

***Microcystis aeruginosa*, un modèle pour étudier le déterminisme de la toxicité chez les cyanobactéries (programme MATRICS)**

J.F. Humbert^{1,2}, C. Boileau³, E. Briand^{2,4,5}, M. Sabart^{2,6}, C. Straub², M. Bormans⁴, L. Hoffmann⁷, D. Latour⁶, C. Quiblier⁵, P. Quillardet², J. Renaut⁷, C.C. Zhang³

1. UMR BIOEMCO, ENS/INRA/CNRS/IRD/UPMC/AgroParisTech/Univ. Paris-Est, Paris
2. Unité des Cyanobactéries, Institut Pasteur, Paris
3. Laboratoire de Chimie Bactérienne, CNRS-Université, Marseille
4. UMR ECOBIO, CNRS/Université, Rennes
5. UMR MCAM, MNHN de Paris/Université Paris Diderot, Paris
6. UMR LMGE, CNRS/Université, Clermont-Ferrand
7. CRP Gabriel Lippmann, Luxembourg

Adresses électroniques des participants : humbert@biologie.ens.fr, quiblier@mnhn.fr, Myriam.Bormans@univ-rennes1.fr, briandenora@yahoo.fr, cczhang@ifr88.cnrs-mrs.fr, delphine.latour@univ-bpclermont.fr, philqui@wanadoo.fr, Marion.SABART@univ-bpclermont.fr, cecile.straub@free.fr, renaut@lippmann.lu, hoffmann@lippmann.lu

I. Introduction

En raison de l'eutrophisation d'un grand nombre d'écosystèmes aquatiques continentaux et probablement aussi en raison des changements climatiques, les proliférations de



Figure 1. Prolifération de *Microcystis aeruginosa* dans la retenue de Villerest.

cyanobactéries semblent de plus en plus fréquentes sur tous les continents et sous toutes les latitudes (Figure 1). Ces proliférations perturbent le fonctionnement des écosystèmes aquatiques (diminution de la biodiversité des communautés phytoplanctoniques, perturbation des réseaux trophiques, mortalité de poissons liée à des phases d'anoxie...) et elles constituent un risque important pour la santé animale et humaine. En effet, de nombreuses espèces de cyanobactéries sont capables de synthétiser des toxines ayant des cibles diverses (foie, système nerveux, peau et muqueuses). Parmi ces toxines, les microcystines (MCs) qui sont des oligopeptides cycliques inhibant les protéines phosphatases (PP1 ou PP2A) des eucaryotes, sont les plus fréquemment produites par les genres majeurs de cyanobactéries présents dans les écosystèmes aquatiques continentaux (*Microcystis*, *Plankthotrix* et *Anabaena*).

Si la voie de synthèse non ribosomale de ces métabolites est désormais bien connue, en revanche de nombreuses questions demeurent sur le rôle fonctionnel de ces toxines, ainsi que sur le déterminisme de leur production lors des événements de prolifération. En effet, lorsque de tels événements surviennent, les concentrations en MCs peuvent présenter, pour une même espèce, de grandes variations d'un écosystème à l'autre, même lorsque ceux-ci sont proches géographiquement les uns des autres, mais aussi au cours du déroulement de ces proliférations. Cette grande variabilité ne permet pas actuellement de prédire le niveau de toxicité potentielle d'une prolifération et son évolution temporelle, à partir de l'estimation de la biomasse des cyanobactéries.

Le projet MATRICS avait donc pour but de mieux connaître et de mieux comprendre les processus qui interviennent dans les variations de toxicité potentielle observées lors des proliférations de cyanobactéries. Dans ce but, nos travaux se sont focalisés sur un modèle

d'étude, *Microcystis aeruginosa* car cette espèce est l'une des plus communes des plans d'eau continentaux et se trouve, de ce fait, impliquée dans de nombreux cas d'intoxications animales et humaines à travers le monde. Les trois principaux objectifs de nos travaux ont été les suivants :

1. Mieux comprendre les variations dans la proportion de cellules potentiellement productrices de microcystines au cours des proliférations de *M. aeruginosa*,
2. Identifier le rôle fonctionnel des microcystines pour les cellules qui les produisent afin de mieux comprendre les variations dans leur production,
3. Proposer un modèle conceptuel puis un modèle mathématique permettant de simuler les variations dans le potentiel toxique lié à la production de MCs, au cours des proliférations de la cyanobactérie.

II. Organisation du projet et méthodologies utilisées

Le projet MATRICS était structuré autour de trois actions de recherche organisées en six ateliers.

La première action de recherche avait pour but d'identifier les facteurs et processus environnementaux qui influencent la production de MCs au cours des diverses phases d'une prolifération. Cette action a reposé sur trois ateliers faisant appel à des suivis de terrain et à des approches expérimentales. Le premier de ces ateliers consistait (i) à évaluer, dans des populations naturelles de *M. aeruginosa*, les variations dans la diversité génétique et dans les proportions de cellules toxiques et non toxiques au cours de divers événements de prolifération de cette espèce et (ii) à rechercher les variables environnementales associées aux variations génotypiques et à la sélection différentielle des cellules productrices ou non-productrices de MCs. Il est en effet désormais établi que la toxicité d'une prolifération de cyanobactéries dépend en grande partie de la proportion relative de ces deux types de cellules dans la population considérée. Pour évaluer cette proportion, nous avons utilisé une approche de Real Time-PCR, ciblant un des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des MCs. Par ailleurs l'étude de la diversité génétique dans les populations de *M. aeruginosa* a reposé sur le séquençage de l'ITS de l'ARNr. Les populations de *Microcystis* étudiées ont été celles de deux retenues de la Loire (Grangent et Villerest) ainsi que de plusieurs petits étangs piscicoles situés dans le même bassin hydrographique. En parallèle à ce suivi de terrain, nous avons développé une approche expérimentale pour comparer la valeur adaptative (fitness) d'une souche sauvage de *M. aeruginosa* productrice de MCs (PCC 7806) et de son mutant non producteur de MCs, dans le but d'évaluer le rapport coût/bénéfice à synthétiser ces métabolites (atelier 2). Ces travaux ont reposé à la fois sur des cultures isolées de ces souches afin d'estimer et de comparer leurs taux de croissance dans diverses conditions environnementales, et sur des co-cultures afin d'évaluer les capacités compétitives relatives de ces souches toxique et non toxique. Les mêmes travaux devaient être aussi réalisés sur ces mêmes souches après insertion, d'un gène rapporteur de stress, dans le but de détecter les effets précoces de la compétition sur les activités physiologiques de ces deux souches (atelier 3). Malheureusement, malgré de nombreuses tentatives faisant appel à diverses stratégies, il n'a pas été possible d'obtenir ces souches contenant ce gène rapporteur précoce de stress en raison de la difficulté à transformer *M. aeruginosa*.

La deuxième action de recherche (ateliers 4 et 5) consistait à réaliser une approche conjointe de transcriptomique et de protéomique comparées, sur la souche sauvage toxique *Microcystis* PCC 7806 et sur son mutant non toxique, lorsqu'elles sont placées dans diverses conditions de culture. Le but de ces travaux était d'identifier des différences dans le métabolisme de ces deux souches (toxique/non toxique) afin de comprendre leurs capacités relatives à se développer dans des conditions environnementales variées mais aussi afin de formuler des hypothèses sur le rôle fonctionnel des MCs dans le métabolisme cellulaire.

L'approche de transcriptomique a reposé sur l'utilisation d'une puce à ADN de technologie Agilent, qui a été développée spécifiquement pour ce projet et validée dans une première étude portant sur l'étude du métabolisme de la seule souche sauvage au cours d'un cycle jour/nuit.

Enfin, la troisième action de recherche (atelier 6) se voulait intégrative des trois précédentes puisqu'elle avait pour but de tenter de modéliser la dynamique des clones producteurs et non producteurs de MCs dans une population de *Microcystis* soumise à des contraintes environnementales diverses.

III. Principaux résultats obtenus

Objectif 1. Mieux comprendre les variations dans la toxicité potentielle au cours des proliférations de *M. aeruginosa*.

Une étude sur la composition génotypique de diverses populations de *M. aeruginosa* a montré que lors des phases de prolifération de cette cyanobactérie, les conditions environnementales

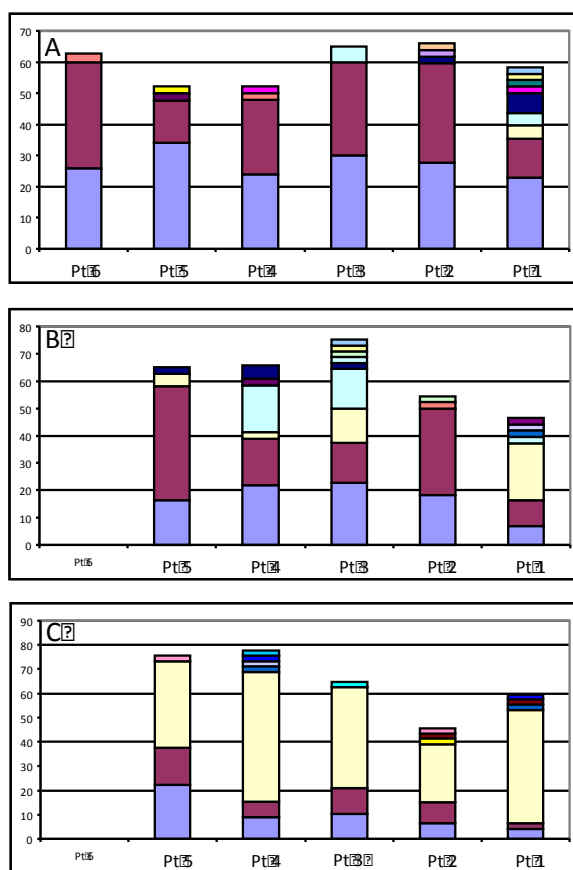


Figure 2. Evolution spatiale et temporelle de la composition génotypique d'une population de *Microcystis aeruginosa* proliférant dans la retenue de Grangent (A : début de la prolifération; B : prélèvement intermédiaire ; C : maximum de la prolifération).

La composition génotypique a été étudiée par séquençage de l'ITS de l'ARNr en six points d'échantillonnage répartis tout au long de la retenue (P1-P6). Chaque couleur correspond à un génotype; leur proportion est donnée en % sur l'axe des ordonnées. Seuls les génotypes trouvés au moins deux fois ont été placés dans cette figure.

peuvent conduire soit à une diminution de la diversité génétique au sein des populations qui s'accompagne de la sélection de quelques génotypes dominants (probablement par exclusion compétitive) (voir par exemple la Figure 2), soit au maintien de cette diversité génétique au sein des populations. Par ailleurs, la comparaison de la composition génotypique de populations proliférant dans des écosystèmes plus ou moins éloignés géographiquement révèle qu'il n'existe aucune structuration biogéographique chez cette cyanobactérie. Enfin, ces travaux ont montré que les processus sélectifs observés dans certaines populations, s'opèrent à l'échelle de chaque écosystème, même lorsque ceux-ci sont interconnectés. Tous ces résultats soulignent l'importance prépondérante des conditions environnementales locales (à l'échelle de chaque écosystème et peut-être même à l'échelle de certaines zones dans l'écosystème) sur la dynamique des populations de la cyanobactérie.

L'étude de l'évolution des proportions de cellules capables ou non, de produire des MCs au cours des phases de proliférations de *M. aeruginosa*, a montré que la sélection progressive d'un nombre restreint de génotypes au cours du développement de certaines proliférations (voir Figure 2), s'accompagne, dans le même temps, d'une diminution de la proportion de cellules productrices de MCs. Lors du déclin de la prolifération, une augmentation de cette proportion de cellules productrices de MCs a été ensuite observée, permettant ainsi de revenir aux proportions observées en tout début de prolifération. Cependant, dans d'autres populations de *M.*

aeruginosa connaissant également des phases de prolifération, aucune variation significative n'a été observée dans ces proportions de cellules productrices ou non productrices de MCs. C'est ainsi que certaines populations présentent pendant toute la durée de la prolifération, une proportion élevée (70-80 %) de cellules productrices de MCs alors que d'autres présentent, au contraire, une proportion toujours faible (30-40%) de ces mêmes cellules. Il n'a pas été possible d'associer ces différentes évolutions dans les proportions de cellules productrices ou non de MCs, à des conditions environnementales particulières.

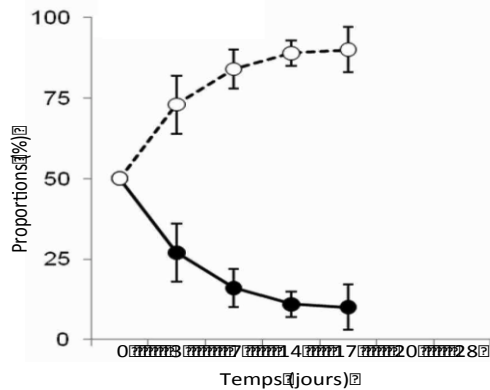


Figure 3. Evolution de la proportion de cellules productrices de MCs (cercles noirs) et de cellules non productrices (cercles blancs) dans des conditions de cocultures optimales pour les deux souches.

Pour tenter de mieux comprendre ces différences dans la fitness des souches productrices ou non productrices de MCs en fonction des conditions environnementales, une approche expérimentale basée sur l'utilisation d'une souche sauvage productrice de MCs (*M. aeruginosa* PCC 7806) et de son mutant non producteur de ces mêmes MCs a été développée. Ces travaux ont permis de montrer que, dans les conditions de culture permettant un taux de croissance élevé et une forte production de MCs, la souche productrice de MCs atteint plus précocement la phase plateau que la souche non productrice, traduisant ainsi une plus grande utilisation des ressources nutritives disponibles. Par ailleurs, dans des conditions de co-

culture permettant également un taux de croissance élevé et une forte production de MCs par la souche toxique, le coût de production des MCs se traduit par une dominance de la souche non productrice de MCs sur la souche productrice. Cette dominance aboutit à la quasi-disparition de cette dernière au bout de deux semaines de culture (Figure 3). Dans des conditions moins favorables à la croissance, aucune exclusion de l'une ou l'autre des deux souches n'a été constatée. Enfin, au cours de certaines de ces mêmes expérimentations, nous avons mis en évidence des relations de type coopération entre les deux souches qui devront être étudiées, de manière plus approfondie, dans le futur.

Objectif 2. Mieux connaître le rôle fonctionnel des microcystines pour les cellules qui les produisent.

La deuxième partie de nos travaux avait pour objectif de mieux comprendre le rôle fonctionnel des MCs pour les cellules qui les produisent. Dans ce but, une approche de transcriptomique comparée a été réalisée sur la souche sauvage PCC 7806 et sur son mutant non toxique. Dans un premier temps, cette approche a nécessité le développement d'une puce à ADN construite à partir du génome de *M. aeruginosa* PCC 7806. La validation de cette puce a été réalisée lors d'une étude du métabolisme global de *M. aeruginosa* au cours d'un cycle jour/nuit (Figure 4). Ce travail a révélé l'existence d'une compartimentation marquée du métabolisme de cette espèce entre la période diurne pendant laquelle s'effectue notamment la synthèse du glycogène, et la période nocturne pendant laquelle s'opèrent la

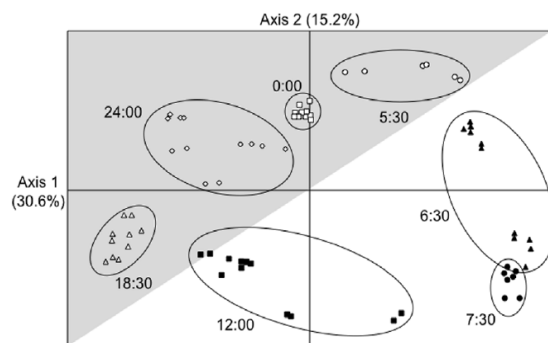


Figure 4. Analyse en composante principale réalisée sur les abondances des transcrits des 4757 gènes sélectionnés du génome de *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, au cours d'un cycle jour/nuit.

A chaque temps d'échantillonnage, les répliques sont regroupés dans la même ellipse. La partie grise de la figure correspond à la phase nocturne du cycle.

dégradation du glycogène et la biosynthèse des acides aminés. Par ailleurs, ce travail a permis de montrer que la biosynthèse des métabolites secondaires (microcystines, aeruginosine et cyanopeptoline) intervient pendant la période diurne, suggérant leur implication potentielle dans le métabolisme central de la cellule.

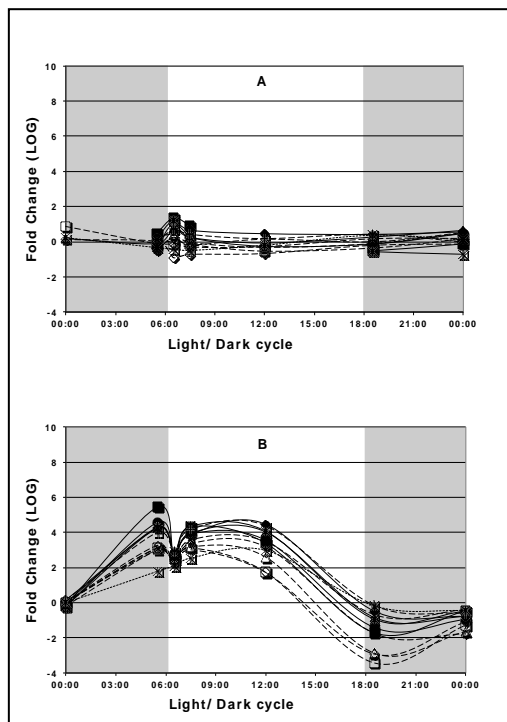


Figure 5. Variations dans l'abondance des transcrits des gènes d'un même cluster impliqué dans la biosynthèse d'un métabolite secondaire dans la souche sauvage productrice de MCs (A) et dans son mutant non producteur (B). La partie grise de la figure correspond à la phase nocturne du cycle.

mutante, un niveau d'expression très élevé, d'un cluster de gènes PKSI/PKSIII impliqués dans la biosynthèse d'un métabolite encore non identifié, alors que celui-ci était quasiment nul chez la souche sauvage productrice de MCs (Figure 5).

L'analyse comparée du protéome réalisée sur les deux souches au cours du même cycle jour/nuit, a confirmé les résultats de l'analyse de leur transcriptome, en montrant que de nombreuses protéines présentent des variations significatives lorsque l'on compare la souche productrice de MCs à celle qui n'en produit pas. Parmi ces protéines présentant des variations significatives, il est apparu que plusieurs d'entre elles sont impliquées dans la photosynthèse (par exemple *psbV*, *psaD*, allophycocyanines, ferredoxin-NADP oxidoreductase, phycobilisome rod linker polypeptide), confirmant ainsi des travaux antérieurs suggérant que les MCs pourraient jouer un rôle dans ce processus de photosynthèse. Pour compléter cette approche, les mêmes échantillons vont être prochainement utilisés dans une analyse du métabolome, afin de rechercher les différences éventuelles entre les deux souches, au niveau de leurs molécules de petites tailles.

Objectif 3. Développer un modèle conceptuel et un modèle mathématique

Cet objectif n'a pu être atteint en raison de la complexité des processus écologiques mis en évidence lors de nos travaux. En effet, nos recherches ont permis de montrer que s'il existe, dans certains écosystèmes, une relation négative (qui aurait pu faire l'objet d'une modélisation), entre les variations d'abondance cellulaire de *M. aeruginosa* et la proportion de cellules potentiellement productrices de MCs, en revanche, dans d'autres écosystèmes cette

Dans un deuxième temps, une comparaison du métabolisme de la souche sauvage productrice de MCs et de son mutant non producteur a été réalisée dans les mêmes conditions de cycle jour/nuit, à la fois par une approche de transcriptomique et par une approche de protéomique. L'étude comparée du transcriptome de ces deux souches a révélé de nombreuses différences dans l'expression de leurs gènes puisque plus de 800 gènes (sur les 4757 pris en compte dans l'analyse) présentent des niveaux d'expression significativement différents dans les deux souches. Il apparaît, par ailleurs, que ces différences dans l'expression de ces gènes surviennent principalement au moment des deux phases clés du cycle jour/nuit que sont le passage de la phase nocturne à la phase diurne et dans une moindre mesure, le passage de la phase diurne à la phase nocturne. Toutes ces observations suggèrent que les MCs ont une action pleiotropique dans le métabolisme cellulaire et qu'il sera difficile d'identifier leur rôle fonctionnel dans ce métabolisme. Ces travaux ont aussi révélé l'existence d'interactions potentielles entre les MCs et d'autres métabolites secondaires. C'est ainsi par exemple que l'on a pu observer, chez la souche

même relation n'est pas retrouvée. Dans ces autres écosystèmes, des proportions élevées ou faibles de cellules potentiellement productrices de MCs peuvent en effet s'observer tout au long des proliférations, sans que l'on soit capable, pour l'instant, d'identifier quels sont les facteurs et processus environnementaux qui déterminent ces réponses différentes des populations de *M. aeruginosa*. De même, les expérimentations en laboratoire ont montré que s'il existe, dans certaines conditions de culture, des différences dans la fitness des deux souches testées (productrice ou non-productrice de MCs), ces différences semblent dépendre de l'interaction entre de nombreux facteurs et processus et nécessiteraient donc des expériences complémentaires pour être mieux comprises. Enfin, nos travaux sur le rôle fonctionnel des MCs en révélant que ces molécules ont une action directe ou indirecte sur de nombreuses voies du métabolisme central, ne contribuent pas, eux non plus, à nous permettre de construire un modèle conceptuel pour tenter de mieux comprendre les variations dans les proportions de cellules produisant ou non des MCs au cours des proliférations de *M. aeruginosa*. Les interactions potentielles entre cellules productrices et non-productrices de MCs mises en évidence lors de nos expérimentations, apportent même un degré de complexité supplémentaire dans la compréhension puis dans la prédiction de tous ces processus.

IV. Publications obtenues

1. 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. *The ISME Journal* 3, 419-429.
2. Briand E., Bormans M., Quiblier C., Salençon M.J. & Humbert J.F. 2012. Evidence of the cost of the production of microcystins by *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) under certain environmental conditions. Sous presse dans *PLoS One*.
3. Pobel D., Godon J.J., Humbert J.F. & Robin J. 2012. High frequency monitoring of changes occurring in the genetic diversity and in the toxicity of a *Microcystis aeruginosa* bloom-forming population in a French pond. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 132-141.
4. Sabart M., Pobel D., Briand E., Combourieu B., Salençon M.J., Humbert J.F. & Latour D. 2010. Spatiotemporal variations in the microcystin concentrations and in the proportions of potentially microcystin producer genotypes in several *Microcystis aeruginosa* populations. *Appl. Env. Microbiol.* 76, 4750-4759.
5. Sabart M., Pobel D., Latour D., Robin J. Salençon M.J. & Humbert J.F. 2009. Spatiotemporal changes in the genetic diversity in French bloom-forming populations of the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Env. Microbiol. Reports* 1, 263-272.
6. Straub C., Quillardet P., Vergalli J., Tandeau de Marsac N. & Humbert J.F. 2011. A day in the life of *Microcystis aeruginosa* PCC7806 as revealed by a transcriptomic approach. *PLoS One* 6, e16208.

Deux autres publications sont en préparation sur les résultats issus des approches de transcriptomique et de protéomique.

V. Perspectives, retombées et valorisation de ces travaux

Les perspectives ouvertes par nos résultats mais aussi par l'analyse de nos échecs sont nombreuses. Le premier challenge va être de tenter d'identifier les conditions environnementales qui se traduisent, soit par le maintien de la proportion des cellules potentiellement toxiques au cours des proliférations, soit par des variations dans ces proportions. Pour ce faire, nous allons débiter prochainement une méta-analyse de tous les

travaux fournissant des données sur les proportions de cellules potentiellement toxiques au cours de phases de proliférations de cyanobactéries afin de rechercher si ces deux types de situations peuvent être associées à des conditions environnementales différentes. En effet, depuis nos travaux qui ont été parmi les premiers publiés sur cette question, de nombreux articles ont récemment paru, ce qui permet désormais d'envisager la réalisation de cette méta-analyse.

Le second challenge va être de poursuivre les travaux réalisés sur le rôle fonctionnel des toxines par d'autres approches que celles utilisées dans le programme Matrics. Dans ce but, nos collaborateurs du Luxembourg vont procéder à une analyse de métabolomique comparée sur la souche sauvage toxique et sur son mutant non toxique afin de caractériser les variations intervenant dans la production de métabolites. Par ailleurs, notre approche de transcriptomique comparée a révélé que de nombreux gènes présentaient des profils d'expression différents chez ces deux souches, au cours du cycle jour/nuit. Il sera intéressant de préciser ces premiers résultats par des travaux basés sur l'utilisation de la PCRq, mais aussi de poursuivre ces comparaisons du métabolisme des deux souches en les plaçant dans d'autres conditions de culture. En particulier, les effets de différents types de stress devront être testés afin de rechercher si les MCs jouent un rôle dans l'acclimatation à ces stress.

Ainsi, si le programme Matrics n'a pas permis d'atteindre tous les objectifs qui avaient été fixés au départ, il a cependant contribué significativement à augmenter nos connaissances sur la production de MCs et sur le rôle de ces métabolites dans le métabolisme des cellules productrices. Ces travaux se sont traduits par six publications dans les meilleures revues d'écologie microbienne et dans la revue généraliste *Plos One*. Un autre aspect essentiel du programme a concerné la formation de plusieurs jeunes scientifiques ; il faut d'ailleurs souligner que tous les articles ont été signés, en premier auteur, par des étudiants(es) en thèse ou par des jeunes chercheuses en post-doctorat. Enfin, ce programme a permis de renforcer les liens entre plusieurs équipes françaises travaillant sur les cyanobactéries et de mettre en place des approches vraiment pluridisciplinaires sur les questions abordées.

En terme de retombées et de valorisation économique, ce programme n'affichait pas un objectif finalisé direct, même si nous espérons pouvoir proposer un modèle permettant de procéder à une première évaluation des risques potentiels liés à la production de MCs, lors des proliférations de *M. aeruginosa*. Malgré cela, certains de nos résultats sont intéressants pour les gestionnaires ou les personnes en charge de la surveillance de plans d'eau connaissant des proliférations de cyanobactéries. C'est ainsi par exemple que nos travaux révèlent qu'il est nécessaire d'exercer une surveillance continue et rapprochée des populations de cyanobactéries lors des proliférations, même lorsque les concentrations en MCs sont faibles au début de ce processus, car nous avons montré que les proportions de cellules productrices ou non-productrices de MCs, et donc les risques toxiques potentiels associés, peuvent évoluer très rapidement dans le temps et dans l'espace.