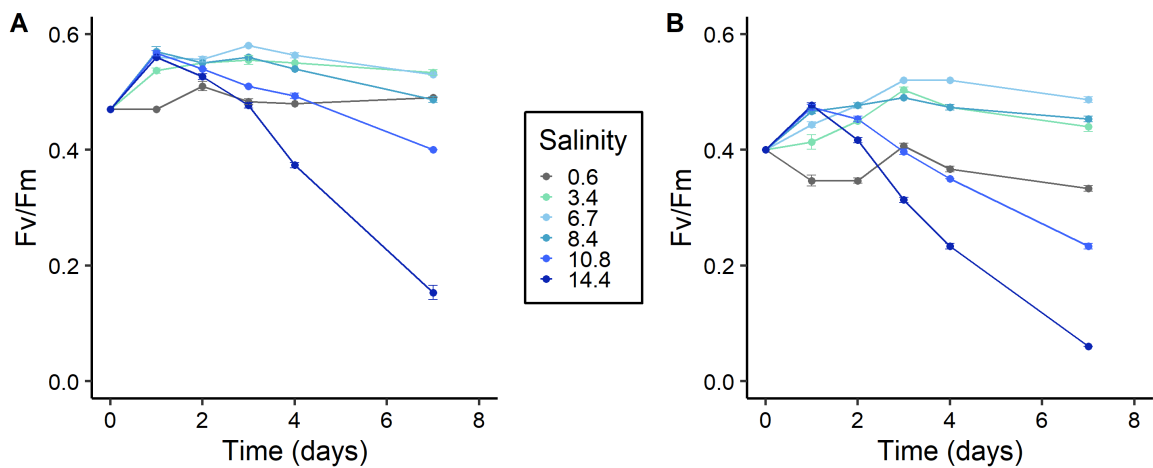


Figure 2: Maximum quantum yield of the PSII ( $F_V/F_M$ ) over time after salt addition for *M. aeruginosa* PCC 7820 (A) and PCC 7806 (B). Triplicate of culture are represented as a mean and error bars represent the standard deviations ( $n = 3$ ).

### Relative gene expressions after a short period of salt-shock

For *M. aeruginosa* PCC 7820 at a salinity of 6.7, the relative *sod* and *groEL* gene expressions remained in the range of -1 to 1 while at salinity 10.7, they were less than -1, after 30 min for *sod* and after 5 and 120 min for *groEL* (Figure 3-A). Concerning *M. aeruginosa* PCC 7806, the *sod* expression at salinity 6.7 was comprised between 0 and 1 at each sampling time (Figure 3-B). However, at salinity 10.7, the *sod* mean expression was 1.51 ( $\pm$  0.39) after 5 min of stress and then decreased between 0 and 1 (Figure 3-B). The *groEL* gene at salinity 10.7 was overexpressed after 5 and 120 min with  $\log_2$ (fold change) values of 3.5 ( $\pm$  1.2) and 2.43 ( $\pm$  0.95) respectively (Figure 3-B).

The *psaA* and *psbC* gene expressions in PCC 7820 remained between -1 and 0 at a salinity of 6.7 (Figure 3-C). At salinity 10.7, these gene expressions were downregulated at all sampling times (Figure 3-C). In PCC 7806, at salinity 6.7, the *psaA* expression were downregulated after 30 min and remained similar to the control condition after 120 min of stress (Figure 3-D). The same trends was observed at a salinity of 10.7. The *psbC* expression remained between 0 and 1 at salinity 6.7 while at salinity of 10.7, the *psbC* expression started by an up-regulation after 5 min and then decreased after 30 min and remained similar to the control condition after 120 min (Figure 3-D).

The *spsA* and *sppA* relative gene expressions were monitored in PCC 7806 only as no primer product was found using the primer pairs designed in PCR. The *spsA* and *sppA* relative gene expressions after salt addition were increased after 120 min at salinity 6.7 and at each sampling time at a salinity of 10.7 (Figure 3-E).

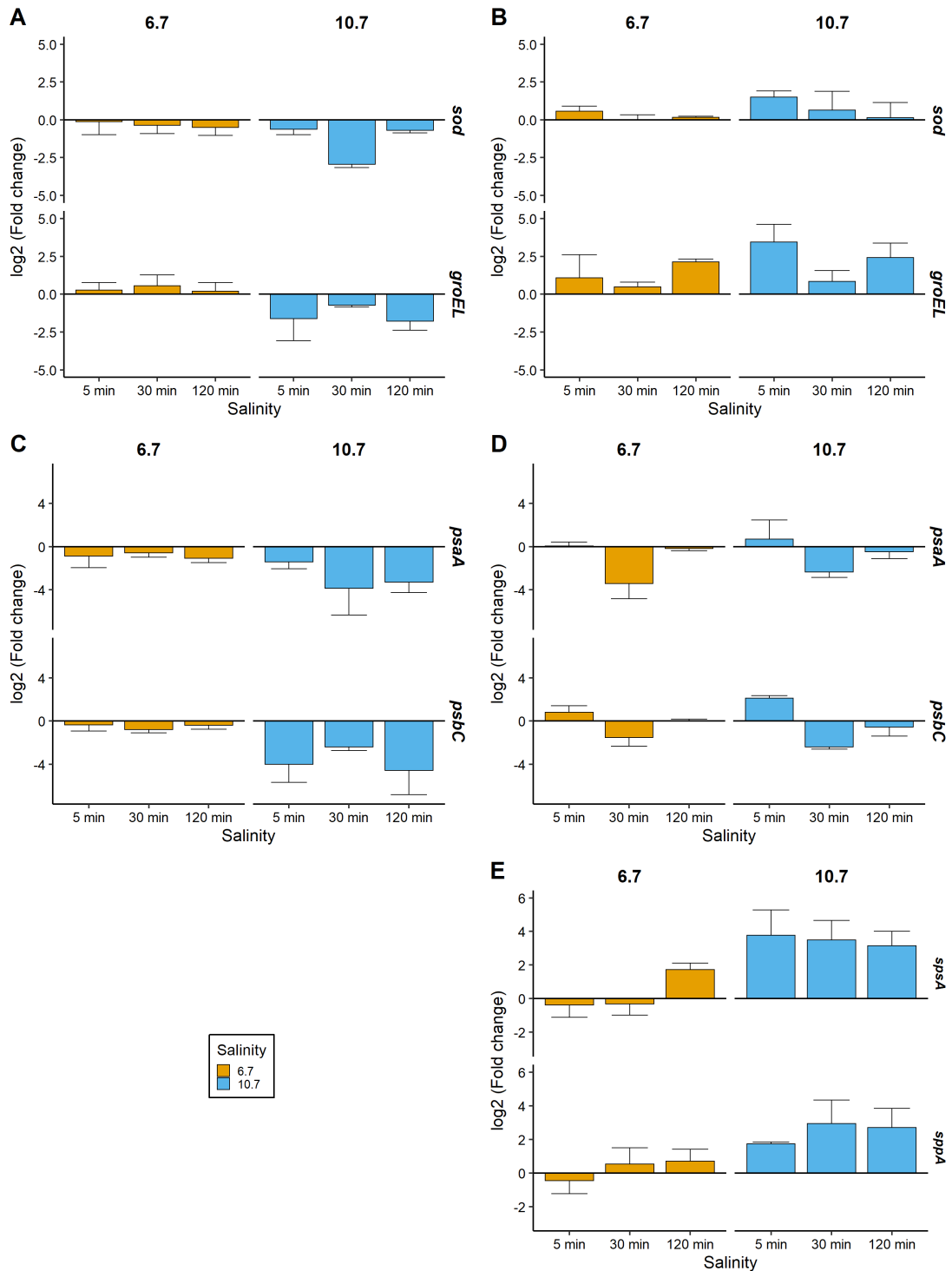


Figure 3: Effect of salt addition on the relative gene expressions expressed as Log<sub>2</sub>(Fold change). (A) Relative *sod* and *groEL* expressions in *M. aeruginosa* PCC 7820. (B) Relative *sod* and *groEL* expressions in *M. aeruginosa* PCC 7806. (C) Relative *psaA* and *psbC* expressions in *M. aeruginosa* PCC 7820. (D) Relative *psaA* and *psbC* expressions in *M. aeruginosa* PCC 7806. (E) Relative *spsA* and *sppA* expressions in *M. aeruginosa* PCC 7806. Gene expressions were normalized to the control condition for each sampling time. Triplicate of culture are represented as a mean and error bars represent the standard deviations (n = 3).

### Metabolome dynamics of *M. aeruginosa* in response to salt treatment

The effects of salt, time and their interaction were investigated on the 382 metabolites obtained by the metabolomic analysis. While ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA) salt and time submodels were validated by a permutation test for both strains, ASCA salt-time interaction submodel was validated only for *M. aeruginosa* PCC 7806 metabolomic dataset (p-value = 0.41 for PCC 7820). The selection of significant features relative to salt, time and their interaction was performed based on the SPE and Leverage scores (Nueda et al. 2007). In PCC 7820, 22 and 42 metabolites were significantly affected by salt and time factors respectively (Figure 4). In PCC 7806, 32, 34 and 29 metabolites were significantly affected by salt, time and interaction factors respectively (Figure 5).

The heatmaps showing the relative abundances of all significantly salt-affected metabolites for PCC 7820 (Figure 4) and PCC 7806 (Figure 4) revealed that both specific and 17 common metabolites were impacted by salt (either under or overexpressed). PCC 7806 showed a greatest diversity of metabolites impacted by salt addition.

Adenosine was identified in both strains, based on HRMS/MS spectra by using the GNPS (Global Natural Product Social Molecular Networking) database (i.e. 8 peaks were shared and the similarity or cosine score was 0.99 while a value of 1 indicates identical spectra).

Sucrose was identified in PCC 7806 and its abundance was significantly impacted by the interaction of salt and time according to the ASCA submodel. In addition, sucrose was analyzed by gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID) and not detected in the control condition (i.e. below the detection limit). However, sucrose was quantified after 2 and 4 days of exposure at a salinity of 6.7 and 10.7. Accordingly, the accumulation of sucrose in PCC 7806 cells ranged between 50 and 150 fg.cell<sup>-1</sup> (Figure S3). By contrast, sucrose was neither detected in the metabolomic dataset nor by GC-FID in PCC 7820. Trehalose was identified in PCC 7820 but it was not significantly impacted by salt, time or their interaction according to ASCA model.

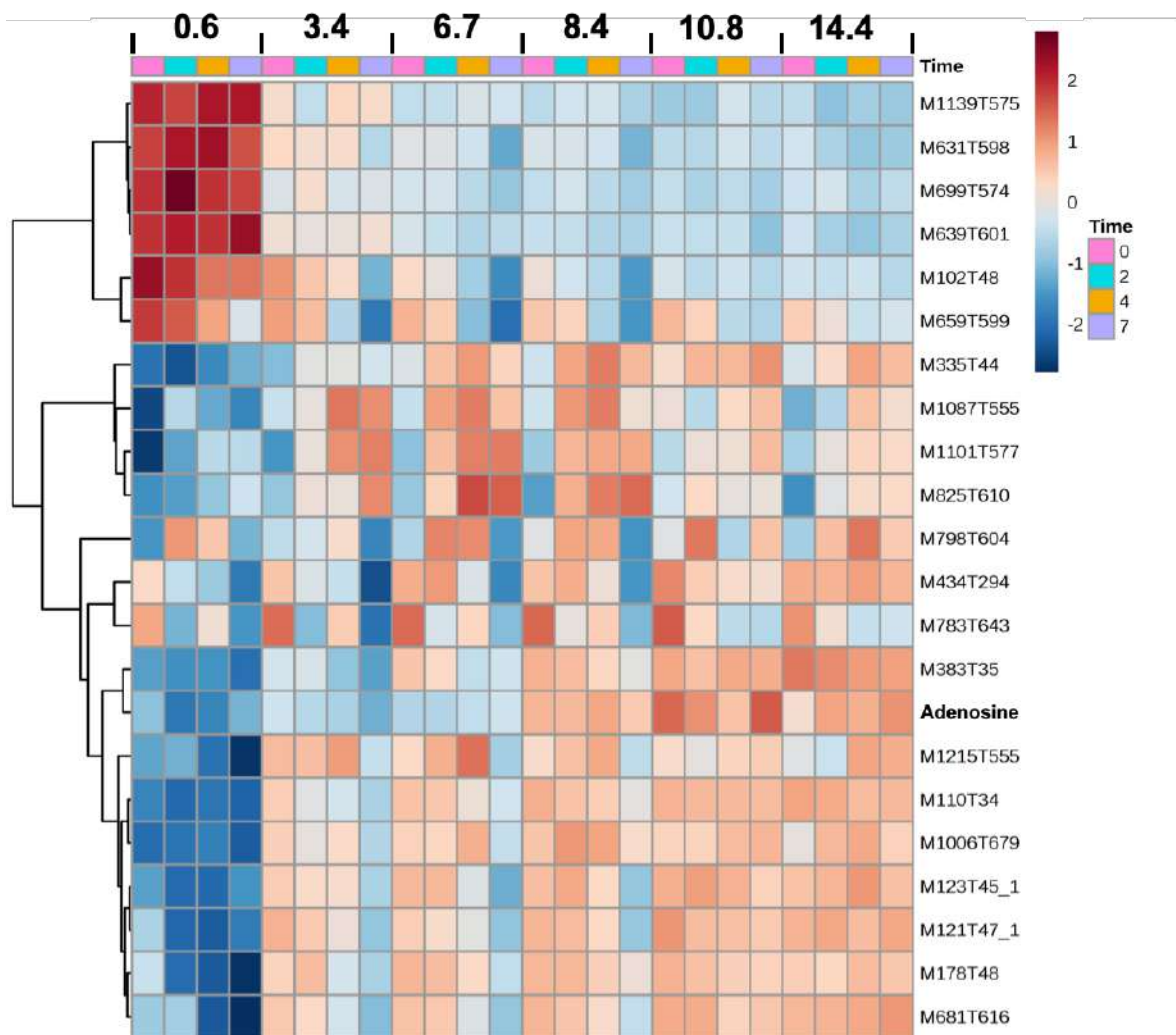


Figure 4: Heatmap of significantly salt-affected (salt and salt-time interaction) metabolites of *M. aeruginosa* PCC 7820. Data represented are means of triplicate. (M: mass; T: retention time).



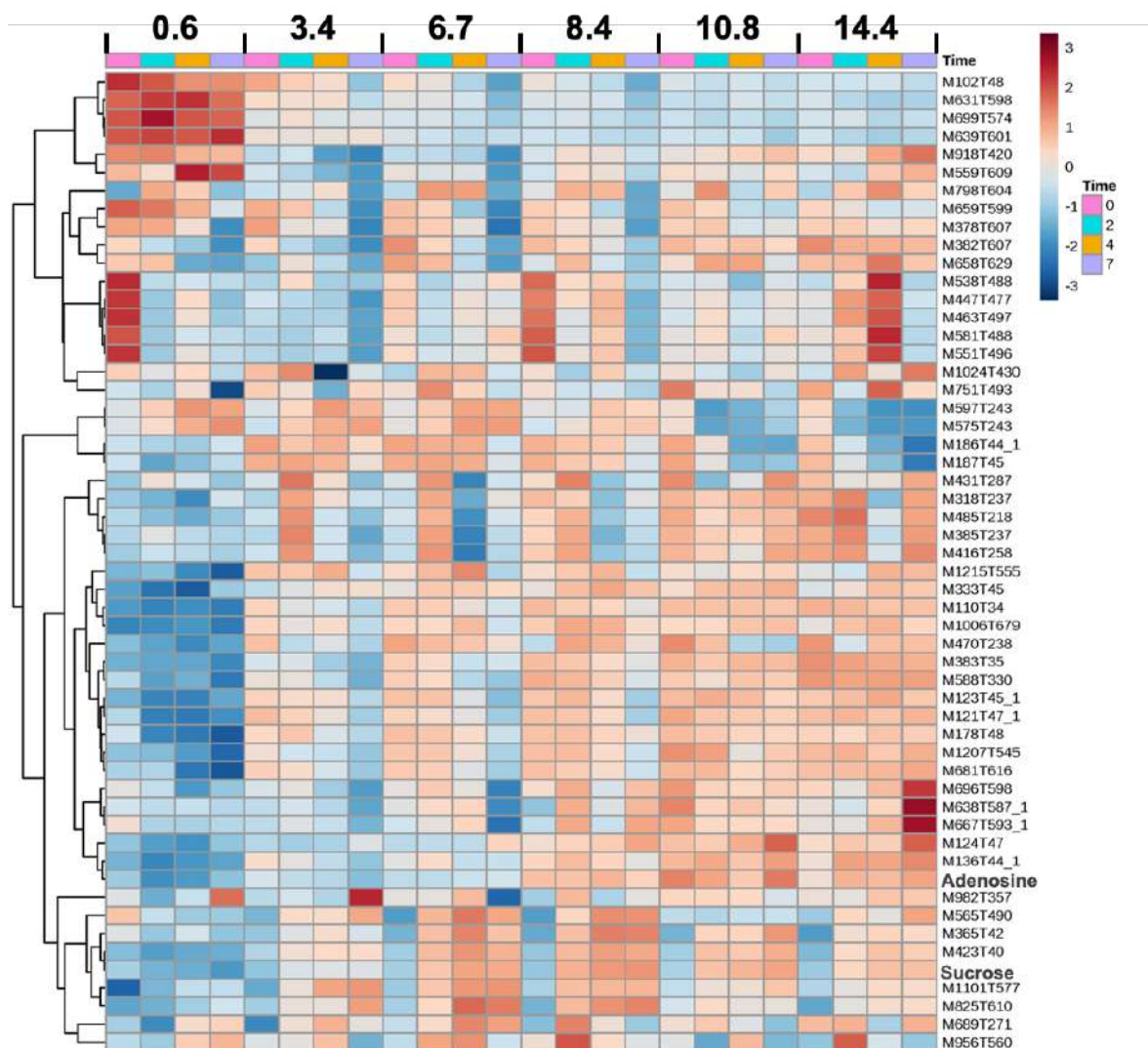


Figure 5: Heatmap of significantly salt-affected (salt and salt-time interaction) metabolites of *M. aeruginosa* PCC 7806. Data represented are means of triplicate. (M: mass; T: retention time).

### MC cellular quotas during salt shock

Five MC variants were quantified in *M. aeruginosa* PCC 7820 with cellular quotas ranges of between 14-39 fg.cell<sup>-1</sup> for MC-LR, 4.9-9.3 fg.cell<sup>-1</sup> for MC-LW, 2.4-4.8 fg.cell<sup>-1</sup> for MC-LF, 1.1-2.7 fg.cell<sup>-1</sup> for MC-LY and 0.9-2.9 fg.cell<sup>-1</sup> for dmMC-LR (Figure 6-A).

Two MC variants (MC-LR and dmMC-LR) were quantified in *M. aeruginosa* PCC 7806 with cellular quotas of 13-27 fg.cell<sup>-1</sup> for MC-LR and 4.7-7.7 fg.cell<sup>-1</sup> for dmMC-LR (Figure 6-B).

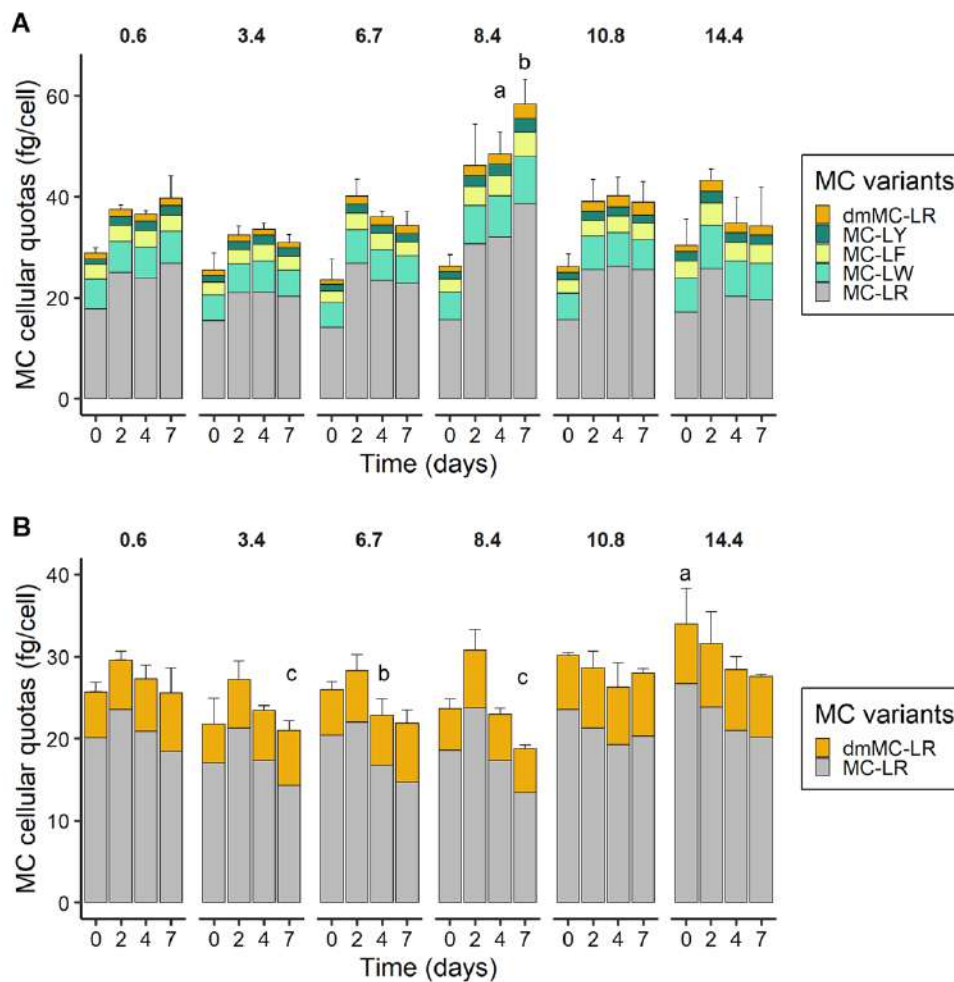


Figure 6: Microcystin cellular quotas over time and salinities for *M. aeruginosa* PCC 7820 (A) and PCC 7806 (B). Error bars represent the standard deviations (n = 3). Letters indicate significant differences between each salt treatment and the control condition (one-way ANOVA and Dunnett's test on salinity treatments at each respective time point).

For PCC 7820, statistically significant effects (one-way ANOVA,  $p$ -value < 0.05) of salinity were obtained only on days 4 and 7 between the control condition and a salinity of 8.4 (Figure 6A). Concerning PCC 7806, the total MC cellular quota was significantly different (one-way ANOVA,  $p$ -value < 0.05) from the control on day 0 at salinity 14.4, on day 4 at salinity 6.7 and on day 7 at salinities 3.4 and 8.4 (Figure 6B).

The relative contribution of each MC variant to the total MC profiles revealed a relative stability of MC ratios over time and salinities for both strains (Figure 7).

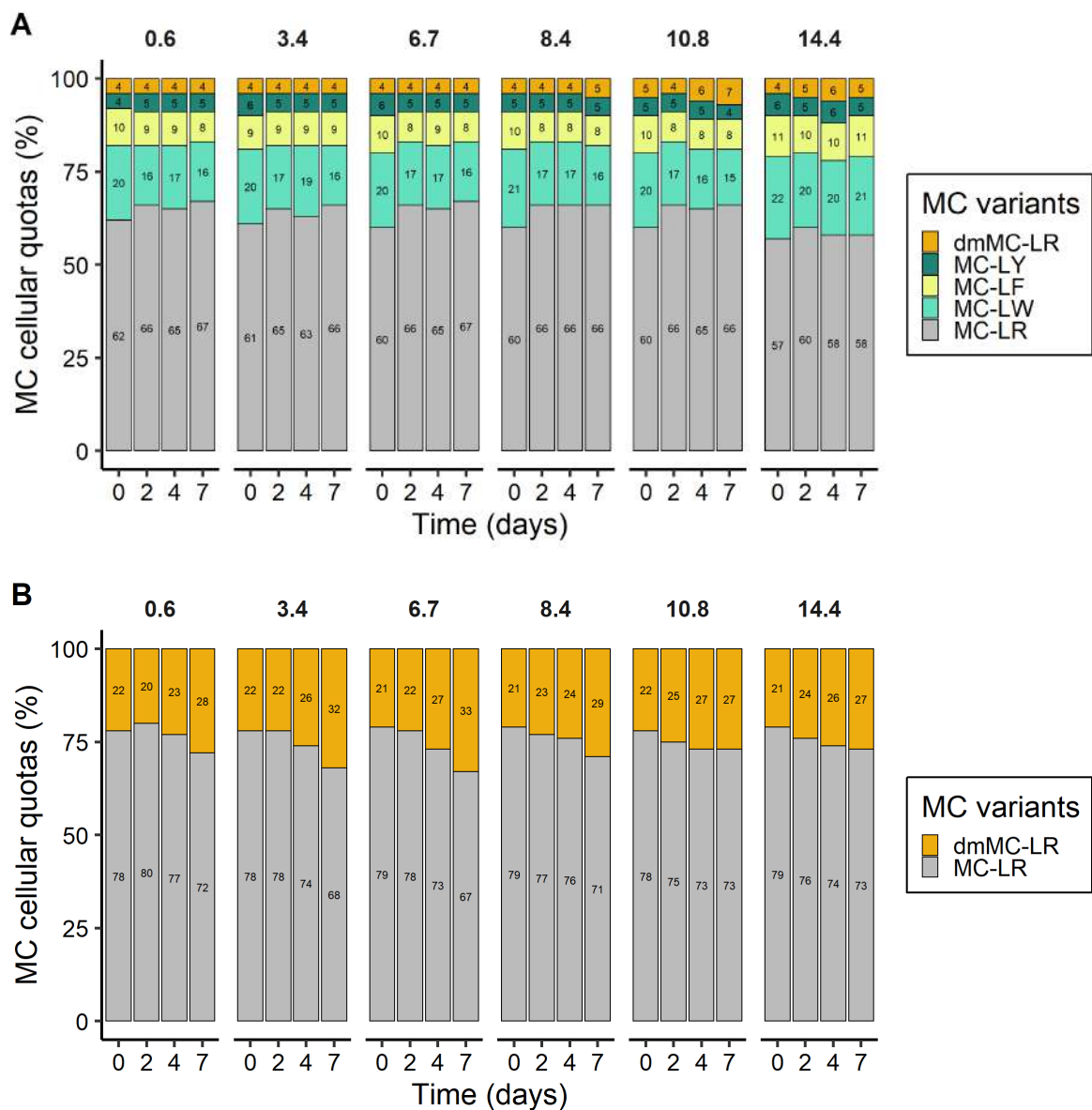


Figure 7: MC cellular quotas over time and salinities expressed as the percentage of each variant relative to the total amount of MCs per cell for *M. aeruginosa* PCC 7820 (A) and PCC 7806 (B).

Irrespective of salinity and time, MC variant proportions for *M. aeruginosa* PCC 7820 represented 60/20/10/5/5% for MC-LR/-LW/-LF/-LY/dmMC-LR respectively (Figure 8-A). Concerning, *M. aeruginosa* PCC 7806, MC-LR/dmMC-LR proportions represented 75/25% of the MC profile (Figure 8-B).

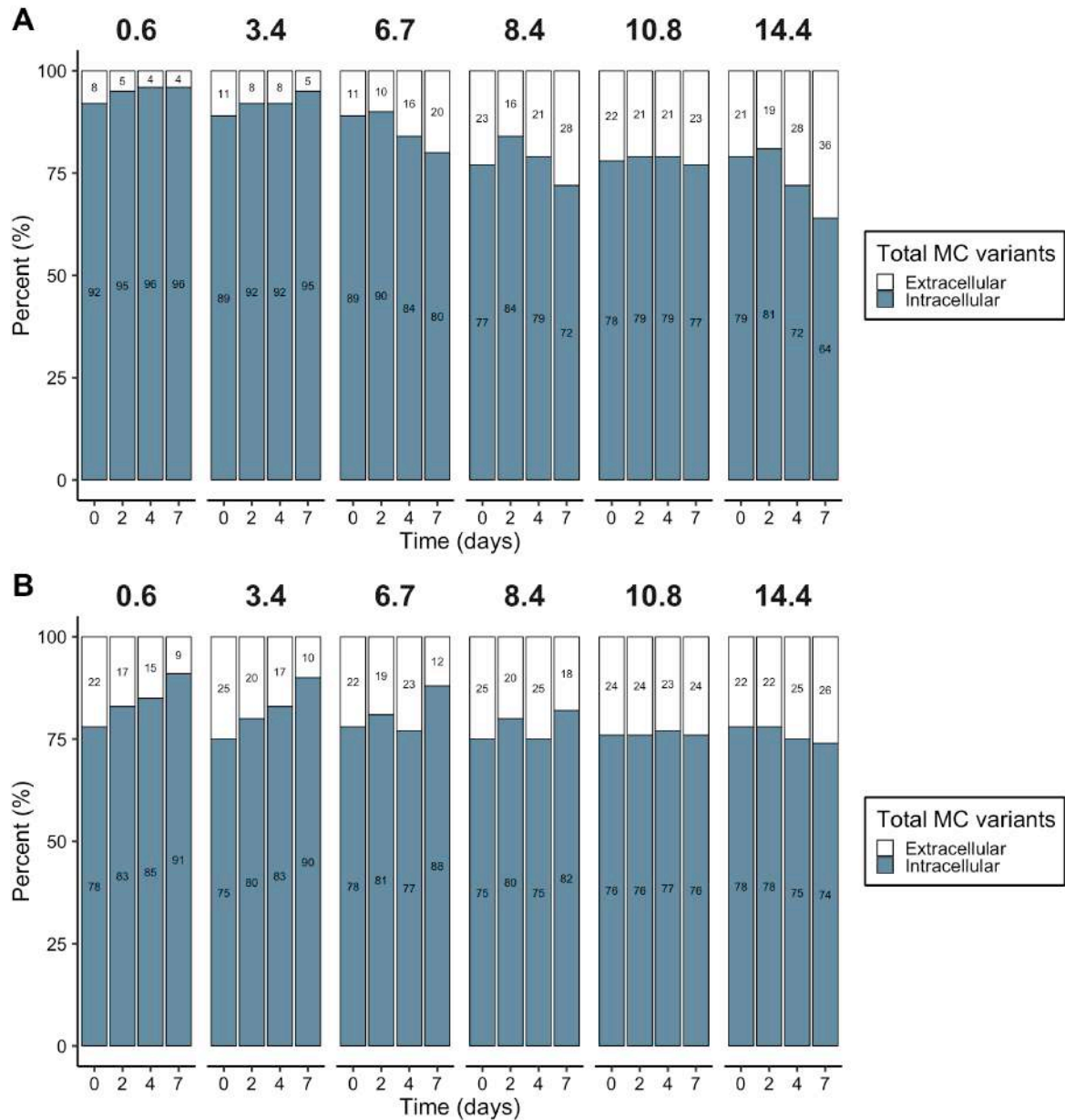


Figure 8: Intracellular and extracellular MC proportions over time for each salinity for *M. aeruginosa* PCC 7820 (A) and PCC 7806 (B).

The proportion of extracellular MCs in *M. aeruginosa* PCC 7820 decreased in the control and at salinity 3.4, from  $8.4 \pm 0.90\%$  to  $3.7 \pm 0.50\%$  and  $11 \pm 2.4\%$  to  $5.2 \pm 0.30\%$  between 0 and 7 days, respectively (Figure 8-A). At higher salinities, the proportion of MCs in the medium increased with both salinities and time and the maximum was reached at salinity 14.4, with an increase from  $21 \pm 1.9\%$  to  $36 \pm 2.4\%$  between 0 and 7 days (Figure 8-A). In the strain *M. aeruginosa* PCC 7806, the proportion of extracellular MCs decreased over time at salinities below 8.4 (Figure 8-B). At a salinity of 10.8, the extracellular MC fraction remained stable at  $24 \pm 1.1\%$  over time. For the highest salinity, a slight increase in extracellular MCs was noted from  $22 \pm 3.0\%$  to  $26 \pm 2.6\%$  (Figure 8-B).

The MC production rate was calculated for all MC variants over the growth period and plotted against the calculated growth rate over the same time period. For each variant and both strains, the growth rate and MC production rate were significantly correlated according to the Pearson correlation test (p-values < 0.05) (Figure S2-AB).

## Discussion

The impact of a salt shock was investigated using different approaches on two strains of *M. aeruginosa* isolated from contrasted environments, respectively fresh and brackish waters for PCC 7820 and PCC 7806. The main consequence of salt stress, for both strains, was first a decrease of photosynthetic activity, as a precursor of the salinity dependent-decreased growth. These two strains exhibited distinct salt tolerances and PCC 7820 isolated from freshwater was less tolerant to salinity compared to the brackish water isolated strain PCC 7806. Above a salinity of 3.4, the growth rate of PCC 7820 significantly decreased while above a salinity of 6.7 the growth rate became negative evidencing cell mortality. Conversely, no negative growth rate was found for the strain PCC 7806, irrespective of salt treatments (i.e. up to salinity 14.4). However, the growth rate was significantly decreased above a salinity of 6.7. The results obtained here for the strain PCC 7820 corroborates a previous study on relatively salt sensitive strains (Zhang et al. 2013). Regarding the strain PCC 7806, the results are in agreement with previous findings on the same strain with a similar experimental setup (Black et al. 2011, Martín-Luna et al. 2015) and closed to the salinity upper limit of 15 observed by Tonk et al. (2007). Nevertheless, both strains may cope with higher salinity when slowly acclimated (PCC 7820 : 7.5 ; PCC 7806 : 16.9) as observed in a previous experiment Georges des Aulnois et al. (2019). Hence, our results are in agreement with Ross et al. (2019) and lead us to consider the salt tolerance range of *M. aeruginosa* corresponding to the mesohaline zone in estuarine ecosystems (Mitsch and Gosselink 2000).

Differences in salt tolerance were also investigated through the relative quantification of targeted gene expressions. Here, the relative gene expressions of *sod* and *groEL* suggested the induction of an oxidative stress in both strains. Indeed, the addition of salt above a salinity of 7 is responsible for oxidative stress in *M. aeruginosa* strain LB 2385 (Ross et al. 2019) and these two genes have been already shown to be overexpressed in response to sulfate addition for *sod* (Lei Chen et al. 2016) and limiting growth conditions for *groEL* (Wei et al. 2016). Both *sod* and *groEL* expressions showed an intraspecific variability in response to salt addition between the two strains. At the highest salinity, patterns of expression of the two strains showed a different response to salt addition. An overexpression of *sod* and *groEL* genes only occurred in

the more salt tolerant strain *M. aeruginosa* PCC 7806 as previously show in the salt tolerant genus *Synechocystis* (Sinetova and Los 2016).

Consequently, the photosynthetic activity of the two strains was impacted as revealed by the fast downregulation of *psaA* and *psbC* that encode proteins belonging to photosystem I and II respectively. These results confirmed the negative impact of salts on the photosynthetic activity of cyanobacteria like *M. aeruginosa* (Adhikary 2005, Ross et al. 2019). This downregulation of *psaA* and *psbC* could be the consequence of osmotic effects. Indeed, Allakhverdiev and Murata (2008) showed that NaCl addition was responsible for a decrease in photosystems activity due to accumulation of Na<sup>+</sup> in the cytosol ultimately resulting in extrinsic protein dissociation from the photosystems. The decrease of F<sub>V</sub>/F<sub>M</sub> values also suggested perturbation of the photosynthetic activity in the cells which could be related to a change of photosystems stoichiometry in response to salt stress (Lu and Vonshak 2002, Adhikary 2005). Altogether, these studies showed differences in salt tolerance of *M. aeruginosa* which could be related to the origin of the strains (Sandrini et al. 2015a) and specific adaptation involving horizontal gene transfer (Guljamow et al. 2007, Tanabe et al. 2019). Further investigation on specific gene expression should be conducted to investigate the different mechanism involved to cope with salt variation in *M. aeruginosa*.

The metabolomic approach represents a useful tool to study the cell response to salt stress. Indeed, metabolomics provide a metabolic fingerprint showing the ultimate salt response of *M. aeruginosa* by analyzing simultaneously the relative expression of hundreds of metabolites (Schwarz et al. 2013). The metabolomes of the two strains were impacted by salt addition which suggests a modification of diverse cellular function in salt stress cells as reported by Hagemann (2011). In this experiment it was possible to distinguish the metabolic fingerprint of the two strains thanks to the relative abundances of specific metabolites that were significantly impacted by salinity, time and their interaction. Indeed, as for adenosine accumulation in response to increasing salinities, 16 other common metabolites were significantly impacted by salt stress in the two strains. Similarly to transcriptomics (Sinetova and Los 2016), this metabolomic approach highlighted putative biomarkers of salt stress. Unfortunately, the main difficulty is the identification of these metabolites (Schwarz et al. 2013). A higher number of metabolites impacted by salt stress were found in *M. aeruginosa* PCC 7806 suggesting that the higher salt tolerance of this strains is related to the accumulation

of a greater diversity of compounds. In particular, as previously found in salt shock, the strains *M. aeruginosa* PCC 7806 synthesizes and accumulates sucrose in response to salt increase (Kolman and Salerno 2016). In the first hours after the stress, an increase of *spsA* and *sppA* gene expressions were observed showing that sucrose synthesis is a highly dynamic process after the occurrence of salt stress (Hagemann 2011, Kolman and Salerno 2016). Sucrose is not only accumulated in *M. aeruginosa* as a response to salt shock but also as a long term response in salt tolerant strains (Tanabe et al. 2018, Georges des Aulnois et al. 2019). Despite the fact that trehalose was identified in *M. aeruginosa* PCC 7820, it was not significantly accumulated in response to salt stress contrary to what we previously found with acclimated culture (Georges des Aulnois et al. 2019). Given the smaller amount of cells extracted here compared to our previous experiment, this results could be related to a too small abundance of trehalose quantified in the samples to detect significant results. Surprisingly, no monogalactosylglycerol metabolites were identified in this salt shock experiment while several were found on both acclimated *M. aeruginosa* PCC 7820 and 7806. It may be assumed that accumulation of glycolipids is a marker of acclimation to brackish condition in *M. aeruginosa*. Further investigations should be conducted to identify these metabolites and confirmed that they are specific biomarkers of salt stress in *M. aeruginosa* but this hypothesis requires further investigation.

Under routine culture conditions, MCs remained mostly intracellular until cell lysis and its production is considered to be constitutive (Rohrlack and Hyenstrand 2007). Hence, variations in MC production and the associated cellular quotas are more likely related to the indirect impact of abiotic and biotic factors on cell growth (Orr et al. 2018). For example, a strong correlation was found between MC production and *M. aeruginosa* growth rates in response to nitrogen and phosphorus limitations (Oh et al. 2000, Long et al. 2001). An indirect impact of salinity on MC production through altered growth was also found on *M. aeruginosa* PCC 7820 and PCC 7806 acclimated to different salinities (Georges des Aulnois et al. 2019). Herein, a salt shock experiment also resulted in a reduction in the growth rate correlated to a reduction in MC production rate. Relatively stable MC cellular quotas (i.e. total and for each MC variants) were found irrespective of the salt treatments and *M. aeruginosa* strains. The release of MCs in the surrounding medium occurred when the salt tolerance of *M. aeruginosa* PCC 7820 and PCC 7806 were surpassed, as previously shown for the *M.*



*aeruginosa* strain LB 2385 (Ross et al. 2019) and natural bloom samples (Orr et al. 2004). Altogether, our results suggested that salt treatment did not impact the synthesis and/or release of a specific MC variant.

Salt shock induced an oxidative stress in *M. aeruginosa* resulting in accumulation of reactive oxygen species and lipid peroxidation (Ross et al. 2019). One of the suggested intracellular functions of MCs is to protect the cells against oxidative stress by binding to cysteine residues on redox sensitive proteins, under high irradiance stress (Zilliges et al. 2011, Meissner et al. 2013) and limiting growth conditions (Wei et al. 2016). Nevertheless, this study did not find strong variations in MC free fractions which could have been attributed to a protein binding process. Further investigations should be conducted on the MC bound fraction during salinity variation. Together with other studies of salt impact on MC production (Orr et al. 2004, Tonk et al. 2007, Georges des Aulnois et al. 2019, Ross et al. 2019), this laboratory experiment study suggests that bloom toxicity during a transfer from freshwater to marine continuum may not be increased by the production of MCs. This assessment raises the question of the selection of toxic or nontoxic phenotypes in response to salt stress as the main reason for toxicity variation of natural bloom, as already been shown for several environmental factors (Orr et al. 2004, Briand et al. 2009, Wood et al. 2017).

## Supplementary

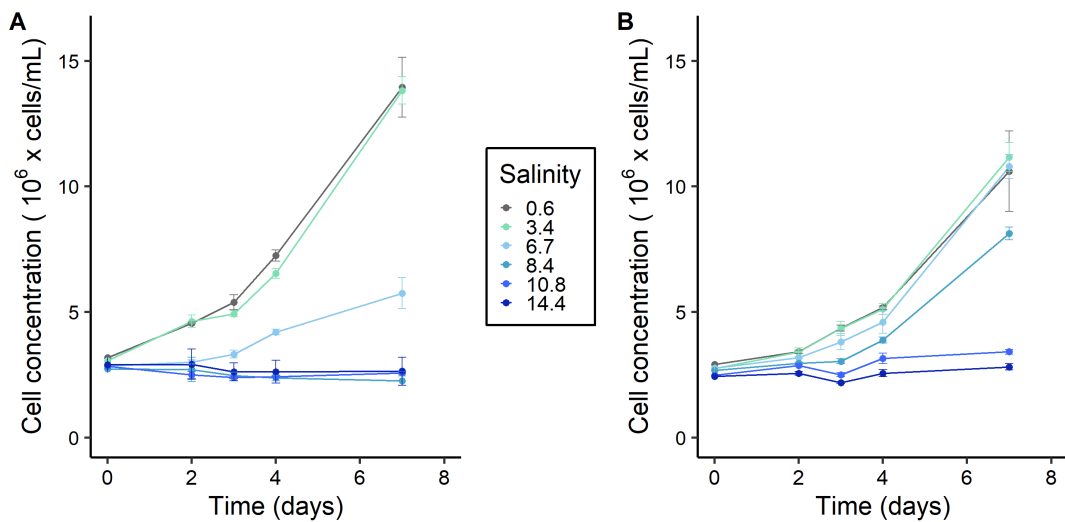


Figure S1: Cell concentrations over time after salt treatments for *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 (A) and PCC 7806 (B). Triplicate of culture are represented as mean and error bars represent the standard deviation.

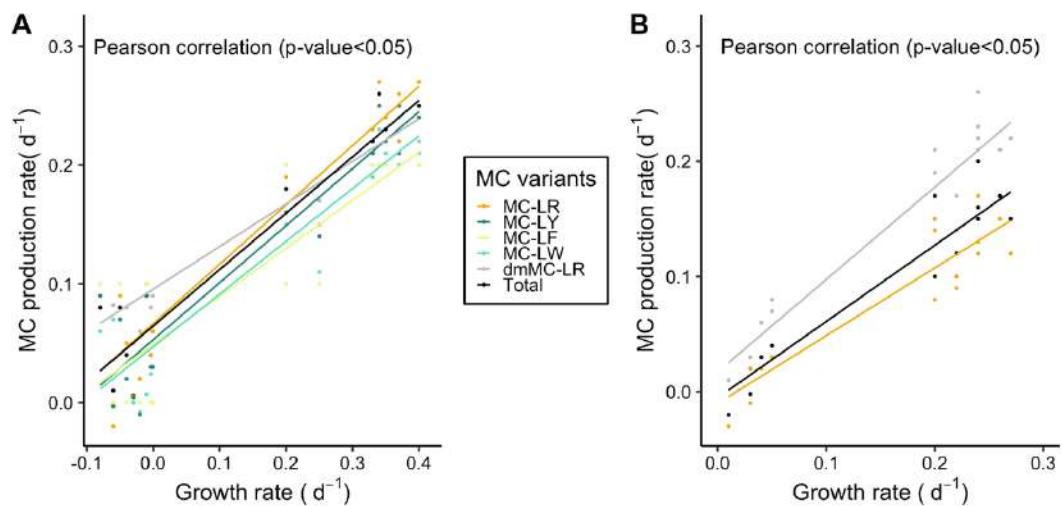


Figure S2: Linear regression between growth rates and MC production rates for *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 (A) and PCC 7806 (B). For both strains and all variants, the Pearson correlation was significant with a  $p$ -value  $< 0.05$ . The “Total” regression curve indicates the linear regression when all of the MC variants were pooled to calculate the MC production rate.

Sucrose was extracted in ethanol then evaporated and rehydrated. In order to have a sufficient amount of cells to extract, the cell pellets obtained from triplicate of cultures were pooled before the extraction (for the salinity 0.6, 6.7 and 10.8). After derivatization, the sucrose was analyzed by gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID) as described by Adams et al. (1999). Analyses were conducted on a GC system (model HP – 6890, Hewlett-Packard) equipped with a CP8008 precolumn (Ret Gap, 2.5 m x 0.32 mm, Agilent Technologies) and a CP-Sil 5 CB capillary column (60 m x 0.32 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ , Agilent). Flow rates for air and H<sub>2</sub> for the FID were 400 and 40 mL.min<sup>-1</sup> respectively. Sucrose CAS [57-50-1] (Sigma-Aldrich) was used as standard and myo-inositol as internal standard to determine concentrations.

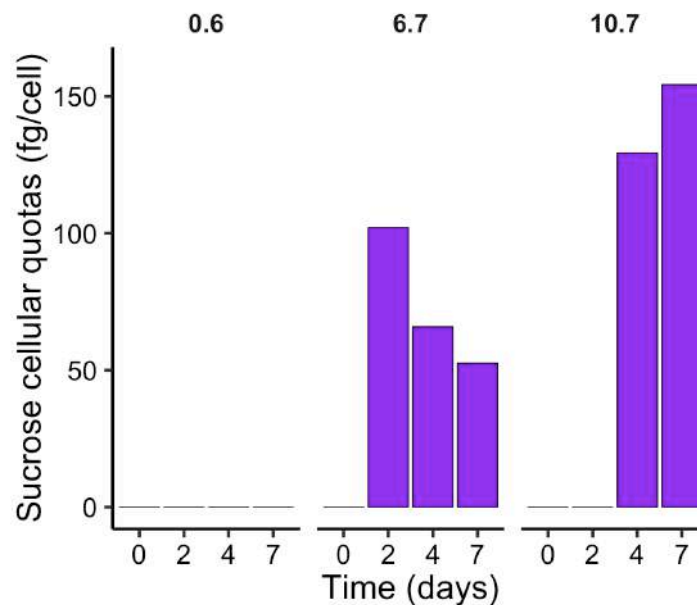


Figure S3: Sucrose cellular quotas over time and salinities for *M. aeruginosa* PCC 7806.



# Conclusion et perspectives



Ce projet de thèse avait pour objectif d'étudier les effets de variations de salinité sur les réponses physiologiques et métaboliques de *M. aeruginosa* dans un contexte de transfert en milieu estuarien. C'est pourquoi les effets d'une augmentation de salinité ont été étudiés chez deux souches de *M. aeruginosa* soumises à un choc salin d'une part et acclimatées à un gradient croissant de salinité d'autre part. L'effet d'un stress a également été étudié sur des échantillons prélevés dans l'environnement et susceptibles d'être transférés en milieu estuarien. Les objectifs de la thèse étaient donc :

- La mise au point d'une méthode d'analyse des MC intracellulaires et dissoutes par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse appliquée à la matrice eau de mer et à l'analyse de ces composés dans des cultures conduites au laboratoire.
- L'étude des limites de tolérance à la salinité chez deux souches de *M. aeruginosa* provenant de milieux présentant des salinités contrastées.
- L'étude de l'impact d'une augmentation de la salinité sur la production, la diversité et l'excrétion de différents analogues de MC produits par *M. aeruginosa*.
- La caractérisation de mécanismes impliqués lors d'une augmentation de la salinité par l'approche métabolomique.

Cette partie conclusion et perspectives est donc l'occasion de revenir sur les différents résultats acquis au cours de cette thèse, de les replacer dans l'état des connaissances actuelles et de proposer différents points à approfondir.

## Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse des MC en milieu salin

Dans un contexte de transfert d'efflorescences de *Microcystis* spp. en milieu estuarien, ce projet de thèse a permis de développer et de caractériser une méthode d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse de neuf analogues de MC et de la nodularine. Cette méthode a été développée afin de permettre le dosage de ces cyanotoxines dans des échantillons d'eau douce et d'eau de mer, mais également dans des cellules prélevées en milieu salin.

### Analyse des MC intracellulaires

Cette méthode permet l'analyse des MC dans des échantillons de cyanobactéries cultivées en laboratoire et prélevés dans l'environnement. La sensibilité de la méthode est bonne et similaire à ce qui est décrit dans la littérature pour les mêmes combinaisons analogues-matrices (Turner et al. 2018). L'étude de la répétabilité intra-jour et inter-jour a démontré que les résultats obtenus avec cette méthode étaient reproductibles au cours du temps. Ainsi, comme le temps d'analyse dure onze minutes par échantillon, l'analyse d'un grand nombre d'échantillons est possible sur plusieurs jours consécutifs. L'étude de la répétabilité de l'analyse et de la stabilité des échantillons sur une échelle de temps plus longue (plusieurs semaines, mois) devra faire l'objet d'expérimentations supplémentaires.



Par ailleurs, l'approche métabolomique réalisée sur *M. aeruginosa* PCC 7820 et PCC 7806 cultivées à différentes conditions de salinité a permis de mettre en évidence que les souches présentaient des empreintes métaboliques distinctes. De plus, la salinité modifie significativement le métabolome de *M. aeruginosa*. Ces résultats laissent supposer l'existence de potentiels effets matrices dépendants des souches et de la salinité qui peuvent altérer les performances de la méthode d'analyse. Dans le but de corriger les résultats obtenus en tenant compte de ces effets matrices, il est possible de réaliser une gamme dans la matrice étudiée ou d'utiliser des étalons internes tels que les MC deutérées ou (Järvenpää et al. 2007). En effet, les étalons internes marqués à l'aide d'isotopes stables présentent une stabilité et une réponse aux effets matrices proches des composés ciblés au cours du processus de préparation et d'analyse des échantillons (Altaner et al. 2019, Haddad et al. 2019). Leur utilisation est donc conseillée afin de réduire les incertitudes de mesures liées aux effets matrices.

Dans les matrices biologiques, une partie plus ou moins importante des MC peut se lier aux protéines ce qui se traduit par la présence de MC sous deux formes : libre et liée (Jüttner and Lüthi 2008, Meriluoto et al. 2016). La méthode d'analyse chimique en LC-MS/MS utilisée ne peut doser que la forme libre. Par conséquent, les MCs liées aux protéines n'ont pas pu être analysées au cours des expérimentations réalisées. Le développement d'une méthode d'extraction adaptée aux MCs liées permettrait d'étudier la part de cette forme de MCs chez *M. aeruginosa* en réponse à une augmentation de la salinité. À ce jour, il est possible de doser indirectement la fraction totale des MC (libres et liées) par l'analyse du MMPB (acide 3-methoxy-2-methyl-4-phenylbutyrique) obtenue suite à l'oxydation du fragment Adda commun à l'ensemble des MC (Meriluoto et al. 2016). Cette analyse reste cependant laborieuse et coûteuse. Une autre approche plus indirecte consiste à doser les MC liées aux protéines par l'analyse des fractions protéiques (Meissner et al. 2013).

## Analyse des MC dissoutes

La présence de sel dans les échantillons d'eau complexifie l'analyse des MC par analyse directe par le système analytique comme il est possible de le faire avec des échantillons d'eau douce (Turner et al. 2018). Afin de pouvoir être analysées, les MC dissoutes dans des échantillons d'eau de mer doivent être purifiées au préalable (Mashile and Nomngongo 2016). De plus, par effet de dilution, les MC dissoutes sont généralement présentes uniquement à l'état de trace dans les échantillons d'eau. Il est donc nécessaire d'appliquer une étape de concentration et de purification des MC dissoutes afin de pouvoir les détecter et les quantifier. Il existe 3 techniques différentes permettant de concentrer et de purifier les MC dissoutes. L'extraction liquide-liquide est possible, mais peu employée pour l'analyse des MC dissoutes (Mashile and Nomngongo 2016). Notre étude a permis de tester les deux autres techniques, la concentration sur phase solide (SPE) et l'échantillonnage passif (SPATT). La SPE est une technique qui permet une analyse quantitative d'un échantillon prélevé à un endroit et un temps donné. À l'inverse, le SPATT est un dispositif non quantitatif qui permet d'analyser la présence des MC sur une échelle de temps continue dans un environnement donné. Pour ces deux méthodes de concentration des MC dissoutes, l'effet de la présence de sel dans l'eau a été évalué sur différents types de résines.

Les tests conduits sur les cartouches SPE ont permis de déterminer que les cartouches de types C18 permettaient d'obtenir des rendements compris entre 80 et 120% indépendamment de la présence de sel dans les échantillons, ce qui n'a pas été le cas des cartouches polymériques de type HLB, les rendant inappropriées à une extraction des MC dans des échantillons d'eau saumâtre. La méthode d'extraction des MC dissoutes dans l'eau a été effectuée sur des échantillons de faibles volumes (15 mL) pour pouvoir être utilisée sur des cultures conduites en laboratoire. Afin d'appliquer cette méthode de concentration sur des échantillons naturels, il est nécessaire d'adapter la méthode sur des cartouches de plus grandes capacités afin de permettre l'analyse des MC sur des échantillons de volume plus important adaptés aux prélèvements in situ (> 500 mL).

Le développement d'échantillonneurs passifs de type SPATT a montré que la résine Strata-X était moins sensible à la présence de sel que la résine HP20. Cependant, les rendements obtenus au cours de ces expérimentations demeurent inférieurs à ceux décrits dans la littérature (Kudela 2011, Zhao et al. 2013). Des études

supplémentaires devraient être menées afin d'améliorer les rendements obtenus avant un déploiement sur le terrain.

Enfin, le transfert des cyanobactéries toxiques d'eau douce vers le milieu estuarien ne concerne pas uniquement le genre *Microcystis*. En effet, l'ensemble des genres de cyanobactéries toxiques sont potentiellement concernés par ce phénomène de transfert. Il apparaît donc nécessaire de développer des méthodes de purifications, d'extractions et d'analyses pour l'ensemble des cyanotoxines décrites à ce jour (Meriluoto et al. 2016).

# Réponses physiologiques de *M. aeruginosa* face à une augmentation de la salinité

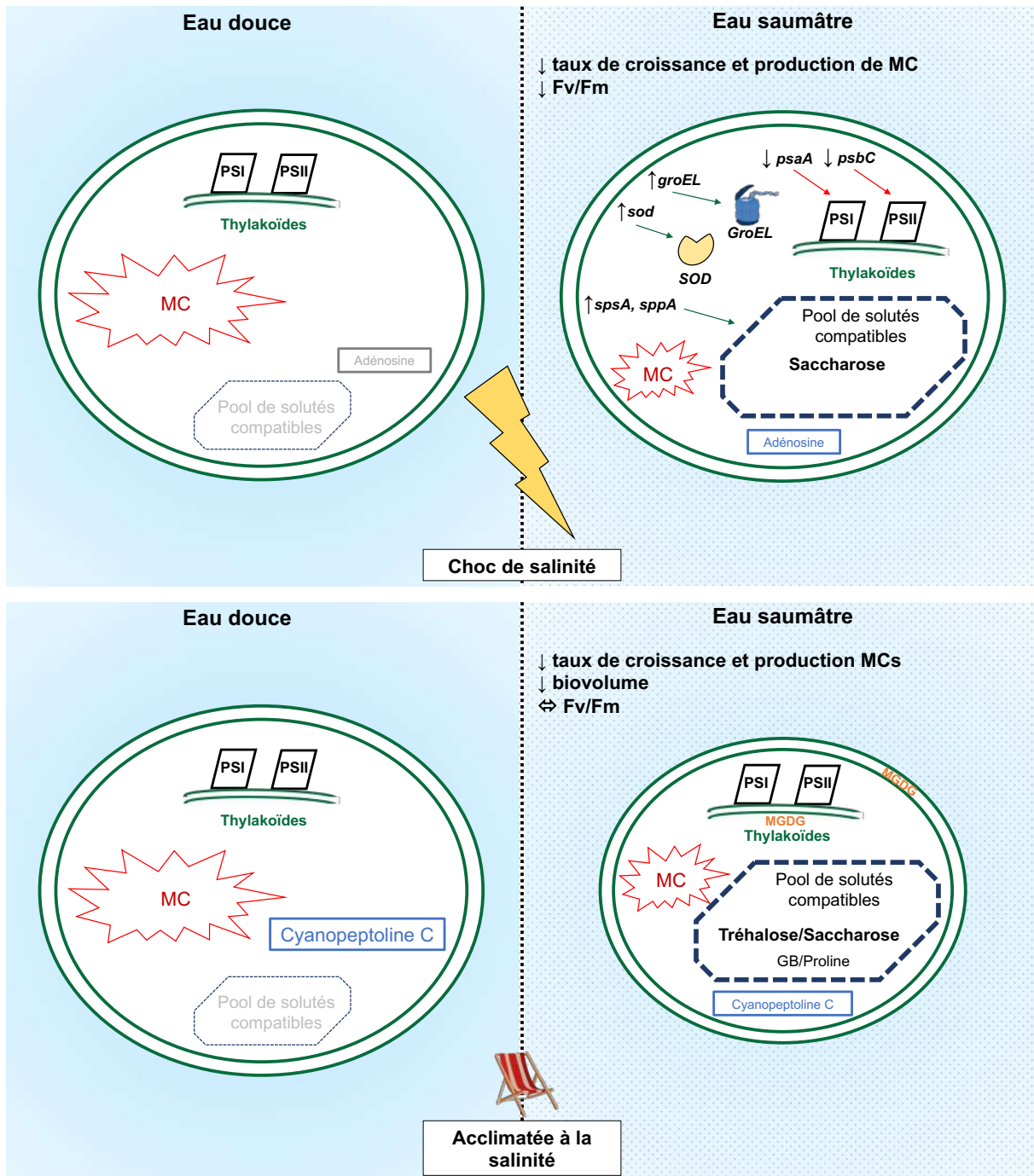


Figure 1 : Schéma bilan illustrant les différents mécanismes cellulaires identifiés au cours de cette thèse chez *M. aeruginosa* soumise à un stress salin (A) et acclimatée à un gradient de salinité (B) (MC : microcystines ; PSI : photosystème I ; PSII : photosystème II ; MGDG : monogalactosyldiacylglycérol).

## Impact de la salinité sur la production de MC, le profil toxinique et la toxicité des efflorescences de *M. aeruginosa*

Dans un contexte de transfert en milieu estuarien, la présence de *Microcystis aeruginosa* et de MC représente un risque pour les organismes exposés et les populations humaines. Cette étude a permis d'étudier l'effet d'une élévation de salinité sur la production de différents analogues de MC chez *M. aeruginosa*. En effet, jusqu'à présent les études menées sur cette question n'ont pas porté sur la quantification des MC (Reed and Walsby 1985, Bartolomé et al. 2009, Zhang et al. 2013, Melero-Jiménez et al. 2019), ou n'ont pu exprimer la quantité de MC qu'en équivalent MC-LR (Tonk et al. 2007, Mazur-Marzec et al. 2010, Black et al. 2011, Chen et al. 2015, Martín-Luna et al. 2015, Tanabe et al. 2018, Ross et al. 2019). Ces travaux de thèse ont notamment permis d'étudier l'effet de la salinité sur différents analogues de MC produits par *M. aeruginosa*. En effet, dans la mesure où la toxicité des MC diffère en fonction des analogues (Buratti et al. 2017), l'étude de l'impact de la salinité sur la production de différents analogues a permis de mieux appréhender le risque sanitaire en cas de transfert en milieu estuarien. Cependant, nos travaux montrent qu'en réponse à des changements de salinité, les profils toxiniques ne sont ni modifiés qualitativement, ni dans leurs proportions relatives. En effet, seules les quantités totales de MC varient. Ainsi, en accord avec Orr et al. (2018), une augmentation de salinité diminue la quantité de MC par cellule principalement au travers d'une réduction du taux de croissance des cellules.

Au niveau moléculaire et de la voie de biosynthèse des MC, seule l'expression du gène *mcyD* codant pour une PKS a été étudiée. Les travaux réalisés dans la littérature ont révélé une inhibition de l'expression du gène après un choc salin (S, 8,5) (Martín-Luna et al. 2015) et (S, 14,5) (Kaebernick et al. 2000). Cependant, Ross et al. (2019) n'ont pas trouvé de différence d'expression de ce même gène au cours d'une expérience de stress salin entre le contrôle et les différentes salinités testées (S, 3, 7 et 10). Ainsi, il existe encore trop peu d'études portant sur l'expression des gènes (cluster *mcyA-J*) impliqués dans la synthèse des MC en réponse à une augmentation de la salinité. Des études complémentaires sur l'expression de ces gènes devraient permettre d'approfondir l'effet potentiel de la salinité sur la voie de biosynthèse des MC.

Comme l'ont montré les travaux de (Ross et al. 2019), un stress salin est à l'origine d'un stress oxydant pour les cellules de *M. aeruginosa* (Hagemann 2011). Au cours de l'expérience de stress (Chapitre 3) réalisée lors de cette thèse, une diminution du  $F_V/F_M$  couplée à l'inhibition de l'expression des gènes *psaA* et *psbC*, ainsi qu'une surexpression des gènes *sod* et *groEL* suggèrent également un stress oxydant chez les souches étudiées (Figure 1). Or, dans la mesure où il a été démontré que la part des MC liées aux protéines augmente, en réponse à un stress oxydant chez *M. aeruginosa* (Zilliges et al. 2011, Wei et al. 2016), il est probable que la salinité puisse également affecter la part des MC liées aux protéines. La vérification de cette hypothèse permettrait de caractériser davantage l'impact d'une augmentation de la salinité sur la production de MC chez *M. aeruginosa*.

Enfin, la diversité des métabolites secondaires chez *M. aeruginosa* ne se limite pas aux MC (Meriluoto et al. 2016). Au cours des expériences réalisées, seule la cyanopeptoline C a été identifiée comme un métabolite affecté par la salinité. Bien que leur rôle ne soit pas clairement défini, certaines études suggèrent que l'absence de certains métabolites secondaires pourrait être compensée par la synthèse d'autres métabolites secondaires (Briand et al. 2016). Des études complémentaires basées sur la diversité et l'analyse d'autres métabolites secondaires produits par *M. aeruginosa* pourraient être conduites afin d'identifier un potentiel rôle de ces composés dans la réponse à un stress salin.

En ce qui concerne les autres genres de cyanobactéries producteurs de MC pouvant être transférés en milieu estuarien, très peu de données sont disponibles sur l'effet de la salinité et ses conséquences sur la production de MC. En effet, une seule étude a été réalisée chez *Planktothrix agardhii* alors que le transfert de *Planktothrix* spp. a été décrit au Portugal, en Italie et en France (Rita et al. 2014, Churro et al. 2017, Bormans et al. 2019). Cette étude décrit comme chez *M. aeruginosa* un maintien de la production de MC entre 0 et 15 g.L<sup>-1</sup> de NaCl (Vergalli et al. 2019). Pour le genre *Dolichospermum*, à l'origine d'efflorescences régulières en mer Baltique, Brutemark et al. (2015) ont rapporté une augmentation de la quantité de MC par cellule aux salinités les plus élevées (S, 6) tandis que les données de terrain sembleraient montrer que la salinité (S, 6) diminue la croissance et la production de MC (Engström-Öst et al. 2011). Face à un nombre restreint d'études et de données, il semble nécessaire d'approfondir nos connaissances à d'autres espèces de cyanobactéries potentiellement toxiques.

Ces études permettront de mieux comprendre leurs seuils de tolérance et leurs réponses physiologiques à la salinité afin de mieux appréhender le risque de contamination des milieux salins.

### Toxicité des efflorescences de *M. aeruginosa* dans un contexte de transfert en milieu estuarien

La toxicité des efflorescences ne dépend pas uniquement de la quantité de toxines produites par cellule, mais également de la part des phénotypes toxiques et non toxiques présents au sein des efflorescences (Briand et al. 2009, Sabart et al. 2010, Wood et al. 2017).

En effet, diverses études mettant en compétition des souches toxiques et leurs mutants non toxiques en réponse à un stress, ont rapporté des réponses physiologiques contrastées pour divers types de facteurs testés (Kaplan et al. 2012). À partir d'une expérience de stress réalisée sur des échantillons naturels Orr et al. (2004) ont suggéré qu'une augmentation de salinité pourrait favoriser les génotypes toxiques et ainsi contribuer à augmenter la toxicité des efflorescences au cours du transfert en milieu estuarien. Les travaux de Tanabe et al. (2019) portant sur l'étude de souches isolées en milieu saumâtre, ont mis en évidence une réduction de la taille du génome de la souche *M. aeruginosa* NIES 4325 par rapport aux autres souches de *M. aeruginosa* considérée comme relativement tolérante à une augmentation de la salinité (i.e., *M. aeruginosa* PCC 7806, Sj et NIES 1211). Cette réduction de la taille du génome s'explique par l'absence de gènes codant pour des protéines de types complexes NRPS et PKS impliquées dans la synthèse de métabolites secondaires tels que les MC, les cyanopeptolines, les aeruginosines, les microviridines et les cyanobactines. Contrairement à Orr et al. (2004), Tanabe et al. (2019) ont émis l'hypothèse qu'une réduction du génome suggère l'existence d'une adaptation spécifique de cette souche aux eaux saumâtres et laisse supposer qu'une telle adaptation pourrait nécessiter la perte de certains gènes tels que ceux impliqués dans la synthèse des MC (Tanabe et al. 2019). En effet, comme chez les bactéries, une réduction de la taille du génome chez les cyanobactéries associée à une diminution du nombre de séquences répétées pourrait témoigner d'une adaptation des organismes à un écosystème défini (Humbert et al. 2013). Au cours de cette thèse, l'étude de souches de *M. aeruginosa* non productrices de MC n'a pas été réalisée.

Des études supplémentaires impliquant des souches productrices et non productrices de MCs devraient permettre de déterminer si il existe un lien entre la salinité et la sélection de génotypes toxiques ou non.

### La diversité des solutés compatibles impliqués dans la réponse au stress salin chez *M. aeruginosa*

Chez les cyanobactéries d'eau douce, le niveau de tolérance à la salinité peut être associé à la nature des solutés compatibles accumulés (Hagemann 2011). En effet, l'approche phylogénétique a démontré le caractère relativement ancestral de la synthèse du saccharose chez les cyanobactéries (Blank 2013) bien qu'au sein des Chroococcales la présence des gènes impliqués dans cette synthèse ait uniquement été décrite chez un nombre restreint de souches telles que *M. aeruginosa* PCC 7806, Sj, NIES 1211 et NIES 4325 (Kolman et al. 2012, Blank 2013, Humbert et al. 2013, Tanabe et al. 2018, 2019). Chez *M. aeruginosa*, la synthèse de solutés compatibles n'est donc pas un caractère ubiquiste. Ceci suggère une perte des gènes au cours de l'évolution, qui aurait de nouveau été acquis par transfert latéral, chez les souches présentant la capacité de produire du saccharose (Kolman and Salerno 2016). Chez les souches, Sj, NIES-1211 et PCC 7806, les gènes impliqués dans la synthèse du saccharose possèdent des séquences relativement similaires, ce qui suggère une acquisition récente (Tanabe et al. 2018). Cependant, la souche NIES-4325 présente des gènes dont la séquence est plus éloignée ce qui suggère l'existence d'un autre organisme donneur pour ces gènes (Tanabe et al. 2019). Au cours de notre étude, la synthèse et l'accumulation de saccharose chez *M. aeruginosa* PCC 7806 ont été détectées en réponse à un stress salin et chez des souches acclimatées à différentes conditions de salinité. L'étude de l'expression des gènes *spsA* et *sppA* impliqués dans la synthèse du saccharose ont permis de mettre en évidence le caractère immédiat de cette synthèse en réponse à une augmentation de la salinité (Figure 1).

Les apports de la phylogénie montrent que les gènes impliqués (*treYZ*, *treA*) dans la synthèse du tréhalose auraient été acquis plus récemment au cours de l'histoire évolutive des cyanobactéries et notamment parmi les Nostocales (Blank 2013). Une autre famille de gènes (*tps*, *tpp*) impliquée dans la synthèse du tréhalose a été acquise par transfert latéral chez l'ancêtre commun du genre *Crocospaera*. Le tréhalose a été identifié comme un soluté compatible chez la souche *M. aeruginosa* PCC 7820



acclimatée à différentes conditions de salinité. Bien que la synthèse de tréhalose en réponse à une forte irradiance ait également été démontrée chez *M. aeruginosa* PCC 7806, la présence des gènes impliqués dans la synthèse n'a pas été mise en évidence (Meissner et al. 2015). Les gènes responsables de la synthèse du tréhalose chez *M. aeruginosa* restent donc à identifier et caractériser chez les souches productrices.

La présence de GB et de proline a également été mise en évidence chez les souches (PCC 7820 et 7806) acclimatées à différentes conditions de salinité.

La synthèse de GB, GG et GGA est considérée comme un caractère acquis plus tardivement, par transfert latéral de gènes, en réponse à une extension de l'aire de répartition de certains genres aux écosystèmes salins (Blank 2013). Ces résultats laissent supposer que la GB et la proline pourraient intervenir dans la réponse de *M. aeruginosa* à une augmentation de la salinité.

Les données issues de l'approche métabolomique conduisent à émettre l'hypothèse de l'existence d'autres composés communs et spécifiques aux souches PCC 7820 et PCC 7806, qui seraient accumulés en réponse à une élévation de salinité. Parmi ces composés non identifiés, il est probable que d'autres solutés compatibles puissent participer à l'équilibre osmotique chez *M. aeruginosa*. Les résultats acquis au cours de cette thèse suggèrent ainsi que la réponse à un stress salin chez *M. aeruginosa* ne peut se réduire uniquement à l'accumulation de saccharose et de tréhalose. Cependant, l'identification des composés mis en évidence par l'approche métabolomique basée sur la spectrométrie de masse est aujourd'hui l'une des principales limites des approches non ciblées (Schwarz et al. 2013). C'est pourquoi des études complémentaires sont nécessaires afin de caractériser davantage la diversité des solutés compatibles accumulés en réponse à une augmentation de salinité chez *M. aeruginosa*.

## Réponses adaptatives de *M. aeruginosa* à une augmentation de la salinité: les apports des expériences de stress et d'acclimatation

Les études menées sur l'impact de la salinité chez *M. aeruginosa* ont mis en évidence une diminution du taux de croissance en réponse à un stress (Reed and Walsby 1985, Tonk et al. 2007, Zhang et al. 2013, Chen et al. 2015, Martín-Luna et al. 2015, Melero-Jiménez et al. 2019, Ross et al. 2019) et après une phase d'acclimatation (Tonk et al. 2007, Mazur-Marzec et al. 2010, Georges des Aulnois et al. 2019). Comme l'a décrit Hagemann (2011), ce ralentissement de croissance est la conséquence d'un déséquilibre osmotique qui implique la mise en place de mécanismes adaptatifs chez la cellule. Ainsi, les souches acclimatées ont présenté une tolérance à la salinité plus importante que les souches ayant subi un stress.

L'étude des paramètres photosynthétiques a également présenté des résultats distincts entre l'expérience de stress et celle d'acclimatation. Ceci suggère une perturbation du fonctionnement de l'appareil photosynthétique à la suite d'une augmentation de la salinité. En réponse à un stress salin, l'expression des gènes *psaA* et *psbC*, impliqués dans la synthèse de protéines constitutives des sous unités appartenant aux PSI et PSII, a été inhibée tandis qu'une diminution du  $F_v/F_M$  a pu être observée (Figure 1). Chez les souches acclimatées, le suivi des paramètres photosynthétiques ( $\alpha$ ,  $E_{trmax}$ ,  $F_v/F_M$ ) a permis de montrer que ceux-ci sont restés stables chez la souche PCC 7820 et ont eu tendance à augmenter pour la souche PCC 7806 (voir Annexe du Chapitre 2). Ces résultats préliminaires suggèrent l'existence de mécanismes de photo-acclimatation ayant permis aux cellules de maintenir une activité photosynthétique suffisante permettant de supporter la croissance des cellules et leur développement. Un déséquilibre entre l'activité photosynthétique et la respiration a en effet été décrit chez les cyanobactéries en réponse à un stress salin (Zhang et al. 2010). A court terme, un déséquilibre osmotique engendré par une augmentation de salinité conduit à réduire le volume des cellules et inhibe l'activité des photosystèmes I et II (Allakhverdiev et al. 2000). En effet, une augmentation de la salinité conduit à une accumulation d'ions  $Na^+$  et  $Cl^-$  au niveau du lumen, ce qui a pour conséquence de dissocier les protéines associées aux PSI et PSII, inhibant ainsi leur activité (Allakhverdiev and Murata 2008). Lorsque l'équilibre osmotique de la cellule est rétabli, l'activité des PSI et PSII est également rétabli. A plus long terme, parmi les mécanismes impliqués dans le processus de photo-

acclimatation, le maintien de la fluidité membranaire des thylakoïdes joue un rôle central (Los et al. 2013). L'augmentation de cette dernière permet le maintien de l'activité des PSI et PSII mais également le maintien de l'activité des canaux ioniques permettant d'assurer l'équilibre osmotique des cellules (Allakhverdiev and Murata 2008). La fluidité membranaire est dépendante du degré d'insaturation des lipides membranaires. Or, l'accumulation de monogalactosyldiacylglycerols (MGDG) présentant divers degrés d'insaturation a pu être mise en évidence chez les souches acclimatées à différentes conditions de salinité. Ces résultats mettent en évidence le rôle des lipides membranaires présents dans les thylakoïdes dans le maintien des activités photosynthétiques comme l'ont démontré les expériences conduites chez *Synechocystis* (Los et al. 2013).

Cependant, l'évaluation des paramètres photosynthétiques menée chez les souches acclimatées, bien que suggérant un impact de la salinité sur les capacités photosynthétiques des cellules, a été réalisée en l'absence d'un dosage des pigments tels que la phycocyanine et la chlorophylle *a*. Ces données acquises par des méthodes de PAM (Pulse Amplitude Modulation) (Kromkamp and Forster 2003) demandent à être confirmées et approfondies par l'étude de la réponse du profil pigmentaire des souches en réponse à une augmentation de la salinité. En effet, une augmentation de la salinité a conduit à une modification du profil pigmentaire chez *Spirulina platensis* ayant des conséquences sur le fonctionnement de l'appareil photosynthétique (Zhang et al. 2010). De plus, les travaux de Lu and Vonshak (2002) ont montré une diminution de la quantité de phycocyanine et l'absence d'effet sur la quantité de chlorophylle chez *Spirulina platensis*.

Ce travail de thèse a permis d'étudier et d'illustrer la plasticité phénotypique de l'espèce *Microcystis aeruginosa* en réponse à une augmentation de la salinité. Cette plasticité bien que dépendante de la souche étudiée, suggère la capacité de *M. aeruginosa* à proliférer en zone mésohaline. Dans un contexte de gestion du risque du transfert en milieu estuarien et de salinisation des écosystèmes aquatiques (Nielsen et al. 2003, Paerl and Paul 2012), l'étude des mécanismes d'adaptation impliqués lors d'une augmentation de la salinité présente un intérêt certain. Le génome de *M. aeruginosa* présente une plasticité génomique importante caractérisée par de nombreuses séquences répétées, des réarrangements du génome, et la possibilité d'acquérir de nouveaux gènes par transfert latéral (Humbert et al. 2013). Parmi ces

caractéristiques, la disponibilité en nutriments (N,P) impacte directement l'activation de gènes impliqués dans la synthèse d'éléments transposables, ce qui suggère une modification de la structure du génome (Steffen et al. 2014). Afin d'identifier les mécanismes potentiellement impliqués dans la réponse adaptative de *M. aeruginosa* à un environnement saumâtre, il apparaît pertinent d'étudier la réponse de ces éléments transposables lors de variations de salinité. De plus, les récentes avancées dans le domaine de l'épigénétique ont permis de mettre en évidence l'existence de nombreux systèmes de restriction-modification et de méthylation au sein du génome de *M. aeruginosa* (Zhao et al. 2018). Encore une fois, l'étude des mécanismes d'épigénétique chez *M. aeruginosa* pourrait permettre de mieux appréhender les mécanismes d'adaptation de cet organisme aux milieux saumâtres (Jeremias et al. 2018).

### L'influence de l'organisation en colonies sur la tolérance à la salinité de *M. aeruginosa*

La majorité des études menées sur l'impact de la salinité chez *M. aeruginosa* ont été réalisées sur des souches isolées puis cultivées en laboratoire ne présentant plus une organisation en colonies. Seuls les travaux de Orr et al. (2004) ont été réalisés à partir d'échantillons naturels. Cependant, ces auteurs n'ont pas fourni de données sur la morphologie des colonies et ont réalisé leurs mesures après application d'une méthode de désagrégation des colonies. De même, l'expérience de stress salin réalisée sur des échantillons naturels au cours de cette thèse n'ont pas permis d'évaluer les conséquences d'une augmentation de la salinité sur l'organisation des colonies (Chapitre 1). Or, chez le genre *Microcystis*, l'organisation en colonies est l'une des caractéristiques pouvant expliquer leur dominance au sein de la communauté phytoplanctonique dans les écosystèmes d'eau douce (Visser et al. 1997, Xiao et al. 2018). Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la tolérance au stress salin, l'étude de l'impact de la salinité sur la morphologie des colonies et la nature chimique de leur mucilage devrait être envisagée. En effet, la présence d'un épais mucilage entourant les colonies crée un microenvironnement divergeant de celui des cellules isolées (Xiao et al. 2018). Cette organisation confère une résistance supérieure aux stress chimiques comme démontré en réponse à un traitement au sulfate de cuivre (Wu et al. 2007) ou au plomb (Bi et al. 2013). Au sein des colonies,

c'est la synthèse d'exopolysaccharides (EPS) qui assure la protection des cellules composant la colonie (Kehr and Dittmann 2015). Pour l'heure, une seule étude suggère que la salinité contribue à diminuer la diversité des morpho-espèces rencontrées dans l'environnement et à sélectionner les colonies de plus grandes tailles (Kruk et al. 2017). Dans la mesure où la morphologie des colonies semble directement influencée par des facteurs environnementaux et ne serait donc pas d'origine génétique (Harke et al. 2016, Xiao et al. 2018), des travaux complémentaires devraient être réalisés afin de caractériser l'impact de la salinité sur les morpho-espèces rencontrées en zone estuarienne. De plus, l'étude de la diversité et de la dynamique de production des EPS chez des colonies soumises à un stress salin devrait permettre de mieux comprendre leur fonction dans la tolérance à la salinité chez *M. aeruginosa*. En effet, des travaux menés sur *Synechocystis* sp. ont démontré le rôle essentiel des EPS dans la tolérance et la réponse au stress salin (Jittawuttipoka et al. 2013). De plus, l'existence d'une corrélation entre la quantité d'EPS synthétisée et la tolérance à la salinité chez différentes souches de *Synechocystis* a également été rapportée (Ozturk and Aslim 2010).

En définitive, la compréhension du devenir de *M. aeruginosa* et plus largement des cyanobactéries toxiques d'eau douce dans les écosystèmes situés à l'interface terre-mer, est aujourd'hui un enjeu sanitaire et sociétal. En effet, les zones côtières sont les zones présentant les densités de populations les plus importantes. De plus, dans un contexte de changement climatique et d'accroissement de la population mondiale, nos besoins en eau douce s'accroissent. Afin de répondre à cette demande, de nombreux pays se tournent vers des méthodes de désalinisation de l'eau de mer prélevée en milieu côtier.

Dans ce contexte, la gestion du risque associé au phénomène de transfert des cyanobactéries et des cyanotoxines ne peut se limiter à la question de la salinité compte tenu de l'importante variabilité des facteurs biotiques et abiotiques rencontrés le long du continuum eau douce – océan. Dans ce contexte, il apparaît essentiel d'approfondir nos connaissances sur l'effet des différents facteurs influençant l'écologie et la physiologie des cyanobactéries toxiques d'eau douce soumises à un transfert en milieu estuarien (Burford et al. 2019). Les connaissances issues de ces études devraient contribuer à la mise en place de programmes de gestion et de contrôle intégrant l'ensemble du continuum eau douce – océan afin de mieux appréhender le risque sanitaire associé aux efflorescences de cyanobactéries toxiques (Paerl et al. 2018).

# Valorisation

## Liste des articles

### Publié :

Georges des Aulnois, M., Roux, P., Caruana, A., Réveillon, D., Briand, E., Hervé, F., Savar, V., Bormans, M., Amzil, Z., 2019. Physiological and Metabolic Responses of Freshwater and Brackish-Water Strains of *Microcystis aeruginosa* Acclimated to a Salinity Gradient: Insight into Salt Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology* 85, 1–15. <https://doi.org/10.1128/AEM.01614-19>

### À soumettre :

Georges des Aulnois, M., E., Robert, P., Caruana, A., Réveillon, D., Briand, E., Savar, V., Guljamow, A., Dittmann E., Amzil, Z., Bormans, M.. Salt shock responses of *M. aeruginosa* strains from fresh- and brackish waters, **à soumettre dans Toxins**.

Georges des Aulnois, M., E., Robert, P., Caruana, A., Réveillon, D., Briand, E., Savar, V., Bormans, M., Amzil, Z.. Solid Phase Extraction, Liquid chromatography – Tandem Mass Spectrometry Applications, for the determination of intracellular and extracellular microcystins in salt stress experiment, **à soumettre dans Toxicon**.



### Liste des présentations orales

Georges des Aulnois, M., Hervé, F., Caruana, A., Briand, E., Dittmann, E., Bormans, M., Amzil, Z., 2019. Salt stress response of brackish and freshwater strains of *Microcystis aeruginosa*. Conférence annuelle du GDR Phycotox 2019. Brest (France).

Georges des Aulnois, M., Caruana, A., Briand, E., Dittmann, E., Bormans, M., Amzil, Z., 2019. Salt stress response of brackish and freshwater strains of *Microcystis aeruginosa*. 11<sup>th</sup> International Conference on Toxic Cyanobacteria. Krakow (Poland).

Georges des Aulnois, M., Roux, P., Malo, F., Caruana, A., Briand, E., Bormans, M., Amzil, Z., 2018. Physiological responses and toxins production of *Microcystis aeruginosa* acclimated to different salinities. O-149. The 18<sup>th</sup> International Conference on Harmful Algae. Nantes (France).

Georges des Aulnois, M., Caruana, A., Briand, E., Bormans, M., Amzil, Z., 2018. Salt stress response of brackish and freshwater strains of *Microcystis aeruginosa*. Conférence annuelle du GIS Cyanos 2018. Besse en Chandesse (France).

### Liste des posters

Georges des Aulnois, M., Caruana, A., Briand, E., Bormans, M., Amzil, Z., 2018. Salt stress response of brackish and freshwater strains of *Microcystis aeruginosa*. P-12. The 18<sup>th</sup> International Conference on Harmful Algae. Nantes (France).

Georges des Aulnois, M., Caruana, A., Bormans, M., Amzil, Z., 2017. Transfer and fate of toxic cyanobacteria from freshwater to the marine environment. Conférence annuelle du GDR Phycotox – GIS Cyanos 2017. Gif-sur-Yvette (France).

# Références

- Adams, M.A., Chen, Z., Landman, P. & Colmer, T.D. 1999. Simultaneous Determination by Capillary Gas Chromatography of Organic Acids, Sugars, and Sugar Alcohols in Plant Tissue Extracts as Their Trimethylsilyl Derivatives. *Analytical Biochemistry*. 266:77–84.
- Adhikary, S.P. 2005. NaCl induced changes in photosystem stoichiometry and photosynthetic activity of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kütz. *Indian Journal of Experimental Biology*. 43:1192–5.
- Albay, M., Matthiensen, A. & Codd, G.A. 2005. Occurrence of toxic blue-green algae in the Kucukcekmece Lagoon (Istanbul, Turkey). *Environmental Toxicology*. 20:277–84.
- Alexova, R., Fujii, M., Birch, D., Cheng, J., Waite, T.D., Ferrari, B.C. & Neilan, B.A. 2011. Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. *Environmental Microbiology*. 13:1064–77.
- Allakhverdiev, S.I. & Murata, N. 2008. Salt stress inhibits photosystems II and I in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*. 98:529–39.
- Allakhverdiev, S.I., Nishiyama, Y., Suzuki, I., Tasaka, Y. & Murata, N. 1999. Genetic engineering of the unsaturation of fatty acids in membrane lipids alters the tolerance of *Synechocystis* to salt stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96:5862–7.
- Allakhverdiev, S.I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M. & Murata, N. 2000. Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiology*. 123:1047–56.
- Altaner, S., Puddick, J., Fessard, V., Feurstein, D., Zemskov, I., Wittmann, V. & Dietrich, D.R. 2019. Simultaneous Detection of 14 Microcystin Congeners from Tissue Samples Using UPLC-ESI-MS/MS and Two Different Deuterated Synthetic Microcystins as Internal Standards. *Toxins*. 11:388.
- Amé, M.V. & Wunderlin, D.A. 2005. Effects of Iron, Ammonium and Temperature on Microcystin Content by a Natural Concentrated *Microcystis Aeruginosa* Population. *Water, Air, and Soil Pollution*. 168:235–48.
- Andersen, R.J., Luu, H.A., Chen, D.Z., Holmes, C.F., Kent, M.L., Le Blanc, M., Taylor, F.J. et al. 1993. Chemical and biological evidence links microcystins to salmon “netpen liver disease”. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxicology*. 31:1315–23.
- Antunes, J.T., Leão, P.N. & Vasconcelos, V.M. 2015. *Cylindrospermopsis raciborskii*: Review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. *Frontiers in Microbiology*. 6:1–13.
- Ashworth, C.T. & Mason, M.F. 1946. Observations on the Pathological Changes Produced by a Toxic Substance Present in Blue-Green Algae (*Microcystis aeruginosa*). *The American journal of pathology*. 22:369–83.
- Atkins, R., Rose, T., Brown, R.S. & Robb, M. 2001. The *Microcystis* cyanobacteria bloom in the Swan River - February 2000. *Water Science and Technology*. 43:107–14.
- Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W.,

- Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R. & Eaglesham, G.K. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. *Toxicology*. 181–182:441–6.
- Babica, P., Blaha, L. & Marsalek, B. 2006. Exploring the natural role of microcystins—A review of effect on photoautotrophic organisms. *Journal of Phycology*. 42:9–20.
- Backer, L.C., Carmichael, W., Kirkpatrick, B., Williams, C., Irvin, M., Zhou, Y., Johnson, T.B. et al. 2008. Recreational exposure to low concentrations of microcystins during an algal bloom in a small lake. *Marine Drugs*. 6:389–406.
- Bail, A. Le & Charrier, B. 2013. Plant Organogenesis. Humana Press, Totowa, NJ. 323–332 pp.
- Balest, L., Murgolo, S., Sciancalepore, L., Montemurro, P., Abis, P.P., Pastore, C. & Mascolo, G. 2016. Ultra-trace levels analysis of microcystins and nodularin in surface water by on-line solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 408:4063–71.
- Bartolomé, M.C., D'ors, A. & Sánchez-Fortún, S. 2009. Toxic effects induced by salt stress on selected freshwater prokaryotic and eukaryotic microalgal species. *Ecotoxicology*. 18:174–9.
- Baxa, D. V., Kurobe, T., Ger, K.A., Lehman, P.W. & Teh, S.J. 2010. Estimating the abundance of toxic *Microcystis* in the San Francisco Estuary using quantitative real-time PCR. *Harmful Algae*. 9:342–9.
- Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J.V. & Hernández, F. 2012. Determination of six microcystins and nodularin in surface and drinking waters by on-line solid phase extraction-ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1266:61–8.
- Benke, P.I., Vinay Kumar, M.C.S., Pan, D. & Swarup, S. 2015. A mass spectrometry-based unique fragment approach for the identification of microcystins. *Analyst*. 140:1198–206.
- Bergman, B., Sandh, G., Lin, S., Larsson, J. & Carpenter, E.J. 2013. *Trichodesmium* - a widespread marine cyanobacterium with unusual nitrogen fixation properties. *FEMS Microbiology Reviews*. 37:286–302.
- Bi, X., Zhang, S., Dai, W., Xing, K. & Yang, F. 2013. Effects of lead(II) on the extracellular polysaccharide (EPS) production and colony formation of cultured *Microcystis aeruginosa*. *Water Science and Technology*. 67:803–9.
- Bishop, C.T., Anet, E.F. & Gorham, P.R. 1959. Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Canadian journal of biochemistry and physiology*. 37:453–71.
- Black, K., Yilmaz, M. & Philips, E.J. 2011. Growth and Toxin Production by *Microcystis Aeruginosa* PCC 7806 (Kutzing) Lemmerman at Elevated Salt Concentrations. *Journal of Environmental Protection*. 02:669–74.
- Blank, C.E. 2004. Evolutionary timing of the origins of mesophilic sulphate reduction and oxygenic photosynthesis: a phylogenomic dating approach. *Geobiology*. 2:1–20.
- Blank, C.E. 2013. Phylogenetic distribution of

- compatible solute synthesis genes support a freshwater origin for cyanobacteria. *Journal of Phycology*. 49:880–95.
- Bormans, M., Amzil, Z., Mineaud, E., Brient, L., Savar, V., Robert, E. & Lance, E. 2019. Demonstrated transfer of cyanobacteria and cyanotoxins along a freshwater-marine continuum in France. *Harmful Algae*. 87:101639.
- Borowitzka, L.J., Demmerle, S., Mackay, M.A. & Norton, R.S. 1980. Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of osmoregulation in a blue-green alga. *Science (New York, N.Y.)*. 210:650–1.
- Botes, D.P., Tuinman, A.A., Wessels, P.L., Viljoen, C.C., Kruger, H., Williams, D.H., Santikarn, S. et al. 1984. The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 2311.
- Briand, E., Bormans, M., Gugger, M., Dorrestein, P.C. & Gerwick, W.H. 2016. Changes in secondary metabolic profiles of *Microcystis aeruginosa* strains in response to intraspecific interactions. *Environmental Microbiology*. 18:384–400.
- Briand, E., Escoffier, N., Straub, C., Sabart, M., Quiblier, C. & Humbert, J.F. 2009. Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a bloom-forming *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) population. *ISME Journal*. 3:419–29.
- Brown, A.D. 1976. Microbial water stress. *Bacteriological reviews*. 40:803–46.
- Brutemark, A., Vandelannoote, A., Engström-Öst, J. & Suikkanen, S. 2015. A less saline Baltic Sea promotes cyanobacterial growth, hampers intracellular microcystin production, and leads to strain-specific differences in allelopathy. *PLoS ONE*. 10:1–15.
- Bucciarelli, E., Ridame, C., Sunda, W.G., Dimier-Huguene, C., Cheize, M. & Belviso, S. 2013. Increased intracellular concentrations of DMSP and DMSO in iron-limited oceanic phytoplankton *Thalassiosira oceanica* and *Trichodesmium erythraeum*. *Limnology and Oceanography*. 58:1667–79.
- Bui, T., Dao, T.-S., Vo, T.-G. & Lürling, M. 2018. Warming Affects Growth Rates and Microcystin Production in Tropical Bloom-Forming *Microcystis* Strains. *Toxins*. 10:123.
- Bukaveckas, P.A., Lesutienė, J., Gasiūnaitė, Z.R., Ložys, L., Olenina, I., Pilkaitytė, R., Pūtys, Ž. et al. 2017. Microcystin in aquatic food webs of the Baltic and Chesapeake Bay regions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 191:50–9.
- Buratti, F.M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E. & Funari, E. 2017. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Archives of Toxicology*. 1–82.
- Burford, M.A., Beardall, J., Willis, A., Orr, P.T., Magalhaes, V.F., Rangel, L.M., Azevedo, S.M.F.O.E. et al. 2016. Understanding the winning strategies used by the bloom-forming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*.
- Burford, M.A., Carey, C.C., Hamilton, D.P., Huisman, J., Paerl, H.W., Wood, S.A. & Wulff, A. 2019. Perspective: Advancing the research agenda for improving understanding of cyanobacteria in a future

- of global change. *Harmful Algae*.
- Carmichael, W.W. & An, J. 1999. Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. *Natural Toxins*. 7:377–85.
- Carmichael, W.W., Beasley, V., Bunner, D.L., Eloff, J.N., Falconer, I., Gorham, P., Harada, K. et al. 1988. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 26:971–3.
- Catherine, A., Bernard, C., Spoof, L. & Bruno, M. 2017. Microcystins and Nodularins. 107–126 pp.
- Chambers, M.C., Maclean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D.L., Neumann, S., Gatto, L. et al. 2012. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature Biotechnology*. 30:918–20.
- Chen, D.Z.X., Boland, M.P., Smillie, M.A., Klix, H., Ptak, C., Andersen, R.J. & Holmes, C.F.B. 1993. Identification of protein phosphatase inhibitors of the microcystin class in the marine environment. *Toxicon*. 31:1407–14.
- Chen, Liang, Chen, J., Zhang, X. & Xie, P. 2016. A review of reproductive toxicity of microcystins. *Journal of Hazardous Materials*. 301:381–99.
- Chen, Lei, Gin, K.Y.H. & He, Y. 2016. Effects of sulfate on microcystin production, photosynthesis, and oxidative stress in *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Science and Pollution Research*. 23:3586–95.
- Chen, L., Mao, F., Kirumba, G.C., Jiang, C., Manefield, M. & He, Y. 2015. Changes in metabolites, antioxidant system, and gene expression in *Microcystis aeruginosa* under sodium chloride stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 122:126–35.
- Cheng, Y.S. 2007. Characterization of Aerosols Containing Microcystin. *Marine Drugs*. 5:136–50.
- Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., Wishart, D.S. et al. 2018. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Research*. 46:W486–94.
- Chorus, I. 2001. Cyanotoxins. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. 384 pp.
- Churro, C., Azevedo, J., Vasconcelos, V. & Silva, A. 2017. Detection of a planktothrix agardhii bloom in Portuguese marine coastalwaters. *Toxins*. 9:1–13.
- Cirés, S., Casero, M. & Quesada, A. 2017. Toxicity at the Edge of Life: A Review on Cyanobacterial Toxins from Extreme Environments. *Marine Drugs*. 15:233.
- Cires, S., Wörmer, L., Agha, R. & Quesada, A. 2013. Overwintering populations of *Anabaena*, *Aphanizomenon* and *Microcystis* as potentia inocula for summer blooms. *Journal of Plankton Research*. 35:1254–66.
- Curson, A.R.J., Williams, B.T., Pinchbeck, B.J., Sims, L.P., Martínez, A.B., Rivera, P.P.L., Kumaresan, D. et al. 2018. DSYB catalyses the key step of dimethylsulfoniopropionate biosynthesis in many phytoplankton. *Nature microbiology*. 3:430.
- Davis, T.W., Harke, M.J., Marcoval, M.A., Goleski, J., Orano-Dawson, C., Berry, D.L.

- & Gobler, C.J. 2010. Effects of nitrogenous compounds and phosphorus on the growth of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacterial blooms. *Aquatic Microbial Ecology*. 61:149–62.
- Demoulin, C.F., Lara, Y.J., Cornet, L., François, C., Baurain, D., Wilmotte, A. & Javaux, E.J. 2019. Cyanobacteria evolution: Insight from the fossil record. *Free Radical Biology and Medicine*.
- Dittmann, E., Fewer, D.P. & Neilan, B.A. 2013. Cyanobacterial toxins: Biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiology Reviews*. 37:23–43.
- Dittmann, E., Neilan, B. a, Erhard, M., von Döhren, H. & Börner, T. 1997. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Molecular microbiology*. 26:779–87.
- Dunn, W.B., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis-McIntyre, S., Anderson, N., Brown, M. et al. 2011. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols*. 6:1060–83.
- Eilers, P.H.C. & Peeters, J.C.H. 1988. A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecological modelling*. 42:199–215.
- Engström-Öst, J., Repka, S. & Mikkonen, M. 2011. Interactions between plankton and cyanobacterium *Anabaena* with focus on salinity, growth and toxin production. *Harmful Algae*. 10:530–5.
- Fastner, J., Abella, S., Litt, A., Morabito, G., Vörös, L., Pálffy, K., Straile, D. et al. 2016. Combating cyanobacterial proliferation by avoiding or treating inflows with high P load—experiences from eight case studies. *Aquatic Ecology*. 50:367–83.
- Favre, L., Ortalo-Magné, A., Pichereaux, C., Gargaros, A., Burlet-Schiltz, O., Cotelle, V. & Culioli, G. 2018. Metabolome and proteome changes between biofilm and planktonic phenotypes of the marine bacterium *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8. *Biofouling*. 34:132–48.
- Fayad, P.B., Roy-Lachapelle, A., Duy, S.V., Prévost, M. & Sauvé, S. 2015. On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the analysis of cyanotoxins in algal blooms. *Toxicon*. 108:167–75.
- Fetscher, A.E., Howard, M.D.A., Stancheva, R., Kudela, R.M., Stein, E.D., Sutula, M.A., Busse, L.B. et al. 2015. Wadeable streams as widespread sources of benthic cyanotoxins in California, USA. *Harmful Algae*. 49:105–16.
- Fewer, D.P., Köykkä, M., Halinen, K., Jokela, J., Lyra, C. & Sivonen, K. 2009. Culture-independent evidence for the persistent presence and genetic diversity of microcystin-producing *Anabaena* (Cyanobacteria) in the Gulf of Finland. *Environmental Microbiology*. 11:855–66.
- Flombaum, P., Gallegos, J.L., Gordillo, R.A., Rincon, J., Zabala, L.L., Jiao, N., Karl, D.M. et al. 2013. Present and future global distributions of the marine Cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110:9824–9.

- Flores, E. & Herrero, A. 2010. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nature reviews. Microbiology*. 8:39–50.
- Funari, E., Manganelli, M., Buratti, F.M. & Testai, E. 2017. Cyanobacteria blooms in water: Italian guidelines to assess and manage the risk associated to bathing and recreational activities. *Science of The Total Environment*. 598:867–80.
- Galinski E A 1995. Osmoadaptation in bacteria. 273–328 pp.
- Gan, N., Xiao, Y., Zhu, L., Wu, Z., Liu, J., Hu, C. & Song, L. 2012. The role of microcystins in maintaining colonies of bloom-forming *Microcystis* spp. *Environmental Microbiology*. 14:730–42.
- Gantar, M., Sekar, R. & Richardson, L.L. 2009. Cyanotoxins from black band disease of corals and from other Coral Reef environments. *Microbial Ecology*. 58:856–64.
- Gehring, M.M. & Wannicke, N. 2014. Climate change and regulation of hepatotoxin production in Cyanobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. 88:1–25.
- Georges des Aulnois, M., Roux, P., Caruana, A., Réveillon, D., Briand, E., Hervé, F., Savar, V. et al. 2019. Physiological and Metabolic Responses of Freshwater and Brackish-Water Strains of *Microcystis aeruginosa* Acclimated to a Salinity Gradient: Insight into Salt Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*. 85:1–15.
- Giannuzzi, L., Carvajal, G., Corradini, M.G., Araujo Andrade, C., Echenique, R. & Andrinolo, D. 2012. Occurrence of Toxic Cyanobacterial Blooms in Rio de la Plata Estuary, Argentina: Field Study and Data Analysis. *Journal of Toxicology*. 2012:1–15.
- Giannuzzi, L., Sedan, D., Echenique, R. & Andrinolo, D. 2011. An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. *Marine Drugs*. 9:2164–75.
- Gibble, C.M. & Kudela, R.M. 2014. Detection of persistent microcystin toxins at the land-sea interface in Monterey Bay, California. *Harmful Algae*. 39:146–53.
- Gibble, C.M., Peacock, M.B. & Kudela, R.M. 2016. Evidence of freshwater algal toxins in marine shellfish: Implications for human and aquatic health. *Harmful Algae*. 59:59–66.
- Gil-de-la-Fuente, A., Godzien, J., Saugar, S., Garcia-Carmona, R., Badran, H., Wishart, D.S., Barbas, C. et al. 2019. CEU Mass Mediator 3.0: A Metabolite Annotation Tool. *Journal of Proteome Research*. 18:797–802.
- Ginn, H.P., Pearson, L.A. & Neilan, B.A. 2010. NtcA from *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 Is Autoregulatory and Binds to the Microcystin Promoter. *Applied and Environmental Microbiology*. 76:4362–8.
- Guitton, Y., Tremblay-Franco, M., Le Corguillé, G., Martin, J.F., Pétéra, M., Roger-Mele, P., Delabrière, A. et al. 2017. Create, run, share, publish, and reference your LC–MS, FIA–MS, GC–MS, and NMR data analysis workflows with the Workflow4Metabolomics 3.0 Galaxy online infrastructure for metabolomics. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 93:89–101.
- Guljamow, A., Jenke-Kodama, H., Saumweber,



- H., Quillardet, P., Frangeul, L., Castets, A.M., Bouchier, C. et al. 2007. Horizontal gene transfer of two cytoskeletal elements from a eukaryote to a cyanobacterium. *Current Biology*. 17:757–9.
- Haddad, S.P., Bobbitt, J.M., Taylor, R.B., Lovin, L.M., Conkle, J.L., Chambliss, C.K. & Brooks, B.W. 2019. Determination of microcystins, nodularin, anatoxin-a, cylindrospermopsin, and saxitoxin in water and fish tissue using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1599:66–74.
- Hagemann, M. 2011. Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. *FEMS Microbiology Reviews*. 35:87–123.
- Hagemann, M. 2013. Genomics of Salt Acclimation. In *BS:ABR*. Elsevier, pp. 27–55.
- Hagemann, M. 2016. Coping with High and Variable Salinity: Molecular Aspects of Compatible Solute Accumulation. In Borowitzka, M. A., Beardall, J. & Raven, J. A. [Eds.] *The Physiology of Microalgae*. Springer International Publishing, Cham, pp. 359–72.
- Hagemann, M. 2019. Salt-Regulated Accumulation of the Compatible Solutes Sucrose and Glucosylglycerol in Cyanobacteria and Its Biotechnological Potential. 10.
- Hagemann, M., Erdmann, N. & Wittenburg, E. 1987. Synthesis of glucosylglycerol in salt-stressed cells of the cyanobacterium *Microcystis firma*. *Archives of Microbiology*. 148:275–9.
- Hagemann, M. & Pade, N. 2015. Heterosides - compatible solutes occurring in prokaryotic and eukaryotic phototrophs. *Plant Biology*. 17:927–34.
- Harke, M.J. & Gobler, C.J. 2013. Global Transcriptional Responses of the Toxic Cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, to Nitrogen Stress, Phosphorus Stress, and Growth on Organic Matter. *PLoS ONE*. 8.
- Harke, M.J., Steffen, M.M., Gobler, C.J., Otten, T.G., Wilhelm, S.W., Wood, S.A. & Paerl, H.W. 2016. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. *Harmful Algae*. 54:4–20.
- Ho, J.C., Michalak, A.M. & Pahlevan, N. 2019. Widespread global increase in intense lake phytoplankton blooms since the 1980s. *Nature*. 566:235–8.
- Holland, A. & Kinnear, S. 2013. Interpreting the Possible Ecological Role(s) of Cyanotoxins: Compounds for Competitive Advantage and/or Physiological Aide? *Marine Drugs*. 11:2239–58.
- Horst, G.P., Sarnelle, O., White, J.D., Hamilton, S.K., Kaul, R.R.B. & Bressie, J.D. 2014. Nitrogen availability increases the toxin quota of a harmful cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Water Research*. 54:188–98.
- Huisman, J., Codd, G.A., Paerl, H.W., Ibelings, B.W., Verspagen, J.M.H. & Visser, P.M. 2018. Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*. 16:471–83.
- Humbert, J.-F., Barbe, V., Latifi, A., Gugger, M., Calteau, A., Coursin, T., Lajus, A. et al. 2013. A Tribute to Disorder in the Genome of the Bloom-Forming Freshwater Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *PLoS ONE*. 8:e70747.
- Janssen, E.M.L. 2019. Cyanobacterial peptides beyond microcystins – A review on co-

- occurrence, toxicity, and challenges for risk assessment. *Water Research*. 151:488–99.
- Järvenpää, S., Lundberg-Niinistö, C., Spooft, L., Sjövall, O., Tyystjärvi, E. & Meriluoto, J. 2007. Effects of microcystins on broccoli and mustard, and analysis of accumulated toxin by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon*. 49:865–74.
- Jeremias, G., Barbosa, J., Marques, S.M., Asselman, J., Gonçalves, F.J.M. & Pereira, J.L. 2018. Synthesizing the role of epigenetics in the response and adaptation of species to climate change in freshwater ecosystems. *Molecular Ecology*. 27:2790–806.
- Jittawuttipoka, T., Planchon, M., Spalla, O., Benzerara, K., Guyot, F., Cassier-Chauvat, C. & Chauvat, F. 2013. Multidisciplinary Evidences that *Synechocystis* PCC6803 Exopolysaccharides Operate in Cell Sedimentation and Protection against Salt and Metal Stresses. *PLoS ONE*. 8.
- Jüttner, F. & Lüthi, H. 2008. Topology and enhanced toxicity of bound microcystins in *Microcystis* PCC 7806. *Toxicon*. 51:388–97.
- Kaebernick, M., Neilan, B.A., Bo, T. & Dittmann, E. 2000. Light and the Transcriptional Response of the Microcystin Biosynthesis Gene Cluster. *Applied and environmental microbiology*. 66:3387–92.
- Kaloudis, T., Zervou, S.-K., Tsimeli, K., Triantis, T.M., Fotiou, T. & Hiskia, A. 2013. Determination of microcystins and nodularin (cyanobacterial toxins) in water by LC–MS/MS. Monitoring of Lake Marathonas, a water reservoir of Athens, Greece. *Journal of Hazardous Materials*. 263:105–15.
- Kaplan, A., Harel, M., Kaplan-Levy, R.N., Hadas, O., Sukenik, A. & Dittmann, E. 2012. The languages spoken in the water body (or the biological role of cyanobacterial toxins). *Frontiers in Microbiology*. 3:1–11.
- Kehr, J.C. & Dittmann, E. 2015. Biosynthesis and function of extracellular glycans in cyanobacteria. *Life*. 5:164–80.
- Klähn, S. & Hagemann, M. 2011. Compatible solute biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*. 13:551–62.
- Kolman, M., Nishi, C., Perez-Cenci, M. & Salerno, G. 2015. Sucrose in Cyanobacteria: From a Salt-Response Molecule to Play a Key Role in Nitrogen Fixation. *Life*. 5:102–26.
- Kolman, M.A. & Salerno, G.L. 2016. Sucrose in bloom-forming cyanobacteria: Loss and gain of genes involved in its biosynthesis. *Environmental Microbiology*. 18:439–49.
- Kolman, M.A., Torres, L.L., Martin, M.L. & Salerno, G.L. 2012. Sucrose synthase in unicellular cyanobacteria and its relationship with salt and hypoxic stress. *Planta*. 235:955–64.
- Komárek, J. 2010. Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia*. 639:245–59.
- Komárek, J. & Komárková, J. 2002. Review of the European *Microcystis* morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. *Czech Phycology*. 2:1–24.
- Konst, H., McKercher, P.D., Gorham, P.R., Robertson, A. & Howell, J. 1965. Symptoms and Pathology Produced By

- Toxic *Microcystis Aeruginosa* NRC-1 In Laboratory and Domestic Animals. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*. 29:221–8.
- Kramer, B.J., Davis, T.W., Meyer, K.A., Rosen, B.H., Goleski, J.A., Dick, G.J., Oh, G. et al. 2018. Nitrogen limitation, toxin synthesis potential, and toxicity of cyanobacterial populations in Lake Okeechobee and the St. Lucie River Estuary, Florida, during the 2016 state of emergency event. *PLoS ONE*. 13.
- Kromkamp, J.C. & Forster, R.M. 2003. The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology. *European Journal of Phycology*. 38:103–12.
- Kruk, C., Segura, A.M., Nogueira, L., Alcántara, I., Calliari, D., Martínez de la Escalera, G., Carballo, C. et al. 2017. A multilevel trait-based approach to the ecological performance of *Microcystis aeruginosa* complex from headwaters to the ocean. *Harmful Algae*. 70:23–36.
- Kudela, R.M. 2011. Characterization and deployment of Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) resin for monitoring of microcystins in fresh and saltwater. *Harmful Algae*. 11:117–25.
- Kuhl, C., Tautenhahn, R., Böttcher, C., Larson, T.R. & Neumann, S. 2012. CAMERA: An Integrated Strategy for Compound Spectra Extraction and Annotation of Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Data Sets. *Analytical Chemistry*. 84:283–9.
- Kurobe, T., Lehman, P.W., Hammock, B.G., Bolotaolo, M.B., Lesmeister, S. & Teh, S.J. 2018. Biodiversity of cyanobacteria and other aquatic microorganisms across a freshwater to brackish water gradient determined by shotgun metagenomic sequencing analysis in the San Francisco Estuary, USA. *PLOS ONE*. 13:e0203953.
- Lawton, L.A., Edwards, C. & Codd, G.A. 1994. Extraction and High-performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Microcystins in Raw and Treated Waters. *Analyst*. 11.
- Lê Cao, K.-A., Boitard, S. & Besse, P. 2011. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics*. 12:253.
- Le Moal, M., Gascuel-Oudou, C., Ménesguen, A., Souchon, Y., Étrillard, C., Levain, A., Moatar, F. et al. 2019. Eutrophication: A new wine in an old bottle? *Science of the Total Environment*. 651:1–11.
- Lehman, P.W., Boyer, G., Hall, C., Waller, S. & Gehrts, K. 2005. Distribution and toxicity of a new colonial *Microcystis aeruginosa* bloom in the San Francisco Bay Estuary, California. *Hydrobiologia*. 541:87–99.
- Lehman, P.W., Boyer, G., Satchwell, M. & Waller, S. 2008. The influence of environmental conditions on the seasonal variation of *Microcystis* cell density and microcystins concentration in San Francisco Estuary. *Hydrobiologia*. 600:187–204.
- Lehman, P.W., Kurobe, T., Lesmeister, S., Baxa, D., Tung, A. & Teh, S.J. 2017. Impacts of the 2014 severe drought on the *Microcystis* bloom in San Francisco Estuary. *Harmful Algae*. 63:94–108.
- Lehman, P.W., Marr, K., Boyer, G.L., Acuna, S.

- & Teh, S.J. 2013. Long-term trends and causal factors associated with Microcystis abundance and toxicity in San Francisco Estuary and implications for climate change impacts. *Hydrobiologia*. 718:141–58.
- Lehman, P.W., Teh, S.J., Boyer, G.L., Nobriga, M.L., Bass, E. & Hogle, C. 2010. Initial impacts of Microcystis aeruginosa blooms on the aquatic food web in the San Francisco Estuary. *Hydrobiologia*. 637:229–48.
- Lewis, E. 1980. The practical salinity scale 1978 and its antecedents. *IEEE Journal of Oceanic Engineering*. 5:3–8.
- Long, B.M., Jones, G.J. & Orr, P.T. 2001. Cellular microcystin content in N-limited Microcystis aeruginosa can be predicted from growth rate. *Applied and environmental microbiology*. 67:278–83.
- Lopes, V.R. & Vasconcelos, V.M. 2011. Planktonic and benthic cyanobacteria of European brackish waters: A perspective on estuaries and brackish seas. *European Journal of Phycology*. 46:292–304.
- Los, D.A., Mironov, K.S. & Allakhverdiev, S.I. 2013. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. *Photosynthesis Research*. 116:489–509.
- Lu, C. & Vonshak, A. 2002. Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial Spirulina platensis cells. *Physiologia Plantarum*. 114:405–13.
- Lyck, S. 2004. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with Microcystis aeruginosa. *Journal of Plankton Research*. 26:727–36.
- Ma, J., Brookes, J.D., Qin, B., Paerl, H.W., Gao, G., Wu, P., Zhang, W. et al. 2014. Environmental factors controlling colony formation in blooms of the cyanobacteria Microcystis spp. in Lake Taihu, China. *Harmful Algae*. 31:136–42.
- MacIntyre, H.L. & Cullen, J.J. 2005. Using cultures to investigate the physiological ecology of microalgae. *Algal culturing techniques*. 287–326.
- MacKintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P. & Codd, G.A. 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters*. 264:187–92.
- Makower, A.K., Schuurmans, J.M., Groth, D., Zilliges, Y., Matthijs, H.C.P. & Dittmann, E. 2015. Transcriptomics-aided dissection of the intracellular and extracellular roles of microcystin in Microcystis aeruginosa PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology*. 81:544–54.
- Manubolu, M., Eklund, S., Dutta, P.C. & Malmlöf, K. 2014. Variable exposure and responses to cyanotoxins in cattle grazing on pastures in the coastal zone of the Baltic Sea: A field study. *International Journal of Environmental Research*. 8:733–40.
- Marie, D., Simon, N. & Vaultot, D. 2005. Phytoplankton cell counting by flow cytometry. *Algal culturing techniques*. 1:253–67.
- Martin-Luna, B., Hernandez, J.A., Bes, M.T., Fillat, M.F. & Peleato, M.L. 2006. Identification of a Ferric uptake regulator from Microcystis aeruginosa PCC7806. *FEMS Microbiology Letters*. 254:63–70.

- Martín-Luna, B., Sevilla, E., Bes, M.T., Fillat, M.F. & Peleato, M.L. 2015. Variation in the synthesis of microcystin in response to saline and osmotic stress in *Microcystis ruginosa* PCC7806. *Limnetica*. 34:205–14.
- Martin, C., Oberer, L., Ino, T., König, W.A., Busch, M. & Weckesser, J. 1993. Cyanopeptolins, new depsipeptides from the cyanobacterium *Microcystis* sp. pcc 7806. *The Journal of Antibiotics*. 46:1550–6.
- Martínez de la Escalera, G., Kruk, C., Segura, A.M., Nogueira, L., Alcántara, I. & Piccini, C. 2017. Dynamics of toxic genotypes of *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) through a wide freshwater to marine environmental gradient. *Harmful Algae*. 62:73–83.
- Martins, R., Pereira, P., Welker, M., Fastner, J. & Vasconcelos, V.M. 2005. Toxicity of culturable cyanobacteria strains isolated from the Portuguese coast. *Toxicon*. 46:454–64.
- Mashile, G.P. & Nomngongo, P.N. 2016. Recent Application of Solid Phase Based Techniques for Extraction and Preconcentration of Cyanotoxins in Environmental Matrices. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 8347:1–8.
- Mazur-Marzec, H., Forycka, K., Kobos, J., Pliński, M. & Browarczyk-Matusiak, G. 2010. Morphological, genetic, chemical and ecophysiological characterisation of two *Microcystis aeruginosa* isolates from the Vistula Lagoon, southern Baltic. *Oceanologia*. 52:127–46.
- Meissner, S., Fastner, J. & Dittmann, E. 2013. Microcystin production revisited: conjugate formation makes a major contribution. *Environmental Microbiology*. 15:1810–20.
- Meissner, S., Steinhauser, D. & Dittmann, E. 2015. Metabolomic analysis indicates a pivotal role of the hepatotoxin microcystin in high light adaptation of *Microcystis*. *Environmental Microbiology*. 17:1497–509.
- Mekebri, A., Blondina, G.J. & Crane, D.B. 2009. Method validation of microcystins in water and tissue by enhanced liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1216:3147–55.
- Melero-Jiménez, I.J., Martín-Clemente, E., García-Sánchez, M.J., Flores-Moya, A. & Bañares-España, E. 2019. Adaptation of the toxic freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to salinity is achieved by the selection of spontaneous mutants. *Phycological Research*. 67:192–201.
- Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E. & Thomas, O. 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International*. 59:303–27.
- Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G.A. (Geoffrey A.. & European Cooperation in the Field of Scientific and Technical Research (Organization) 2016. Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. 548 pp.
- Metcalfe, J.S. & Codd, G.A. 2012. Cyanotoxins. *In Ecology of Cyanobacteria II*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 651–75.
- Michalak, A.M., Anderson, E.J., Beletsky, D., Boland, S., Bosch, N.S., Bridgeman, T.B., Chaffin, J.D. et al. 2013. Record-setting

- algal bloom in Lake Erie caused by agricultural and meteorological trends consistent with expected future conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110:6448–52.
- Mikami, K. & Murata, N. 2003. Membrane fluidity and the perception of environmental signals in cyanobacteria and plants. *Progress in Lipid Research*. 42:527–43.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. & Mittler, R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment*. 33:453–67.
- Miller, M.A., Kudela, R.M., Mekebri, A., Crane, D., Oates, S.C., Tinker, M.T., Stedler, M. et al. 2010. Evidence for a novel marine harmful algal bloom: Cyanotoxin (microcystin) transfer from land to sea otters. *PLoS ONE*. 5:1–11.
- Misson, B., Sabart, M., Amblard, C. & Latour, D. 2012. Benthic survival of *Microcystis*: Long-term viability and ability to transcribe microcystin genes. *Harmful Algae*. 13:20–5.
- Mitsch, W.J. & Gosselink, J.G. 2000. *Wetlands* John Wiley & Sons, Inc., New York, New York.
- Mohamed, Z.A. & Al-Shehri, A.M. 2015. Biodiversity and toxin production of cyanobacteria in mangrove swamps in the Red Sea off the southern coast of Saudi Arabia. *Botanica Marina*. 58:23–34.
- Mohammad, A., Reed, R.H. & Stewart, W.D.P. 1983. The halophilic cyanobacterium *Synechocystis* DUN52 and its osmotic responses. *FEMS Microbiology Letters*. 16:287–90.
- Moisander, P.H., Lehman, P.W., Ochiai, M. & Corum, S. 2009. Diversity of *Microcystis aeruginosa* in the Klamath River and San Francisco Bay delta, California USA. *Aquatic Microbial Ecology*. 57:19–31.
- Neilan, B.A., Pearson, L.A., Muenchhoff, J., Moffitt, M.C. & Dittmann, E. 2013. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*. 15:1239–53.
- Nielsen, D.L., Brock, M.A., Rees, G.N. & Baldwin, D.S. 2003. Effects of increasing salinity on freshwater ecosystems in Australia. *Australian Journal of Botany*. 51:655.
- Nishizawa, T., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K.-I. & Shirai, M. 1999. Genetic Analysis of the Peptide Synthetase Genes for a Cyclic Heptapeptide Microcystin in *Microcystis* spp.1. *J. Biochem*. 126:520–9.
- Nueda, M.J., Conesa, A., Westerhuis, J.A., Hoefsloot, H.C.J., Smilde, A.K., Talón, M. & Ferrer, A. 2007. Discovering gene expression patterns in time course microarray experiments by ANOVA–SCA. *Bioinformatics*. 23:1792–800.
- O’Neil, J.M., Davis, T.W., Burford, M.A. & Gobler, C.J. 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*. 14:313–34.
- Oehrle, S., Rodriguez-Matos, M., Cartamil, M., Zavala, C. & Rein, K.S. 2017. Toxin composition of the 2016 *Microcystis aeruginosa* bloom in the St. Lucie Estuary, Florida. *Toxicon*. 138:169–72.
- Oehrle, S.A., Southwell, B. & Westrick, J. 2010. Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Toxicon*.

- Ogawa, T., Misumi, M. & Sonoike, K. 2017. Estimation of photosynthesis in cyanobacteria by pulse-amplitude modulation chlorophyll fluorescence: problems and solutions. *Photosynthesis Research*. 133:63–73.
- Oh, H.M., Lee, S.J., Jang, M.H. & Yoon, B.D. 2000. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat. *Applied and environmental microbiology*. 66:176–9.
- Omidi, A., Esterhuizen-Londt, M. & Pflugmacher, S. 2018. Still challenging: the ecological function of the cyanobacterial toxin microcystin – What we know so far. *Toxin Reviews*. 37:87–105.
- Onyema, I.. 2018. Phytoplankton Composition and Dynamics at A Tropical Tidal Creek, Lagos. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, B. Zoology*. 10:79–89.
- Oren, A. 2007. Diversity of Organic Osmotic Compounds and Osmotic Adaptation in Cyanobacteria and Algae. *In Archaea*. pp. 639–55.
- Organization, W.H. 2003. Cyanobacterial Toxins: Microcystin-LR in Drinking-Water Background Document for Development of WHO Guidelines for Drinking-Water Quality.
- Orr, P.T. & Jones, G.J. 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and Oceanography*. 43:1604–14.
- Orr, P.T., Jones, G.J. & Douglas, G.B. 2004. Response of cultured *Microcystis aeruginosa* from the Swan River, Australia, to elevated salt concentration and consequences for bloom and toxin management in estuaries. *Marine and Freshwater Research*. 55:277.
- Orr, P.T., Willis, A. & Burford, M.A. 2018. Application of first order rate kinetics to explain changes in bloom toxicity—the importance of understanding cell toxin quotas. *Journal of Oceanology and Limnology*. 36:1063–74.
- Ortiz, X., Korenkova, E., Jobst, K.J., MacPherson, K.A. & Reiner, E.J. 2017. A high throughput targeted and non-targeted method for the analysis of microcystins and anatoxin-A using on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography--quadrupole time-of-flight high resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 409:4959–69.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. & Watanabe, M.M. 1999. Characterization of morphospecies and strains of the genus *Microcystis* (Cyanobacteria) for a reconsideration of species classification. *Phycological Research*. 47:189–97.
- Otsuka, S., Suda, S., Shibata, S., Oyaizu, H., Matsumoto, S. & Watanabe, M.M. 2001. A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützing ex Lemmermann 1907 under the rules of the bacteriological code. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51:873–9.
- Ozturk, S. & Aslim, B. 2010. Modification of exopolysaccharide composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress. *Environmental Science and Pollution Research*. 17:595–

- 602.
- Pade, N. & Hagemann, M. 2014. Salt Acclimation of Cyanobacteria and Their Application in Biotechnology. *Life*. 5:25–49.
- Paerl, H. 2014. Mitigating Harmful Cyanobacterial Blooms in a Human- and Climatically-Impacted World. *Life*. 4:988–1012.
- Paerl, H.W., Havens, K.E., Hall, N.S., Otten, T.G., Zhu, M., Xu, H., Zhu, G. et al. 2019. Mitigating a global expansion of toxic cyanobacterial blooms: Confounding effects and challenges posed by climate change. *Marine and Freshwater Research*.
- Paerl, H.W. & Huisman, J. 2009. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports*. 1:27–37.
- Paerl, H.W. & Otten, T.G. 2016. Duelling 'CyanoHABs': unravelling the environmental drivers controlling dominance and succession among diazotrophic and non-N<sub>2</sub>-fixing harmful cyanobacteria. *Environmental Microbiology*. 18:316–24.
- Paerl, H.W., Otten, T.G. & Kudela, R. 2018. Mitigating the Expansion of Harmful Algal Blooms Across the Freshwater-to-Marine Continuum. *Environmental Science & Technology*. 52:5519–29.
- Paerl, H.W. & Paul, V.J. 2012. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research*. 46:1349–63.
- Paerl, H.W., Xu, H., McCarthy, M.J., Zhu, G., Qin, B., Li, Y. & Gardner, W.S. 2011. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu, China): The need for a dual nutrient (N & P) management strategy. *Water Research*. 45:1973–83.
- Paldavičiene, A., Zaiko, A., Mazur-Marzec, H. & Razinkovas-Baziukas, A. 2015. Bioaccumulation of microcystins in invasive bivalves: A case study from the boreal lagoon ecosystem. *Oceanologia*. 57:93–101.
- Peacock, M.B., Gobble, C.M., Senn, D.B., Cloern, J.E. & Kudela, R.M. 2018. Blurred lines: Multiple freshwater and marine algal toxins at the land-sea interface of San Francisco Bay, California. *Harmful Algae*. 73:138–47.
- Pearson, L.A., Dittmann, E., Mazmouz, R., Ongley, S.E., D'Agostino, P.M. & Neilan, B.A. 2016. The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. *Harmful algae*. 54:98–111.
- Pearson, L.A., Hisbergues, M., Börner, T., Dittmann, E., Neilan, B.A., Pearson, L.A., Hisbergues, M. et al. 2004. Inactivation of an ABC Transporter Gene, *mcyH*, Results in Loss of Microcystin Production in the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 Inactivation of an ABC Transporter Gene, *mcyH*, Results in Loss of Microcystin Production in the Cyanobacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:6370–8.
- Pérez-Carrascal, O.M., Terrat, Y., Giani, A., Fortin, N., Greer, C.W., Tromas, N. & Shapiro, B.J. 2019. Coherence of *Microcystis* species revealed through population genomics. *The ISME Journal*.
- Perkins, R.G. & Kromkamp, J.C. 2010. Chlorophyll *a* Fluorescence in Aquatic



- Sciences: Methods and Applications. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29:45e – 45.
- Pham, T.-L. & Utsumi, M. 2018. An overview of the accumulation of microcystins in aquatic ecosystems. *Journal of Environmental Management*. 213:520–9.
- Poste, A.E., Hecky, R.E. & Guildford, S.J. 2011. Evaluating Microcystin Exposure Risk through Fish Consumption. *Environmental Science & Technology*. 45:5806–11.
- Preece, E.P., Hardy, F.J., Moore, B.C. & Bryan, M. 2017. A review of microcystin detections in Estuarine and Marine waters: Environmental implications and human health risk. *Harmful Algae*. 61:31–45.
- Preece, E.P., Moore, B.C. & Hardy, F.J. 2015. Transfer of microcystin from freshwater lakes to Puget Sound, WA and toxin accumulation in marine mussels (*Mytilus trossulus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 122:98–105.
- Qian, Z., Li, Z., Ma, J., Gong, T. & Xian, Q. 2017. Analysis of trace microcystins in vegetables using matrix solid-phase dispersion followed by high performance liquid chromatography triple-quadrupole mass spectrometry detection. *Talanta*. 173:101–6.
- Rai, A.N., Bergman, B. & Rasmussen, U. (Eds.) 2002. *Cyanobacteria in Symbiosis*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Rantala, A., Fewer, D.P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Börner, T. & Sivonen, K. 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:568–73.
- Reed, R.H. & Walsby, A.E. 1985. Changes in turgor pressure in response to increases in external NaCl concentration in the gas-vacuolate cyanobacterium *Microcystis* sp. *Archives of Microbiology*. 143:290–6.
- Richardson, L.L., Sekar, R., Myers, J.L., Gantar, M., Voss, J.D., Kaczmarek, L., Remily, E.R. et al. 2007. The presence of the cyanobacterial toxin microcystin in black band disease of corals. *FEMS Microbiology Letters*. 272:182–7.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. & Stanier, R.Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology*. 111:1–61.
- Rita, D.P., Valeria, V., Silvia, B.M., Pasquale, G. & Milena, B. 2014. Microcystin Contamination in Sea Mussel Farms from the Italian Southern Adriatic Coast following Cyanobacterial Blooms in an Artificial Reservoir. *Journal of Ecosystems*. 2014:1–11.
- Robson, B.J. & Hamilton, D.P. 2003. Summer flow event induces a cyanobacterial bloom in a seasonal Western Australian estuary. *Marine and Freshwater Research*. 54:139.
- Rohrlack, T. & Hyenstrand, P. 2007. Fate of intracellular microcystins in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanophyceae). *Phycologia*. 46:277–83.
- Romero-Oliva, C.S., Contardo-Jara, V., Block, T. & Pflugmacher, S. 2014. Accumulation of microcystin congeners in different aquatic plants and crops - A case study from lake Amatitlán, Guatemala.

- Ecotoxicology and Environmental Safety*. 102:121–8.
- Ross, C., Santiago-Vázquez, L. & Paul, V. 2006. Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology*. 78:66–73.
- Ross, C., Warhurst, B.C., Brown, A., Huff, C. & Ochrietor, J.D. 2019. Mesohaline conditions represent the threshold for oxidative stress, cell death and toxin release in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology*. 206:203–11.
- Roué, M., Darius, H.T. & Chinain, M. 2018. Solid phase adsorption toxin tracking (Spatt) technology for the monitoring of aquatic toxins: A review. *Toxins*. 10.
- Sabart, M., Pobel, D., Briand, E., Combourieu, B., Salençon, M.J., Humbert, J.F. & Latour, D. 2010. Spatiotemporal Variations in Microcystin Concentrations and in the Proportions of Microcystin-Producing Cells in Several *Microcystis aeruginosa* Populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 76:4750–9.
- Sandrini, G., Cunsolo, S., Schuurmans, J.M., Matthijs, H.C.P. & Huisman, J. 2015a. Changes in gene expression, cell physiology and toxicity of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* at elevated CO<sub>2</sub>. *Frontiers in Microbiology*. 6.
- Sandrini, G., Huisman, J. & Matthijs, H.C.P. 2015b. Potassium sensitivity differs among strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis* and correlates with the presence of salt tolerance genes. *FEMS Microbiology Letters*. 362:1–17.
- Schmidt, J., Wilhelm, S. & Boyer, G. 2014. The Fate of Microcystins in the Environment and Challenges for Monitoring. *Toxins*. 6:3354–87.
- Schopf, J.W. 2012. The Fossil Record of Cyanobacteria. In Whitton, B. A. [Ed.] *Ecology of Cyanobacteria II*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 15–36.
- Schreiber, U. 2004. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method: An Overview. In *Chlorophyll a Fluorescence*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 279–319.
- Schwarz, D., Orf, I., Kopka, J. & Hagemann, M. 2013. Recent applications of metabolomics toward cyanobacteria. *Metabolites*. 3:72–100.
- Sellner, K.G., Lacouture, R.V. & Parrish, C.R. 1988. Effects of increasing salinity on a cyanobacteria bloom in the Potomac River estuary. *Journal of Plankton Research*. 10:49–61.
- Serive, B., Kaas, R., Bérard, J.-B., Pasquet, V., Picot, L. & Cadoret, J.-P. 2012. Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae. *Bioresource Technology*. 124:311–20.
- Sevilla, E., Martin-Luna, B., Bes, M.T., Fillat, M.F. & Peleato, M.L. 2012. An active photosynthetic electron transfer chain required for *mcyD* transcription and microcystin synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Ecotoxicology*. 21:811–9.
- Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Teresa Bes, M., Luisa Peleato, M. & Fillat, M.F. 2010. Microcystin-LR synthesis as response to nitrogen: Transcriptional analysis of the *mcyD* gene in *Microcystis*

- aeruginosa PCC7806. *Ecotoxicology*. 19:1167–73.
- Shih, P.M., Hemp, J., Ward, L.M., Matzke, N.J. & Fischer, W.W. 2017. Crown group Oxyphotobacteria postdate the rise of oxygen. *Geobiology*. 15:19–29.
- Sinetova, M.A. & Los, D.A. 2016. Systemic analysis of stress transcriptomics of *Synechocystis* reveals common stress genes and their universal triggers. *Molecular BioSystems*. 12:3254–8.
- Sivonen, K. & Jones, G. 1999. Cyanobacterial toxins. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. 1:43–112.
- Smilde, A.K., Jansen, J.J., Hoefsloot, H.C.J., Lamers, R.J.A.N., van der Greef, J. & Timmerman, M.E. 2005. ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA): A new tool for analyzing designed metabolomics data. *Bioinformatics*. 21:3043–8.
- Smith, C.A., Want, E.J., O'Maille, G., Abagyan, R. & Siuzdak, G. 2006. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical chemistry*. 78:779–87.
- Sobrinho, C., Matthiensen, A., Vidal, S. & Galvao, H. 2004. Occurrence of microcystins along the Guadiana estuary. *Limnetica*. 23:133–44.
- Soo, R.M., Hemp, J. & Hugenholtz, P. 2019. Evolution of photosynthesis and aerobic respiration in the cyanobacteria. *Free Radical Biology and Medicine*.
- Soo, R.M., Hemp, J., Parks, D.H., Fischer, W.W. & Hugenholtz, P. 2017. On the origins of oxygenic photosynthesis and aerobic respiration in Cyanobacteria. *Science*. 355:1436–40.
- Soto-Liebe, K., Méndez, M.A., Fuenzalida, L., Krock, B., Cembella, A. & Vásquez, M. 2012. PSP toxin release from the cyanobacterium *Raphidiopsis brookii* D9 (Nostocales) can be induced by sodium and potassium ions. *Toxicon*. 60:1324–34.
- Stefels, J. 2000. Physiological aspects of the production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants. *Journal of Sea Research*. 43:183–97.
- Steffen, M.M., Dearth, S.P., Dill, B.D., Li, Z., Larsen, K.M., Campagna, S.R. & Wilhelm, S.W. 2014. Nutrients drive transcriptional changes that maintain metabolic homeostasis but alter genome architecture in *Microcystis*. *ISME Journal*. 8:2080–92.
- Steinke, M., Hodapp, B., Subhan, R., Bell, T.G. & Martin-Creuzburg, D. 2018. Flux of the biogenic volatiles isoprene and dimethyl sulfide from an oligotrophic lake. *Scientific Reports*. 8:630.
- Straub, C., Quillardet, P., Vergalli, J., de Marsac, N.T. & Humbert, J.F. 2011. A day in the life of *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806 as revealed by a transcriptomic analysis. *PLoS ONE*. 6.
- Sukenik, A., Hadas, O., Kaplan, A. & Quesada, A. 2012. Invasion of Nostocales (cyanobacteria) to subtropical and temperate freshwater lakes - physiological, regional, and global driving forces. *Frontiers in Microbiology*. 3:1–9.
- Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., Daykin, C.A., Fan, T.W.-M. et al. 2007. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. Chemical Analysis Working Group

- (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society*. 3:211–21.
- Sun, J. & Liu, D. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research*. 25:1331–46.
- Svirčev, Z., Lalić, D., Bojadžija Savić, G., Tokodi, N., Drobac Backović, D., Chen, L., Meriluoto, J. et al. 2019. Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. Springer Berlin Heidelberg.
- Szymańska, E., Saccenti, E., Smilde, A.K. & Westerhuis, J.A. 2012. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics*. 8:3–16.
- Takahashi, T., Umehara, A. & Tsutsumi, H. 2014. Diffusion of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) from the reservoir of Isahaya Bay, Japan, into the marine and surrounding ecosystems as a result of large-scale drainage. *Marine Pollution Bulletin*. 89:250–8.
- Tanabe, Y., Hodoki, Y., Sano, T., Tada, K. & Watanabe, M.M. 2018. Adaptation of the Freshwater Bloom-Forming Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to Brackish Water Is Driven by Recent Horizontal Transfer of Sucrose Genes. *Frontiers in Microbiology*. 9:1–11.
- Tanabe, Y., Yamaguchi, H., Sano, T. & Kawachi, M. 2019. A novel salt-tolerant genotype illuminates the sucrose gene evolution in freshwater bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*. 111:1009–10.
- Tang, C., Sun, B., Yu, K., Shi, J., Liu, M., Jiang, T., Huo, Y. et al. 2018. Environmental triggers of a *Microcystis* (Cyanophyceae) bloom in an artificial lagoon of Hangzhou Bay, China. *Marine Pollution Bulletin*. 135:776–82.
- Taranu, Z.E., Gregory-Eaves, I., Leavitt, P.R., Bunting, L., Buchaca, T., Catalan, J., Domaizon, I. et al. 2015. Acceleration of cyanobacterial dominance in north temperate-subarctic lakes during the Anthropocene. *Ecology Letters*. 18:375–84.
- Teikari, J.E., Hou, S., Wahlsten, M., Hess, W.R. & Sivonen, K. 2018. Comparative genomics of the Baltic Sea toxic cyanobacteria *Nodularia spumigena* UHCC 0039 and its response to varying salinity. *Frontiers in Microbiology*. 9:1–13.
- Testai, E., Buratti, F.M., Funari, E., Manganeli, M., Vichi, S., Arnich, N., Biré, R. et al. 2016. Review and analysis of occurrence, exposure and toxicity of cyanobacteria toxins in food. *EFSA supporting publication 2016:EN-998*. 309p.
- Thomas, M.K. & Litchman, E. 2016. Effects of temperature and nitrogen availability on the growth of invasive and native cyanobacteria. *Hydrobiologia*. 763:357–69.
- Tonk, L., Bosch, K., Visser, P. & Huisman, J. 2007. Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Microbial Ecology*. 46:117–23.
- Tonk, L., Welker, M., Huisman, J. & Visser, P.M. 2009. Production of cyanopeptolins, anabaenopeptins, and microcystins by the harmful cyanobacteria *Anabaena* 90 and *Microcystis* PCC 7806. *Harmful Algae*. 8:219–24.
- Turner, A.D., Waack, J., Lewis, A., Edwards, C.

- & Lawton, L. 2018. Development and single-laboratory validation of a UHPLC-MS/MS method for quantitation of microcystins and nodularin in natural water, cyanobacteria, shellfish and algal supplement tablet powders. *Journal of Chromatography B*. 1074–1075:111–23.
- Umehara, A., Takahashi, T., Komorita, T., Orita, R., Choi, J.W., Takenaka, R., Mabuchi, R. et al. 2017. Widespread dispersal and bioaccumulation of toxic microcystins in benthic marine ecosystems. *Chemosphere*. 167:492–500.
- UNESCO 1985. The international system of units (SI) in oceanography.
- Utkilen, H. & Gjølme, N. 1992. Toxin Production by *Microcystis aeruginosa* as a Function of Light in Continuous Cultures and Its Ecological Significance. *Applied and environmental microbiology*. 58:1321–5.
- Van de Waal, D.B., Verspagen, J.M.H., Lüring, M., Van Donk, E., Visser, P.M. & Huisman, J. 2009. The ecological stoichiometry of toxins produced by harmful cyanobacteria: an experimental test of the carbon-nutrient balance hypothesis. *Ecology Letters*. 12:1326–35.
- van den Berg, R.A., Hoefsloot, H.C.J., Westerhuis, J.A., Smilde, A.K. & van der Werf, M.J. 2006. Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*. 7:1–15.
- van der Kloet, F.M., Bobeldijk, I., Verheij, E.R. & Jellema, R.H. 2009. Analytical Error Reduction Using Single Point Calibration for Accurate and Precise Metabolomic Phenotyping. *Journal of Proteome Research*. 8:5132–41.
- Vareli, K., Jaeger, W., Touka, A., Frillingos, S., Briasoulis, E. & Sainis, I. 2013. Hepatotoxic Seafood Poisoning (HSP) Due to Microcystins: A Threat from the Ocean? *Marine Drugs*. 11:2751–68.
- Vareli, K., Zarali, E., Zacharioudakis, G.S.A., Vagenas, G., Varelis, V., Pilidis, G., Briasoulis, E. et al. 2012. Microcystin producing cyanobacterial communities in Amvrakikos Gulf (Mediterranean Sea, NW Greece) and toxin accumulation in mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Harmful Algae*. 15:109–18.
- Vergalli, J., Vergalli, J., Fayolle, S., Combes, A. & Franquet, E. 2019. Persistence of microcystin production by *Planktothrix agardhii* (Cyanobacteria) exposed to different salinities Persistence of microcystin production by *Planktothrix agardhii* (Cyanobacteria) exposed to different salinities. *Phycologia*. 00:1–11.
- Verspagen, J.M.H., Passarge, J., Jöhnk, K.D., Visser, P.M., Peperzak, L., Boers, P., Laanbroek, H.J. et al. 2006. Water management strategies against toxic *Microcystis* blooms in the Dutch delta. *Ecological applications: a publication of the Ecological Society of America*. 16:313–27.
- Vial, J. & Jardy, A. 1999. Experimental comparison of the different approaches to estimate LOD and LOQ of an HPLC method. *Analytical Chemistry*. 71:2672–7.
- Vis, D.J., Westerhuis, J.A., Smilde, A.K. & van der Greef, J. 2007. Statistical validation of megavariate effects in ASCA. *BMC Bioinformatics*. 8:1–8.
- Visser, P.M., Passarge, J. & Mur, L.R. 1997. Modelling vertical migration of the cyanobacterium *Microcystis*. *Hydrobiologia*. 349:99–109.

- Visser, P.M., Verspagen, J.M.H., Sandrini, G., Stal, L.J., Matthijs, H.C.P., Davis, T.W., Paerl, H.W. et al. 2016. How rising CO<sub>2</sub> and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*. 54:145–59.
- Wada, H. & Murata, N. 1998. Membrane Lipids in Cyanobacteria BT - Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics. In Paul-André, S. & Norio, M. [Eds.]. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 65–81.
- Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V. V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D.D. et al. 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*. 34:828–37.
- Watson, S.B., Monis, P., Baker, P. & Giglio, S. 2016. Biochemistry and genetics of taste- and odor-producing cyanobacteria. *Harmful Algae*. 54:112–27.
- Wei, N., Hu, L., Song, L.R. & Gan, N.Q. 2016. Microcystin-bound protein patterns in different cultures of *Microcystis aeruginosa* and field samples. *Toxins*. 8.
- White, E. & Kaplan, D. 2017. Restore or retreat? saltwater intrusion and water management in coastal wetlands. *Ecosystem Health and Sustainability*. 3:e01258.
- Whitton, B.A. 2012. Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time. Springer Netherlands, Dordrecht. 1–760 pp.
- Wiedner, C., Visser, P.M., Fastner, J., Metcalf, J.S., Codd, G. a & Mur, L.R. 2003. Effects of Light on the Microcystin Content of. *Society*. 69:1475–81.
- Wood, A.M., Everroad, R.C. & Wingard, L.M. 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. *Algal culturing techniques*. 18:269–88.
- Wood, J.M. 1999. Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 63:230–62.
- Wood, S.A., Borges, H., Puddick, J., Biessy, L., Atalah, J., Hawes, I., Dietrich, D.R. et al. 2017. Contrasting cyanobacterial communities and microcystin concentrations in summers with extreme weather events: insights into potential effects of climate change. *Hydrobiologia*. 785:71–89.
- Wood, S.A., Holland, P.T. & MacKenzie, L. 2011. Development of solid phase adsorption toxin tracking (SPATT) for monitoring anatoxin-a and homoanatoxin-a in river water. *Chemosphere*. 82:888–94.
- Wood, S.A., Jentzsch, K., Rueckert, A., Hamilton, D.P. & Cary, S.C. 2009. Hindcasting cyanobacterial communities in Lake Okaro with germination experiments and genetic analyses. *FEMS Microbiology Ecology*. 67:252–60.
- Wood, S.A., Kuhajek, J.M., de Winton, M. & Phillips, N.R. 2012. Species composition and cyanotoxin production in periphyton mats from three lakes of varying trophic status. *FEMS Microbiology Ecology*. 79:312–26.
- Wu, Z. xing, Gan, N. qin, Huang, Q. & Song, L. rong 2007. Response of *Microcystis* to copper stress - Do phenotypes of *Microcystis* make a difference in stress tolerance? *Environmental Pollution*. 147:324–30.
- Wurtsbaugh, W.A., Paerl, H.W. & Dodds, W.K.

2019. Nutrients, eutrophication and harmful algal blooms along the freshwater to marine continuum. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water*. 6:e1373.
- Xiao, M., Li, M. & Reynolds, C.S. 2018. Colony formation in the cyanobacterium *Microcystis*. *Biological Reviews*. 93:1399–420.
- Yang, Z., Kong, F. & Zhang, M. 2016. Groundwater contamination by microcystin from toxic cyanobacteria blooms in Lake Chaohu, China. *Environmental Monitoring and Assessment*. 188.
- Yeung, A.C.Y., D'Agostino, P.M., Poljak, A., McDonald, J., Bligh, M.W., Waite, T.D. & Neilan, B.A. 2016. Physiological and Proteomic Responses of Continuous Cultures of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 to Changes in Iron Bioavailability and Growth Rate. *Applied and Environmental Microbiology*. 82:5918–29.
- Yoshizawa, S., Matsushima, R., Watanabe, M.F., Harada, K., Ichihara, A., Carmichael, W.W. & Fujiki, H. 1990. Inhibition of protein phosphatases by *Microcystis* and nodularin associated with hepatotoxicity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 116:609–14.
- Yunes, J.S., Salomon, P.S., Matthiensen, A., Beattie, K.A., Raggett, S.L. & Codd, G.A. 1996. Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, southern Brazil. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 5:223–9.
- Zendong, Z., Herrenknecht, C., Abadie, E., Brissard, C., Tixier, C., Mondeguer, F., Séchet, V. et al. 2014. Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins. *Toxicon*. 91:57–68.
- Zhang, T., Gong, H., Wen, X. & Lu, C. 2010. Salt stress induces a decrease in excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem II but an increase to photosystem I in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Journal of Plant Physiology*. 167:951–8.
- Zhang, Y., Xu, Q. & Xi, B. 2013. Effect of NaCl salinity on the growth, metabolites, and antioxidant system of *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Freshwater Ecology*. 28:477–87.
- Zhao, H., Qiu, J., Fan, H. & Li, A. 2013. Mechanism and application of solid phase adsorption toxin tracking for monitoring microcystins. *Journal of Chromatography A*. 1300:159–64.
- Zhao, L., Song, Y., Li, L., Gan, N., Brand, J.J. & Song, L. 2018. The highly heterogeneous methylated genomes and diverse restriction-modification systems of bloom-forming *Microcystis*. *Harmful Algae*. 75:87–93.
- Zilliges, Y., Kehr, J.C., Meissner, S., Ishida, K., Mikkat, S., Hagemann, M., Kaplan, A. et al. 2011. The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. *PLoS ONE*. 6.





**Titre :** Variations de salinité chez la cyanobactérie toxique d'eau douce *Microcystis aeruginosa* dans un contexte de transfert en milieu estuarien : réponses physiologiques et métaboliques

**Mots clés :** Microcystines, Salinité, Écophysiologie, Métabolomique, Stress, Acclimatation

**Résumé :** Les efflorescences de *Microcystis aeruginosa* se développent sur l'ensemble des continents et leurs intensités et fréquences devraient s'accroître avec le changement climatique. Ces proliférations sont associées à la production de toxines appartenant à la famille des microcystines. Dans ce contexte, l'aire de répartition de *M. aeruginosa* tend à s'étendre aux zones estuariennes. Sa présence ainsi que celles des microcystines en zone côtière est principalement due au transfert des efflorescences d'eau douce par le continuum eau douce – estuaire. Ce transfert peut aboutir à la lyse des cellules libérant les microcystines dans l'environnement. Le risque sanitaire lié au transfert de *M. aeruginosa* et les conséquences d'une augmentation de la salinité sur sa croissance, sa production de microcystines et plus généralement sur sa physiologie ont été peu étudiés. L'objectif principal de cette thèse a été d'étudier les réponses physiologiques et métaboliques de *M. aeruginosa* à une augmentation de salinité. Cette étude a tout d'abord permis le développement d'une méthode d'extraction et d'analyse des microcystines par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie

de masse pour l'analyse d'échantillons de cellules et d'eau, prélevés en milieu salin. La réponse physiologique de *M. aeruginosa* confrontée à une augmentation de la salinité a été étudiée chez deux souches (PCC 7820 et PCC 7806) par stress et après acclimatation à la salinité. Ces travaux ont mis en évidence que *M. aeruginosa* peut tolérer des variations de salinité par l'accumulation de solutés compatibles tels que le tréhalose (PCC 7820) et le saccharose (PCC 7806). Les analyses conduites en métabolomique ont révélé l'existence d'une diversité de métabolites spécifiques d'une réponse à une augmentation de salinité. Chez les souches acclimatées, l'accumulation de lipides membranaires (monogalactosylglycerol) a été mise en évidence. Également, la production de microcystines est apparue corrélée au taux de croissance de *M. aeruginosa* en réponse à une augmentation de la salinité. Ces travaux suggèrent que les variations de salinité chez *M. aeruginosa* n'affectent pas directement la nature et la quantité des microcystines produites. Ces analyses menées sur des échantillons naturels et en laboratoire suggèrent que les cellules peuvent survivre et croître en condition mésohaline.

**Title :** Salinity variations in *Microcystis aeruginosa* in the context of a transfer to estuaries: physiological and metabolic responses

**Keywords :** Microcystins, Salinity, Ecophysiology, Metabolomics, Stress, Acclimation

**Abstract:** *M. aeruginosa* is one of the most pervasive toxic freshwater cyanobacterial species worldwide. The frequency and intensity of *M. aeruginosa* blooms are expected to increase in response to climate change. The influence of *M. aeruginosa* is extending to estuaries and coastal environment due to the transfer of freshwater bloom across the freshwater-estuary continuum. This transfer can ultimately result in cell lysis and the subsequent release of dissolved microcystins. Little is known about this phenomenon and the effect of salt increase on growth, microcystin production and *M. aeruginosa* physiology. This PhD project therefore aimed to better describe the physiological and metabolic response of *M. aeruginosa* to salt increase. First, a method using liquid chromatography coupled to mass spectrometry was developed and characterized in order to conduct the quantification of microcystins in cells and water samples taken from estuaries.

The physiological responses of *M. aeruginosa*, subjected to a salinity increase was monitored on two acclimated and non-acclimated strains (PCC 7820 and PCC 7806). This work provided insights into the accumulation of compatible solutes like trehalose (PCC 7820) and sucrose (PCC 7806) in response to salt increase. Metabolomic analyses revealed the existence of specific metabolites involved in salt stress and acclimation responses. In acclimated strains, the synthesis of monogalactosyldiacylglycerol in response to salt increase was found. Overall, the different experiments conducted on *M. aeruginosa* revealed that the microcystin production rate was correlated to the growth rate. Taken together, the results obtained from laboratory and field samples suggest that cell lysis is not an immediate phenomenon and that *M. aeruginosa* cells could survive and proliferate in mesohaline conditions.