Potentiel toxique et structure génétique de populations de Microcystis en lien avec les différentes phases de son cycle de vie

Benjamin Misson

▶ **To cite this version:**

Benjamin Misson. Potentiel toxique et structure génétique de populations de Microcystis en lien avec les différentes phases de son cycle de vie. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2011. Français. NNT : 2011CLF22168 . tel-00678587

HAL Id: tel-00678587

https://theses.hal.science/tel-00678587

Submitted on 13 Mar 2012

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

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

UNIVERSITE CLERMONT-FERRAND II
BLAISE PASCAL
N° D.U. 2168

Année 2011

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE,
SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT
N° d'ordre 558

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE
(Spécialité : Ecologie des systèmes aquatiques continentaux)

Soutenue le 19 octobre 2011

Benjamin MISSON

POTENTIEL TOXIQUE ET STRUCTURE GENETIQUE DE POPULATIONS DE *MICROCYSTIS* EN LIEN AVEC LES DIFFERENTES PHASES DE SON CYCLE DE VIE

Jury composé de :

HOFFMANN Lucien	Professeur, Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann, Luxembourg (rapporteur)
HUMBERT Jean-François	Directeur de recherche INRA, UMR Bioemco, Paris (rapporteur)
ROBIN Joël	Enseignant-chercheur, ISARA, Lyon (examinateur)
BRIAND Jean-François	Maître de conférences, MAPIEM-EA, Université du Sud Toulon-Var (examinateur)
AMBLARD Christian	Directeur de recherche CNRS, LMGE, UMR 6023, Université Blaise Pascal, Co-directeur de thèse
LATOUR Delphine	Maître de conférences, LMGE, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, Co-directrice de thèse

Laboratoire « Microorganismes : Génome et Environnement »
Unité mixte de recherche CNRS 6023

Résumé

L'eutrophisation croissante des écosystèmes aquatiques favorise le développement des cyanobactéries, parmi lesquelles *Microcystis* est la plus représentée dans les régions tempérées. La capacité de *Microcystis* à produire une puissante hépatotoxine, la microcystine, est à l'origine de diverses perturbations écologiques, et de nombreuses nuisances sanitaires. La compréhension des facteurs déterminant la toxicité des efflorescences de *Microcystis* constitue, de fait, un enjeu majeur des recherches actuelles.

Dans ce contexte, l'objectif premier de ce travail de thèse était d'étudier la variabilité temporelle et l'implication potentielle de la toxicité de *Microcystis* à l'échelle de son cycle de développement annuel. Pour cela, il était nécessaire de considérer, en particulier, les parties les moins connues du cycle de développement : la phase de survie benthique, et les transitions entre les phases benthique et planctonique, via les processus de recrutement et de sédimentation.

Nous avons alors étudié le potentiel toxique des populations de *Microcystis* grâce à des approches complémentaires menées à différentes échelles spatio-temporelles, en considérant à la fois les gènes impliqués dans la synthèse de microcystines, leur transcription et les concentrations en microcystines. Cette étude s'est appuyée, en parallèle, sur la caractérisation de la structure génétique des populations de *Microcystis* dans les compartiments benthique et planctonique.

La prise en compte systématique de la phase de vie benthique a tout d'abord permis d'améliorer nos connaissances sur cette phase du cycle de développement de *Microcystis*. Ainsi, *Microcystis* peut survivre plusieurs années en profondeur dans les sédiments, sans que les populations ne perdent leur potentiel toxique, ou que leur structure génétique soit altérée. En revanche, en surface des sédiments, le potentiel toxique et la structure génétique des populations sont variables, de manière similaire à ce qui peut être observé dans la colonne d'eau.

Enfin, ces travaux ont également mis en évidence l'influence des phases de transition entre l'eau et les sédiments dans la variabilité du potentiel toxique et de la structure génétique des populations de *Microcystis*. Les processus de recrutement benthique et de sédimentation occasionnent, en effet, une sélection génétique, qui, bien que paraissant indépendante du potentiel toxique des génotypes, peut grandement affecter le potentiel toxique des sous-populations benthiques et planctoniques de *Microcystis*.

Abstract

The increasing eutrophication of aquatic ecosystems promotes the development of cyanobacteria, among which *Microcystis* is the most widespread in temperate regions. The ability of this cyanobacterium to produce a potent hepatotoxin, called the microcystin, represent a serious threat for both natural life and human health. Thus, understanding the factors determining the toxicity of *Microcystis* blooms is a major challenge of actual research.

In this context, the main goal of this work was to study the temporal variability and the potential implication of *Microcystis* toxicity, at the scale of its annual life cycle. For that, it was necessary to consider more particularly, the least known parts of the cycle: the benthic survival phase, and the transition between the benthic and the planktonic phases, through the benthic recruitment and the sedimentation processes.

Then, we studied the toxic potential of *Microcystis* populations through complementary approaches conducted at different spatio-temporal scales, by considering the genes controlling the synthesis of the microcystin, their transcription and the concentrations of microcystin. In parallel, the genetic structure of *Microcystis* populations was characterized in both benthic and planktonic compartments.

By considering systematically the benthic life stage, we were first able to improve our knowledge on this phase of *Microcystis* development cycle. Thus, *Microcystis* is able to survive several years in deep sediments, without the population's toxic potential or genetic structure being degraded. On the other hand, at the sediment surface, the toxic potential and the genetic structure of the populations vary, in a similar range to what observed in the water column.

Furthermore, this work also shed the light on the influence of benthic-pelagic transitions in the variability of the genetic structure and the toxic potential of the populations of *Microcystis*. Indeed, a genetic selection occurs during the benthic recruitment and the sedimentation processes. Although such a selection does not seem to rely on the toxic potential of the genotypes, it can greatly modify the toxic potential of both benthic and planktonic sub-populations of *Microcystis*.

Remerciements

Voilà maintenant 3 ans et demi que j'ai intégré le monde de la recherche sur les cyanobactéries, que je me forme à la recherche par la recherche… Quelle expérience ! Il y a bien eu quelques moments difficiles, on parlera du lot commun à tous les thésards… Mais grâce à de nombreuses personnes, il y a surtout eu de belles réussites et d'innombrables moments agréables, tant sur le plan professionnel que personnel. L'heure est maintenant venue de remercier toutes les personnes qui m'ont accompagné dans cette grande aventure, et grâce à qui je garderai un agréable souvenir de cette thèse.

Pour commencer, je remercie Lucien Hoffmann, Jean-François Humbert, Joël Robin et Jean-François Briand, les membres de mon jury, pour avoir accepté de juger mon travail.

Je voudrais également remercier toutes les personnes ayant participé à mon comité de thèse : Joël Robin, Marie-José Salençon, Marc Bouvy, Myriam Bormans, Bruno Combourieu et Marie Charpin. Ces deux comités m'ont vraiment été profitables.

Un grand merci aux deux personnes sans qui cette thèse n'aurait jamais eu lieu : Delphine Latour et Christian Amblard, mes deux directeurs de thèse. Si cette thèse s'est bien déroulée, c'est surtout parce que j'ai eu de bons encadrants ! Vous vous êtes toujours impliqués dans ce projet, depuis sa conception jusqu'à son terme, sans pour autant me brider, et tout en sachant vous rendre disponibles malgré vos responsabilités respectives. Christian, je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre laboratoire depuis mon stage de M1, et de m'avoir suivi, aidé et conseillé jusqu'au bout, bien que ma thèse n'ait finalement pas pris la tournure que vous souhaitiez. Votre expérience, votre efficacité et vos qualités de communicant ont vraiment été très appréciables. Delphine, merci de m'avoir accompagné sur le terrain, à la paillasse et dans la rédaction depuis mon stage de M2. Pendant tout ce temps, tu m'as montré comment tambouiller et jouer à la dinette dans la gadoue… Plus sérieusement, si tous les thésards avaient un encadrant comme toi, beaucoup moins se plaindraient ! Tu m'as laissé conduire mon projet, tout en me guidant dès que j'en exprimais le besoin, et tu t'es toujours rendue extrêmement disponible… Pour tout cela, je te dois un immense merci. Pour finir, grâce à toi, j'ai commencé à m'ouvrir aux cultures étrangères, et malgré mes *a priori* gustatifs prononcés, je ne peux nier que c'était du pur bonheur. D'ailleurs, j'en ai gardé des traces : maintenant, j'adore le thé à la menthe !

Vient maintenant le tour de mes collègues… Certains d'entre vous sont même devenus de vrais amis, chose sur laquelle j'étais loin de compter en arrivant entre ces murs ! Vous êtes nombreux à m'avoir conseillé, assisté ou soutenu, et grâce à vous tous, j'ai pu mesurer à quel point la recherche est vraiment « un sport collectif ».

En premier lieu, je me dois de remercier Marion Sabart. Elle y est aussi pour beaucoup dans mon affection particulière pour la boue de Grangent ! Marion, je te remercie très sincèrement pour ta présence depuis mon stage de M2. Tu m'as notamment formé aux dosages de microcystines et à la « biomol »… et pour cela, médaillée tu devrais être ! Grâce à toi, moi qui n'avais jamais fait de biologie moléculaire avant cette thèse, j'ai pu monter ma propre étude d'ARN, c'est dire si tu as su me remettre à niveau rapidement ! Je garderai aussi un bon souvenir des nombreuses demi-journées consacrées à essayer de faire fonctionner ces fichus test

enzymatiques… jusqu'à ce que notre obstination nous permette de solutionner tous nos problèmes ! Tout ça nous aura permis de passer beaucoup de temps à travailler ensemble, j'y ai bien pris goût et j'espère bien que nous pourrons continuer. Tu m'as aussi beaucoup appris à organiser et gérer mon effort, et vu l'importance que cela peut avoir à l'échelle d'une thèse, je t'en suis une nouvelle fois très reconnaissant.

Au laboratoire, de nombreuses personnes ont daigné me servir de « chauffeur » pour aller jusqu'à Grangent, et pour m'aider dans mes prélèvements. Je remercie ainsi Denis Sargos, Agnès Robin, Jonathan Colombet, et Antoine Thouvenot, qui ont réussi à supporter le bien mauvais copilote que je faisais à cause de mon incroyable capacité à finir mes nuits dans la voiture… Je remercie aussi Mélanie Gerphagnon (mais non, je n'ai pas failli m'endormir au volant !) Magalie Skaljac, Romain Guihéneuf, et Pierre Souvignet pour m'avoir aidé sur le terrain.

Je voudrais aussi remercier Lionel Jouve, qui m'a aidé à concevoir mes trappes. Les résultats n'étaient pas à la hauteur de mes espérances, mais le dispositif était très bien !

Pour ce qui est des analyses des échantillons, je remercie chaleureusement Agnès Robin, Emilie Duffaud et Florence Donnadieu-Bernard pour leur aide dans l'ouverture des carottes, les extractions d'ADN et de microcystines, les dosages en PP2a, les PCRq et le clonage. Je remercie également Aurélie Descroix pour avoir lancé les manips de clonage sur mes premiers échantillons, et Delphine Boulouis pour m'avoir aidé à mettre au point les techniques d'extraction d'ARN et de RT, dans le cadre de son stage de M1. Enfin, je remercie Eric Dugat-Bony pour sa disponibilité et ses précieux conseils lorsque j'ai décidé d'étudier les ARN.

Je tiens également à remercier Jean-Jacques Godon pour m'avoir accueilli dans son équipe du Laboratoire de Biotechnologies de l'Environnement, au centre INRA de Narbonne, pour la réalisation de la SSCP. Un grand merci aussi à Valérie Bru-Adan pour son aide technique, à Anaïs Bonnafous pour la démonstration de l'analyse statistique des résultats, et à Jérôme Hamelin pour avoir pris un peu de temps pour me présenter les différentes pistes d'exploitation possibles.

Je n'oublie pas non plus tous les autres qui m'ont apporté leur aide pour l'utilisation de diverses techniques qui ont été laissées de côté, ou dont les résultats n'ont pas encore été exploités. Merci à Emeline Valton pour sa disponibilité au moment où j'ai failli basculer dans le monde des analyses protéiques. Merci aussi à Fanny Perrière pour la formation accélérée à l'extraction des acides gras. Merci enfin à Pascale Besse-Hogan, du laboratoire de chimie voisin (SEESIB), pour son aide et sa disponibilité lors de l'utilisation de leur HPLC.

Après la réalisation des mesures vient le temps de l'analyse. A ce sujet, je remercie François Enault, pour avoir spécialement adapté son cours sur les ANOVA à mes données.

Mon expérience de thésard aurait été bien triste sans mes collègues de bureau. J'ai eu la chance de « cohabiter » avec quatre personnes géniales. Merci à Marlène Jobard et Serena Rasconi de m'avoir accueilli dans leur nouveau bureau, de m'avoir initié à l'art du goûter, et de m'avoir fait profiter de leur expérience d'ainées ! Merci aussi à Stéphanie Palesse et Eléonore Attard d'avoir donné un second souffle à ce bureau. Votre joie de vivre, les crises d'Eve Angélite de Stéph, et l'expérience d'Elé m'ont grandement aidé pendant les derniers mois de rédaction…

Je remercie aussi Brigitte, Nathalie et Yvette pour leur aide dans les différentes tâches administratives. Grâce à elles, trouver le bon formulaire ne s'apparente jamais à la recherche du laissez-passer A38 !

Je tiens également à remercier tous les autres occupants du laboratoire, actuels ou passés, que je n'ai pas encore cités, pour les bons moments de détente passés dans et à l'extérieur du labo. Un merci tout particulier au « gang de Nélaton » pour son élan de fraicheur dans notre vie laborantine. Merci aussi à Claire Valiente, à Aurélie Bournilhas, aux deux Olivier, à Bashir,

Guillaume, Jérémie et Jérémy, Jeff, et tous les autres… Merci à tous d'avoir fait que, contrairement à ce qu'on me laissait croire lorsque j'ai choisi d'aller jusqu'au doctorat, ma thèse au LMGE a été un bon moment.

Je dois aussi un grand merci à différentes personnes du « monde extérieur ». Je pense tout d'abord à David Pobel. Merci pour ta compagnie et ton entrain depuis les dosages en HPLC à Thonon, jusqu'à l'ICTC à Istanbul. Je garderais longtemps les souvenirs mémorables de ton escalade du mur d'enceinte du centre VVF à Sète, des Bisküvit Pötibör, …

Mille mercis à mes amis d'Angers, de Clermont, de Nîmes, de Paris et du M1 BPE, maintenant bien dispersés. Grâce à vous, j'ai pu m'évader et remettre les pieds sur Terre quand j'en ai eu le plus besoin.

Je remercie également toute ma famille, dont la patience, l'ouverture d'esprit et la capacité d'adaptation ont été exemplaires. Merci à tous de n'avoir jamais cessé de me soutenir et de croire en moi.

Enfin, je remercie tout particulièrement Anne, qui a enduré tous mes choix, supporté mon acharnement, et qui m'a toujours été d'une grande aide dans les moments délicats. Je t'en suis extrêmement reconnaissant, car sans toi, les choses auraient été beaucoup plus difficiles.

à mon père,

à Bruno Calais, pour m'avoir
appris que nul ne peut progresser
s'il ne s'en donne pas les moyens et
ne cherche pas à dépasser ses limites.

"Knowledge is knowing that we cannot know."
Ralph Waldo Emerson (1803–1882)

SOMMAIRE

Chapitre 1 :

INTRODUCTION GENERALE

I – Contexte scientifique 21

II – Synthèse bibliographique : les cyanobactéries du genre *Microcystis* – caractéristiques générales et potentiel toxique 25

1. Caractéristiques morphologiques du genre *Microcystis* 25
2. Niche écologique et distribution géographique de *Microcystis* 26
3. Cycle de développement annuel de *Microcystis* 28
4. Le potentiel toxique de *Microcystis* 34
5. Le rôle écologique des microcystines 47

III - Objectifs et organisation de la thèse 53

Chapitre 2 :

SITES D'ETUDE ET METHODES

I – Présentation des sites d'échantillonnage 59

II – Méthodes de prélèvement et traitement des échantillons 63

III – Les dénombrements de colonies et de cellules 66

IV – Le dosage des microcystines 66

V – Les différentes analyses génétiques 68

1. Extraction des acides nucléiques 68
2. Analyse de la diversité et de la structure génétique des populations 68
3. Estimation des proportions de cellules potentiellement toxiques 71
4. Etude la transcription d'un gène de microcystine dans des cellules benthiques 74

Chapitre 3 :

VARIABILITE TEMPORELLE DU POTENTIEL TOXIQUE DE *MICROCYSTIS* DANS LES SEDIMENTS

Introduction **.....81**

I - Variabilité temporelle du potentiel toxique et de la structure génétique de populations benthiques de *Microcystis* 83

Article n°1 : Evolution of the toxic potential and the genotypic structure of benthic populations of *Microcystis* at different time scales 85

II - Variabilité du potentiel toxique de *Microcystis* au cours de sa phase de vie benthique : apport de l'étude de la transcription du gène mcyB 107

Article n°2 : Benthic survival of *Microcystis*: long-term viability and ability to transcribe microcystin genes **.....109**

Chapitre 4 :

INFLUENCE ET VARIABILITE DU POTENTIEL TOXIQUE DE *MICROCYSTIS* LORS DES TRANSITIONS ENTRE LES PHASES BENTHIQUE ET PLANCTONIQUE DE SON CYCLE DE VIE

Introduction **.....129**

I – Le recrutement benthique, processus à l'origine des proliférations planctoniques 131

1. Influence de différents paramètres physiques et du temps de vie benthique sur le recrutement benthique de *Microcystis* 131

Article n° 3 : Influence of light, sediment mixing, temperature and duration of benthic life on the benthic recruitment of *Microcystis*.....133

2. Implication du potentiel toxique et de la taille des colonies de *Microcystis* dans le processus de recrutement benthique.....149

Article n° 4 : Involvement of microcystins and colony size in the benthic recruitment of the cyanobacterium *Microcystis* (Cyanophyceae) 151

II - Influence des interactions eau-sédiments sur la diversité génétique et le potentiel toxique des populations benthiques et planctoniques de *Microcystis* 177

Article n° 5 : Shifts in the genotypic composition and the toxicity of benthic and planktonic populations of *Microcystis* can be induced by benthic-pelagic transfers and horizontal transports 179

Chapitre 5 :

DISCUSSION GENERALE

I – Rappel des objectifs et originalité des approches utilisées.....201

II – Caractérisation et dynamique des populations benthiques de *Microcystis*.....203

1. Comparaison du potentiel toxique de populations benthiques de *Microcystis* issues de blooms différents.....203
2. Facteurs impliqués dans les variations de potentiel toxique et de structure génétique des populations benthiques de *Microcystis*.....205

III – Variabilité du potentiel toxique et de la structuration génétique des populations de *Microcystis* lors des transitions entre les phases de vie benthique et planctonique.....207

1. Le recrutement benthique.....207
2. La sédimentation.....208

IV – Influence des interactions eau-sédiments sur la dynamique des proliférations planctoniques de *Microcystis* 209

Chapitre 6 :

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

I – Conclusion : variabilité de la structure génétique et du potentiel toxique des populations de *Microcystis* à l'échelle de son cycle de développement.....215

II - Perspectives d'étude 219

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 225

Chapitre 1 :

INTRODUCTION GENERALE

I – Contexte scientifique

Les cyanobactéries sont des organismes procaryotes photolithotrophes oxygéniques, c'est-à-dire capables d'utiliser l'énergie lumineuse pour produire leur propre matière organique et du dioxygène à partir de dioxyde de carbone et d'eau. Leur présence sur Terre depuis plusieurs milliards d'années leur a permis de coloniser une très grande diversité d'écosystèmes, de l'équateur jusqu'aux pôles. Bien qu'elles se développent essentiellement dans les eaux douces, saumâtres ou marines tempérées, elles colonisent aussi des habitats aquatiques extrêmes tels que les sources hydrothermales ou les lacs polaires, mais aussi des habitats terrestres variés (Mur *et al*. 1999).

Depuis plusieurs décennies, les cyanobactéries constituent une part prépondérante du phytoplancton des écosystèmes d'eau douce, en raison de l'eutrophisation croissante de ces milieux causée par les rejets des activités humaines (Codd & Bell 1985). En effet, les activités industrielles, agricoles et domestiques occasionnent des apports excessifs en azote et en phosphore directement utilisables au sein des réseaux trophiques aquatiques, et, en premier lieu, par les producteurs primaires dont les cyanobactéries font partie (Kononen 2001; Smith 2003). Ainsi, la biomasse phytoplanctonique des écosystèmes d'eau douce augmente fortement, et les cyanobactéries prolifèrent généralement en fin d'été ou en début d'automne, formant des fleurs d'eau, aussi appelées efflorescences ou « blooms ».

Lors de ces épisodes de fleurs d'eau, les cyanobactéries prennent le pas sur les autres organismes phytoplanctoniques grâce à diverses adaptations morphologiques et physiologiques. En effet, certaines espèces sont capables de former des colonies ou des filaments de grande taille pour limiter la prédation, elles peuvent aussi synthétiser des vésicules à gaz pour mieux résister à la sédimentation et réguler le positionnement dans la colonne d'eau, des nitrogénases pour fixer l'azote atmosphérique et ainsi mieux profiter des apports en phosphore excédentaire, ou encore des métabolites toxiques. Il en résulte la production d'une biomasse très importante, qui peut occasionner différents problèmes d'ordre écologique et sanitaire (Landsberg 2002; Rondel *et al.* 2008). Ces efflorescences sont notamment responsables de désoxygénations importantes de la colonne d'eau pouvant entrainer une forte mortalité parmi les autres communautés pélagiques. L'impasse trophique que constituent certaines cyanobactéries, en raison de leur toxicité, leur taille ou encore leur faible qualité nutritionnelle, peut aussi entrainer une réduction notable de

l'abondance et de la diversité de leurs prédateurs et, par conséquent, des niveaux trophiques supérieurs.

Pour les activités humaines, les efflorescences cyanobactériennes sont une source importante de nuisances. La couleur de l'eau et la forte odeur parfois associée aux efflorescences sont à l'origine d'une baisse de fréquentation des sites touristiques, et la présence de différentes cyanotoxines, dangereuses pour l'homme, contraint souvent les gestionnaires de plans d'eau à usage récréatif à en interdire l'accès. Ces mêmes cyanotoxines peuvent contaminer les ressources en eau potable, obligeant les distributeurs à des traitements contraignants et couteux, et limitant encore un peu plus nos ressources en eau. Ainsi, la compréhension du déterminisme de la production des cyanotoxines apparait nécessaire pour permettre une meilleure prévention et une meilleure gestion du risque sanitaire associé.

Parmi les différentes cyanotoxines répertoriées, l'une des plus fréquemment rencontrées est la microcystine, une puissante hépatotoxine (Sivonen & Jones 1999). La microcystine est probablement la cyanotoxine la plus étudiée, et sa toxicité sur divers organismes est maintenant bien documentée (*e.g.* Babica *et al.* 2006; Wilson *et al.* 2006). Cependant, plusieurs données soutiennent l'hypothèse selon laquelle le caractère toxique de cette molécule ne correspondrait pas à sa fonction primaire (Watanabe *et al.* 1992; Rantala *et al.* 2004). Depuis, les fonctions potentielles, biologiques et écologiques, de la microcystine font l'objet de diverses hypothèses très discutées.

Si les cyanobactéries productrices de microcystine n'appartiennent pas toutes au même genre, *Microcystis* reste le principal genre qui synthétise cette toxine (Sivonen & Jones 1999). De plus, les cyanobactéries du genre *Microcystis* ont une aire de répartition très étendue, faisant de la toxicité des microcystines une problématique sanitaire d'envergure planétaire. Malgré les nombreux progrès réalisés dans la compréhension du déterminisme des efflorescences de *Microcystis*, les facteurs régulant l'évolution de leur toxicité sont encore largement débattus, rendant pour le moment impossible la prévision de la toxicité des efflorescences de cette cyanobactérie ainsi que l'anticipation des risques associés.

Les enjeux sanitaires et sociaux actuels liés à la qualité de l'eau, ainsi que les enjeux scientifiques ayant trait au rôle des toxines dans le fonctionnement des écosystèmes, font donc de la recherche sur le déterminisme du potentiel toxique des efflorescences de *Microcystis* une

nécessité, afin d'améliorer nos connaissances sur les différents facteurs de régulation et nos possibilités de prévention et de gestion du risque.

II – Synthèse bibliographique : les cyanobactéries du genre *Microcystis* – caractéristiques générales et potentiel toxique

Afin de mieux cerner la problématique spécifique de la dynamique du potentiel toxique des populations naturelles de *Microcystis*, il est nécessaire de revenir sur les fondements des connaissances actuelles sur ce sujet. Ainsi, cette synthèse bibliographique débute par des considérations générales sur *Microcystis*, avant de présenter son cycle de développement. Ensuite, les éléments connus du déterminisme de production des microcystines chez *Microcystis* et les fonctions hypothétiques associées à ces cyanotoxines sont détaillés. Pour finir, les variations de toxicité de *Microcystis* en milieu naturel sont abordées, en relation avec le cycle de développement de cette cyanobactérie.

1. Caractéristiques morphologiques du genre *Microcystis*

Les cyanobactéries du genre *Microcystis* sont constituées de cellules sphériques de 0.8 à 7µm de diamètre, contenant des vésicules à gaz et regroupées et maintenues sous forme de colonies par un mucilage incolore (Bourrelly 1970 ; Holt *et al.* 1994). A l'instar de bien d'autres genres cyanobactériens, *Microcystis* ne produit aucune forme cellulaire différenciée (figure 1).

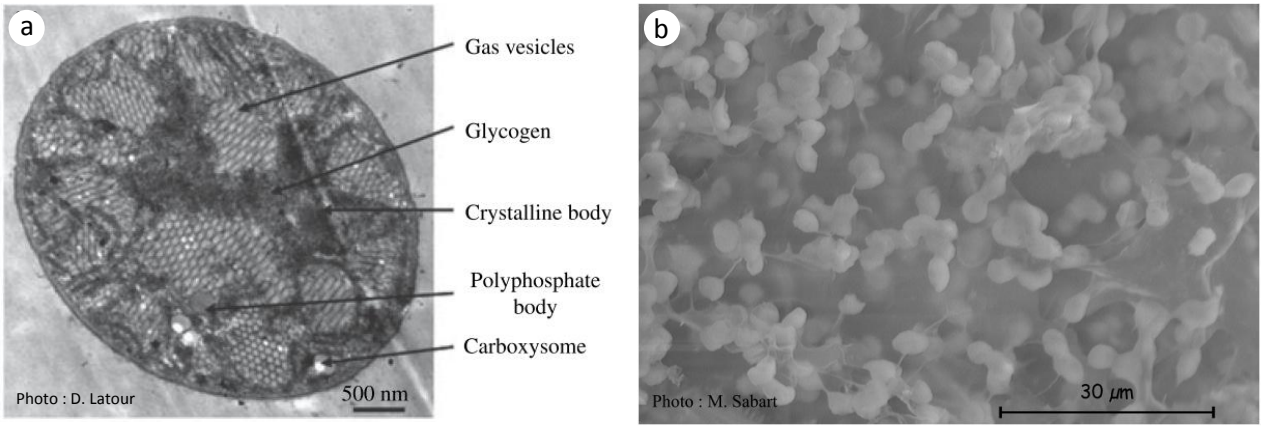


Figure 1 : Ultrastructure cellulaire et organisation coloniale de *Microcystis*.

a : Coupe transversale d'une cellule observée en microscopie électronique à transmission, montrant les nombreuses vésicules à gaz (Latour *et al.* 2007). **b** : observation d'une colonie en microscopie électronique à balayage, montrant le mucilage entourant et reliant les cellules.

Au sein du genre *Microcystis*, plusieurs morphotypes ont été identifiés (figure 2). Ils diffèrent par la taille des cellules, la taille et la forme des colonies ou encore les caractéristiques du mucilage (Komarek 1991; Watanabe 1994, 1996). Bien que ces morphotypes aient originellement été considérés comme différentes espèces, l'utilisation de techniques de biologie moléculaire a permis de démontrer qu'ils ne reflétaient pas la phylogénie de *Microcystis*, et qu'un seul génotype pouvait correspondre à plusieurs phénotypes (Neilan *et al.* 1997; Otsuka *et al.* 1998, 1999). De plus, une étude a mis en évidence la plasticité phénotypique des souches de *Microcystis*, qui peuvent présenter des caractéristiques de différents morphotypes selon les conditions (Otsuka *et al.* 2000). Les seules caractéristiques morphologiques ne sont donc pas suffisantes pour distinguer différentes espèces au sein de ce genre. L'observation de la grande similarité de génome entre différents morphotypes (plus de 70% d'identité ; (Kondo *et al.* 2000; Otsuka *et al.* 2001) a mené à la proposition d'un regroupement des nombreux morphotypes sous une espèce unique : *Microcystis aeruginosa* (Otsuka *et al.* 2001). Néanmoins, une étude récente a démontré la constance de certains phénotypes au sein d'une même lignée de *Microcystis aeruginosa*, mettant en évidence la nécessité de combiner phylogénie et critères morphologiques pour améliorer la classification du genre *Microcystis* (Yoshida *et al.* 2008b).

Afin de lever toute ambigüité liée à cette classification, seul le nom de genre *Microcystis* sera utilisé dans la suite de ce manuscrit.

2. Niche écologique et distribution géographique de *Microcystis*

Microcystis est une cyanobactérie qui se développe préférentiellement dans les écosystèmes aquatiques riches en nutriments, dans une eau à plus de 15°C, stratifiée thermiquement et peu turbide (Reynolds *et al.* 1981; Robarts & Zohary 1987; Elser 1999; Huisman *et al.* 1999). Cette niche écologique assez peu restrictive explique l'ubiquité de *Microcystis*. Sa présence a en effet été relevée sur tous les continents, de l'équateur aux régions froides (*e.g.* Ganf 1974; Ganf *et al.* 1989; Beron 1990; Tsujimura *et al.* 2000; Brunberg & Blomqvist 2003; Murphy *et al.* 2003).

Bien qu'elle se développe essentiellement dans les écosystèmes naturels ou artificiels d'eau douce, *Microcystis* présente de grandes capacités de résistance à la salinité (Tonk *et al.* 2007), expliquant sa présence dans divers écosystèmes d'eau saumâtre (*e.g.* Lehman *et al.* 2005; Lehman *et al.* 2008).

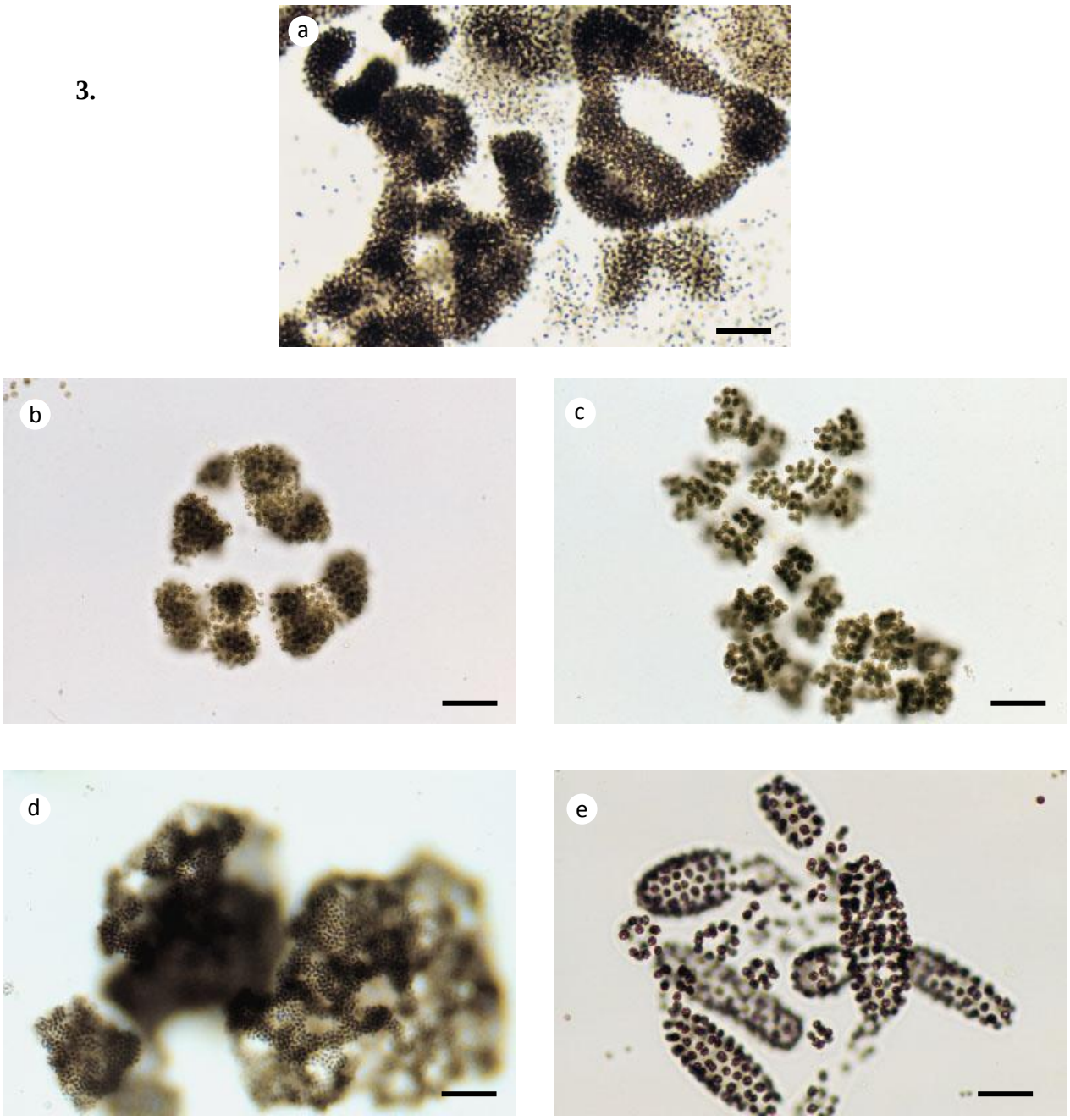
Figure 2 : Principaux morphotypes du genre *Microcystis*

a : *M. aeruginosa*, **b** : *M. novacekii*, **c** : *M. viridis*, **d** : *M. ichtyoblabe*, **e** : *M. wesenbergii*

Barre d'échelle : 100 µm

Photos : http://research.kahaku.go.jp/botany/aoko/aokokids/mycro-pictures.html

3.



Cycle de développement annuel de *Microcystis*

Bien que leurs efflorescences puissent être pérennes en région tropicale (Wicks & Thiel 1990; Prakash *et al.* 2009), les cyanobactéries du genre *Microcystis* sont généralement méroplanctoniques. En effet, en région tempérée, elles présentent un cycle de développement annuel faisant intervenir une phase de vie planctonique et une phase de vie benthique, articulées par des processus de recrutement benthique et de sédimentation (Reynolds & Rogers 1976; Reynolds *et al.* 1981). Alors que la phase de vie planctonique a fait l'objet de très nombreuses études, la phase de vie benthique, et surtout les interactions entre ces deux phases, sont bien moins documentées.

3.1. La phase de développement planctonique

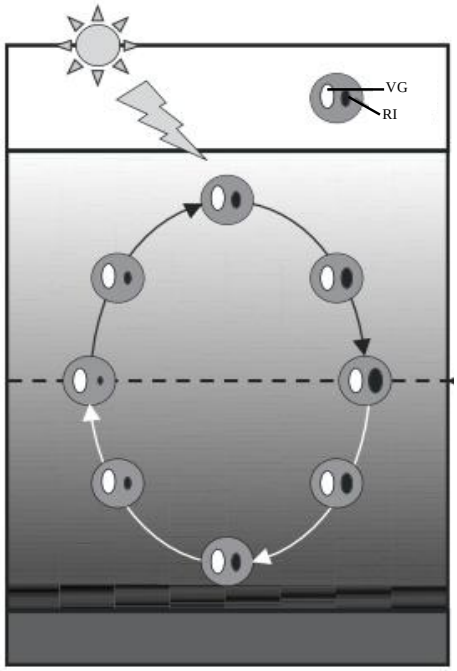
C'est en général au cours de la saison estivale que *Microcystis* trouve les conditions les plus favorables à son développement dans la colonne d'eau. La combinaison d'une eau à plus de 15°C, riche en nutriments et stratifiée thermiquement, permet alors une prolifération massive des colonies dans l'épilimnion (Reynolds 1973; Reynolds *et al.* 1981), avec de fortes accumulations juste sous la surface formant ainsi les efflorescences.

Au cours de cette phase planctonique, *Microcystis* régule sa position dans la colonne d'eau en fonction de la quantité de lumière perçue, grâce à la présence de vésicules à gaz dans son cytoplasme (Walsby 1994). La régulation de la flottabilité de *Microcystis* dépend des quantités respectives de vésicules à gaz et de réserves carbonées, stockées sous forme de glycogène et autres hydrates de carbone dans les cellules (Kromkamp & Mur 1984; Thomas & Walsby 1985). Cette accumulation des réserves internes dépend essentiellement de l'activité photosynthétique des cellules, et donc de la quantité de lumière qu'elles captent. En effet, lorsque qu'une cellule de *Microcystis* reçoit de la lumière, elle photosynthétise des molécules carbonées denses. Ces dernières s'accumulent dans le cytoplasme dès lors que l'activité photosynthétique est supérieure à l'activité respiratoire, entrainant une augmentation de la densité cellulaire. Ainsi, lorsque les cellules sont éclairées par une forte lumière, elles descendent dans la colonne d'eau, jusqu'à atteindre des couches profondes moins éclairées (figure 3). Dans ces zones sombres, l'activité photosynthétique est très faible, voire nulle, alors que l'activité respiratoire et la synthèse protéique persistent, entrainant donc une dégradation des réserves carbonées et une diminution de la densité des cellules qui vont remonter vers la surface (figure 3). Ces variations

de flottabilité interviennent à l'échelle de la journée en milieu naturel, elles sont à l'origine des migrations verticales de *Microcystis* (Walsby & Mcallister 1987 ; figure 3). Ces migrations sont d'autant plus rapides que les colonies de *Microcystis* sont grosses et denses en cellules (Rabouille *et al.* 2003; Rabouille & Salencon 2005).

Lorsque la colonne d'eau est stable, c'est-à-dire lorsque le brassage par le vent est minimal, l'auto-ombrage des colonies de *Microcystis* diminue la pénétration de la lumière dans l'eau et fait augmenter leur flottabilité, entrainant leur accumulation juste sous la surface. Ainsi, dans ces conditions de stabilité, plus les colonies de *Microcystis* sont abondantes, plus elles s'accumulent sous la surface, formant alors une écume verdâtre pouvant parfois atteindre plusieurs dizaines de centimètres d'épaisseur (Zohary 1985).

Figure 3 : Migration verticale de *Microcystis*



Le volume des vésicules à gaz (VG) reste globalement constant. Au-dessus de la profondeur de compensation (pointillés), La quantité de réserves internes (RI) augmente car le taux de production par photosynthèse dépasse le taux de respiration. En-dessous de la profondeur de compensation, RI diminue car le taux de respiration est plus important que le taux de production.
(figure issue de Verspagen 2006)

3.2. Le déclin et la sédimentation automnale

A l'automne, lorsque la température de l'eau baisse, l'équilibre entre accumulation et dégradation des réserves internes est perturbée. Il a en effet été démontré qu'à faible température, la production de protéines dans les cellules de *Microcystis* diminuait plus vite que la production de glucose, entrainant son accumulation sous forme de glycogène et, par conséquent, une augmentation de la densité des cellules. Ce phénomène est à l'origine de la sédimentation des colonies planctoniques qui rejoignent alors la surface des sédiments (figure 4), expliquant en partie le déclin de la prolifération planctonique (Visser *et al.* 1995). La sédimentation massive des colonies planctoniques semble intervenir dans des eaux présentant une température inférieure à 14°C, mais cette température seuil varie selon les écosystèmes étudiés (Reynolds & Rogers 1976; Thomas & Walsby 1986; Robarts & Zohary 1987; Visser *et al.* 1995).

D'autres facteurs semblent intervenir dans le déclin des efflorescences de *Microcystis*. L'attachement de particules colloïdales, argileuses ou métalliques, au mucilage des colonies lors du brassage automnal de la colonne d'eau ferait augmenter leur densité et accélèrerait leur sédimentation (Oliver *et al.* 1985; Verspagen *et al.* 2006). La prédation et la décomposition par d'autres organismes microbiens, ainsi que l'implication de cyanophages ont également été proposées comme facteurs du déclin automnal des populations planctoniques (Takamura *et al.* 1984; Yoshida *et al.* 2008a).

Cette sédimentation ne constitue pas une simple perte de biomasse, mais bien une transition vers la prochaine étape du cycle de vie de *Microcystis*, qui correspond à la phase de vie benthique (Reynolds *et al.* 1981).

3.3. La phase de vie benthique

Cette phase de vie correspond à la saison hivernale (figure 4). Au cours de leur phase de vie benthique, les colonies de *Microcystis* sont exposées à des conditions de vie défavorables : peu ou pas de lumière, des températures basses, et parfois une désoxygénation totale du milieu.

Les cellules de *Microcystis* benthiques survivent à ces conditions défavorables sans différenciation morphologique particulière, mais en entrant dans un état de quiescence (Reynolds *et al.* 1981). Elles préservent une activité enzymatique faible comparée aux cellules planctoniques (Latour *et al.* 2004, 2007), et maintiennent leurs photosystèmes dans un état fonctionnel (Fallon & Brock 1981; Takamura *et al.* 1984; Verspagen *et al.* 2004). Au cours de

cette phase benthique, la densité des cellules de *Microcystis* diminue progressivement suite à la consommation de leur réserves de glycogène (Visser *et al.* 1995; Verspagen *et al.* 2004), ce qui permet aux colonies de retrouver une certaine flottabilité (Tsujimura *et al.* 2000; Verspagen *et al.* 2004).

Cette survie benthique peut avoir une durée variable, puisque les colonies ne quittent les sédiments que lorsque les conditions environnementales le leur permettront. Ainsi, bien que la durée de vie benthique classique corresponde à un hivernage de quelques mois (Reynolds & Rogers 1976; Reynolds *et al.* 1981; Takamura *et al.* 1984), des cellules actives ont été observées dans des colonies enfouies dans les sédiments depuis plus d'un an (Latour *et al.* 2007).

3.4. Le recrutement printanier

Dans le cycle de développement annuel de *Microcystis*, le processus de recrutement benthique correspond à la transition entre la phase de survie benthique hivernale et la phase de prolifération planctonique estivale (figure 4). Cette transition s'effectue par le retour de colonies benthiques dans la colonne d'eau au printemps ou en été (*e.g.* Reynolds *et al.* 1981; Trimbee & Harris 1984; Brunberg & Blomqvist 2003; Verspagen *et al.* 2005).

Diverses études ont permis de démontrer que l'activité métabolique et le taux de division des cellules benthiques de *Microcystis* augmentent au printemps en réponse à l'augmentation de la température en profondeur, à la raréfaction de l'oxygène dissous ou encore à l'augmentation de l'intensité lumineuse pénétrant jusqu'aux sédiments (Reynolds *et al.* 1981; Caceres & Reynolds 1984; Trimbee & Harris 1984; Visser *et al.* 1995; Latour *et al.* 2004a, 2004c; Verspagen *et al.* 2004). De ces observations est issue l'hypothèse d'un processus de retour actif des colonies de *Microcystis* dans la colonne d'eau par un allègement de leurs cellules, suite à la reprise de leur activité métabolique et à la consommation de leur réserves carbonées denses. Cette hypothèse est notamment appuyée par l'observation d'un recrutement benthique variable selon le rapport N:P, le recrutement étant maximal lorsque le ratio N:P est minimal (Stahl-Delbanco *et al.* 2003).

En parallèle de ce processus actif, un phénomène passif alternatif a été envisagé plus récemment : les colonies benthiques seraient remises passivement en suspension dans la colonne d'eau, en même temps que les sédiments, lors du brassage de la colonne d'eau ou encore par bioturbation (Stahl-Delbanco & Hansson 2002; Verspagen *et al.* 2004). Cette remise en

suspension des sédiments serait à l'origine du détachement des particules sédimentaires collées au mucilage des colonies, entrainant ainsi la réduction de leur densité (Verspagen *et al.* 2004).

La part exacte de ces deux processus dans le recrutement benthique de *Microcystis* semble difficile à évaluer, et pourrait varier selon la profondeur de l'écosystème et son exposition au vent. En effet, en zone littorale ou peu profonde, les sédiments peuvent recevoir de la lumière, se réchauffent plus rapidement et peuvent être facilement exposés à la remise en suspension induite par le brassage de la colonne d'eau (Tsujimura *et al.* 2000; Verspagen *et al.* 2004). Ces conditions, très différentes de celles retrouvées en zone profonde (*i.e.* obscurité totale, anoxie, remise en suspension limitée), favoriseraient la reprise d'activité métabolique de *Microcystis*, et feraient de ces zones littorales la principale source de recrutement benthique de *Microcystis*, le recrutement à partir des zones profondes étant minoritaire (Brunberg 2002; Brunberg & Blomqvist 2003).

Néanmoins, il a été démontré dans un lac de barrage aux pentes très abruptes (la retenue du barrage de Grangent) que les colonies benthiques de *Microcystis* ne pouvaient pas se maintenir dans les zones littorales, et finissaient par être entrainées vers les zones les plus profondes du lac au cours de l'hiver (Latour & Giraudet 2004). Dans cette situation, un inoculum benthique ne peut alors provenir que des zones profondes. La diminution d'abondance de colonies benthiques dans cette zone au printemps confirme qu'un processus de recrutement peut tout de même avoir lieu sans lumière et avec des températures ne dépassant pas 9°C (Latour *et al.* 2004c).

Enfin, l'observation de cellules isolées et de colonies de *Microcystis* se maintenant dans la colonne d'eau durant l'hiver laisse supposer l'existence d'un recrutement printanier planctonique, capable d'initier une efflorescence estivale (Latour 2002; Verspagen *et al.* 2004).

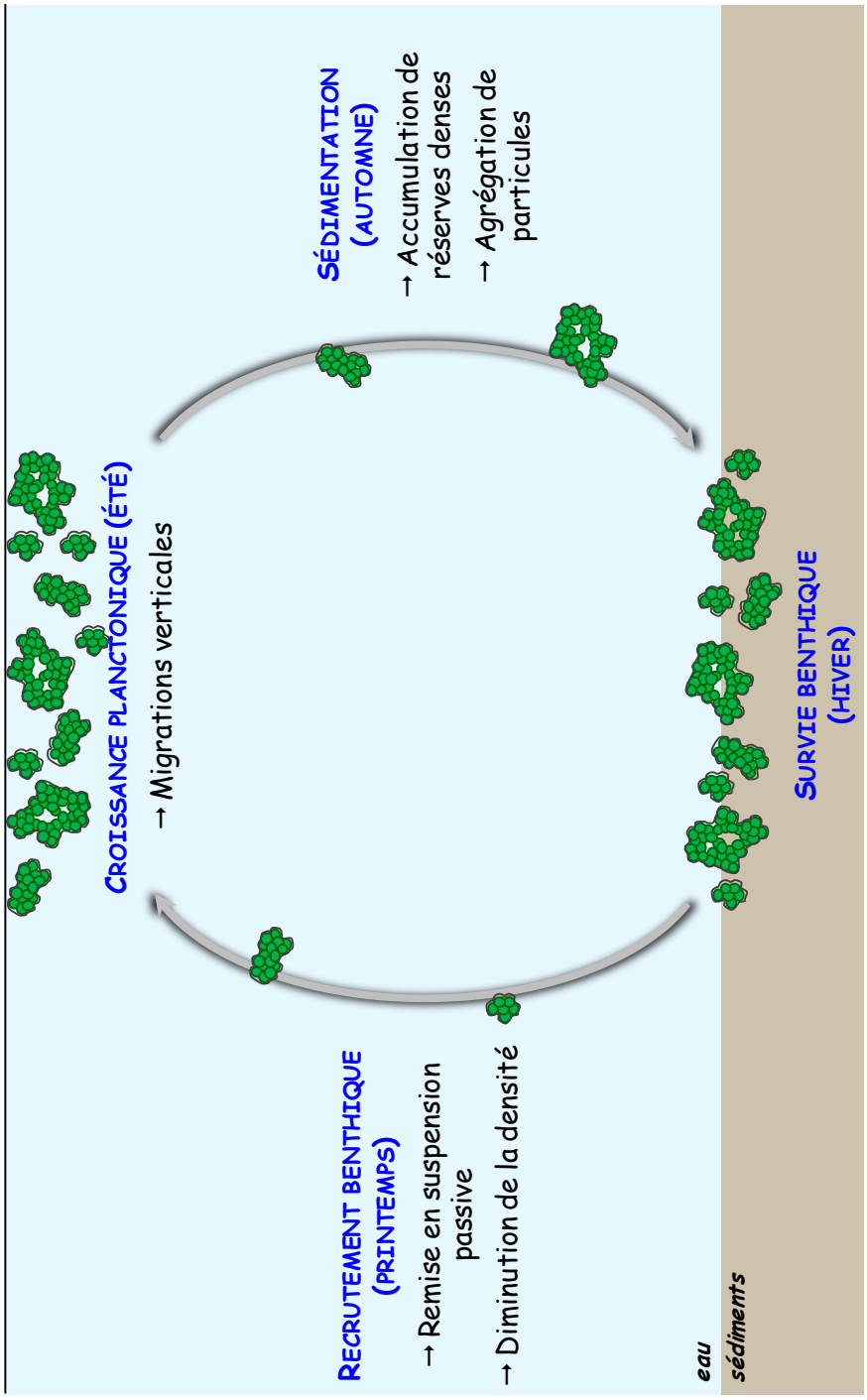


Figure 4 : Modèle classique du cycle de développement de *Microcystis*

4. Le potentiel toxique de *Microcystis*

Les efflorescences de *Microcystis* sont associées depuis bien longtemps à la production de toxines (Codd *et al*. 2005), mais ce n'est qu'à la fin du XX^{ème} siècle que la confirmation de la toxicité de cette cyanobactérie fut apportée (Hughes *et al.* 1958). Au cours des années 1980, la toxicité des efflorescences de *Microcystis* a été mieux caractérisée, et désignée comme responsable de sérieux dommages hépatiques chez différents mammifères (Watanabe & Oishi 1980 ; Falconer *et al.* 1983). Une hépatotoxine a alors été isolée à partir de cultures de *Microcystis*, et nommée en conséquence microcystine (Carmichael *et al.* 1988).

Bien que *Microcystis* soit le principal genre cyanobactérien producteur de microcystine, cette toxine peut également être synthétisée par d'autres cyanobactéries appartenant notamment aux genres *Planktothrix* et *Anabaena*, mais aussi, dans une moindre mesure, aux genres *Nostoc*, *Anabaenopsis* et *Hapalosiphon* (Sivonen & Jones 1999).

La plupart des travaux de recherche actuels sur les efflorescences de *Microcystis* n'étudient pas directement leur toxicité, c'est-à-dire leur capacité à tuer d'autres organismes. Cette toxicité est évaluée indirectement via la mesure de la concentration en microcystine et la détermination des proportions de cellules possédant les gènes permettant la synthèse de microcystine. Ces deux paramètres permettent alors de caractériser le potentiel toxique d'une population. Cependant, de nombreux autres métabolites secondaires toxiques, parmi lesquels nous pouvons notamment citer les aeruginosines, les cyanopeptolines, ou encore les microviridines, ont été identifiés dans des cultures de *Microcystis* (Welker & Von Döhren 2006). Tous ne sont pas aussi toxiques, et c'est bien aux microcystines que *Microcystis* doit l'essentiel de sa toxicité.

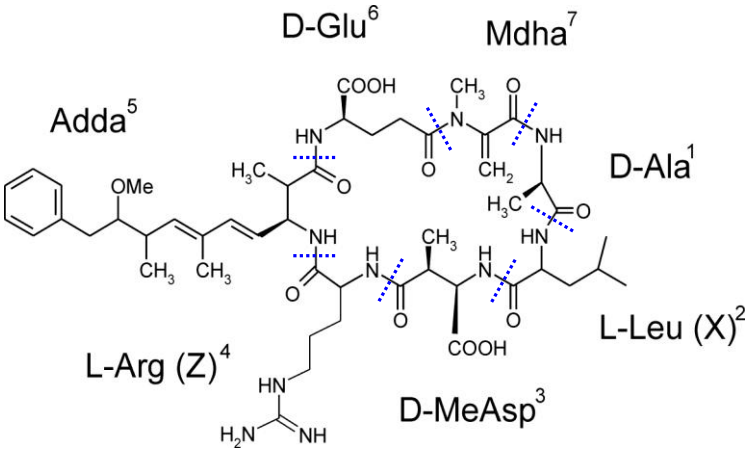
C'est la raison pour laquelle cette partie de la synthèse bibliographique sera consacrée à une revue des connaissances sur le mode d'action et la synthèse des microcystines, mais aussi sur la fonction écologique de cette molécule pour *Microcystis*, fonction qui est, à l'heure actuelle, encore très largement discutée et peu connue.

4.1. Structure et toxicité des microcystines

Les microcystines sont de petits peptides cycliques constitués de sept acides aminés, dont cinq sont constants et deux sont variables (figure 5). Les deux acides aminés variables, couplés aux possibles modifications structurales de divers acides aminés constants (Sivonen & Jones 1999), ont rendu possible la formation de très nombreux variants, dont près de 90 ont d'ores et

déjà été identifiés (Welker & Von Döhren 2006). Ils sont nommés en fonction des acides aminés occupant les positions variables : la microcystine LR correspond, par exemple, à une microcystine portant une leucine (L) en position 2 et une arginine (R) en position 4. Tous ces variants ne sont pas observés avec la même fréquence en milieu naturel, et au sein d'une efflorescence de *Microcystis* seuls quelques uns sont dominants, la plupart n'étant présents qu'en faibles concentrations. Le variant LR apparaît comme le variant le plus fréquemment retrouvé (Sivonen & Jones 1999).

Figure 5 : Structure moléculaire de la microcystine, variant LR



(1) D-alanine, (2) L-leucine, (3) acide D-erythro-β-méthylaspartique, (4) L-arginine, (5) acide 3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-dienoïc, (6) D-glutamate, (7) N-méthyldéhydroalanine.
X et Z (positions 2 et 4) représentent les deux acides aminés variables de la molécule.
Issu de Fewer *et al.* (2007)

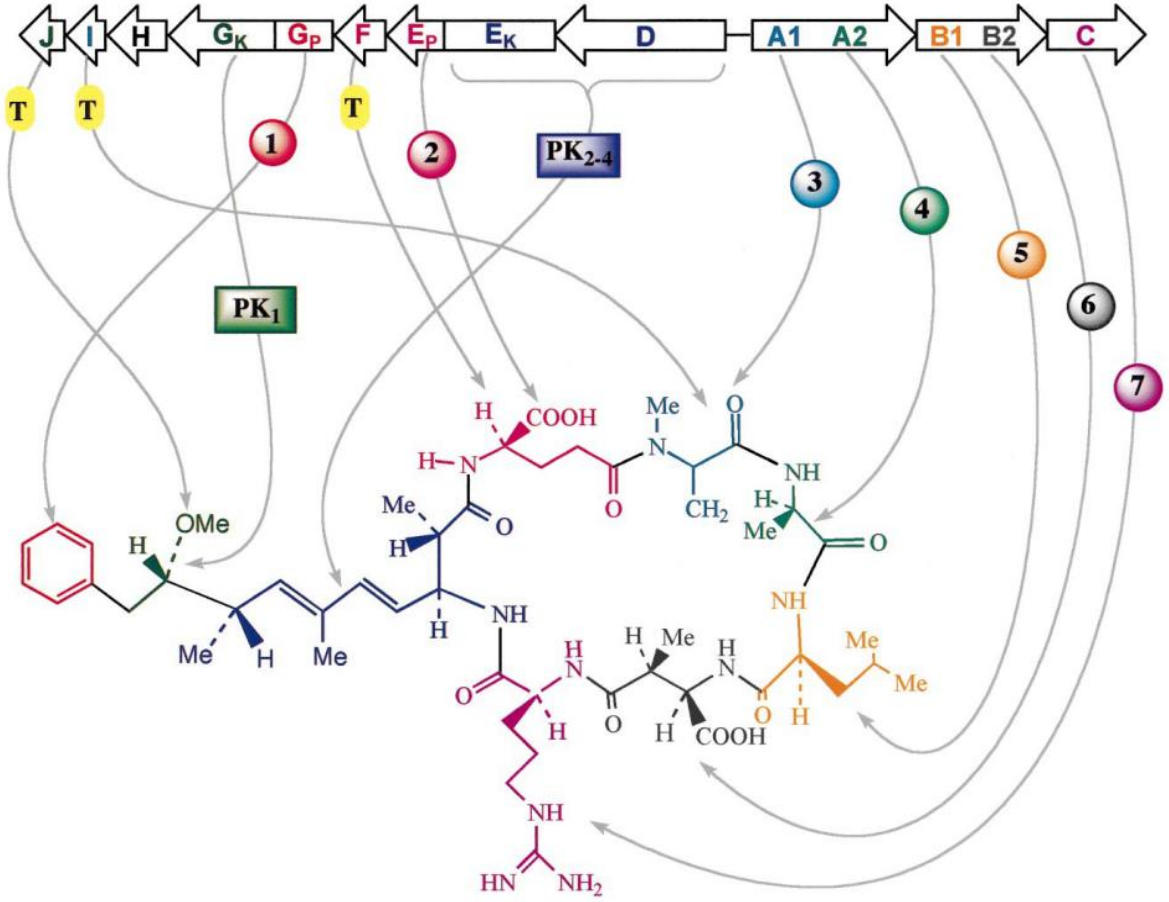
Chez les animaux « supérieurs », la toxicité des microcystines semble s'exprimer principalement au niveau du foie, d'où leur classification parmi les hépatotoxines (Rabergh *et al.* 1991; Falconer & Yeung 1992; Nishiwakimatsushima *et al.* 1992). Cet organotropisme s'explique par la capacité de ces toxines à pénétrer spécifiquement dans les cellules hépatiques en utilisant le système de transport actif des acides biliaires (Eriksson *et al.* 1990). Au niveau intracellulaire, la toxicité des microcystines s'exprime par une inhibition forte et spécifique de l'activité des protéines phosphatases de type 1 et 2a (Mackintosh *et al.* 1990), et se traduit, dans les cellules affectées, par des perturbations du cycle cellulaire, de la structure cellulaire, de certaines voies métaboliques, ou encore de la régulation de la voie apoptotique (Falconer 2005). Cependant, tous les variants de microcystine ne présentent pas le même niveau de toxicité, et c'est encore le variant LR qui paraît le plus toxique (Sivonen & Jones 1999).

Ce mode d'action intracellulaire est retrouvé chez la plupart des organismes eucaryotes exposés, depuis les microalgues unicellulaires jusqu'aux métazoaires (Babica *et al.* 2006 ; Wilson *et al.* 2006). En revanche, les procaryotes ne produisant pas les mêmes protéines phosphatases, la toxicité des microcystines chez ces organismes reste assez mal documentée. De nombreuses bactéries seraient insensibles, alors que certaines archées et des cyanobactéries non hépatotoxiques possèderaient des protéines phosphatases sensibles aux microcystines de *Microcystis* (Shi *et al.* 1999; Sivonen & Jones 1999; Kaebernick & Neilan 2001).

4.2. Voie de biosynthèse de la microcystine

La synthèse de la microcystine suit une voie de production non ribosomale, mise en évidence chez *Microcystis* (Dittmann *et al.* 1997; Nishizawa *et al.* 1999, 2000; Tillett *et al.* 2000), puis chez *Planktothrix* (Christiansen *et al.* 2003) et *Anabaena* (Rouhiainen *et al.* 2004). Chez *Microcystis*, cette voie de biosynthèse est codée par un cluster comprenant 10 gènes (nommés *mcyA* à *J* ; Tillett *et al.* 2000) organisés en deux opérons, dont la transcription est régulée par un promoteur central commun et bidirectionnel (Kaebernick *et al.* 2002). L'inactivation d'un seul de ces 10 gènes suffit à inhiber la production de microcystine (Dittmann *et al.* 1997; Pearson *et al.* 2004). Cette synthèse complexe fait intervenir différentes enzymes qui assemblent et modifient les sept acides aminés constituant la microcystine (figure 6). Ces enzymes sont des polykétides synthases, des peptides synthétases non ribosomales et des enzymes impliquées dans le « tailoring » de certains acides aminés. Un de ces dix gènes, *mcyH*, coderait pour un transporteur de type ABC qui permettrait l'export des microcystines (Pearson *et al.* 2004).

Figure 6 : Modèle de biosynthèse de la microcystine LR
(Kaebernick & Neilan 2001)



Le cluster de gènes *mcyA-J* ainsi que la microcystine sont représentés. Les cercles numérotés indiquent l'ordre des acides aminés incroporés lors de l'assemblage du peptide par les peptide synthétases non ribosomales (codées par les gènes *mcyA, B, C,* E_p et G_p). Les rectangles numérotés indiquent l'ordre d'intervention des polykétides synthases dans la formation de l'acide aminé Adda (gènes $mcyG_k$, E_k et *D*). Les « T » représentent les enzymes de « tailoring » (codées par les gènes *mcyF, I* et *J*). *mcyH* présente de fortes similarités avec des gènes de transporteurs ABC.

(Kaebernick & Neilan 2001)

4.3. Facteurs de régulation de la production des microcystines

4.3.1. La croissance cellulaire

Depuis les premières expériences réalisées pour déterminer les facteurs régulant la croissance et la toxicité de *Microcystis*, des relations positives entre taux de croissance des cellules et quotas cellulaires en toxines ont été relevées en conditions variables de luminosité (Vanderwesthuizen & Eloff 1985; Watanabe & Oishi 1985; Utkilen & Gjolme 1992). Cette relation a été confirmée par plusieurs études (Rapala *et al.* 1997; Kaebernick *et al.* 2000; Wiedner *et al.* 2003), faisant ainsi apparaître plusieurs seuils de régulation : la production de microcystine augmenterait fortement lors du passage d'une intensité lumineuse faible à une intensité modérée, puis serait stable, voire diminuerait en cas de forte intensité lumineuse. La valeur de ces seuils varierait en fonction des souches et des conditions de culture (Wiedner *et al.* 2003).

Orr & Jones (1998) furent les premiers à démontrer l'existence d'un lien entre quotas cellulaires en microcystine et disponibilité en nutriments dans le milieu. Comme le taux de croissance et les quotas cellulaires en microcystine étaient corrélés positivement à la disponibilité en azote dans cette expérience, il a été conclu que le taux de production de microcystine par *Microcystis* était directement et linéairement lié au taux de division cellulaire, et donc à la croissance de cette cyanobactérie. Cette relation linéaire a aussi été observée en conditions de cultures limitées en azote (Long *et al.* 2001) et limitées en phosphore (Oh *et al.* 2000).

De toutes ces observations concordantes, il a été conclu que la production de microcystine par *Microcystis* était constitutive, et qu'elle dépendait directement du taux de croissance de la cyanobactérie (figure 7), les plus forts quotas cellulaires en microcystine étant retrouvés dans les meilleures conditions de croissance pour la cyanobactérie (Kaebernick & Neilan 2001).

4.3.2. La disponibilité relative en azote et en phosphore

La dépendance du taux de synthèse de microcystine vis-à-vis du taux de croissance des cellules a par la suite été nuancée par Downing *et al.* (2005a, 2005b) qui ont étudié l'influence de rapport azote : phosphore (N:P) sur la toxicité de cultures de *Microcystis*. Ils ont ainsi pu clairement démontrer qu'en conditions non limitantes, le taux d'assimilation de l'azote par les cellules pouvait faire varier leur production de microcystine, indépendamment de leur taux de croissance (figure 7). En effet, plus l'azote était excédentaire dans leurs expériences, plus les quotas cellulaires en microcystine augmentaient. Ils ont ainsi montré que la production de microcystine pouvait se faire à un niveau basal de manière constitutive, mais aussi qu'elle

pouvait être augmentée en réponse à des facteurs n'influençant pas le taux de croissance (figure 7).

4.3.3. La lumière

Plusieurs éléments tendent à montrer qu'il existe un lien direct entre les processus photosynthétiques et les microcystines. En effet, l'immunolocalisation des microcystines dans les cellules de *Microcystis*, réalisée pour la première fois par Shi *et al.* (1995), puis confirmée par Young *et al.* (2005), a révélé un regroupement préférentiel de ces molécules au niveau des lamelles thylakoïdiennes, renforçant alors l'idée du lien entre les microcystines et les structures permettant l'utilisation de la lumière dans les cellules de *Microcystis*.

L'apport des techniques de biologie moléculaire, après la description des gènes à l'origine de la synthèse de microcystine chez *Microcystis*, a permis de démontrer que la qualité et la quantité de lumière pouvaient réguler la production de microcystines (figure 7), via la transcription des gènes *mcy*. En effet, un éclairage monochrome bleu ou rouge, ainsi qu'une lumière blanche de forte intensité (68 µmol de photons m^{-2} s^{-1}) conduisent à l'augmentation de la transcription des gènes *mcyB* et *mcyD* (Kaebernick *et al.* 2000). La comparaison d'une souche de *Microcystis* toxique et d'une souche mutée spécifiquement sur un des gènes du cluster *mcy*, a mis en évidence la nécessité de produire les microcystines pour exprimer certains gènes (les gènes *mrp*, pour « microcystin related protein ») dont l'expression est ensuite régulée par la lumière (Dittmann *et al.* 2001). Plus récemment, Deblois & Juneau (2010) ont émis l'hypothèse d'une modulation du contenu en microcystine des cellules de *Microcystis* par le fonctionnement de l'appareil photosynthétique. Cette hypothèse semble renforcée par une analyse transcriptomique, d'après laquelle la transcription des gènes *mcy* est plus importante lorsque les cellules sont exposées à la lumière que lorsqu'elles sont à l'obscurité (Straub *et al.* 2011).

4.3.4. Les métaux

La synthèse des microcystines est indéniablement influencée par la concentration en divers éléments métalliques dans le milieu, et notamment par la concentration en fer (figure 7), mais cette influence semble varier fortement selon les souches de *Microcystis* utilisées (Alexova *et al.* 2011). En effet, des relations positives ont été observées entre concentration en fer dans le milieu et quotas cellulaires en microcystine ou transcription des gènes *mcy* (Utkilen & Gjolme 1995; Alexova *et al.* 2011). A l'inverse, dans d'autres études (Lukac & Aegerter 1993; Lyck *et*

al. 1996; Sevilla *et al.* 2008; Alexova *et al.* 2011), une limitation en fer entraînait une plus forte transcription des gènes *mcy* et une accumulation de microcystine dans les cellules. Enfin, une même souche ne répondrait pas de la même façon à une variation de la disponibilité en fer dans le milieu selon qu'elle est en phase de croissance exponentielle ou en phase stationnaire (Alexova *et al.* 2011).

4.3.5. Le stress oxydatif

Lorsqu'un stress affecte le fonctionnement d'une cellule et conduit à la formation d'un pool important d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, pour « Reactive Oxygen Species »), on parle alors de stress oxydatif. Ce facteur est connu pour ses conséquences néfastes sur le fonctionnement cellulaire, notamment sur le fonctionnement et le processus de synthèse *de novo* de l'appareil photosynthétique des cyanobactéries (Latifi *et al.* 2009). L'influence de stress oxydatifs provoqués par l'ajout de ROS sur des cultures de *Microcystis* a révélé une modulation de l'expression des gènes de microcystine, avec une diminution rapide de leur transcription (Kaebernick *et al.* 2000). Malgré cette diminution de transcription, une accumulation de protéine McyB dans les 48 h suivant le début de l'exposition (Schatz *et al.* 2007), et une augmentation des quotas cellulaires en microcystine dans les cellules survivantes ont aussi été observées (Ross *et al.* 2006). Le stress oxydatif constituerait alors un facteur potentiel supplémentaire régulant la synthèse de microcystine (figure 7).

4.3.6. Les interactions avec d'autres organismes aquatiques

Des travaux en conditions contrôlées ont permis de démontrer que les quotas cellulaires en microcystine d'une culture de *Microcystis* pouvaient être augmentés en réponse à la détection de divers compétiteurs potentiels (figure 7). Cette régulation de la production des microcystines a été observée en présence de lentilles d'eau dans le milieu de culture (Jang *et al.* 2007a), et lors de l'ajout de filtrat de cultures d'autres cyanobactéries non productrices de toxine (Jang *et al.* 2006) ou d'autres microalgues (Vardi *et al.* 2002). Dans le cas de la présence de lentilles d'eau dans le milieu, l'augmentation des quotas cellulaires était accompagnée d'une inhibition de la croissance de *Microcystis*, confirmant bien la relative indépendance de ces deux paramètres (Downing *et al.* 2005a, 2005b).

De même, la présence de divers prédateurs potentiels fait augmenter la production de microcystine (figure 7). En effet, diverses espèces de zooplancton phytoplanctonophage (Jang *et*

al. 2003), des poissons phytoplanctonophages comme la carpe argentée, et, dans une moindre mesure, des poissons omnivores comme le carrassin (Jang *et al.* 2004). L'influence du zooplancton serait fonction du stade de développement et de la densité des individus, une plus grande abondance et des organismes adultes entraînant une augmentation maximale des quotas cellulaires en microcystine (Jang *et al.* 2007b). *Microcystis* répondrait à la présence de ces différents prédateurs en détectant leurs kairomones qui entraînent une augmentation dose-dépendante de microcystine (Jang *et al.* 2007b; Ha *et al.* 2009).

Enfin, d'autres signaux chimiques extracellulaires, produits par *Microcystis* elle-même, entraînent une surexpression de ses gènes *mcy* et/ou une augmentation des quotas cellulaires en microcystine. Ceci a été mis en évidence par l'augmentation de la concentration en protéine McyB après exposition au contenu intracellulaire de *Microcystis* productrices de microcystine, ou à de la microcystine purifiée (Vardi *et al.* 2002; Schatz *et al.* 2007). L'augmentation observée étant plus importante suite à l'exposition au contenu intracellulaire global, elle suggère que la production de microcystine soit régulée par diverses molécules, libérées lors de la lyse de certaines cellules dans le milieu (figure 7).

4.4. Variabilité spatio-temporelle du potentiel toxique au sein d'une prolifération planctonique de *Microcystis*

Lors d'une efflorescence de *Microcystis*, la quantité de microcystine mesurée dans l'eau correspond essentiellement aux microcystines contenues dans les cellules de *Microcystis*, puisque ces toxines sont libérées dans le milieu essentiellement lors de la lyse des cellules. La concentration en microcystine intracellulaire peut varier de manière très importante au cours d'une même efflorescence. A titre d'exemple, au cours de l'efflorescence de 2006 dans la retenue de Grangent, la concentration en microcystine particulaire pouvait varier de 1 à plus de 15 $\mu g.L^{-1}$ (Sabart *et al.* 2010). Si lors de ce bloom, la concentration en microcystine semblait fortement liée à l'abondance de *Microcystis*, Welker *et al.* (2003) ont montré que la concentration en microcystine pouvait également varier indépendamment de la biomasse de *Microcystis*. La régulation de la production de microcystine, étudiée sur des cultures, a permis de montrer que le contenu en microcystine des cellules d'une même souche pouvait varier d'un facteur 2 à 3 (Kardinaal & Visser 2005). Or en milieu naturel, la variabilité des quotas cellulaires paraît bien plus grande (*e.g.* de 0.01 à plus de 5 $\mu g.mm^{-3}$; Welker *et al.* 2003). La succession de cellules de *Microcystis* de toxicité différente apparaît alors comme un facteur majeur impliqué dans la variabilité de la toxicité d'une efflorescence de cette cyanobactérie (Kardinaal & Visser 2005). Cette succession peut reposer sur des caractéristiques génotypiques, métaboliques ou phénotypiques de *Microcystis*, et avoir différentes origines (figure 7).

4.4.1. Influence de la variabilité génotypique

L'estimation de la proportion des cellules potentiellement toxiques (*i.e.* possédant les gènes de microcystine) au sein d'un bloom de *Microcystis* a permis de révéler, d'une part, que toutes les cellules ne possédaient pas les gènes *mcy* et, d'autre part, que cette proportion pouvait grandement varier d'une efflorescence à une autre, mais aussi temporellement au sein d'une même efflorescence (Kurmayer *et al.* 2003; Kurmayer & Kutzenberger 2003; Kardinaal *et al.* 2007a; Briand *et al.* 2009; Sabart *et al.* 2010). Ainsi, la dynamique de concentration en microcystine dans une efflorescence de *Microcystis* apparaît parfois liée à la succession de différents génotypes toxiques et non toxiques (Kurmayer *et al.* 2003; Kardinaal *et al.* 2007a; Davis *et al.* 2009 ; figure 7), alors que certaines études montrent, à l'inverse, l'indépendance de ces deux paramètres (Kardinaal *et al.* 2007a; Sabart *et al.* 2010).

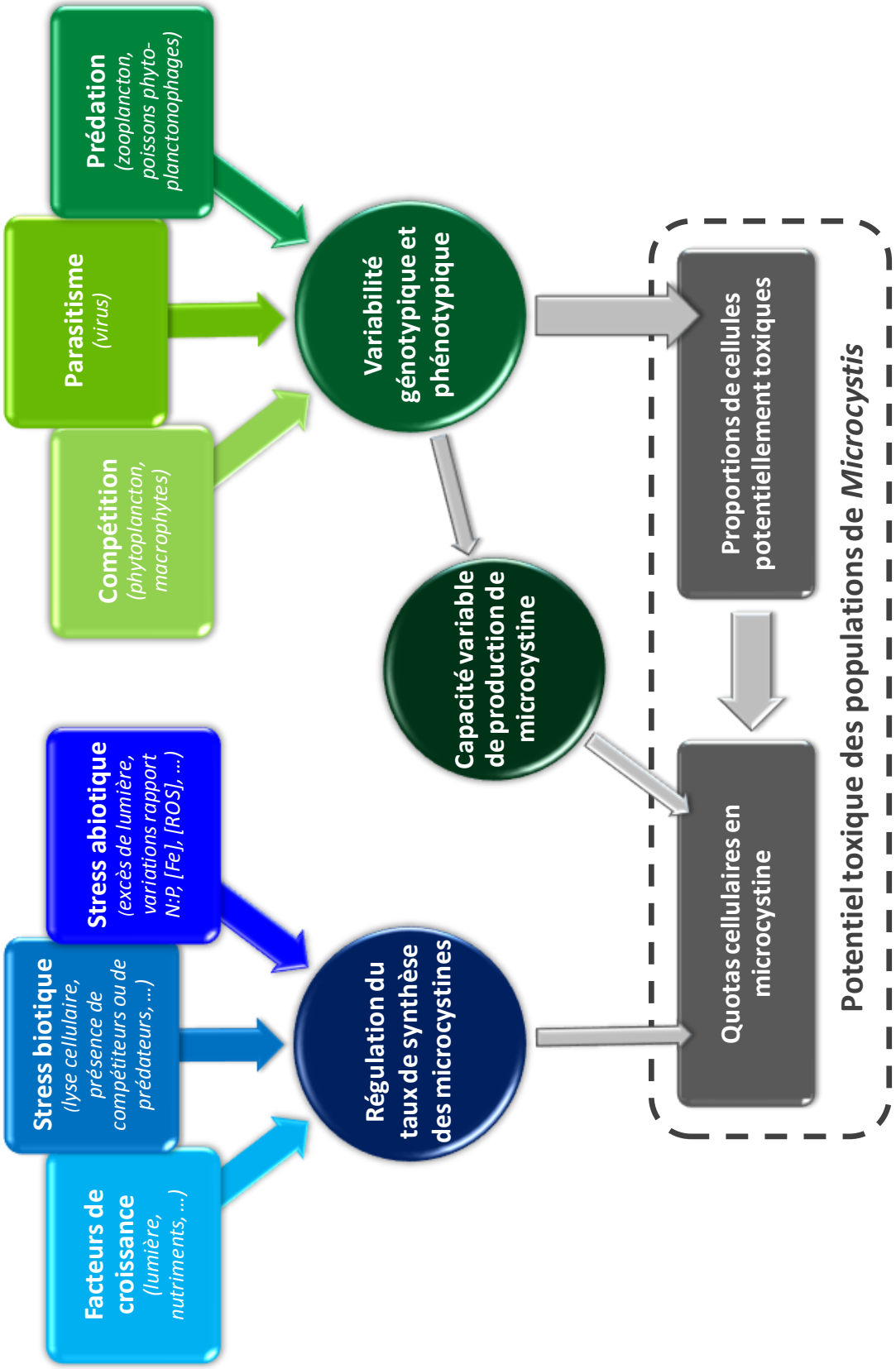


Figure 7 : Présentation synthétique des facteurs de régulation du potentiel toxique des populations de *Microcystis*.

Une autre approche de caractérisation génotypique des blooms de *Microcystis* a consisté en une tentative de distinction phylogénétique des génotypes possédant ou non les gènes de microcystine par comparaison des séquences de leurs gènes d'ARNr 16S, ou de l'ITS (pour « Internal Transcribed Spacer ») 16S-23S. Cette seconde approche n'a toutefois pas permis de distinguer phylogénétiquement les génotypes potentiellement toxiques et non toxiques de *Microcystis* (Neilan *et al.* 1997; Otsuka *et al.* 1998, 1999; Lyra *et al.* 2001). En revanche, la comparaison de la séquence de l'ITS et du potentiel toxique de souches isolées du milieu naturel a tout de même permis de préciser la relation entre ces deux variables : un génotype ITS donné serait soit toujours potentiellement toxique, soit toujours non toxique (Janse *et al.* 2003; Janse *et al.* 2004). De ceci, nous pouvons déduire que tout changement de proportions de clones potentiellement toxiques dans une population planctonique correspond à un changement de structure génotypique, basée sur les séquences de l'ITS 16S-23S.

4.4.2. Influence de la variabilité de la capacité de production

La variabilité génétique est à l'origine d'une variabilité de capacités métaboliques (figure 8). Plusieurs études ont révélé que différentes souches toxiques de *Microcystis* pouvaient présenter des taux de production de microcystine variables en conditions de culture similaires, et pouvaient faire varier ce taux de manière différente en réponse à un stimulus externe (Long *et al.* 2001; Rohrlack *et al.* 2001; Carrillo *et al.* 2003; Wiedner *et al.* 2003).

De plus, il est également bien connu que différentes souches de *Microcystis* peuvent produire des variants différents de microcystine, en dépit de conditions environnementales similaires (Kurmayer *et al.* 2002). Une unique souche peut même produire différents variants en proportions variables selon les conditions du milieu (Van De Waal *et al.* 2009).

Ainsi, au cours d'une efflorescence de *Microcystis*, la succession de différentes souches toxiques peut affecter le pool de microcystine produite, d'un point de vue quantitatif mais aussi qualitatif (figure 7).

4.4.3. Influence de la variabilité phénotypique

La variabilité génotypique peut induire une variabilité phénotypique, visible pour plusieurs critères. Au cours d'une efflorescence de *Microcystis*, la variabilité phénotypique des colonies peut tout d'abord consister en la présence de différents morphotypes (*e.g.* Kurmayer *et al.* 2002). Or les différents morphotypes de *Microcystis* n'ont pas tous le même potentiel toxique.

Par exemple, les morphotypes *aeruginosa* et *flos-aquae* seraient essentiellement représentés par des colonies toxiques alors que le morphotype *ichtyoblabe* regrouperait essentiellement des colonies non toxiques, et que le morphotype *wesenbergii* ne serait pas toxique (Fastner *et al.* 2001; Kurmayer *et al.* 2002). La succession de différents morphotypes dominants peut donc entraîner des variations de toxicité au cours d'une efflorescence de *Microcystis* (figure 7), et peut parfois expliquer la majeure partie de la variabilité de quantité de microcystine (Park *et al.* 1998; Chen *et al.* 2009). De plus, les différents morphotypes de *Microcystis* peuvent produire différents variants de microcystine, plus ou moins toxiques, qui conduisent également à la variation de la toxicité de l'efflorescence lors de leur succession (Fastner *et al.* 2001; Chen *et al.* 2009). Cependant, vu la plasticité morphologique de la plupart des morphotypes de *Microcystis* (Otsuka *et al.* 2000), leur distinction ne semble pas évidente, et leur prise en compte ne constitue pas un moyen suffisant pour expliquer et prédire la dynamique de toxicité au cours d'une efflorescence.

La variabilité phénotypique de *Microcystis* peut aussi se manifester par la taille variable de ses colonies. Quelques études ont rapporté une corrélation positive entre la taille des colonies de *Microcystis* et les quotas cellulaires en microcystine des cellules qui les composent (Jungmann *et al.* 1996; Kurmayer *et al.* 2003; Via-Ordorika *et al.* 2004). Ces observations sont renforcées par la découverte d'un plus fort potentiel toxique dans les grosses colonies, qui contiennent plus souvent des microcystines, ou qui en possèdent plus souvent les gènes, que les petites colonies (Kurmayer *et al.* 2003; Via-Ordorika *et al.* 2004). Ainsi, la distribution des tailles de colonies de *Microcystis* lors d'une efflorescence pourrait indirectement influencer le potentiel toxique de la population (figure 7).

4.4.4. Déterminisme de la succession de génotypess de *Microcystis* de toxicité variable au cours d'une efflorescence

L'évolution temporelle du contenu en microcystine des efflorescences de *Microcystis*, via la succession de différents génotypes, résulte des capacités adaptatives (ou « fitness ») de ces génotypes vis-à-vis des facteurs de croissance et des pressions de prédation, de parasitisme et de compétition pour l'accès aux ressources (figure 7).

Il a ainsi été démontré que les souches toxiques seraient plus compétitives que les souches non toxiques en situation de forte intensité lumineuse, de forte disponibilité en nutriments et de faible disponibilité en CO_2 dissous (Hesse & Kohl 2001; Vezie *et al.* 2002; Kardinaal *et al.* 2007b; Van De Waal *et al.* 2011). Une augmentation de température favoriserait aussi les

génotypes toxiques de *Microcystis*, et cet avantage serait encore plus important lorsque la concentration en phosphates augmente en parallèle (Davis *et al.* 2009). Pour ce qui est de la compétition avec les autres producteurs primaires du milieu, les cyanobactéries du genre *Microcystis* sont connues pour être de faibles compétitrices pour l'utilisation des ressources, notamment en raison de leur faible taux de croissance et de leur fort besoin en lumière (Reynolds 1997, Huisman et al. 1999). Elles contrebalanceraient ceci par une meilleure résistance au broutage par le zooplancton grâce à différentes adaptations morphologiques et physiologiques, dont la production de microcystine fait partie (Kaebernick & Neilan 2001; Jang *et al.* 2007b; Jang *et al.* 2008). La toxicité des cellules peut alors être considérée comme un bénéfice compétitif lorsque les pressions de prédation et de compétition sont fortes.

Ces différences de capacité adaptative entre génotypes toxiques et non toxiques résulteraient de la balance entre bénéfices et inconvénients à produire de la microcystine (Kardinaal *et al.* 2007a; Briand *et al.* 2009). En effet, le fort coût énergétique supposé pour la production de microcystine, en raison de leur voie de biosynthèse non-ribosomale, représenterait une contrainte majeure pour les cellules toxiques. En revanche, les cellules productrices de microcystine pourraient tirer un avantage de la toxicité de ces molécules en cas de forte pression de compétition ou de prédation. La variabilité de capacité d'adaptation constituerait ainsi un facteur important dans le déterminisme des successions de différents génotypes de *Microcystis* de toxicité variable au cours des efflorescences.

Enfin, un dernier facteur de succession de différents génotypes de toxicité variable pourrait résider dans la pression de lyse virale au cours des efflorescences. En effet, bien que ce domaine reste encore peu étudié, le parallèle a été fait entre la diminution de la proportion de cellules de *Microcystis* potentiellement toxiques lors d'une efflorescence et l'augmentation de l'abondance de cyanophages potentiellement infectieux de cette cyanobactérie (Yoshida *et al.* 2008a).

4.5. Variabilité du potentiel toxique de *Microcystis* durant sa phase de vie benthique et lors des transitions entre vie benthique et vie planctonique

Les connaissances sur la toxicité de *Microcystis* en dehors de la période de prolifération planctonique sont très limitées. Tout d'abord, aucune étude directe du potentiel toxique de *Microcystis* au cours de la sédimentation d'une efflorescence n'a été réalisée à ce jour. Wörmer *et al.* (2011) ont démontré qu'une part importante des microcystines particulaires planctoniques

sédimentait tout au long d'une efflorescence de *Microcystis*, et que cette sédimentation était d'autant plus importante que la biomasse planctonique de *Microcystis* était importante, sans pour autant faire le lien avec la sédimentation des colonies.

Pour ce qui est de la phase de survie benthique, la présence de microcystine dans les cellules benthiques de *Microcystis* n'a été mise en évidence que récemment (Ihle *et al.* 2005; Latour *et al.* 2007). Les quotas cellulaires en microcystine dans le milieu benthique apparaissent plus forts que dans la colonne d'eau, et cela d'autant plus que le temps passé dans les sédiments augmente (Latour *et al.* 2007). Cependant, les mécanismes à l'origine de cette observation n'ont pas été identifiés. Sur la base des données bibliographiques, Ihle *et al.* (2005) ont supposé que la synthèse de microcystine n'avait pas lieu dans les sédiments car les conditions étaient défavorables à la croissance. Cette hypothèse laissait alors entrevoir une meilleure survie des cellules toxiques comme explication à ces observations. Néanmoins, dans les rares lacs où les proportions de cellules potentiellement toxiques ont été mesurées dans le compartiment benthiques, elles apparaissaient toujours plus faibles que dans l'eau de ces mêmes lacs, ne dépassant jamais 20% dans le compartiment benthique (Rinta-Kanto *et al.* 2005, 2009; Kim *et al.* 2010).

Enfin, bien que la présence de microcystine dans des cellules benthiques pendant plus d'un an suggère une influence possible de ces molécules sur le recrutement benthique (Ihle *et al.* 2005; Latour *et al.* 2007), ce n'est que très récemment que la première étude en rapport avec cette hypothèse est parue (Schöne *et al.* 2010). D'après cette étude, les colonies toxiques de *Microcystis* seraient avantagées et préférentiellement sélectionnées au cours de ce recrutement benthique. Ce recrutement préférentiel pourrait expliquer que les proportions de cellules toxiques et les quotas cellulaires en microcystine soient plus importants au début des proliférations planctoniques qu'au moment du pic d'abondance (Kardinaal & Visser 2005; Kardinaal *et al.* 2007a; Briand *et al.* 2009; Sabart *et al.* 2010).

5. Le rôle écologique des microcystines

Microcystis étant le principal producteur de cette toxine, mais aussi le modèle cyanobactérien le plus utilisé pour l'étudier, c'est essentiellement à travers différents travaux réalisés sur ce modèle que la compréhension du rôle écologique de la microcystine est basée.

Les différentes recherches réalisées ont mené à deux grandes catégories de fonctions hypothétiques. Il existerait tout d'abord des fonctions liées aux interactions biotiques et à la toxicité de la microcystine. Par ailleurs, diverses fonctions, plus directement liées au fonctionnement cellulaire de *Microcystis* en réponse aux interactions avec l'environnement abiotique, ont également été proposées.

5.1. Implication des microcystines dans les interactions biotiques

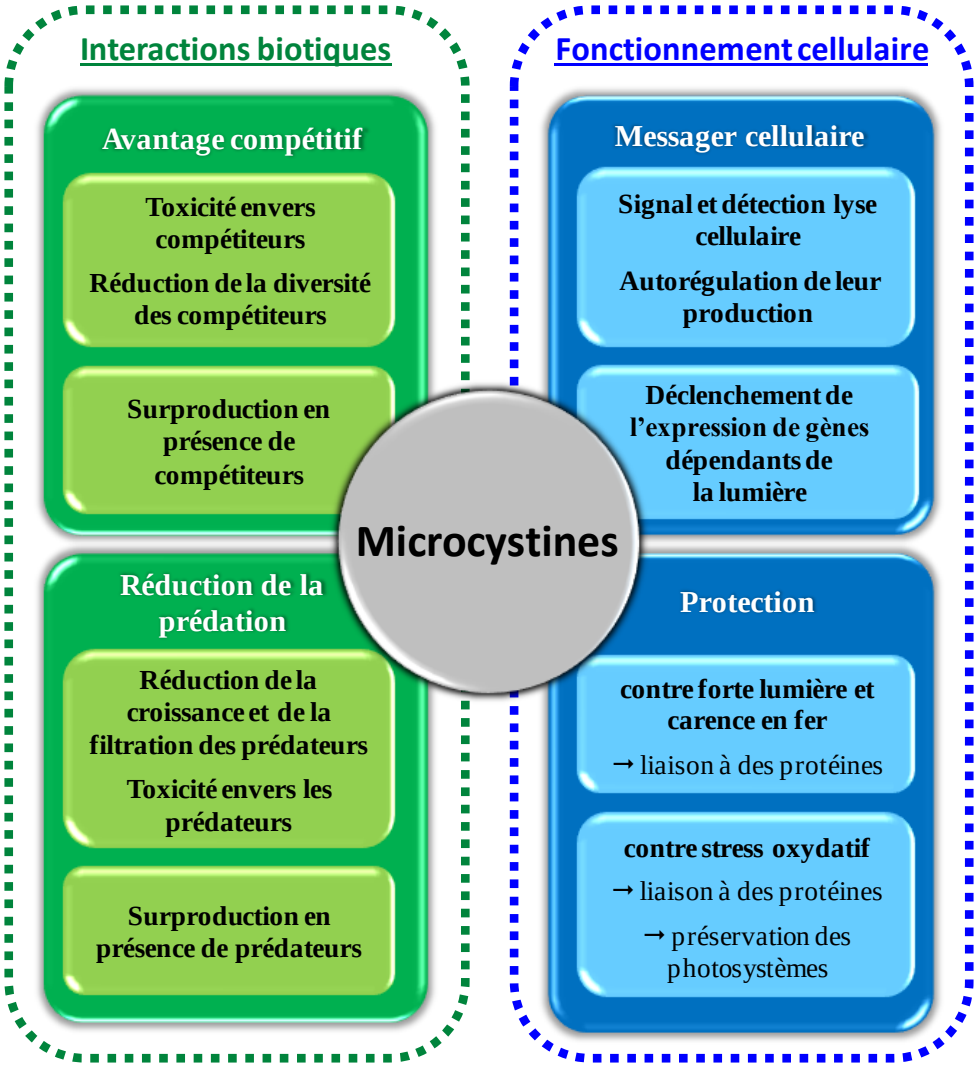
Dans les écosystèmes aquatiques, la toxicité des microcystines se manifeste à différents niveaux pour les communautés de producteurs primaires : au niveau du peuplement où elles sont connues pour réduire la diversité spécifique du phytoplancton (Sedmak & Kosi 1998), et au niveau cellulaire où elles peuvent avoir, selon l'espèce considérée, différents effets toxiques allant de la réduction de la croissance jusqu'à entraîner de profondes modifications morphologiques et physiologiques (Singh *et al.* 2001; Mitrovic *et al.* 2005; Ou *et al.* 2005; Sedmak & Elersek 2005). Cet impact sur les communautés photosynthétiques, associé à l'augmentation de production de microcystine par *Microcystis* en présence d'autres producteurs primaires, sont à l'origine de l'hypothèse d'un rôle allélopathique des microcystines. Ces molécules serviraient ainsi à limiter la compétition pour les ressources en affectant les principaux compétiteurs de *Microcystis* (figure 8).

Les microcystines sont également connues pour affecter les prédateurs potentiels des cyanobactéries. En effet, plusieurs espèces zooplanctoniques présentent une sensibilité à ces molécules. Elle peut se traduire par une atteinte du taux de filtration, une diminution du taux de croissance ou encore une forte mortalité (Demott & Moxter 1991; Jang *et al.* 2003; Guo & Xie 2006). Ces observations, couplées à une surproduction de microcystine lors de l'exposition à des prédateurs phytoplanctonophages (Jang *et al.* 2003; Jang *et al.* 2004), ont abouti à l'hypothèse d'une réduction de la prédation par la production de microcystine, conférant ainsi une seconde grande fonction écologique à cette cyanotoxine (figure 8).

S'il ne fait aucun doute que les microcystines comptent parmi les plus puissantes toxines naturelles retrouvées dans les milieux aquatiques, plusieurs facteurs semblent montrer que cette toxicité ne correspond pas à la fonction première de ces molécules. En effet, une étude phylogénétique des gènes de cyanotoxines a suggéré leur apparition avant la lignée des métazoaires (Rantala *et al.* 2004). De plus, les synthèses de nombreux travaux ayant étudié

l'impact des microcystines sur les communautés phytoplanctoniques et zooplanctoniques ont permis de constater que les microcystines ne seraient toxiques que sur certaines espèces, et à des doses rarement retrouvées en milieu naturel (Babica *et al.* 2006; Wilson *et al.* 2006). Tout ceci conduit à penser que l'implication des microcystines dans l'allélopathie et la réduction de la prédation ne serait, en fait, que des fonctions secondaires de ces molécules.

Figure 8 : Fonctions écologiques hypothétiques attribuées aux microcystines.



5.2. Implication des microcystines dans le fonctionnement cellulaire

Bien qu'il semble exister un taux de production minimal de microcystine directement lié à la croissance des cellules de *Microcystis*, divers stimuli sont également connus pour moduler l'expression des gènes *mcy* indépendamment du taux de croissance. La nature de ces stimuli a conduit à attribuer plusieurs rôles hypothétiques aux microcystines, vis-à-vis du fonctionnement de la cellule.

La transcription des gènes *mcy* et la production de microcystine sont fortement régulées par la lumière, avec une surexpression des gènes proportionnelle à l'intensité lumineuse, et une très faible expression à l'obscurité (Kaebernick *et al.* 2000; Straub *et al.* 2011). Au-delà de ce lien, la signification biologique et écologique de cette régulation lumière-dépendante pourrait résider dans une meilleure adaptation et une meilleure survie des souches toxiques en conditions de forte lumière (Kardinaal *et al.* 2007b; Zilliges *et al.* 2011). Cette meilleure adaptation et/ou survie pourrait être liée à deux fonctions potentielles des microcystines : une fonction de protection de certaines protéines impliquées dans le métabolisme primaire des cellules, protéines auxquelles les microcystines peuvent se lier de manière covalente (Zilliges *et al.* 2011), et une fonction de messager intracellulaire signalant la qualité et la quantité de lumière perçue afin d'ajuster l'expression de certains gènes lumière-dépendants (Dittmann *et al.* 2001 ; figure 8).

Ce rôle de messager a été repris plus récemment pour expliquer l'augmentation de transcription des gènes *mcy* en réponse à la présence de microcystine dans le milieu extracellulaire. Les microcystines pourraient donc bien jouer un rôle de molécule signal, induisant notamment la régulation de leur propre production. Les microcystines serviraient alors de messagers intracellulaires et extracellulaires (figure 8). Puisqu'elles sont essentiellement préservées à l'intérieur des cellules productrices, tant que ces dernières ne sont pas lysées (Watanabe *et al.* 1992), la détection de microcystine dans le milieu extérieur est perçue comme le signal d'une importante mortalité cellulaire (Schatz *et al.* 2007). En réponse, les cellules survivantes s'agrègeraient plus facilement, et augmenteraient leur vitesse de division, leur production de pigments et leur production de microcystine pour améliorer leurs chances de survie face aux conditions défavorables ayant entrainé la mort de leurs congénères (Kehr *et al.* 2006; Sedmak & Eleršek 2006; Schatz *et al.* 2007).

Après la démonstration du pouvoir chélateur des microcystines (Rojas *et al.* 1990; Humble *et al.* 1997), l'hypothèse d'un rôle de sidérophore a également été proposée pour les

microcystines (Utkilen & Gjolme 1995). Bien qu'une souche toxique puisse présenter un meilleur taux d'assimilation du fer qu'une souche non toxique (Utkilen & Gjolme 1995), la très faible excrétion de microcystine dans le milieu rend peu probable l'idée d'une chélation du fer extracellulaire par ces toxines (Watanabe *et al.* 1992; Alexova *et al.* 2011). Néanmoins, la meilleure assimilation du fer par les souches toxiques, associée à une meilleure survie des souches toxiques en cas de carence en fer (Lyck *et al.* 1996) ont conduit à l'émergence d'un rôle hypothétique de protection des cellules toxiques par les microcystines en cas de sévère carence en fer (Alexova *et al.* 2011 ; figure 8).

La régulation de la synthèse de microcystine par le stress oxydatif est à l'origine de la dernière fonction intracellulaire hypothétique attribuée aux microcystines. En cas de surplus d'énergie lumineuse, les photosystèmes des cyanobactéries utilisent l'oxygène comme accepteur d'électron alternatif afin de dissiper l'énergie excédentaire emmagasinée par les photosystèmes (Visser *et al.* 1995; Latifi *et al.* 2009). Ce processus entraine la formation de ROS, en quantité proportionnelle à l'intensité lumineuse perçue. Une carrence en fer dans les cellules cyanobactériennes est aussi connue pour entrainer une importante production de ROS (Latifi *et al.* 2009). Ainsi, l'excès de lumière et la disponibilité en fer pourraient bien influencer la production de microcystine indirectement, via le déclenchement d'un stress oxydatif (Alexova *et al.* 2011; Zilliges *et al.* 2011). De plus, une souche de *Microcystis* toxique est apparue plus résistante à la présence de peroxyde d'hydrogène que son homologue muté spécifiquement sur un gène de microcystine (souche PCC7806 et son mutant Δ*mcyB*) : le mutant présentait une importante dépigmentation démontrant la dégradation de son appareil photosynthétique (Zilliges *et al.* 2011). Tout ceci a conduit à la proposition d'un rôle hypothétique de protection contre le stress oxydatif pour les microcystines (Alexova *et al.* 2011; Zilliges *et al.* 2011). Une telle protection pourrait notamment s'effectuer via la liaison des microcystines à différentes protéines impliquées dans le métabolisme primaire de *Microcystis* (Zilliges *et al.* 2011 ; figure 8).

III - Objectifs et organisation de la thèse

L'analyse de la bibliographie met en évidence un manque important de données concernant l'évolution globale du potentiel toxique de *Microcystis* au cours de son cycle de développement, et plus particulièrement au cours de sa phase de vie benthique et lors des phases de transition entre le compartiment benthique et le compartiment planctonique. L'implication potentielle de ces phases de transition et de la survie benthique de *Microcystis* dans la variabilité de la toxicité de ses efflorescences planctoniques parait pourtant très importante, puisque les stocks de colonies benthiques sont à l'origine des proliférations planctoniques (Reynolds et al. 1981).

Dans ce contexte, le but principal de ma thèse était de comprendre la variabilité spatio-temporelle et l'implication potentielle de la toxicité de *Microcystis* à l'échelle de son cycle annuel de développement, afin de mieux appréhender le déterminisme de son potentiel toxique et le rôle écologique des microcystines. Au travers de cet objectif assez vaste, les principales questions auxquelles je voulais apporter des éléments de réponse étaient les suivantes :

- Comment évolue le potentiel toxique de *Microcystis* au cours de sa phase de vie benthique ? Quels sont les facteurs déterminant cette évolution ?
- Le potentiel toxique de *Microcystis* est-il impliqué dans les processus de recrutement benthique et de sédimentation ?
- Quelle est l'influence des interactions entre les phases benthique et planctonique sur l'évolution de la structure génétique et le potentiel toxique des populations de *Microcystis* ?

Afin de répondre à ces questions, la suite du manuscrit est organisée en quatre chapitres présentant les méthodes utilisées, les résultats obtenus organisés sous forme d'articles, et une discussion générale de l'ensemble des résultats acquis.

Le chapitre 2 consiste en une **présentation des sites d'étude et des méthodologies** que j'ai choisis.

Le **chapitre 3** concerne **la variabilité temporelle du potentiel toxique de *Microcystis* dans les sédiments.** Il est subdivisé en deux parties, correspondant chacune à un article :

I – Variabilité temporelle du potentiel toxique et de la structure génétique de populations benthiques de *Microcystis*

article n°1 : *Evolution of the toxic potential and the genotypic structure of benthic populations of Microcystis at different time scales.* **Misson B.**, Donnadieu-Bernard F., Godon J.J., Amblard C. et Latour D. (Article soumis à la revue *Water Research*)

II - Variabilité du potentiel toxique de *Microcystis* au cours de sa phase de vie benthique : l'apport de l'étude de la transcription du gène *mcyB*

article n°2 : *Benthic survival of Microcystis: long-term viability and ability to transcribe microcystin genes.* **Misson B.,** Sabart M., Amblard C. et Latour D. (Article en révision dans la revue *Harmful Algae*)

Le **chapitre 4** correspond à l'**étude de la variabilité temporelle du potentiel toxique de *Microcystis* en relation avec les interactions entre les phases benthique et planctonique.** Il se compose de deux parties :

I – Le recrutement benthique, processus à l'origine des proliférations planctoniques

1. Influence de différents paramètres physiques et du temps de vie benthique sur le recrutement benthique de *Microcystis*

article n°3 : *Influence of light, sediment mixing, temperature and duration of benthic life on the benthic recruitment of Microcystis*. **Misson B**. and Latour D. (Article en révision dans la revue *Journal of Plankton Research*)

2. Implication du potentiel toxique et de la taille des colonies de *Microcystis* dans le processus de recrutement benthique

article n°4 : *Involvement of microcystins and colony size in the benthic recruitment of the cyanobacterium Microcystis (Cyanophyceae).* **Misson B.,** Sabart M., Amblard C. and Latour D. (*Journal of Phycology* 2011, 47 : 42-51)

II - Influence des interactions eau-sédiments sur la diversité génétique et le potentiel toxique des populations benthiques et planctoniques de *Microcystis.*

article n°5 : *Shifts in the genotypic composition and the toxicity of benthic and planktonic populations of Microcystis can be induced by benthic-pelagic transfers and horizontal transports.* **Misson B.,** Sabart M., Duffaud E., Amblard C. and Latour D. (Article en préparation)

Le **chapitre 5** consiste en une **discussion générale** de ces résultats. Il présente également les principales conclusions issues de mon travail de thèse, ainsi que leur portée écologique.

Enfin, le **chapitre 6** présentes les conclusions de ce travail de thèse, ainsi que les **perspectives d'étude** qui s'inscrivent dans la suite directe de mes recherches.

Contribution personnelle aux différents articles :

A l'exception des travaux présentés dans l'article n°3, j'ai contribué de manière importante à l'échantillonnage, à la conception des expérimentations, à l'obtention et à l'exploitation des résultats de l'ensemble des études présentées dans ce manuscrit. J'ai également réalisé les analyses statistiques présentées dans les cinq articles. Enfin, j'ai rédigé les articles n°1, 2, 4 et 5, et j'ai fortement contribué à la rédaction de l'article n°3.

Chapitre 2 :

SITES D'ETUDE ET METHODES

Au cours de ce travail de thèse, j'ai été amené à combiner des suivis en milieu naturel, sur différents sites, et des expériences en conditions contrôlées, à partir d'échantillons naturels. Pour l'analyse des échantillons, j'ai utilisé différentes techniques souvent complémentaires afin d'acquérir le maximum d'informations. Ce chapitre constitue une présentation des sites dans lesquels les échantillons ont été prélevés, et le principe des différentes techniques qui ont été utilisées. Afin de limiter les redondances avec les sections « *Material and Methods* » des différents articles, les protocoles précis ne sont pas détaillés dans ce chapitre.

I – Présentation des sites d'échantillonnage

1. La retenue de Grangent

Toutes les études en milieu naturel ont été réalisées dans la retenue de barrage de Grangent. Ce lac artificiel a été créé en 1957, suite à la construction d'un barrage hydroélectrique sur le cours amont de la Loire, à environ 15 km à l'Ouest de Saint-Etienne (figure 9). La retenue est située dans un secteur de gorges aux pentes abruptes, et s'étend sur une superficie de 365 ha pour 21 km de long, dans les départements de la Haute-Loire et de la Loire. Elle est située à une altitude de 420 m, et présente une profondeur maximale de 50 m au niveau du barrage. Le lac de Grangent constitue une importante réserve en eau ($57{,}4 \times 10^6$ m^3), aujourd'hui utilisée à plusieurs fins : production d'électricité, irrigation de la plaine du Forez, alimentation en eau potable, sports nautiques et tourisme.

D'un point de vue écologique, la retenue de Grangent subit des apports très importants en azote et phosphore par les rejets d'eaux usées et le lessivage des sols de son bassin versant. Ces apports ont rapidement contribué à une eutrophisation marquée de ses eaux. Cette eutrophisation occasionne le développement d'efflorescences estivales récurrentes de *Microcystis* dans cette retenue depuis la fin des années 1970. Les nuisances occasionnées par ces fleurs d'eau envers les nombreuses utilisations du lac, notamment récréatives, ont rapidement mené les gestionnaires (EDF) à engager des programmes de recherche sur le développement de *Microcystis* dans ce lac. Les différentes études menées au cours des 15 dernières années ont permis une première caractérisation de la population de *Microcystis*, et notamment d'acquérir des connaissances concernant la phase benthique de cette cyanobactérie dans ce lac (Berthon *et al.* 1996; Latour

2002; Latour *et al.* 2002, 2004a, 2004b, 2004c, 2007; Latour & Giraudet 2004; Humbert *et al.* 2005; Briand *et al*. 2009; Sabart 2009; Sabart *et al.* 2009, 2010).

Ce lac de barrage est régulièrement soumis à des crues majeures du fleuve qui l'alimente. La dernière de ces crues est survenue en Novembre 2008, et a profondément affecté les sédiments de la retenue. La population benthique de *Microcystis* a, par conséquent, été largement affectée, ce qui a fortement contraint le choix des sites d'étude et m'a amené à considérer alternativement deux stations dans ce lac, selon l'objectif visé.

La première station est située au niveau de l'ancien lit mineur de la Loire, dans la zone aval de la retenue, à proximité du lieu-dit les Camaldules (station Cam, figure 10). Cette station est située dans une zone d'accumulation préférentielle de sédiments et de colonies benthiques de *Microcystis* (Latour & Giraudet 2004), justifiant ainsi l'utilisation de ces sédiments riches en colonies pour la première expérience de recrutement (chapitre IV, article 3). Cette station est également localisée dans la zone du lac où les crues majeures de la Loire ont déposé le plus de sédiments allochtones. A titre d'exemple, la crue de novembre 2008 a occasionné un dépôt de près d'un mètre de sédiments dans cette partie de la retenue. Les dépôts de ces crues majeures ont enfoui en profondeur des colonies de *Microcystis* récemment sédimentées, constituant ainsi des conditions pertinentes pour l'étude de la survie benthique stricte de *Microcystis*, avec des populations facilement identifiables et datables, isolées de toute interaction avec la phase de vie planctonique (chapitre III, articles 1 et 2).

La seconde station est localisée dans le lit d'un affluent de la Loire, le Lizeron (station Liz, figure 10). Cette station étant en retrait du lit de la Loire, l'influence de la crue de Novembre 2008 était plus limitée, et des colonies de *Microcystis* étaient toujours présentes en surface des sédiments après son passage. Elle a donc été choisie pour l'étude des interactions entre les phases de vie benthique et planctonique de *Microcystis* (chapitre IV, article 5). Il s'agit d'une station un peu moins profonde (22 m), et qui n'a présenté aucune période de stratification thermique marquée durant la période de suivi.

Figure 9 : Situation géographique des retenues de Grangent et Villerest sur le fleuve Loire

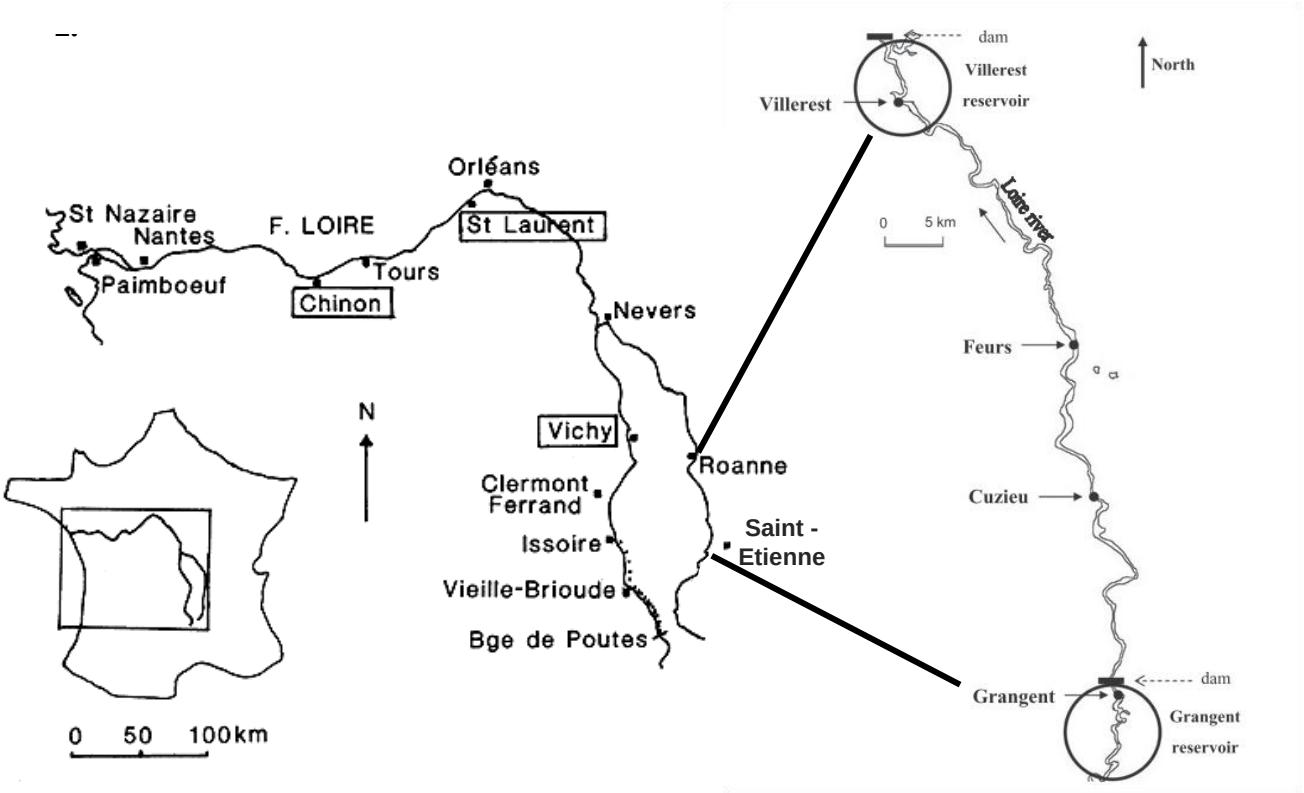
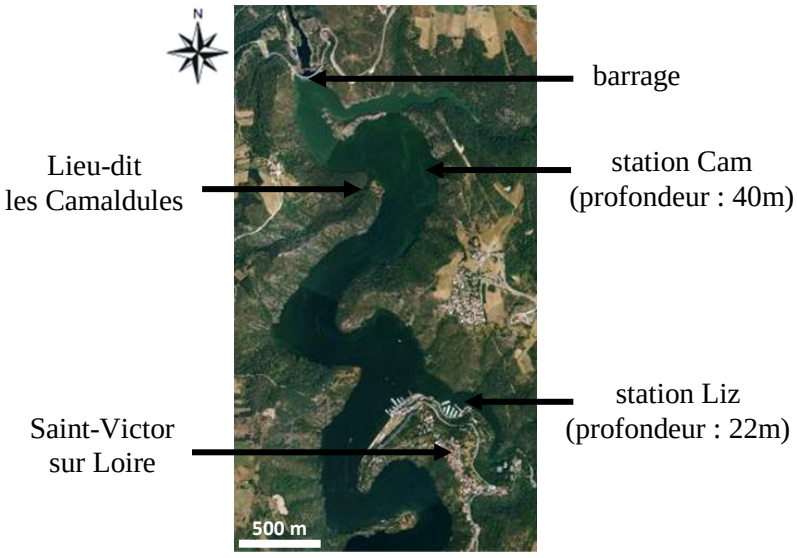


Figure 10 : Présentation des stations prospectées dans la retenue de Grangent



2. La retenue de Villerest

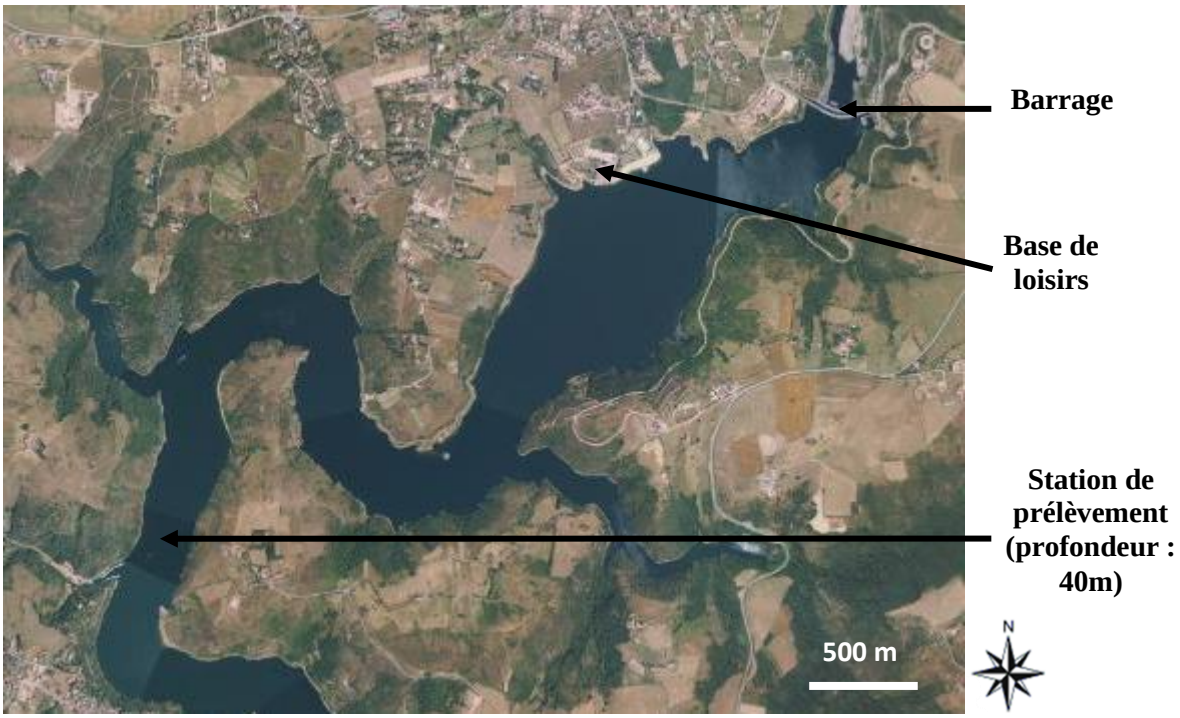
Ce second lac artificiel est également une retenue créée suite au barrage de la Loire, environ 80 km à l'aval du barrage de Grangent, sur la commune de Villerest près de Roanne (figure 9). La retenue de Villerest s'étend sur 34 km de long pour une superficie de 712 ha, entre Balbigny et Villerest, dans le département de la Loire. Elle est située à une altitude de 315m et sa profondeur maximale est de 45 m.

Ce lac de barrage a été mis en eau plus récemment que celui de Grangent (1984), et à des fins différentes : sa fonction principale consiste en l'écrêtement des crues et au soutien d'étiage. Une fonction de production électrique et des activités touristiques se sont, par la suite, ajoutées dans les utilisations de cette retenue.

La retenue de Villerest présente de nombreuses similarités avec la retenue de Grangent : toutes deux sont situées sur le même fleuve, dans deux secteurs de gorges aux pentes abruptes, et ont une profondeur maximale similaire. De plus, dès la fin des années 1980, la retenue de Villerest est devenue hypereutrophe, caractère qui s'est manifesté par l'apparition d'importantes efflorescences de *Microcystis*.

Ce lac a été échantillonné plus ponctuellement. Des sédiments très riches en colonies de *Microcystis* et de l'eau de surface (0,5 m) ont été prélevés dans la zone aval de la retenue (figure 11), à une station présentant une profondeur de 40 m et un fonctionnement de type lacustre similaire à celui de la station Cam de la retenue de Grangent. Cet échantillonnage a été effectué pour la seconde expérience de recrutement présentée dans ce manuscrit (chapitre IV, article 4) : la première expérience ayant démontré de faibles taux de recrutement, et les sédiments de la retenue de Villerest étant nettement plus riches en *Microcystis* que ceux de Grangent au moment de l'échantillonnage, l'utilisation des sédiments de Villerest a permis d'optimiser l'étude du recrutement.

Figure 11 : Localisation du site de prélèvement dans la retenue de Villerest

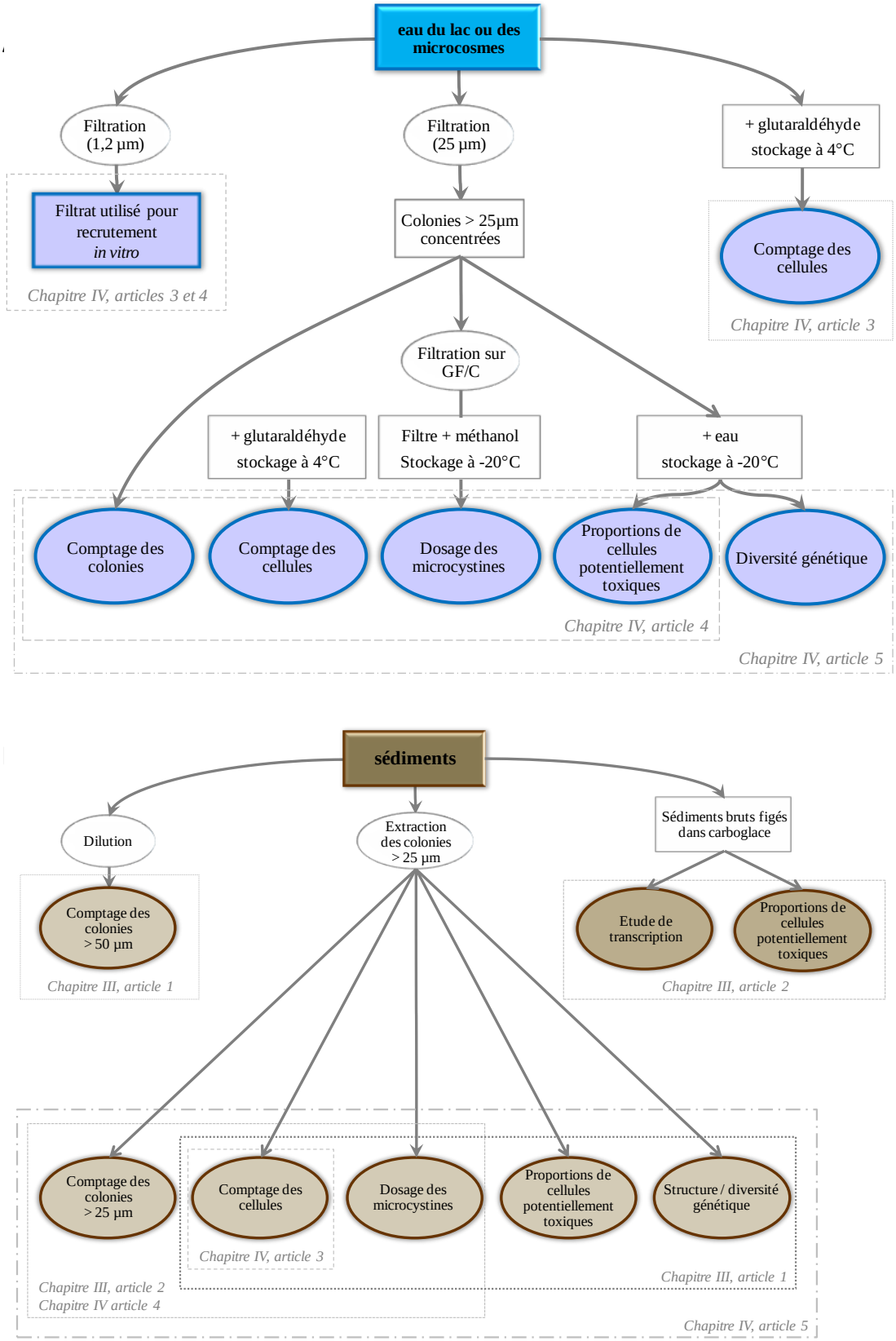


II – Méthodes de prélèvement et traitement des échantillons

1. Echantillons d'eau

Tous les prélèvements d'eau réalisés dans le cadre de cette thèse ont consisté en un échantillonnage d'eau brute en surface de la colonne d'eau (0,5 m). Cette eau était, soit analysée directement, soit filtrée sur 1,2 µm pour être ensuite utilisée dans les expériences de recrutement. Pour l'étude des *Microcystis* planctoniques (chapitre 4, articles 4 et 5), les colonies étaient concentrées sur de la toile à bluter de maille 25µm, puis récupérées dans un volume d'eau déterminé. Ce procédé de concentration permettait de pallier aux faibles abondances, notamment en début et fin de prolifération, et optimisait ainsi la détection des microcystines et le rendement d'extraction des acides nucléiques tout au long du suivi. Ce concentrat était utilisé tel quel pour les dénombrements de colonies, un aliquot était fixé avec du glutaraldéhyde (1% final) en vue des comptages de cellules, d'autres aliquots étaient directement congelés à -20°C en vue des futures extractions d'ADN, et, enfin, un volume déterminé était filtré, les filtres étant congelés à -20°C dans du méthanol à 75% en prévision des extractions de microcystines (figure 12 A).

Figure 12 : Protocole de traitement des échantillons d'eau (A) et de sédiments (B)



2. Echantillons de sédiments

L'échantillonnage des sédiments a fait appel à différentes techniques, selon les besoins en sédiments. L'utilisation d'une benne a permis de collecter une grande quantité de sédiments superficiels, alors que le carottage des sédiments a permis de prélever avec précision des strates profondes en quantité plus réduite. Une fois prélevés, tous les échantillons de sédiments n'ont pas été traités suivant le même protocole, selon les objectifs visés (figure 12 B) :

- pour l'étude des ARN (chapitre III, article 2), les acides nucléiques totaux ont été extraits à partir d'échantillons de sédiments bruts rapidement figés dans de la carboglace, afin de limiter leur évolution après le prélèvement.

- le dénombrement des colonies dans les strates profondes (chapitre II, article 1) s'est fait à partir de sédiments dilués dans de l'eau, afin d'avoir un aperçu rapide de la pertinence de l'échantillonnage. Cette préparation des échantillons pour le dénombrement des colonies correspondait au protocole de suivi de routine des populations benthiques de la station Cam du lac de Grangent, suivi réalisé dans le cadre d'un contrat de recherche financé par EDF. Pour les dosages de toxines et les analyses génétiques dans ces strates profondes (chapitre III, articles 1 et 2), pour l'ensemble des mesures réalisées sur la population benthique de la station Liz (chapitre IV, article 5), et pour celles réalisées sur le compartiment benthique lors des expériences *in vitro* (chapitre IV, articles 3 et 4), les colonies de *Microcystis* étaient tout d'abord extraites des sédiments. Pour cela, les sédiments étaient dilués dans un mélange d'eau et de silice colloïdale (Ludox TM 50) afin de créer un gradient de densité. La centrifugation du mélange permettait alors de faire sédimenter toute la fraction minérale grossière, alors que la fraction organique contenant les colonies de *Microcystis* se retrouvait dans le surnageant. Les colonies étaient ensuite récoltées, concentrées et rincées sur de la toile à bluter de 25 µm de maille, puis remises en suspension dans un volume d'eau donné. Ensuite le même protocole de stockage que celui retenu pour l'eau était utilisé. Cette élimination de la fraction minérale permettait d'améliorer la précision des dénombrements de colonies, l'extraction et la détection de l'ADN et des microcystines dans les différents échantillons.

III – Les dénombrements de colonies et de cellules

Au cours de ce travail de thèse, deux techniques adaptées au dénombrement spécifique de *Microcystis* ont été utilisées. Tout d'abord, pour identifier et compter les colonies, nous avons utilisé l'autofluorescence naturelle de leurs pigments. En effet, excités par une lumière de longueur d'onde comprise entre 510 et 560 nm (lumière verte), les pigments émettent une lumière rouge. Un dénombrement des colonies directement sur filtre, en microscopie photonique à épifluorescence, constitue alors une méthode rapide et précise, aussi bien adaptée aux échantillons planctoniques que benthiques. Les colonies planctoniques concentrées et les colonies extraites des sédiments ont ainsi été filtrées sur une maille de 25 µm maximum, les colonies benthiques des strates profondes étant, quant à elles, dénombrées sur une maille de 50 µm pour éliminer la majeure partie des sédiments fins dont elles n'étaient pas isolées.

La seconde technique correspond au dénombrement de cellules de *Microcystis*. A partir des échantillons fixés à la glutaraldéhyde, les colonies étaient dissociées à l'aide d'une sonde à ultrasons de puissance modérée. Les cellules ainsi séparées étaient alors dénombrées à l'aide d'hématimètres de Thoma, en microscopie photonique en lumière naturelle.

IV – Le dosage des microcystines

Pour pouvoir doser les microcystines intracellulaires, la première étape consiste à les extraire des cellules de *Microcystis*. Pour cela, le stockage des échantillons pendant au minimum 24 heures à -20°C et dans du méthanol à 75%, puis deux extractions successives aux ultrasons permettent d'optimiser le rendement d'extraction (Barco *et al.* 2005).

Une fois l'extraction réalisée, trois types de techniques sont couramment utilisés dans la littérature pour doser les microcystines : des méthodes d'HPLC (High Performance Liquid Chromatography), des méthodes immunologiques basées sur la reconnaissance des toxines par des anticorps (tests ELISA) et des méthodes enzymatiques basées sur l'utilisation des protéines phosphatases. Les méthodes d'HPLC permettent une identification précise et rapide des différents variants de microcystines, mais sont limitées, d'une part, par la nécessité de posséder des échantillons riches en microcystines pour assurer une bonne détection et, d'autre part, par le faible choix de variants disponibles dans le commerce pour permettre leur quantification. Les

tests ELISA présentent un seuil de détection plus faible que l'HPLC, pour un temps de manipulation plus long et un coût plus important. Ces tests permettent aussi la quantification spécifique de certains variants. Enfin, les méthodes basées sur l'inhibition des protéines phosphatases présentent un seuil de détection comparable à celui des tests ELISA, et un coût faible équivalent à celui de l'HPLC. La principale limite de l'utilisation de la méthode via les protéines phosphatases est son manque de spécificité : elle ne permet pas de quantifier les différents variants de microcystine présents dans un échantillon, ni même de distinguer les microcystines des nodularines, autres cyanotoxines de structure très proche.

Afin de maximiser la détection des microcystines dans les échantillons tout en limitant le coût de mes analyses, j'ai utilisé les dosages enzymatiques liés à l'inhibition des protéines phosphatases pour l'ensemble de mes échantillons. Ces méthodes enzymatiques sont basées sur l'inhibition des protéines phosphatases 1 et 2a (PP1 et PP2a) par les microcystines. Ce sont des méthodes colorimétriques : les protéines phosphatases dégradent un substrat, le paranitrophényl phosphate (pNPP), pour former un produit coloré jaune, le paranitrophénol (pNP). Les microcystines inhibant cette réaction, la coloration du milieu réactionnel est inversement proportionnelle à la concentration en microcystines (figure 13). Une mesure d'absorbance à 405 nm permet de quantifier cette inhibition. Il suffit alors de réaliser une gamme étalon avec plusieurs concentrations de référence pour déterminer ensuite la concentration en toxine dans les échantillons. Cette gamme étalon étant réalisée avec un variant purifié, les résultats ne peuvent être exprimés qu'en équivalence par rapport à ce variant. J'ai choisi d'utiliser le variant LR pour les gammes étalons, sachant que ce variant est le plus fréquemment observé en milieu naturel (Sivonen & Jones 1999).

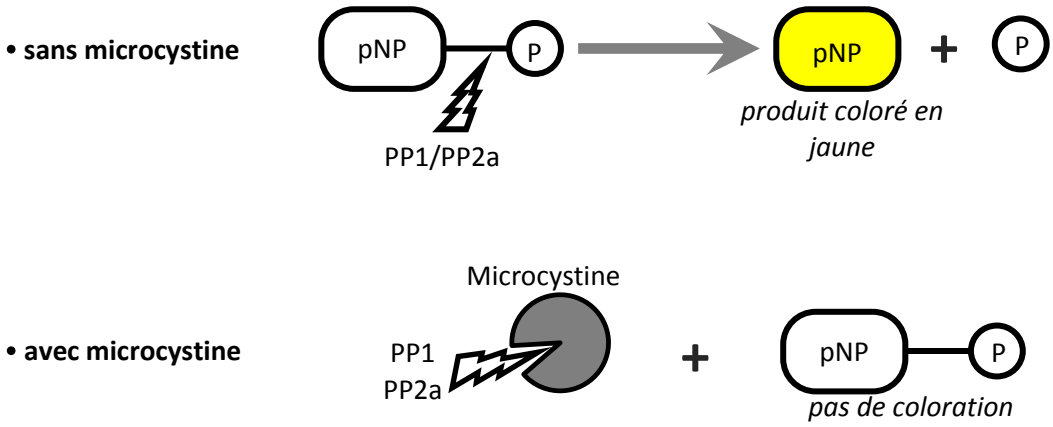


Figure 13 : Principe du dosage des microcystines par test d'inhibition des protéines phosphatases

V – Les différentes analyses génétiques

1. Extraction des acides nucléiques

Deux méthodes sont couramment employées pour l'extraction des acides nucléiques à partir d'échantillons environnementaux. La première consiste en l'utilisation de kits commerciaux. Elle repose alors généralement sur une lyse chimique ou mécanique des structures cellulaires, puis sur une purification des acides nucléiques par adsorption spécifique sur une membrane ou une colonne, les acides nucléiques étant élués après plusieurs lavages successifs. Cette méthode présente l'avantage d'être relativement rapide, mais son rendement est globalement assez faible. Après avoir testé de tels kits d'extraction commerciaux (NucleoSpin Extract II, NucleoSpin Tissue XS et NucleoSpin Plasma, de Macherey-Nagel) sur les échantillons, la quantité d'acides nucléiques récoltés s'est avérée trop faible pour les différentes analyses à réaliser.

La seconde méthode consiste à coupler la lyse des cellules avec une purification au phénol-chloroforme. Bien qu'elle soit plus longue et plus fastidieuse que l'utilisation des kits commerciaux, cette méthode permet généralement d'obtenir un meilleur rendement d'extraction, et constitue, de fait, la méthode la plus adaptée en cas de faibles concentrations en ADN cible, ce qui était le cas pour la majorité des échantillons. C'est pourquoi j'ai choisi d'appliquer cette méthode à toutes les extractions d'acides nucléiques.

2. Analyse de la diversité et de la structure génétique des populations

2.1. Le clonage-séquençage

Il s'agit de l'approche la plus employée pour l'analyse de la diversité génétique de *Microcystis*. Cette approche consiste tout d'abord en l'amplification de la séquence d'intérêt par PCR à partir de l'ADN extrait des échantillons environnementaux (figure 14). Le gène ainsi amplifié est alors inséré dans un vecteur (par exemple un plasmide), c'est l'étape de ligation. Vient ensuite l'étape de transformation qui consiste à insérer le vecteur dans des bactéries dont la membrane est rendue perméable (bactéries dites « compétentes »). Les bactéries transformées sont alors cultivées sur un milieu solide. Intervient alors l'étape de sélection des bactéries contenant le gène d'intérêt. Plusieurs cas de figure peuvent se présenter : (i) les bactéries peuvent ne pas avoir été transformées, (ii) les bactéries peuvent avoir été transformées avec un vecteur ne portant pas le gène d'intérêt, (iii) les bactéries peuvent avoir été transformées avec un vecteur

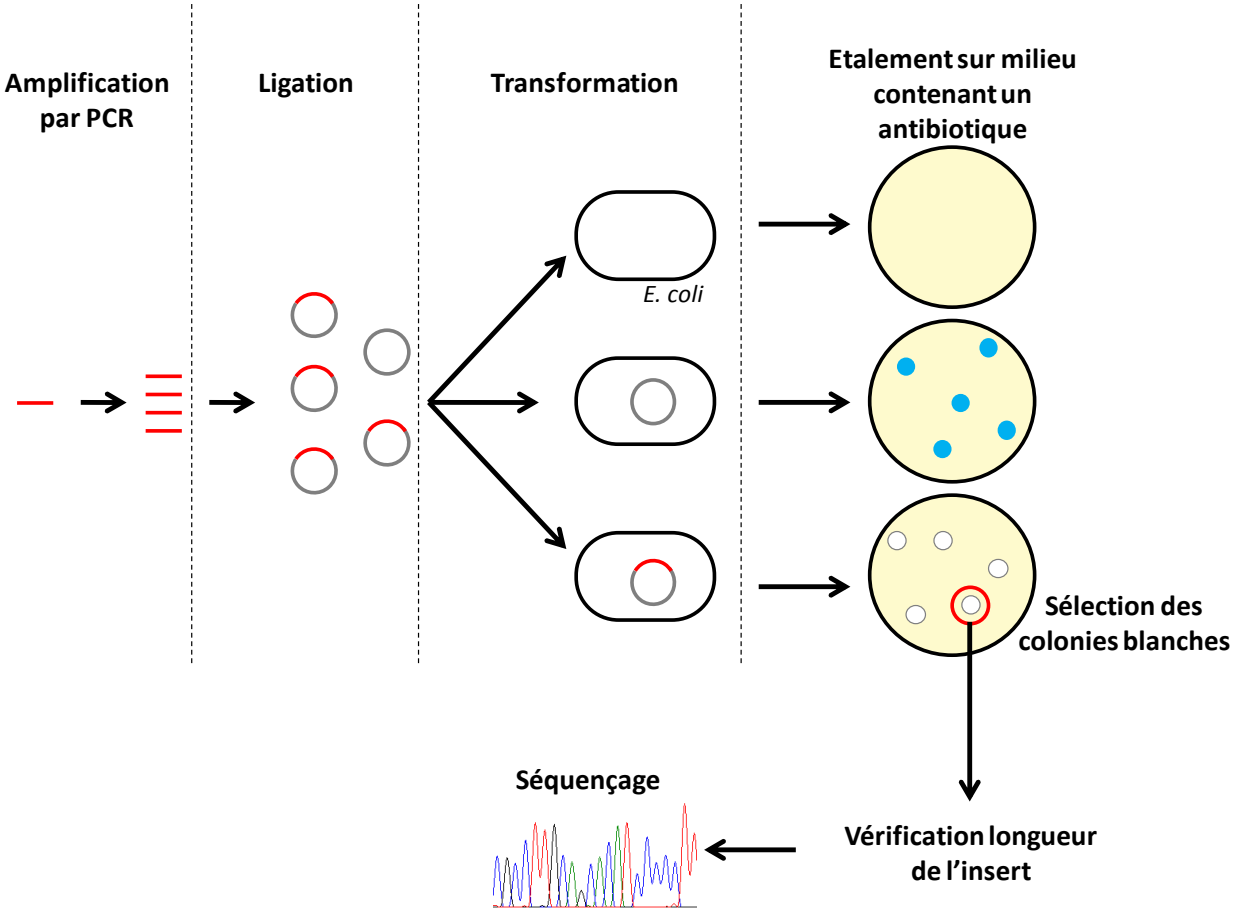
contenant le gène d'intérêt. La sélection repose sur plusieurs paramètres : d'une part, la présence dans le vecteur d'un gène de résistance à un antibiotique et d'un gène codant pour une enzyme (la β-galactosidase), et, d'autre part, la présence dans le milieu de culture de l'antibiotique en question et du substrat de l'enzyme (X-Gal). Ainsi, les bactéries non transformées ne pourront pas se développer, en raison de la présence de l'antibiotique. Ensuite, si la ligation s'est déroulée correctement, le gène de l'enzyme est inactivé. La dégradation du X-Gal par la β-galactosidase formant un produit coloré en bleu, les colonies contenant un plasmide sans le gène d'intérêt deviennent bleues alors que celles contenant le plasmide et le gène d'intérêt restent blanches. Les colonies blanches sont alors récoltées, et une PCR sur colonie est effectuée pour vérifier la présence du gène d'intérêt dans son intégralité. Les clones correctement transformés sont ainsi utilisés pour séquencer le gène cloné.

Figure 14 : Principe de la méthode de clonage séquençage.

1 : bactérie non transformée

2 : bactérie transformée avec un vecteur sans insert

3 : bactérie transformée avec un vecteur possédant la séquence d'intérêt



Cette méthode est relativement longue et coûteuse, et surtout limitée par le séquençage d'un nombre restreint de clones, choisis aléatoirement. Ceci a pour conséquence de ne pas donner une représentation précise de la structure génotypique de la population, et de ne pas représenter de manière exhaustive la richesse de séquences présentes. Néanmoins, cette méthode permet une identification précise des génotypes majoritaires présents dans l'échantillon, et une estimation de leurs proportions relatives. De plus, elle permet de comparer, avec précision, les séquences d'échantillons d'origine variée, tout en autorisant une comparaison relative de leur diversité génotypique. C'est pourquoi j'ai utilisé cette approche pour étudier la composition génotypique lors des interactions entre les phases de vie benthique et planctonique de *Microcystis* (chapitre IV, article 5).

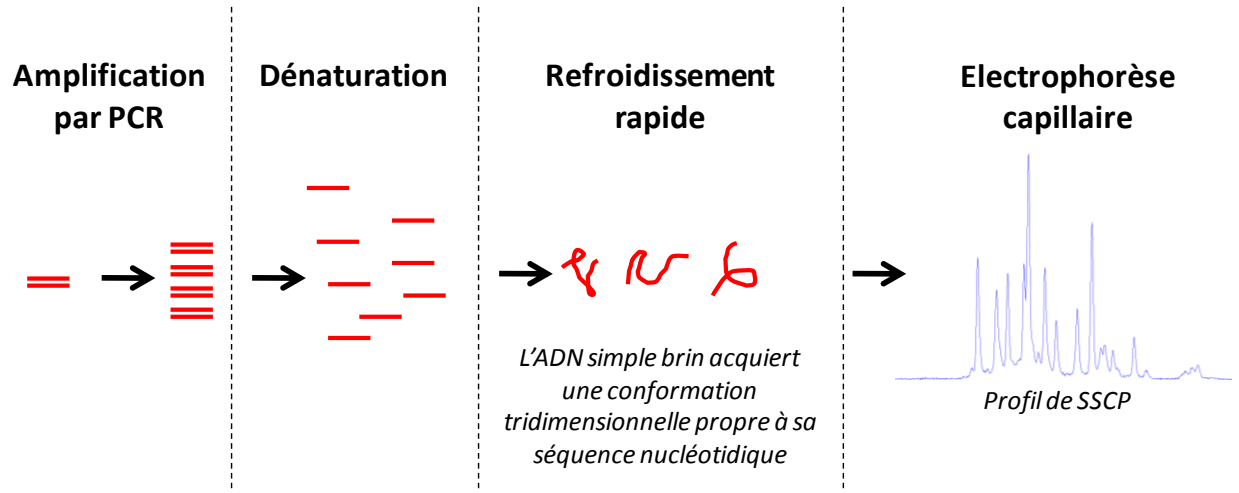
2.2. Les techniques d'empreintes moléculaires

La structure génétique des populations de *Microcystis* a été étudiée par des méthodes d'empreinte moléculaire telle que la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, (Janse *et al.* 2003)) ou la SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism, Pobel *et al.* en préparation). Ces techniques d'empreintes moléculaires ne sont pas aussi résolutives que le clonage-séquençage, la distinction de génotypes très proches pouvant être délicate et très sensible aux conditions d'électrophorèse. Elles sont aussi moins informatives que le clonage-séquençage, puisque qu'elles ne donnent pas directement accès aux séquences des différents génotypes et ne permettent donc pas d'appréhender leur degré de similarité. Cependant, ces méthodes d'empreintes moléculaires constituent tout de même des outils puissants permettant de comparer avec précision de nombreux échantillons, et demandent un temps de manipulation bien plus réduit. De plus, ces méthodes ne reposant pas sur le choix d'un nombre limité de séquences à caractériser, elles donnent une meilleure représentation de l'échantillon dans son ensemble. La SSCP présentant l'avantage de reposer sur une détection automatisée des profils, et permettant une comparaison de l'abondance relative des différents génotypes détectés, j'ai choisi d'utiliser cette technique pour étudier la structure génétique des populations benthiques profondes (chapitre III, article 1).

La SSCP repose sur l'amplification du gène d'intérêt par PCR à partir de l'ADN extrait des échantillons naturels (figure 15). Après dénaturation des produits de PCR par une forte température, l'ADN est très rapidement refroidi. Le changement brutal de température ne permet

pas aux brins d'ADN de s'hybrider avec leurs brins complémentaires, mais ils acquièrent une conformation spatiale par appariement internes entre bases complémentaires. Les ADN simple brin sont alors séparés par une électrophorèse capillaire. La conformation des brins est directement liée à leur séquence, et la moindre mutation peut entraîner un changement de conformation du brin et donc ralentir ou accélérer sa migration dans le polymère lors de l'électrophorèse. La détection des différents génotypes est réalisée automatiquement lors du passage devant un capteur, et un profil représentant la quantité d'ADN détectée devant le capteur en fonction du temps de migration est établi. Sur ce profil, chaque pic correspond en théorie à une génotype différent, et l'importance relative des différents génotypes peut ainsi être estimée en intégrant l'aire sous les pics. Ainsi, cette technique permet de détecter de très faibles modifications de séquence, une simple mutation pouvant théoriquement être mise en évidence. Afin d'obtenir une bonne sensibilité de la méthode, la principale contrainte consiste à analyser des fragments d'ADN relativement courts (moins de 200 bases).

Figure 15 : Principe de la SSCP



3. Estimation des proportions de cellules potentiellement toxiques

On qualifie de « potentiellement toxiques » les cellules possédant le cluster de gènes permettant la synthèse de la microcystine. Néanmoins, la présence de ce cluster, souvent identifiée grâce à la présence d'un seul des dix gènes qui le composent, ne permet pas d'affirmer

que la cellule est capable de produire la toxine car l'inactivation d'un seul de ces dix gènes peut suffire à inhiber la voie de biosynthèse (Dittmann *et al.* 1997; Pearson *et al.* 2004).

Les proportions de ces cellules dans les échantillons naturels de *Microcystis* sont déterminées par la quantification relative par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitative en temps réel (PCRq) du nombre de copies d'un gène du cluster *mcy* par rapport au nombre de copies d'une séquence de référence : l'ITS de l'opéron codant pour la production de la phycocyanine (PC). Cette technique consiste en l'amplification des deux gènes d'intérêt au cours d'une même réaction (en duplex), couplée à la détection de la quantité de produits formés à la fin de chaque cycle de la PCR. La quantification des produits de PCR est effectuée grâce à des sondes de type TaqMan : ces sondes sont de petits fragments d'ADN complémentaires et spécifiques de la séquence du gène d'intérêt (figure 16). A une extrémité d'une sonde se trouve un fluorophore (différent pour chaque gène amplifié), et à l'autre extrémité se trouve un quencher qui inhibe le fluorophore. Ces sondes se fixent sur les brins d'ADN dénaturés au niveau de la séquence d'intérêt. Lors du passage de la polymérase, elles sont clivées et les fluorophores libérés peuvent alors être détectés par le capteur du thermocycleur. Ainsi, l'intensité de fluorescence dans le milieu est proportionnelle à la quantité de produits de PCR formés. Pour être détectée par le thermocycleur, la fluorescence doit dépasser une intensité seuil pour être distinguée du bruit de fond. Ce seuil correspond à un certain nombre de cycles de PCR, qu'on appelle cycle-seuil (Ct, pour *cycle threshold*). Plus le nombre de copies initiales du gène d'intérêt est grand, plus ce Ct sera faible (figure 17).

Pour la mise au point de cette méthode au laboratoire, j'ai choisi d'utiliser le gène *mcyB*, qui est l'un des plus employés et pour lequel les séquences d'amorces spécifiques sont disponibles dans la littérature. Des valeurs seuil de fluorescences pour chaque gène ont été fixées de manière à optimiser la quantification. Cette optimisation a été effectuée grâce à des courbes de calibration, réalisées à partir de dilutions successives de l'ADN de différentes souches axéniques de *Microcystis*. La quantification relative des deux gènes d'intérêt a alors fait appel à la méthode ΔCt (Briand *et al*. 2009), qui consiste à faire la différence entre le Ct obtenu pour le gène de référence (*i.e.* PC) et le Ct obtenu pour le gène *mcyB* ($\Delta Ct = Ct_{PC} - Ct_{mcyB}$). La valeur standard de ΔCt pour une proportion de cellules potentiellement toxiques de 100% a été obtenue en faisant la moyenne du ΔCt obtenu pour 8 souches axéniques toxiques de la « Pasteur Culture collection of Cyanobacteria » (PCC). Partant du principe qu'une quantité d'ADN diminuée de moitié

Figure 16 : Principe de la PCR quantitative utilisant une sonde de type TaqMan

R : fluorophore, Q : quencher

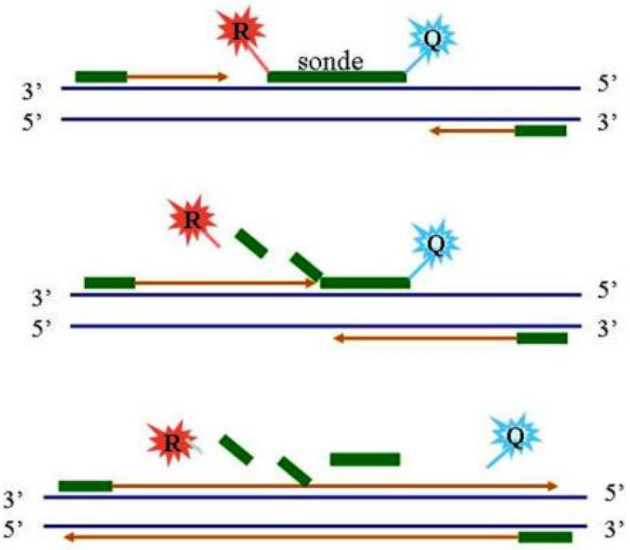
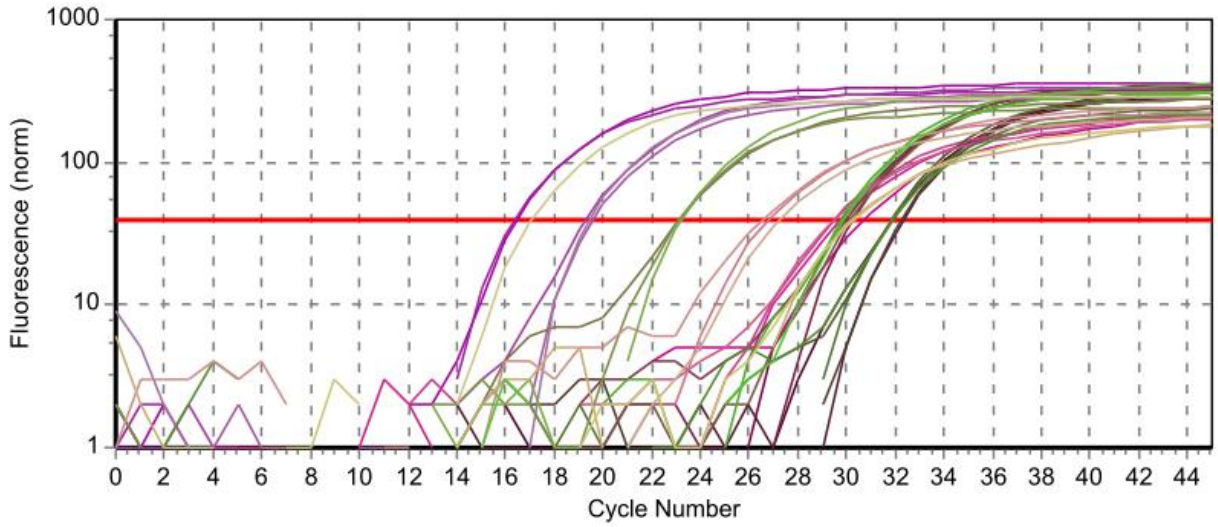


Figure 17 : Courbes d'amplification d'un gène en PCR quantitative

Ces courbes représentent l'intensité de fluorescence (unité arbitraire) en fonction du nombre de cycle PCR réalisés. La ligne rouge représente le seuil de détection, fixé manuellement. Plus les courbes d'amplification franchissent le seuil après un nombre élevé de cycles, plus la quantité initiale d'ADN cible était faible.



correspond à une détection du signal un cycle plus tard, lorsque la proportion de cellules portant le gène *mcyB* diminue de 50%, le ΔCt diminue alors de 1. Cette relation permet de calculer une équation théorique donnant ΔCt en fonction de la proportion de cellules potentiellement toxiques.

Cette équation théorique a alors été vérifiée expérimentalement en mélangeant des proportions variables d'ADN de souches toxiques et non toxiques, afin de confirmer la fiabilité de la méthode. Les valeurs seuil retenues, et les équations théoriques et expérimentales sont présentées dans les sections « *Material and methods »* des articles.

Au-delà de nous renseigner sur le potentiel toxique d'un échantillon de *Microcystis*, cette technique est un outil d'un grand intérêt pour étudier avec plus de précision la production de microcystine en milieu naturel. En effet, en combinant ces résultats avec les dénombrements de cellules et les dosages de microcystines, il est possible de calculer des quotas cellulaires spécifiques aux cellules potentiellement toxiques, plutôt que de considérer des quotas cellulaires moyens pour l'ensemble de la population, comme c'est souvent le cas dans la littérature.

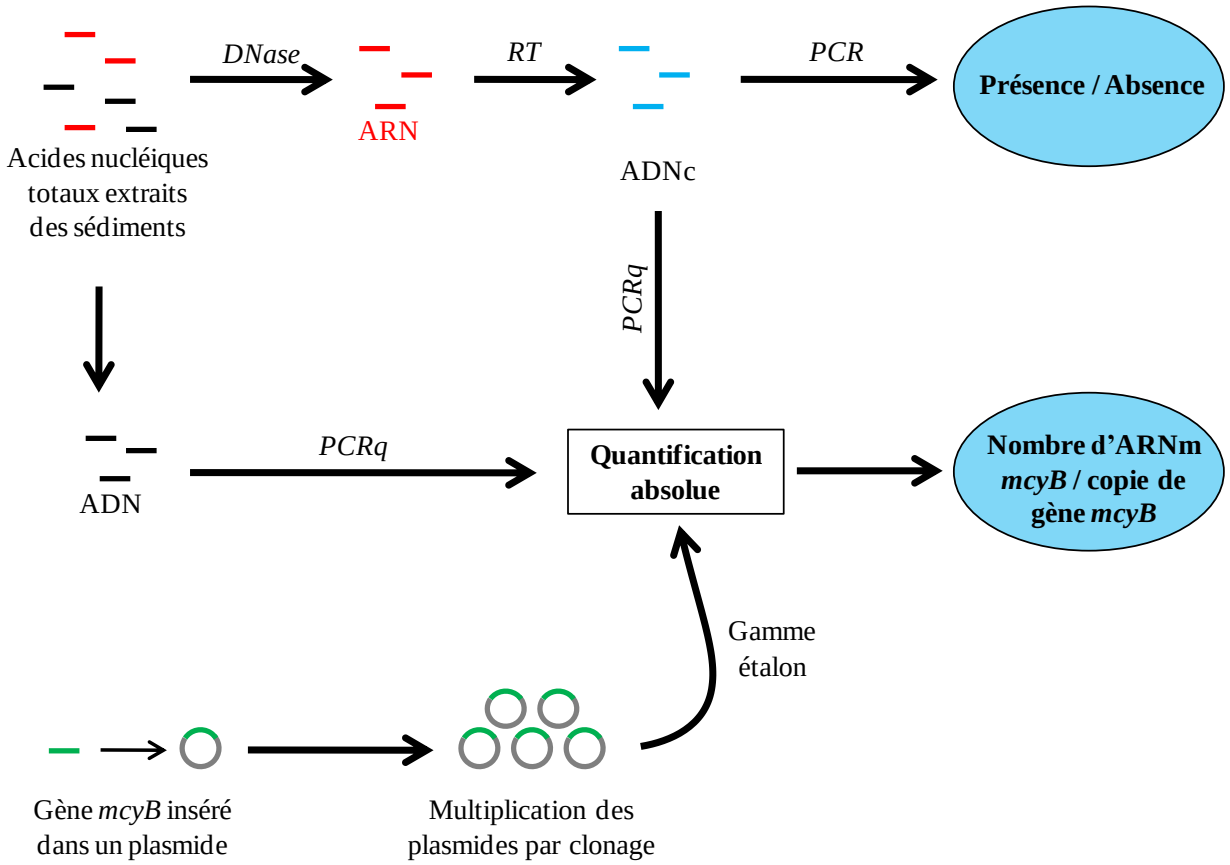
4. Etude de la transcription d'un gène de microcystine dans des cellules benthiques

Par souci de cohérence avec les mesures de proportions de cellules potentiellement toxiques, j'ai choisi d'étudier la transcription du gène *mcyB*. Pour cette étude de transcription, il a été nécessaire de déterminer la présence ou l'absence de transcrits *mcyB* (figure 18), en utilisant une technique de transcription inverse couplée avec une PCR (RT-PCR, *Reverse Transcription – PCR*). La RT consiste à rétrotranscrire les ARN cibles en ADN, alors appelés ADN complémentaires (ADNc). Ces ADNc servent ensuite de base à la PCR. Les produits de RT-PCR sont révélés par électrophorèse sur gel d'agarose.

Dans un second temps, la transcription du gène *mcyB* a été comparée entre différents échantillons (figure 18). Pour cela, la RT était couplée à la PCRq. La PCRq n'était pas réalisée avec des sondes TaqMan comme lors de la détermination des proportions de cellules potentiellement toxiques. Puisque qu'un seul gène était amplifié à chaque réaction, un marquage non spécifique utilisant le SYBR Green a été employé. Le SYBR Green est un intercalant de l'ADN qui fluoresce dès lors qu'il peut se fixer sur une molécule d'ADN double brin. Ainsi, au cours de la PCRq, la fluorescence dans le milieu réactionnel est proportionnelle à la quantité d'ADN double brin formée. Selon le même principe que la fluorescence des sondes TaqMan, un seuil de fluorescence, permettant de distinguer le signal du bruit de fond, doit être établi pour

déterminer le Ct de chaque échantillon. Pour quantifier le nombre exact de copies de gène ou d'ADNc, une gamme étalon est alors nécessaire. Pour établir cette gamme, il faut cloner le gène d'intérêt (ici le gène *mcyB*) dans un plasmide, qui est ensuite introduit dans une bactérie cultivée. Les divisions de la bactérie en croissance permettront la réplication des plasmides. Un plasmide contenant une copie du gène, le pool de plasmides extrait des bactéries cultivées est alors quantifié et utilisé pour réaliser une gamme étalon avec des quantités précises de copies de gène. L'équation reliant le nombre de copies au Ct, obtenue avec cette gamme étalon, peut ainsi être utilisée pour quantifier le nombre de copies présentes dans un échantillon à partir de son Ct.

Figure 18 : Protocole utilisé pour l'étude de la transcription du gène *mcyB*



Peu d'études ont quantifié de manière absolue la transcription des gènes de microcystine, et toutes n'ont considéré que des cultures mono-souche. Ainsi, les deux unités retrouvées dans la littérature (nombre d'ARN *mcy* rapporté au nombre de cellules dans la culture, ou nombre d'ARN *mcy* rapporté au nombre d'ARNr 16s) n'étaient pas adaptées à cette étude, car elles auraient toutes deux rapporté le nombre de transcrits *mcyB* produits par la sous-population toxique à la quantité ou à l'activité des cellules de l'ensemble de la population, incluant les cellules non toxiques. C'est pourquoi j'ai extrait en parallèle les ADN et les ARN de mes échantillons, et quantifié à la fois les transcrits et les gènes *mcyB*. Sachant que lorsque que le cluster *mcy* est présent dans le génome d'une cellule, il n'est présent qu'en une seule copie, exprimer les résultats en rapportant le nombre de copies d'ARN *mcyB* au nombre de copies de gène *mcyB* permet alors d'obtenir une image du niveau moyen de transcription par copie de génome contenant le cluster *mcy*, donc, *a priori*, par cellule potentiellement toxique.

Chapitre 3 :

VARIABILITE TEMPORELLE DU POTENTIEL TOXIQUE DE *MICROCYSTIS* DANS LES SEDIMENTS

Introduction

Les connaissances sur le potentiel toxique de *Microcystis* au cours de sa phase de vie benthique sont très limitées. Les quelques études ponctuelles conduites sur cette phase mettent en évidence des contradictions et, donc, la nécessité d'étudier précisément l'évolution du potentiel toxique de *Microcystis* dans les sédiments. En effet, si de forts quotas cellulaires en microcystine ont été mesurés dans une population piégée dans les sédiments depuis un an (Latour *et al.* 2007), de très faibles proportions de cellules potentiellement toxiques peuvent également être retrouvées (Rinta-Kanto *et al.* 2009).

De plus, les rares études temporelles du potentiel toxique de populations benthiques de *Microcystis* qui ont été réalisées se sont toutes focalisées sur les sédiments superficiels. Or, l'évolution des populations benthiques de *Microcystis* situées à l'interface eau-sédiment peut être fortement influencée par les apports et les pertes de colonies benthiques induites par la sédimentation de colonies planctoniques ou le recrutement benthique (Brunberg & Blomqvist 2003; Verspagen *et al.* 2005). Ainsi, les résultats issus de quelques suivis temporels de telles populations localisées dans les premiers centimètres de sédiments pourraient avoir été influencés par les échanges de colonies avec la phase planctonique (Ihle *et al.* 2005; Kim *et al.* 2010) et il s'avère alors difficile d'identifier une dynamique benthique stricte.

Dans ce contexte, une partie de mes travaux avait pour but d'étudier spécifiquement cette phase de vie benthique de *Microcystis*, en s'affranchissant de l'influence des interactions avec la phase planctonique. La retenue de Grangent constituait pour cela un site d'étude particulièrement adapté, puisque plusieurs populations benthiques ont été enfouies en profondeur dans les sédiments à l'aval de la retenue suite à des crues automnales de la Loire. Ces populations représentent donc de bons modèles, et sont à la base des deux études présentées dans ce chapitre. Dans la première partie (I), l'évolution temporelle du potentiel toxique et de la structure génotypique de populations benthiques profondes est présentée. Dans la seconde étude (II), la transcription du gène *mcyB* est analysée dans des populations benthiques d'âge variable, et utilisée comme marqueur de la viabilité et de la capacité à initier la synthèse des microcystines.

I - Variabilité temporelle du potentiel toxique et de la structure génétique de populations benthiques de *Microcystis*

Préambule

La présence de microcystines dans des cellules benthiques de *Microcystis* a fait émerger l'hypothèse d'une implication de ces molécules dans les processus de survie benthique de cette cyanobactérie (Ihle *et al.* 2005; Latour *et al.* 2007). Une telle implication pourrait se traduire par une meilleure survie des cellules toxiques et/ou une augmentation des quotas cellulaires en microcystine au cours du temps de vie benthique. Cette hypothèse est renforcée par l'observation de quotas cellulaires en microcystine plus importants dans des populations benthiques que dans des populations planctoniques d'un même lac (Latour *et al.* 2007). De plus, dans cette même étude, plus la population benthique considérée était enfouie en profondeur, plus ses cellules étaient riches en microcystine. Néanmoins, cette étude n'était que ponctuelle et ne permettait donc pas de considérer les variations temporelles liées au temps de vie benthique.

La durée de vie benthique de *Microcystis* s'avère très variable : elle peut s'étendre de quelques mois, dans le cas d'une remobilisation annuelle (*e.g.* Reynolds *et al.* 1981; Trimbee & Harris 1984; Latour *et al.* 2004c; Verspagen *et al.* 2005), à plusieurs années lorsque des facteurs exceptionnels, comme des crues, viennent enfouir en profondeur les populations benthiques de surface (Latour *et al.* 2007). La prise en compte de deux populations benthiques, issues de la sédimentation d'efflorescences s'étant développées à plusieurs années d'écart, et suivies pendant 1,5 à 2 ans, a ainsi permis l'étude d'une large gamme de durées de vie benthique.

Le potentiel toxique de ces deux populations a été étudié en mesurant à la fois les quotas cellulaires en microcystines et les proportions de cellules potentiellement toxiques. Parallèlement, afin de prendre en compte l'influence d'éventuels processus de sélection génétique, l'évolution de la structure génotypique des populations a été suivie par SSCP sur l'ITS 16S-23S, région hypervariable adaptée à l'étude de la génétique des populations (Boyer *et al.* 2001; Humbert *et al.* 2005).

ARTICLE N° 1 :

Evolution of the toxic potential and the genotypic structure of benthic populations of *Microcystis* at different time scales

Benjamin MISSON[a,b], Florence DONNADIEU-BERNARD[a,b], Jean-Jacques GODON[c], Christian AMBLARD[a,b] and Delphine LATOUR[a,b].

[a] Clermont Université, Université Blaise Pascal, LMGE, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France

[b] CNRS, UMR 6023, LMGE, BP 80026, F-63171 AUBIERE Cedex, France

[c] INRA, UR 0050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, 11100 NARBONNE, France

Running title : Dynamics of benthic populations of *Microcystis*

Article soumis pour publication dans la revue Water Research

ABSTRACT

Microcystis colonies are known to overwinter on the sediment surface of the freshwater ecosystems they invade. However, the genotypic and toxicological evolution of a population during this benthic life stage is still poorly known. In this study, we report a two-year-long survey of benthic populations of *Microcystis*, which had spent from a few days to more than six years in the sediment. In order to avoid any interaction with the planktonic proliferations, we chose two deeply buried benthic populations, which could moreover be easily dated. Quantitative PCR on *mcyB* gene and protein phosphatase inhibition assays were performed to measure their toxic potential, and their genotypic structure was assessed by CE-SSCP based on 16S-23S ITS amplification. The microcystin content of the cells seemed to vary sharply during the first months of benthic survival, whereas it was low and constantly decreasing after several years of benthic life. No genetic selection was observed either in the proportions of potentially toxic clones or in the ITS sequences, whatever the population considered. From these results, the benthic life stage of *Microcystis* rather appears to preserve the structure and the composition of the population at a far larger time scale than a classical overwintering. Finally, some genotypes were common in both of the benthic populations, although they originated from planktonic blooms which developed five years apart, thus suggesting a large overlapping between planktonic proliferations of successive years.

Keywords: Cyanobacteria, *Microcystis*, sediment, *mcy* genes, cyanotoxins, genetic fingerprinting.

INTRODUCTION

Microcystis is a wide spread freshwater cyanobacterium, which is well known for its frequent production of a potent hepatotoxic heptapeptide called the microcystin (MC). In spite of the numerous studies concerning pathway the determination and the regulation of its biosynthesis (*e.g.* Dittmann *et al.* 1997; Tillett *et al.* 2000; Kaebernick *et al.* 2002), the toxicity of annual blooms remains unpredictable.

One of the factors that promote *Microcystis* ecological success is its biphasic life cycle. Indeed *Microcystis* is a meroplanktonic cyanobacterium which overwinters on the sediment surface after the sedimentation of the summer planktonic bloom. This benthic phase of the life cycle is of major importance for the next planktonic proliferation, since the benthic recruitment occurring in spring allows the inoculation of the water column by benthic colonies (Reynolds *et al.* 1981; Takamura *et al.* 1984).

It has been demonstrated that MCs could be present in benthic cells of *Microcystis* all along the overwintering period (Ihle *et al.* 2005; Latour *et al.* 2007), and such benthic cells are known to preserve a metabolic activity (Latour *et al.* 2004c). From these observations, the hypothesis of a potential implication of the MC either in the benthic survival of *Microcystis*, or in the benthic recruitment process that occur just after the benthic phase, emerged. Moreover, recent studies highlighted a particular importance of *Microcystis* toxic potential in the benthic recruitment process. Indeed, Schöne *et al.* (2010) observed a preferential recruitment of potentially toxic cells (*i.e.* possessing the *mcy* genes), and Misson *et al.* (2011) found that recruited cells contained much more MC than on average in the initial benthic stock. Thereafter, the yet unexplored evolution of the toxic potential of a population of *Microcystis* during its benthic overwintering appears to be of major concern, since it could directly impact the benthic recruitment and thus condition the toxic potential of the future planktonic bloom.

Beyond its usual annual life cycle, *Microcystis* is also known to survive in the sediment for longer periods of time than a simple overwintering, preserving all the potential needed for growth after more than one year of benthic life (Latour *et al.* 2007). Although all these old populations have been described as toxic, the temporal evolution of their toxic potential has not been described either, and could bring new information about the involvement of *Microcystis* toxic potential in its benthic survival.

Previous attempts to explore the benthic overwintering of *Microcystis* mainly focused on the first centimeters under the sediment surface, where benthic populations of *Microcystis* are exposed to interactions with the planktonic population through the recruitment and sedimentation processes (Latour *et al.* 2004c; Verspagen *et al.* 2004, 2005; Ihle *et al.* 2005). These interactions can induce modifications in the benthic populations of *Microcystis* by depleting them or by bringing new colonies, thus preventing the study of the strict benthic evolution of *Microcystis*. Then, the study of deeply buried but still viable benthic populations can be helpful to overcome this problem. For that, the Grangent reservoir (France) appears to be of particular interest since its high sedimentation rate and recent exceptional flood events have trapped freshly sedimented *Microcystis* colonies in deep sediment, then avoiding any exchange with the water column and allowing the monitoring of their evolution in benthic conditions.

In this study, we aimed to characterize and monitor the potential evolution of such deeply buried benthic populations by considering both their toxic potential and their genotypic structure, in order to highlight any selection process during the benthic life stage of *Microcystis*. For that, we monitored two benthic populations: the first one originated from the bloom of 2008 and was studied from its sedimentation; the second one originated from the bloom of 2003 and had already spent more than 4 years in the sediment. For both of these populations, the colony concentration, the proportions of potentially MC producing cells (*mcyB*+ cells), the MC content of the cells and the genotypic structure of the populations were measured over time.

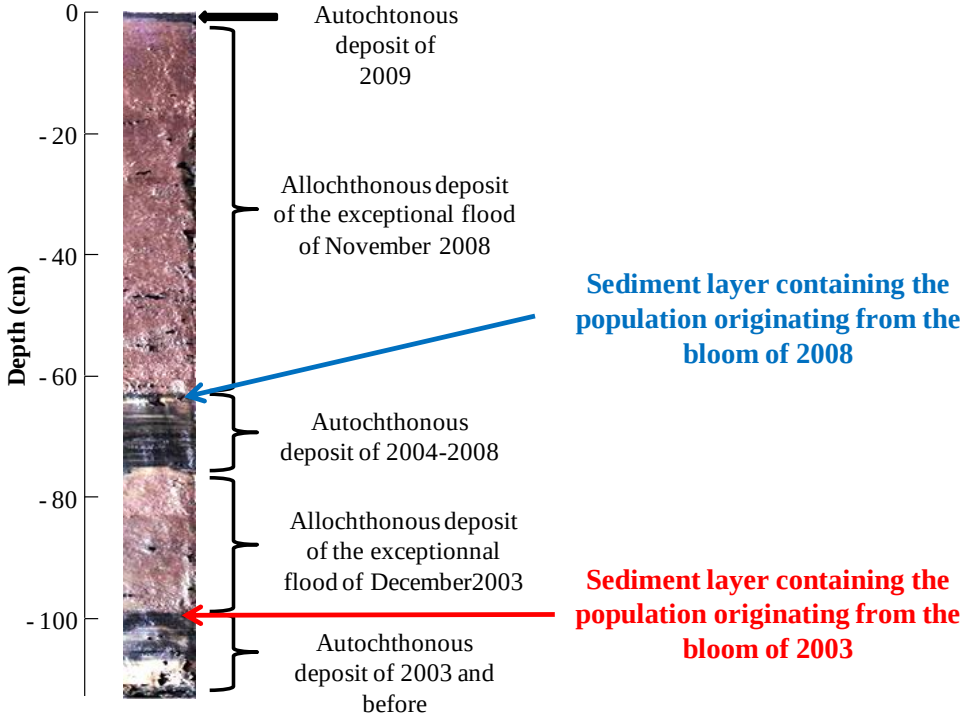


Figure 19. Origin of the sediment layers within a sediment core of the Grangent reservoir sampled at the Camaldules station in December 2009. The identification of the different layers was obtained by an isotopic dating of the sediment combined to a several-year-long survey during which sediment core were sampled at least once a month.

MATERIAL AND METHODS

Study site and sampling.

Lake Grangent is a eutrophic artificial reservoir located in the East of the Massif Central, in France. This freshwater lake was created by damming of the Loire River in 1957. It measures 21 km in length, with a maximum depth of 50 m near the dam wall and a surface area of 3.65 km^2. Since the late 80's, summer blooms of *Microcystis* have been reported, and important concentrations of this cyanobacterium are known to accumulate in the sediment in the deepest areas of the lake (Latour & Giraudet 2004).

Within this lake, sediments were sampled with a sediment corer (UWITEC devices, Mondsee, Austria) in the deepest part of the lake ("Camaldules", maximal depth of 45m). At this sampling site, the exceptional floods of December 2003 and November 2008 brought huge amounts of brown and sandy sediments (about 50cm and 1m respectively), thus making the autochthonous deposit of the preceding summers, containing the sedimented *Microcystis*, quite easily identifiable all along the monitoring (for more details on the dating of the sediment, see figure 19 and Latour *et al.* 2007). However, their regular sampling was hard because of technical limitations induced by the depth of the lake, the mean depth of those populations into the sediment (on average 77 cm and 163 cm under the sediment surface for the population of 2008 and 2003 respectively) and the sometimes hardly distinguishable limit between the sandy deposit of the flood of 2008 and the autochthonous sediment immediately under. Thus the population of 2003 was sampled 9 times between January 2008 and March 2010, and the population of 2008 was sampled 8 times between its sedimentation in October 2008 (before it was overlaid by the flood deposit) and March 2010.

Microcystis counting

Microcystis colonies were counted under an epifluorescence microscope at 510-560 nm (Laborlux S, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) following Latour *et al.* (2007) method, modified as follows: for each sample, sediments were slowly homogenized, and 4mL were diluted in 100mL of water. Then, 10mL of the mixture was filtered on a 50µm mesh and the colonies were enumerated. The results are expressed in colonies per mL of sediment ($colonies \cdot mL^{-1}$).

Benthic *Microcystis* extraction

Microcystis colonies were isolated from the sediment by centrifugation with Ludox TM 50 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), as previously described (Verspagen *et al.* 2004; Misson *et al.* 2011). They were then concentrated on a 25µm mesh and stored at -20°C for future analysis, suspended in either 2mL of 75% methanol for MC extraction or in water for DNA analysis.

Protein phosphatase inhibition assay

Prior to MC extraction, an aliquot of 250µL of the 75% methanol mixture was used to count *Microcystis* cells with a Thoma counting chamber under a microscope at x400 magnification (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), after colonies disruption by low-power ultrasonic vibration (20kHz; Reynolds & Jarowski 1978; Latour *et al.* 2007).

The remaining 1.75mL of the 75% methanol mixture was then used for a double MC extraction by ultrasonic vibration, as previously described (Misson *et al.* 2011). Extracted MCs were preserved at -20°C in 75% methanol until analysis.

MC concentrations were measured by protein phosphatase 2a inhibition assays as proposed by An & Carmichael (1994) and modified by Rivasseau *et al.* (1999). Cell counts were then used to calculate mean MC cellular quotas (further expressed as fg eq MC-LR·cell^{-1}).

Genetic analyses

DNA was extracted from benthic colonies isolated from the sediment by a chemical lysis and a phenol-chloroform-based extraction, as proposed by Humbert & Le Berre (2001). Purified DNA was stored in water at -20°C until future analysis.

Quantitative PCR (qPCR) assays were run to estimate the proportions of *mcyB*+ cells in every sample using the ΔCt method adapted for *Microcystis* (Briand *et al*. 2009*)*, as described previously (Misson *et al.* 2011). For the data analysis, fluorescence thresholds were set manually to 51 (relative fluorescence) for *PC* gene amplification, and to 44 for *mcyB* amplification for all the samples. The C_T number for both the target genes was determined using 8 MC-producing *Microcystis* strains (PCC 7806, PCC 7813, PCC 7820, PCC 7941, PCC9354, PCC 9355, PCC 9443 and PCC 9808) as external standards, and ΔC_T was estimated as the difference between C_T for the *PC* gene and C_T for the *mcyB* gene. The mean ΔC_T was 4.17 ± 0.45, corresponding to 100% toxic cells. The relative proportion of *mcyB*+ genotypes was calculated using the

theoretical equation relating the proportion of *mcyB*+ genotypes to the ΔC_T: y=3.32log(x)-2.4727, where y is the ΔC_T and x is the percentage of the *mcyB*+ genotype strains. This equation has been experimentally validated using axenic *Microcystis* strains from the PCC, as described by Briand *et al*. (2009). qPCR results were combined MC measurements and to cell counts in order to calculate specific mean MC cellular quotas of *mcyB*+ cells.

The genotypic structure of *Microcystis* benthic populations was measured in every sample by PCR and capillary electrophoresis single strand conformation polymorphism (CE-SSCP). The 16S-23S ITS region was amplified by PCR using the primers 5'-6FAM labeled 227f (5'-CCTTAAAGGGAGACCTAATT-3') and 228r (5'-CTCAGAGCCAGCATTCTCTC-3'). Reactions were performed in a 50µL reaction mix containing 1µL of template DNA, 200nM of dNTP, 400nM of each primer, 5µL of buffer (10X Pfu Turbo) and 1.25U of Pfu Turbo DNA polymerase (Invitrogen). The PCR program consisted of an initial step of 2 min at 94°C, followed by 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 55°C and 30 s at 72°C, and ended by a final step of 10 min at 72°C. The PCR products size (around 250 bp) was checked on 1% ethidium bromide stained agarose gel, with Hyperladder I (Invitrogen). PCR products were then diluted between 20 and 100 times, depending on the band intensity on the gel, and CE-SSCP was performed as described in (Sen *et al.* 2008).

Data analysis.

Raw SSCP data were analyzed with the R package (version 2.10.1). Statfingerprints (version 2.0) was used to align SSCP profiles with the internal standard (GeneScan ROX) and to normalize the entire area of SSCP patterns prior to calculate Simpson's diversity index (-log[D]) for each sample (Loisel 2009). Normalized data were used to calculate euclidian distances between the different samples within each population, using XLStat (version 2010.3.03, Addinsoft, Paris, France)

XLStat was also used to perform Spearman's correlation tests and analyses of variance (ANOVA). The level of significance was set at 5%.

Figure 20: Temporal evolution of *Microcystis* colonies concentrations. Mean values (±SD) of counting replicates are presented for (a) the population originating from the bloom of 2008 and (b) the population originating from the bloom of 2003.

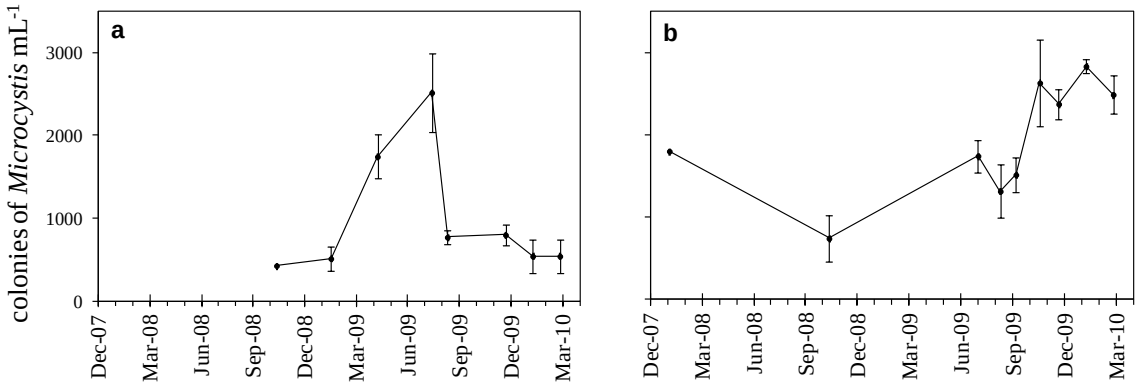


Table 1. Euclidian distances between the SSCP profiles. The population originating from the bloom of 2008 in presented in (a) and the population originating from the bloom of 2003 in (b).

a

2008	08/10	09/01	09/04	09/07	09/08	09/12	10/01	10/03
08/10	0	-	-	-	-	-	-	-
09/01	0.050	0	-	-	-	-	-	-
09/04	0.067	0.060	0	-	-	-	-	-
09/07	0.035	0.047	0.044	0	-	-	-	-
09/08	0.044	0.065	0.084	0.052	0	-	-	-
09/12	0.039	0.058	0.072	0.038	0.046	0	-	-
10/01	0.040	0.053	0.066	0.031	0.035	0.038	0	-
10/03	0.052	0.057	0.056	0.033	0.075	0.059	0.055	0

b

2003	08/01	08/10	09/07	09/08	09/09	09/11	09/12	10/01	10/03
01/08	0	-	-	-	-	-	-	-	-
10/08	0.036	0	-	-	-	-	-	-	-
07/09	0.046	0.017	0	-	-	-	-	-	-
08/09	0.068	0.045	0.046	0	-	-	-	-	-
09/09	0.063	0.048	0.050	0.024	0	-	-	-	-
11/09	0.034	0.033	0.036	0.076	0.076	0	-	-	-
12/09	0.029	0.015	0.026	0.052	0.051	0.030	0	-	-
01/10	0.057	0.028	0.030	0.040	0.050	0.053	0.039	0	-
03/10	0.074	0.050	0.055	0.025	0.043	0.080	0.058	0.041	0

RESULTS

Population dynamics

Both of the benthic populations of *Microcystis* we studied presented temporal variations in their colony concentrations, ranging between about 400 and 3000 colonies·ml^{-1} (figure 20). However, different temporal evolutions were observed between the two populations. Indeed, the population of 2008 presented great punctual variations: significant increases were observed between January and July 2009 (figure 20a; one way ANOVA, Tukey post-hoc tests), immediately followed by a sharp decrease between July and August 2009. In contrast, the population of 2003 presented more regular values, with only one significant difference, observed between September and November 2009 (figure 20b; one way ANOVA, Tukey post-hoc tests). None of the population presented a decreasing trend in their respective colonial abundance dynamics.

Genotypic structure and genetic diversity of the samples

CE-SSCP profiles within each population presented similar euclidian distances, ranging from 3.1% to 8.4% within the population of 2008, and from 1.7% to 8% within the population of 2003 (table 1). Most of the samples of 2008 presented a similar genotypic structure with the dominance of one genotype (n°1 on figure 21), except for three dates (09/01, 09/04 and 10/03). Three other genotypes (n°3, 6 and 12) also appeared to be frequently encountered in important proportions (figure 21). Similarly, in the population of 2003, the genotypic structure of the samples consisted in most cases in the domination of one major genotype (n°3), excepted for three dates (09/08, 10/01 and 10/03). Other important genotypes were represented by the peaks n°5 and 7 (figure 21).

In spite of the difference in the major genotype of each population, the two third of the most important identified peaks (n°1, 3, 5, 6, 7, 8, 9 and 11) were found in both of the populations (figure 21).

Concerning the genetic diversity, Simpson's diversity index appeared to be slightly variable for the population of 2008, with values ranging from 3.2 to 4.2 (figure 22). Variations of higher magnitude were observed in the population of 2003 with values ranging from 2.3 to 4.5. However, these variations were more punctual and restricted to the summer of 2009 (figure 22).

In spite of these variations, no general trend was observed and the dynamics did not seem to be linked with the populations dynamics (Spearman's correlation tests, $P > 0.05$).

Proportions of mcyB+ cells

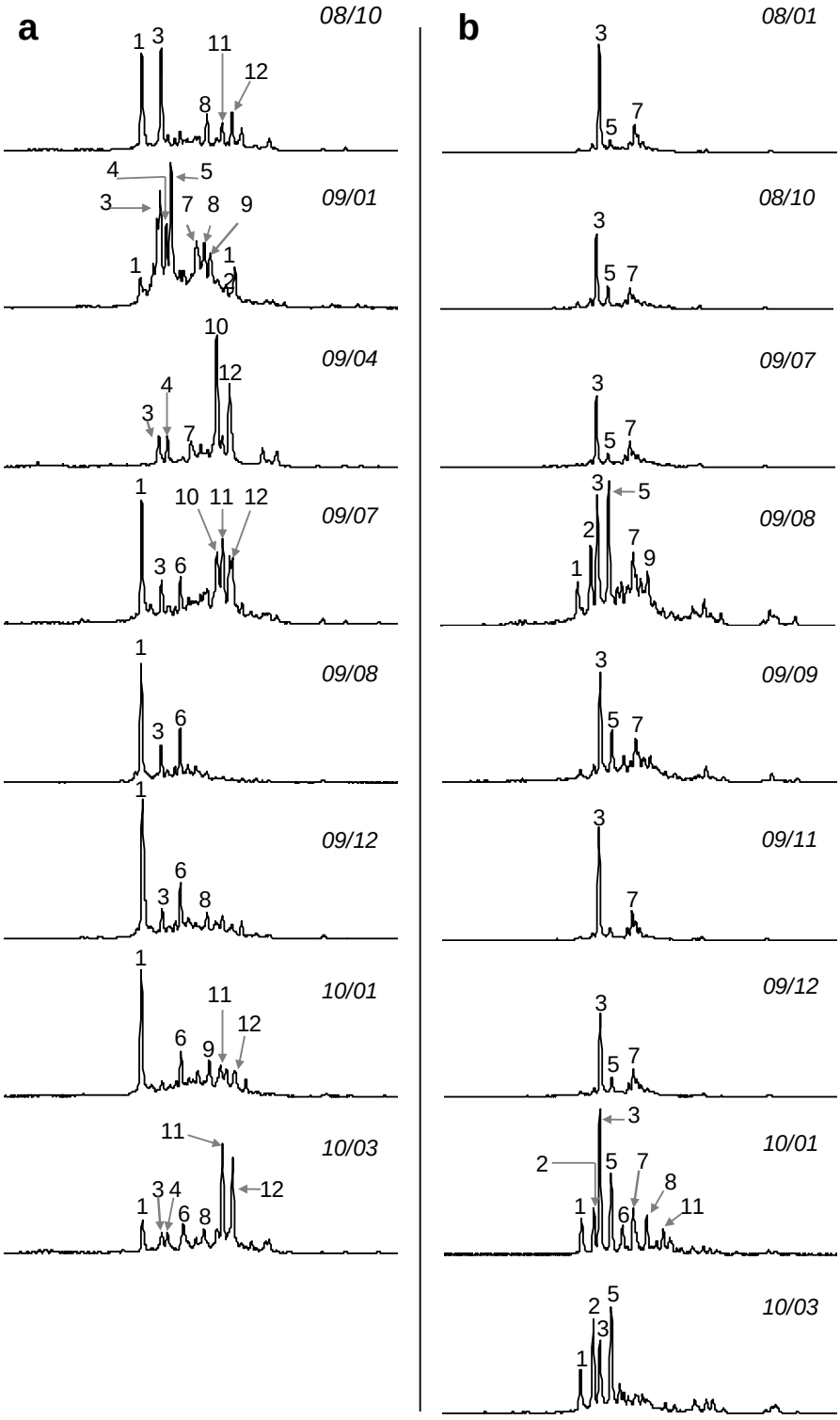
The proportions of *mcyB*+ cells were on average of 55.2% (± 11.3) for the population of 2008, and of 31.7% (±14.7) for the population of 2003. In both populations, these proportions varied over time and in different ways (figure 22). For the population of 2008, we observed an important decrease from about 80% of *mcyB*+ cells just after its sedimentation to a significantly lower value of about 40% in the following spring (one way ANOVA, Tukey post-hoc test). After that decrease, we observed quite stable values without any significant changes (figure 23a). Concerning the population of 2003, the proportions of *mcyB*+ cells proved to vary irregularly with two important and significant increases in autumn 2008 and in autumn 2009 from about 20% to 50% (one way ANOVA, Tukey post-hoc test), immediately followed by sharp returns to 20% (figure 23b).

The dynamics of the proportion of *mcyB*+ cells of each population did not correlate with the dynamics of Simpson's diversity index (Spearman's correlation tests, $P > 0.05$).

MC cellular quotas

The study of mean intracellular MC concentrations of the overall cells in both populations highlighted important temporal variations (figure 24). Moreover, the MC cellular quotas varied in different ways depending on the age of the population (figure 24). Indeed, on one hand, the youngest population, originating from the bloom of 2008, presented values ranging from 28.9 to 253.9 fg eq MC-LR.cell^{-1}, with important and irregular changes of tendency (figure 24a). Intracellular MC concentration in this population showed two significant increases, during its first winter (in 2008) and in the following summer (in 2009). For the other dates of the survey, MC cellular quotas remained lower (one way ANOVA, Tukey post-hoc tests). On the other hand, in the population originating from the bloom of 2003, MC cellular quotas decreased from about 30 to about 10 fg eq MC-LR.cell^{-1} during our monitoring. This decrease appeared to be significantly correlated to the duration of benthic life (Spearman's correlation test, $\rho = -0.850$, $P = 0.006$).

Figure 21. PCR-SSCP profiles. All the samples of (a) the population originating from the bloom of 2008 and (b) the population originating from the bloom of 2003 are presented. The numbering of the peaks is based on their exact x value, considering that all the profiles were aligned using the same internal standards.



The calculation of *mcyB*+ cells specific MC contents did not provide any difference in the temporal pattern of this parameter for the population of 2008 (figure 23a). For the population of 2003, a slight change in the dynamics appeared with the observation of a lower concentration at the second sampling date (figure 23b).

Although mean MC cellular quotas evolution appeared to be linked to the proportions of *mcyB*+ cells in the population of 2008 (Spearman's correlation test, $\rho = 0.810$, $P = 0.022$), it was not the case for the population of 2003 (Spearman's correlation test, $\rho = 0.400$, $P = 0.291$). Concerning *mcyB*+ cells specific MC contents, they were not linked to the proportions of *mcyB*+ cells in any of the populations studied (Spearman's correlation tests, $\rho = 0.238$ and $P = 0.582$ for the population of 2008, $\rho = -0.333$ and $P = 0.385$ for the population of 2003).

None of MC content dynamics was linked to the dynamics of Simpson's diversity index (Spearman's correlation tests, $P > 0.05$).

Figure 22: Temporal evolution of Simpson's diversity index. The values calculated with Statfingerprints are presented for (a) the population originating from the bloom of 2008 and (b) the population originating from the bloom of 2003.

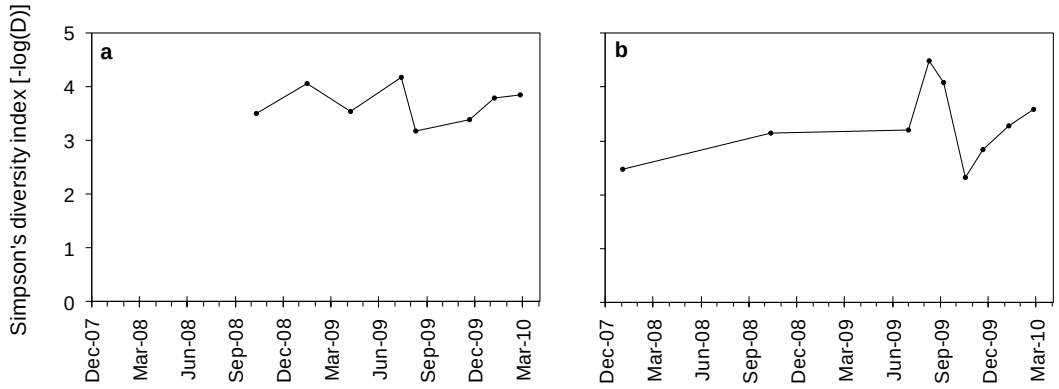


Figure 23: Temporal evolution of the proportions of *mcyB*+ cells. Mean values (±SD) of measurement replicates are presented for (a) the population originating from the bloom of 2008 and (b) the population originating from the bloom of 2003.

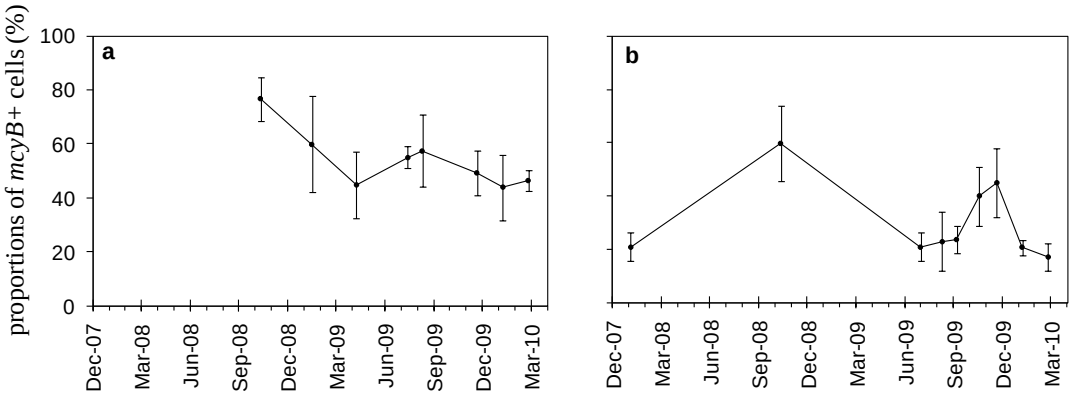
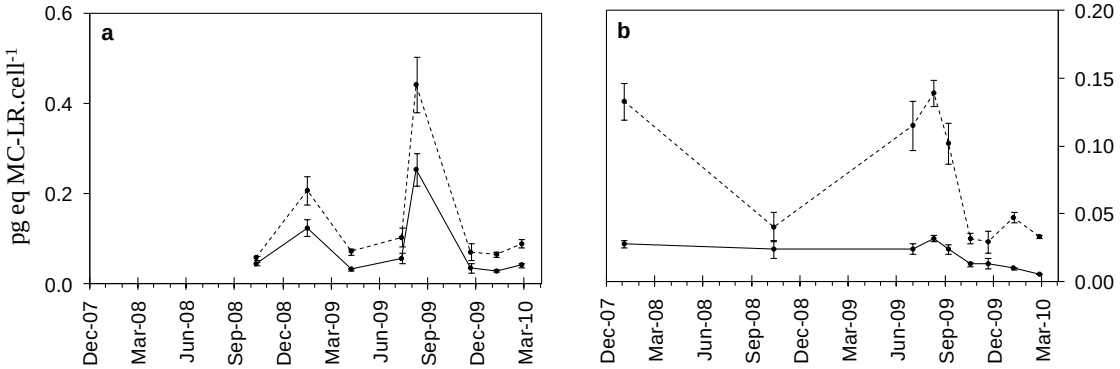


Figure 24: Temporal evolution of intracellular MC concentrations. Mean values (±SD) of measurement replicates are presented for (a) the population originating from the bloom of 2008 and (b) the population originating from the bloom of 2003. Solid lines represent MC cellular quotas of the overall populations, dashed lines represent MC cellular quotas of the *mcyB*+ sub-populations.



.

DISCUSSION

Through the monitoring of deeply buried benthic populations of *Microcystis*, this study is the first one where the strict benthic evolution of this cyanobacterium is investigated, independently from any interaction with the cyanobacteria from the planktonic phase (*e.g*. through transport, recruitment and sedimentation). The dating of sediment layers previously performed at the same sampling site in Grangent reservoir allowed us to monitor benthic *Microcystis* with various and known durations of benthic life. Then, our first striking result was the observation of temporal variations in the proportions of *mcyB*+ cells and the MC cellular quotas, whereas the genotypic structures and compositions remained more constant. Hence, although the benthic environment appears very confined, *Microcystis* population can still evolve. The different parameters we considered evolved quite independently, and their variations may not have the same origin.

Genotypic structure within each population

During our monitoring, the genotypic structure of each population appeared relatively stable, the major genotypes being the same in samples taken several months or years apart. This low variability of the genotypic structure and composition within each sediment layer during the whole length of our monitoring indicates a long term preservation of benthic populations of *Microcystis.* Indeed, the genotypic structure remained very stable for both the youngest population, from its sedimentation and during about 1.5 years, and the oldest population, which had already spent about 4.5 years in the sediment before the beginning of our monitoring. This long-lasting stability, reinforced by both the absence of decrease in colony concentrations and the long-lasting sustainability of the genetic diversity within each population, also suggests the absence of any particular genetic selection during that benthic survival phase of *Microcystis* life cycle. However, method limitations prevent us from extensive analysis of the numerous minor genotypes, which are otherwise indistinguishable on SSCP spectra because of their low proportion when compared to the major genotypes, and because of their overlaying on the SSCP spectra (Sen *et al.* 2008). Hence, a benthic genetic selection remains reliable, but would be restricted to minor genotypes and thus would only have a low influence on the composition of the population.

Comparison of the genotypic composition of different *Microcystis* populations

By comparing the genotypic structure of two benthic populations of different age, this study revealed that several genotypes appeared to be common and of major importance for both of the populations. Their presence, in two populations resulting from the sedimentation of planktonic blooms which developed 5 years apart, suggests a relatively important conservation of the genotypic composition of *Microcystis* populations in Grangent reservoir over successive years. Rinta-Kanto *et al.* (2009) also found that the most abundant *mcyA* sequences of *Microcystis* in sediments sampled in 1971 and 2004 in Lake Erie were the same, and Tanabe & Watanabe (2011) reported that a panmictic cluster of multilocus sequence typing genotypes dominated the planktonic population of *Microcystis* during several years in a Japanese lake. Thereafter, since different studies using different methods to measure the genotypic composition of *Microcystis* samples from different lakes report similar observations, this interannual conservation of genotypic composition of *Microcystis* may be the rule in a number of lakes with very different characteristics.

Then, Humbert *et al.* (2005) found similar sequences in both planktonic and benthic populations of *Microcystis*, and proposed that there was no functional ecotype, adapted either to the planktonic or the benthic phase, in *Microcystis* populations of Grangent reservoir. Our results tend to confirm this hypothesis since some genotypes are present in distinct benthic populations which have proliferated in the water several years apart. Thus, they must be adapted to both planktonic and benthic conditions, and they could constitute a pool of genotypes which ensure the inter-annual durability of *Microcystis* populations in Grangent reservoir. However, the dominance of these genotypes in benthic populations does not necessarily mean that they were also dominant in the water column. Indeed, previous studies dealing with the genotypic structure of *Microcystis* populations showed a great variability during one planktonic proliferation, according to the cyanobacterial biomass variations and to varying environmental conditions (Briand *et al*. 2009; Kim *et al.* 2010). Hence, it seems hard to believe that the same genotypes could have dominated different blooms, several years apart. According to the 'everything is everywhere' hypothesis (Bass Becking 1934), we assume that the major genotypes found in our benthic populations were rather minor genotypes during the planktonic proliferations, but better adapted during the bloom collapse and its sedimentation, and thus selected. Indeed, similar

unfavorable environmental and sedimentation conditions could have led to a best survival of these genotypes, thereafter well preserved during the benthic survival.

Further studies are now needed to investigate the exact contribution of recruitment and sedimentation processes in the genotypic composition of *Microcystis* populations and its sustainability over years.

Evolution of the proportions of mcyB+ cells

Regarding the dynamics of the proportion of *mcyB*+ cells, we first recorded sharp variations in the youngest population, from its sedimentation to about 1.5 years of benthic life. The proportions of *mcyB*+ cells decreased during the first overwintering period, suggesting a potential selection of non-toxic cells during a usual benthic overwintering period of a few months. However, the study of the older population also highlighted variations of similar magnitude, but with both increases and decreases. Thus we assume that the evolution of the proportions of *mcyB*+ cells was not linked to the duration of the benthic life stage. Moreover, these strong and repeated variations observed in the oldest populations suggest that such genetic selection, based on the toxic potential, during *Microcystis* benthic overwintering cannot be generalized.

MC cellular quotas variations

MC cellular quotas variations could not be explained by changes in the proportions of *mcyB*+ cells. This result is in agreement with previous reports (Sabart *et al.* 2010; Misson *et al.* 2011), and could be interpreted as an independent regulation of these two parameters. Then, considering two populations trapped in the sediment for various period of time revealed that MC cellular quotas could evolve differently during the benthic life stage depending on the time elapsed since the sedimentation of the population. Hence, two temporal scales could be discriminated.

First, in the short-term after the sedimentation, during the first months of benthic life, sharp variations of MC cellular quotas were observed through the monitoring of the population of 2008. Such variations were also observed for the population of 2003 during a previous monitoring (from January to December 2005, D. Latour, unpublished data), where the MC cellular contents showed important variations without any temporal trend (values ranged from 260 to 1240 fg eq MC-LR·cell^{-1}). Now, the deep benthic environment is often considered as a

stable physical biotope, because it is not submitted to major turbulence and because the range of temperatures is quite stable, contrary to what is frequently observed in the water column. However, the benthic environment is also known as an extreme biotope for cyanobacteria because of the lack of light, the usually low temperatures and its fast and various chemical modifications, related for example to the microbial activity in this confined environment. Such chemical variations, like oxygen depletion, are known to affect *Microcystis* metabolism (Caceres & Reynolds 1984). Moreover, Zilliges *et al.* (2011) proposed that MCs could bind to proteins as part of the general oxidative stress response, leading to misestimating MC cellular quotas. Thus, short-term variations of chemical benthic conditions could thereby lead to variations in the quantity of bound MCs, which could not be detected by phosphatase inhibition assays, therefore explaining the punctual variations of MC content we measured by a response of the cells to environmental stress.

MC synthesis in the sediment could also partly explain the variations of MC content we measured. Although this non-ribosomal biosynthesis must represent a huge energetic cost for a benthic cell surviving in unfavorable conditions, the putative function of protein protection against oxidative stress proposed by Zilliges *et al.* (2011) could thereafter bring enough benefits to the cell to compensate the cost of its production, thus making MC content regulation by synthesis reliable in benthic cells.

Beyond these punctual variations measured at a short-term time scale, a second time scale appeared with the investigation on the oldest population of 2003. Indeed, in the long term, MC cellular quotas seemed to decrease according to the increasing duration of benthic life. Since this decrease over time was not explained by the selection of non toxic strains, it suggests a massive loss of intracellular MCs, which could have occurred during the benthic survival of this population but probably only after a few years of benthic life. This long term evolution could be the result of MC cellular quotas regulation. Indeed a decrease in MC production, and/or an increase in MC consumption by the cells or in MC release outside of the cells (Jahnichen *et al.* 2008), could lead to a decrease of MC cellular quotas. In a previous study, we showed that MC production was still initiated in both of the populations studied here, with lower *mcyB* transcription levels in the oldest population (Misson *et al*. not yet published). MC production in the oldest cells could therefore be limited because of their low global viability. Moreover, it has been shown that the morphology and structure of benthic colonies could be affected with

increasing time of benthic life by progressive loss of cells (Latour *et al.* 2007), thus making MC release outside of old surviving cells probable because of increasing membrane porosity. Now, although it remains speculative, aging of the overall microbial community surrounding *Microcystis* cells could lead to a reduced microbial activity, thus explaining the absence, in this oldest population, of the sharp variations of MC contents observed in the youngest one.

Therefore, the fact that such a decrease occurred only in a several year old population is consistent with an important role of the MC in the benthic survival of toxic cells, which may compensate the high cost of MC production as proposed above.

The high energy demanding synthesis of MCs must rely on important energy resources within the cell. Since these old benthic cells are in complete darkness for several years, it seems obvious that their internal energy sources may be depleted, thus directly limiting the production of MCs. Further studies are now needed to better understand the sustainability of *Microcystis* metabolic activity, among which MC production, in such benthic populations of various ages. The evolution of their internal reserves should be of major concern in order to find out on which energy sources the activity of benthic *Microcystis* relies on, and more precisely whether *Microcystis* is able to survive for long time extents thanks to important internal reserves or to heterotrophy as suggested by previous studies (Moezelaar & Stal 1997; Kamjunke & Jahnichen 2000).

CONCLUSION

This work allowed us to demonstrate that *Microcystis* toxic potential seems to be well preserved in the sediment, and for far longer periods than a usual overwintering of a few months. Hence, we propose that the toxic potential of benthic *Microcystis* evolves differently, according to the time spent in the sediment. At the time scale of a classical overwintering life stage (or a few more months), the toxic potential seems to be globally well preserved but varies punctually without any general trend. Then after many years of benthic life, MC cellular quotas seem to decrease, without any genetic selection on the toxic potential of the cells. These findings tend to show the absence of any advantage for the toxic cells compared to non-toxic ones in the benthic survival of *Microcystis*, but are still in agreement with the idea of a great importance of the MC in the benthic survival process of toxic cells.

By studying the genotypic structure and diversity at different time scales, we demonstrated an important stability for several years within a benthic population of *Microcystis*, since no genetic selection was detected during that time. Surprisingly, we found a pool of dominant genotypes shared by the two populations studied, which bloomed in the water column five years apart. This result suggests an important inter-annual overlapping of the genotypic composition of planktonic blooms in Grangent reservoir. More research is now needed to further qualify and quantify this overlapping, and to investigate the potential link between benthic and planktonic diversity. Particular attention should then be paid to benthic recruitment and sedimentation processes, since they constitute the critical phases framing the stable benthic overwintering, which constitute the main link between planktonic proliferations over years.

AKNOWLEDGEMENTS

B.M. was supported by a Ph.D. fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work was also partly funded by Electricité de France Research and Development (EDF R & D).

We thank Pierre Souvignet and Antoine Thouvenot for their support during the field sampling.

II - Variabilité du potentiel toxique de *Microcystis* au cours de sa phase de vie benthique : apport de l'étude de la transcription du gène mcyB

Préambule

Après avoir observé le déclin des quotas cellulaires en microcystines dans les cellules benthiques les plus anciennes, et leur grande variabilité dans les cellules les plus récemment sédimentées, la question de l'origine de ces changements s'est posée. Les fluctuations de contenu en microcystines relevées n'étant pas liées à l'évolution des proportions de cellules porteuses des gènes de microcystine, elles pourraient résulter de variations de taux de synthèse des microcystines. Cependant, cette synthèse en conditions benthiques n'a jamais été démontrée, elle est même exclue par certains auteurs (Ihle *et al.* 2005), sans pour autant avoir été étudiée. Dans nos populations benthiques d'intérêt, en dépit de l'observation de cellules benthiques âgées à priori intactes lors de leur observation au microscope, la présence de cellules viables, condition *sine qua none* pour la synthèse des microcystines, reste à démontrer.

Afin d'étudier à la fois la viabilité et la capacité à synthétiser des microcystines dans des populations benthiques d'âge variable, la transcription d'un gène *mcy* a été étudiée, la présence d'ARN messager d'un tel gène dans un échantillon attestant à la fois de la viabilité de cellules et de leur capacité à initier la synthèse des microcystines.

Cette étude, présentée dans l'article suivant, inclut l'utilisation de la RT-PCR comme technique de screening permettant d'identifier les populations actives et initiant la synthèse de toxine, ainsi que l'utilisation de la RT-PCRq pour quantifier et comparer avec plus de précision l'activité transcriptionnelle du gène d'intérêt entre les différentes populations. Les paramètres plus classiques du potentiel toxique des populations, à savoir les quotas cellulaires en microcystine et les proportions de cellules potentiellement toxiques, ont également été pris en considération pour être mis en parallèle des activités transcriptionnelles mesurées. Trois populations benthiques, issues de la sédimentation d'efflorescences s'étant développées au cours de différentes années, sont utilisées dans cette seconde étude pour effectuer une première approche de l'influence du temps de vie benthique sur l'activité transcriptionnelle du gène d'intérêt.

ARTICLE N° 2 :

Benthic survival of *Microcystis*: long-term viability and ability to transcribe microcystin genes

Benjamin MISSON[a,b], Marion SABART[a,b], Christian AMBLARD[a,b] and Delphine LATOUR[a,b].

[a] Clermont Université, Université Blaise Pascal, LMGE, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France

[b] CNRS, UMR 6023, LMGE, BP 80026, F-63171 AUBIERE Cedex, France

Running title: Viability and toxic potential of old benthic *Microcystis*

Article en révision dans Harmful Algae

ABSTRACT

Microcystis is a microcystin-producing cyanobacterium known to proliferate in the water column of freshwater ecosystems and to overwinter in the sediment. The presence of microcystins in benthic cells trapped in the sediments for long periods of time raises the question of the origin of these toxins. In order to (i) find out whether this cyanobacterium is able to produce microcystins during its benthic survival and (ii) investigate the viability of old benthic cells, we looked for the mRNA of one microcystin gene (*mcyB*) in three benthic populations of *Microcystis* deeply buried in the sediment for periods ranging from several months to more than 6 years. By revealing the presence of *mcyB* mRNA in every benthic population we investigated, we showed that benthic *Microcystis* could remain viable and able to initiate microcystin production after more than 6 years of benthic life. In addition to shedding the light on the need to pay far more attention to the benthic phase of *Microcystis* in future cyanobacterial risk assessment and freshwater management, this finding also suggests that microcystins could be involved in the benthic survival mechanisms of *Microcystis*. The quantification of *mcyB* transcripts by RT-qPCR, done for the first time here in natural samples, highlighted important differences between the various populations.

Key words: *Microcystis*; benthic phase; microcystin; toxic potential; *mcyB* transcripts.

INTRODUCTION

Microcystis is a widespread cyanobacterial genus known to proliferate abundantly in late summer in many freshwater ecosystems, and to produce a potent hepatotoxin known as microcystin (MC). Production of this toxin is currently the source of major environmental and health issues (Falconer 2005; Babica *et al.* 2006). At present, most management strategies suffer from our inability to predict spatio-temporal variations in the concentrations of MCs in natural aquatic ecosystems. Most of the time, *Microcystis* populations are composed of both potentially MC producing (*mcy*+) cells, which contain the MC gene cluster, and non toxin-producing cells that lack these genes (Fastner *et al.* 1999). This genetic composition, like many other biotic and abiotic factors, is known to influence MC concentrations within natural populations (Long *et al.* 2001; Kardinaal *et al.* 2007a, 2007b; Yoshida *et al.* 2007; Hotto *et al.* 2008; Briand *et al*. 2009; Davis *et al.* 2009; Sabart *et al.* 2010). Despite the growing interest in the processes regulating the dynamics of MC concentrations, we are still unable to explain or predict them, and the ecological role of MC remains unclear.

This lack of understanding may be related to the fact that most studies have been conducted without taking the entire development cycle of *Microcystis* into consideration. This cyanobacterium is meroplanktonic, *i.e*. its life cycle involves an alternation between planktonic and benthic phases. Thus, after the summer planktonic bloom, *Microcystis* colonies sink down to the sediment during the autumn, and survive on the surface of the bottom sediment during the winter. During this survival, *Microcystis* do not present any particular resting form, and is known to maintain a low but still persisting metabolic activity (Latour *et al.* 2007). Although some specific features on the preservation of the photosystems have been provided (Fallon & Brock 1981; Takamura *et al.* 1984; Verspagen *et al.* 2004), the mechanisms involved in this survival are still poorly known. A benthic recruitment process then occurs in spring: some of the healthiest colonies of the benthic stock inoculate the water column, and this allows a new planktonic growth of the population to occur during the following summer (Reynolds *et al.* 1981). The benthic life stage of *Microcystis* is still poorly understood, and only a few studies of the toxic potential of benthic *Microcystis* have been conducted. However, they have all shown that MCs are conserved throughout the overwintering period (Ihle *et al.* 2005; Kim *et al.* 2010; Schöne *et al.* 2010) and indeed for even longer periods, as they have still been found after a year passed in

the sediment (Latour *et al.* 2007). This remarkably persistent presence of MCs in viable benthic cells of *Microcystis* raises many questions about their production and conservation during the benthic phase, on the one hand and about their implication in the processes involved during the benthic survival and the recruitment process, on the other. Moreover, according to recent studies, the spring recruitment process of *Microcystis* could potentially lead to the selection of the most toxic cells from amongst the benthic population (Schöne *et al.* 2010; Misson *et al.* 2011), which makes it crucial to elucidate the processes involved in the benthic overwintering phase of *Microcystis*.

In order to improve our understanding of the implication of the MCs in the annual life cycle of *Microcystis*, we wanted to find out through this study whether the MCs found in *Microcystis* cells that have been living in sediments for several months or years had all been synthesized during the planktonic growth phase and then preserved since sedimentation, or whether *Microcystis* cells are able to synthesize MCs during the benthic life stage. One way to answer this question was to look for intermediate stages in the production of MC in benthic *Microcystis* cells. MC production is known to involve two types of intermediate stage: one is the transcription of *mcy* genes, resulting in the production of *mcy* mRNA, and the other is the translation of these mRNAs into polyketide synthases and non ribosomal peptide synthetases that assemble amino acids to form the MC. In this study, we chose to look for the mRNA of *mcyB*, the mere presence of which would demonstrate both the viability of the benthic cells (Sheridan *et al.* 1998) and their ability to initiate MC production (Tillett *et al.* 2000). We looked for *mcyB* mRNA, with the aim of quantifying it if present in deeply buried benthic populations of *Microcystis* that we also characterized by measuring both their abundance and toxic potential (*i.e.* the proportion of cells containing the *mcyB* gene (further called *mcyB*+ cells) and the mean MC content of these potentially toxic cells). In order to look for a possible effect of a prolonged benthic phase on *Microcystis* toxic potential, on *mcyB* transcription levels, and indirectly on the viability of toxic *Microcystis*, we compared three populations that had been trapped in the sediment for periods ranging from a few months to nearly seven years.

MATERIAL AND METHODS

Study site and sampling

Sediments were sampled using a sediment corer (UWITEC devices, Mondsee, Austria) in June 2010 in a dam reservoir on the Loire River (Grangent reservoir, Massif Central, France). This artificial lake is now well known for its regular summer blooms of *Microcystis*, and this cyanobacterium has been monitored in both the water and the sediments of the reservoir for many years (*e.g*. Latour & Giraudet 2004; Latour *et al.* 2004c,. 2007; Sabart *et al.* 2009; Sabart *et al.* 2010). Two stations were prospected in the lake: one is in the deepest part of the lake ("Camaldules"), and the other in a shallower area ("Lizeron"). At both stations, water temperature and 0_2 concentrations were measured above the sediments using a multiparametric probe (OXI 320, WTW, Weilheim, Germany). The characteristics of the sampling stations are shown in table 2. Because of the great depth and turbidity of the water, the sediments are in total darkness throughout the year at both these stations. Three different benthic *Microcystis* populations were sampled. They corresponded to the sedimentation of three different bloom events, and they were buried deep enough to exclude any interaction with a planktonic population for a period ranging from a few months to a few years. The first population was sampled in the core taken from the Lizeron area, from 6 to 8 cm below the sediment surface, and corresponded to the sedimentation of a bloom that took place in 2009 (dating obtained from an 18-month survey of the sediments at this sampling site; Misson B., personal communication). The two other sediment layers were sampled in the core from the Camaldules, and corresponded to sediments dating from 2008 and 2003 (from 75 to 77 cm and from 98 to 102 cm below the sediment surface respectively ; sediments were dated on the basis of an eight-year long survey and isotopic dating, for more details see Latour *et al.* 2007).

Processing the samples

The cores were opened on the shore, immediately after sampling, being careful to keep the sediment in the dark. Each sediment sample was homogenized and divided into two sub-samples. The first one was spread in 2 mL aliquots immediately frozen in dry ice, then brought back to the lab and stored at -80°C prior to extracting RNA and DNA.

Table 2: Characteristics of the sampling sites in Grangent reservoir. Z_{eu} is the mean depth of the euphotic zone measured for the year 2009, and based on Secchi disk measurements. Temperature and oxygen concentration were measured just above the sediments, and just before the sampling, in June 2010.

Sampling station	Localization	Maximum depth (m)	Z_{eu} (m)	Temperature (°C)	Dissolved oxygen ($mg \cdot L^{-1}$)
Camaldules	45°27'44"N, 4°15'28"E	45	6.76	7.0	1.4
Lizeron	45°26'58"N, 4°15'40"E	25	5.50	6.5	15.5

Table 3: Primers used for RT, PCR, RT-qPCR and multiplex qPCR in this study

Targeted gene region (*method*)	Primer	Sequence (5'-3')	Target size	Reference
mcyB gene region (*RT and PCR*)	Tox2+ Tox2-	AGGAACAAGTTGCACAGAATCCGCA ACTAATCCCTATCTAAACACAGTAACTCA	357 bp	(Kaebernick *et al.* 2000)
mcyB gene region (*RT-qPCR and multiplex qPCR*)	30F 108R	CCTACCGAGCGCTTGGG GAAAATCCCCTAAAGATTCCTGAGT	78 bp	(Kurmayer & Kutzenberger 2003)
PC gene region (*multiplex qPCR*)	188F 254R	GCTACTTCGACCGCGCC TCCTACGGTTTAATTGAGACTAGCC	66 bp	(Kurmayer & Kutzenberger 2003)

The second sub-sample was not frozen, but was kept cool until it was brought back to the lab. Then a first aliquot was used to count benthic colonies of *Microcystis* under an epifluorescence microscope (Laborlux S, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) according to the Latour *et al.* (2007) method. In parallel, a second aliquot was used to extract *Microcystis* colonies from the sediments by centrifuging with Ludox TM 50 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), as previously described (Verspagen *et al.* 2004). Extracted colonies were collected on a 25-µm pore-sized nylon mesh, gently rinsed, and suspended in 2 mL aliquots of 75% methanol. They were then stored at -20°C prior to MC extractions.

Nucleic acid extraction

Both DNA and RNA were extracted in a single extraction process from the sediments stored at -80°C, using Rnase-free solutions and equipment. The extractions were performed on ice, and the nucleic acids were extracted from all the samples simultaneously using the Bailly *et al.* (2007) method modified as follows: for each sample, 2 mL of sediment was defrosted in 3 mL of TRIS-saturated phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1, by vol.) and 2 mL of Rnase-free water with constant mixing. Lysis was then performed by 3 successive bead-beating steps (30s at 30Hz in a Retsch MM301 Ball Mill) with glass beads (≤106 µm (140-finer U.S. sieve), Sigma-Aldrich). After one more phenol-chloroform-isoamylalcohol extraction, and two chloroform-isoamylalcohol extractions, nucleic acids were precipitated overnight in 100% ethanol with 3m sodium acetate, and then centrifuged and rinsed twice with 70% ethanol. The remaining ethanol was evaporated, and the pellets were dissolved in 200 µL of Rnase-free water. The quantity and quality of the nucleic acid obtained was assessed using the NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). One half of the extract was stored at -20°C and used subsequently for DNA analysis; the remaining 100 µL were subjected to DNase according to the manufacturer's instructions (Turbo DNA free, AMBION, Austin, TX, USA) and further used for RNA analyses.

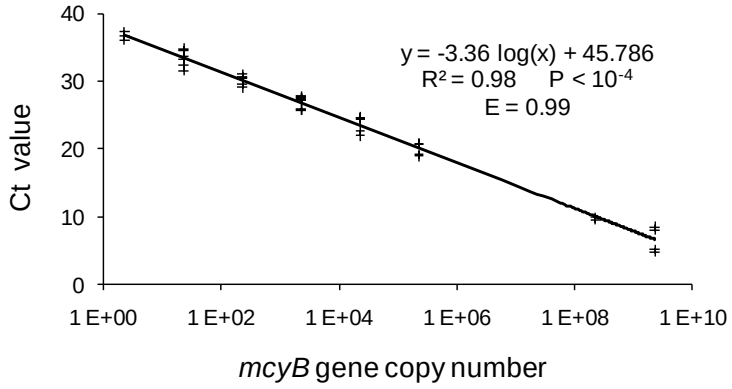
mcyB transcription analyses

One µL of extracted RNA was immediately used for reverse transcription (RT), corresponding to 430 ng for the samples of 2009 and 2003, and to 900 ng for the sample of 2008. RT was performed by using Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, and using the genus-specific reverse primer

Tox2 (Table 3). The resulting cDNA was stored at -20°C, and the remaining RNA was stored at -80°C.

The presence of *mcyB* mRNA in the different samples was investigated by a PCR conducted in a final volume of 50 µL containing 1.5 units of Biotaq DNA polymerase (Bioline, London, UK), 5µL of 10X NH_4 reaction buffer (Bioline), 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 3 µL of cDNA, and 2.4 µM of Tox2+ and Tox2- primers, which are both highly specific to the *mcyB* gene of the genus *Microcystis*. PCR products were revealed on a SYBR Safe (Invitrogen)-stained 1% agarose gel.

Figure 25: Ct vs. *mcyB* gene copy number standard curve used for RT-qPCR. E is the efficiency of amplification and was calculated according to the following equation: $E = 10^{(-1/a)-1}$, where a is the slope of the standard curve.



mcyB mRNA were quantified, in the samples where they had been detected, using quantitative PCR (qPCR). To do this, the *mcyB* gene of the PCC 7806 strain was cloned using pGEM-T vector systems (Promega, USA) after PCR amplification with the Tox2 primer set (Table 3), to produce plasmids containing the target *mcyB* insert. In a single qPCR run, seven dilutions (ranging from 2 x 10^9 to 2 x 10^0 copies) of linearized plasmid were then used in duplicate to establish Ct (threshold cycle number, the cycle number at which the fluorescence first exceeds the threshold) vs. gene copy numbers standard curves (figure 25). All the DNA and cDNA samples (each diluted 1/10) was amplified and triplicated. RNA samples were also run to check for residual DNA, and negative PCR controls were performed. This run was replicated three times to check for reproducibility. All the qPCRs were carried out in a Mastercycler ep realplex (Eppendorf) in a final volume of 20 µL containing 10 µL of Quantitect SYBR green

PCR mix (Qiagen), 4 µL of cDNA or 2 µL of the other templates and 400 nM of primers 30F and 108R (Table 3). This primer set is highly specific to the *mcyB* gene of *Microcystis* (Kurmayer & Kutzenberger 2003); here it was used to target a smaller sequence within the sequence cloned into the plasmid. The PCR program consisted of an initial step at 95°C for 15 min, followed by 40 cycles of 30s at 95°C, 30s at 53°C and 30s at 72°C. A melting curve analysis was performed at the end of each run to ensure that the Tm of all the amplification products is the same that the theoretical Tm of the targeted sequence in PCC 7806. This theoretical Tm was calculated by taking the targeted sequence from the sequenced genome of the PCC 7806 strain (Frangeul *et al.* 2008), and by using the online "Tm calculation for oligos" tool of Promega. We obtained TM = 77°C. For the data analysis, fluorescence thresholds were set manually to 33 (relative fluorescence) for all the samples. The number of *mcyB* RNA or DNA copies extracted from one sample was then quantified using the equation of the standard curve (Figure 25), after checking that the Ct of every single sample replicate was within the standard curve. Expression levels were calculated as the number of transcripts per gene copy. Since *mcy+* cells of *Microcystis* are known to possess only one copy of the *mcyB* gene (Kurmayer & Kutzenberger 2003), the expression level reflects the mean number of *mcyB* transcripts per *mcyB+* cell.

Toxic potential assessment

Proportions of potentially toxic cells

DNA extracted as described above was also used for a second type of analysis: the estimation of the proportions of *mcyB+* genotypes. This was performed by using multiplex real time qPCR and the ΔCt method adapted for *Microcystis* (Briand *et al*. 2009), as described previously (Misson *et al.* 2011). Briefly, this method consists in the relative quantification of two genes: one MC gene, hereafter *mcyB*, and one reference gene, hereafter the ITS of the phycocyanin operon (*PC*). For the data analysis, fluorescence thresholds were set manually to 51 (relative fluorescence) for *PC* gene amplification, and to 44 for *mcyB* amplification for all the samples. The C_T number for both the target genes was determined using 8 MC-producing *Microcystis* strains (PCC 7806, PCC 7813, PCC 7820, PCC 7941, PCC9354, PCC 9355, PCC 9443 and PCC 9808) as external standards, and ΔC_T was estimated as the difference between C_T for the *PC* gene and C_T for the *mcyB* gene. The mean ΔC_T was 4.17 ± 0.45, corresponding to 100% toxic cells. The relative proportion of *mcyB+* genotypes was calculated using the

theoretical equation relating the proportion of *mcyB*+ genotypes to the ΔC_T: y=3.32log(x)-2.4727, where y is the ΔC_T and x is the percentage of the *mcyB*+ genotype strains. This equation has been experimentally validated using axenic *Microcystis* strains from the PCC, as described by Briand *et al*. (2009).

Microcystin cellular quotas

The 2 mL aliquots of methanol 75% containing benthic colonies of *Microcystis* were used to measure intracellular MC concentrations. For that, 250 µL were sub-sampled, diluted in water, and subjected to low-power ultrasonic vibration (20 kHz) in order to disrupt the colonies (Reynolds & Jarowski 1978; Latour *et al.* 2007). Isolated cells were then counted under a microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) at x400 magnification with a Thoma counting chamber. The remaining 1.75 mL were subjected to a double toxin extraction by ultrasonic vibration (Misson *et al.* 2011). Extracted MCs were preserved in 75% methanol and quantified by PP1 inhibition assay (An & Carmichael 1994; Rapala *et al.* 2002). The quantity of MC was then combined with the cell counts and the proportions of *mcyB*+ cells in order to be expressed the MC content of *mcyB*+ cell (pg eq MC-LR.cell^{-1}).

Data analysis

All the statistical analyses were performed with XLStat 2010 (2009.4.05 version, Addinsoft, Paris, France). The level of significance was set at 5%. The normality of the data was checked with the Shapiro-Wilk normality test.

RESULTS

Colonial abundance

The three populations presented different abundances, with the highest number of colonies of *Microcystis* obtained for the population sedimented in 2009 (6178 ± 478 colonies·mL^{-1}), and the lowest for the population sedimented in 2008 (451 ± 190 colonies·mL^{-1}) (figure 26A).

mcyB transcripts

RT-PCR revealed the presence of *mcyB* transcripts in every sample, though the PCR products were barely visible for the population of 2003 (figure 27). The quantification of *mcyB* transcripts per *mcyB*+ cell first confirmed that *mcyB* transcripts were present in every sample. Then, it also revealed important differences between the three populations, with the highest quantity of transcripts per gene copy observed for the population sedimented in 2008 (12.2 *mcyB* transcripts per gene copy), and the lowest for the population sedimented in 2009 (2.8 *mcyB* transcripts per gene copy; figure 26B).

Toxic potential

Concerning the toxic potential of the different sub-populations, we found proportions of *mcyB*+ cells of *Microcystis* ranging from 30.1% (± 5.1%) for the population sedimented in 2003, to 53.9% (± 21.9%) for the population sedimented in 2008, without any statistical difference (figure 26C). The MC content of *mcyB*+ cells tended to decrease as the duration of the benthic life stage increased (Spearman's correlation test, n=18, $\rho = 0.945$, $p < 10^{-4}$), with a maximum cellular quota of 85.8 fg eq·MC-LR·cell^{-1} for the population sedimented in 2009, an intermediate value of 58.9 fg eq·MC-LR·cell^{-1} for the population sedimented in 2008, and a minimum of 20.8 fg eq·MC-LR·cell^{-1} for the population sedimented in 2003 (figure 26D).

DISCUSSION

We report here the first evidence of MC gene transcription in benthic *Microcystis* cells that had been deeply buried in the sediment for several years. The presence of *mcyB* transcripts in three benthic populations of *Microcystis* with different durations of benthic life is strong evidence that this cyanobacterium is able to initiate MC production in the sediments, even after a prolonged benthic life stage. This could explain why *Microcystis* cells still contain MCs after several years of benthic life. However, our findings do not necessarily mean that MC production is completed in the benthic populations we investigated, since both the translation of mRNA and the activity of the enzymes which build the MC might be regulated differently (Alifano *et al.* 1994; Tillett *et al.* 2000), and so we still cannot say whether the synthesis of MCs is actually completed during the benthic life stage. These findings open new perspectives for the understanding of the benthic survival of *Microcystis*, and the regulation of MC production.

Since mRNAs are known to have a very short life span (Alifano *et al.* 1994; Sheridan *et al.* 1998), the fact that they were present in every benthic population we investigated is an indisputable proof of the viability and the great survival capacity of *Microcystis* cells in the sediments, even at great depths and for periods of several years (nearly seven years for the oldest population). This is consistent with previous studies, which had already suggested the viability of benthic *Microcystis* cells (Latour *et al.* 2004a, 2004c, 2007; Verspagen *et al.* 2004; Schöne *et al.* 2010), but over shorter time scales. It is still not clear how this cyanobacterium manages to survive for such a long period in an unfavorable environment, and especially in total darkness. It seems obvious that its metabolic activity relies on heterotrophy, since *Microcystis* is known to be able to perform fermentation (as demonstrated by Moezelaar & Stal 1997), and to assimilate exogenous amino acids (Kamjunke & Jahnichen 2000). However, it would be interesting to know whether this heterotrophic activity depends solely on the internal reserves accumulated before the sedimentation, or whether *Microcystis* is able to use external resources present in the benthic environment.

Furthermore, the persistence of this transcriptional activity on *mcy* cluster after several years in the sediment, and despite unfavorable environmental conditions (low oxygen concentration, low temperature and the absence of light) seems to indicate that MCs must confer benefits to the benthic cells so that their synthesis keeps being initiated. Our results are therefore

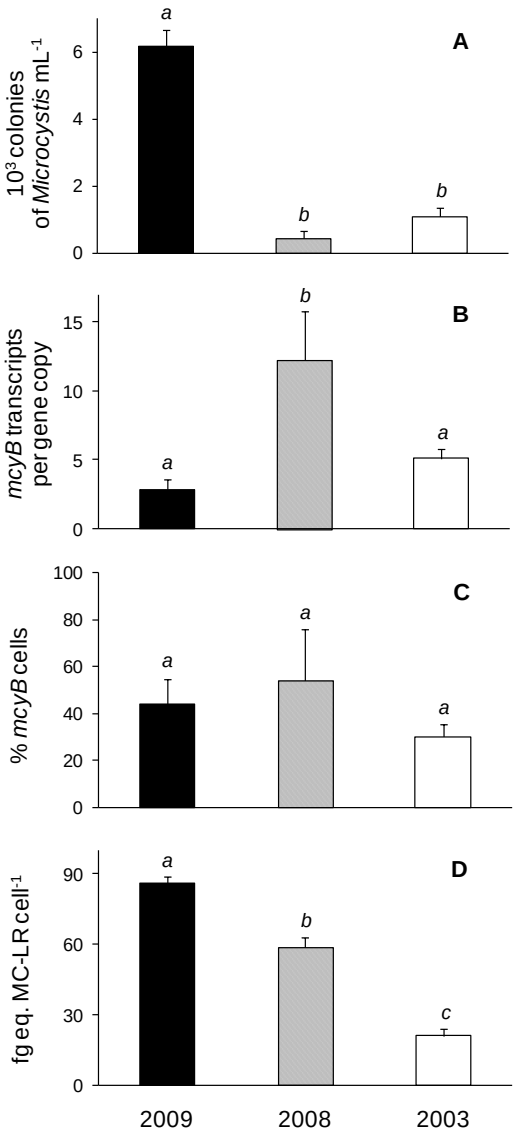


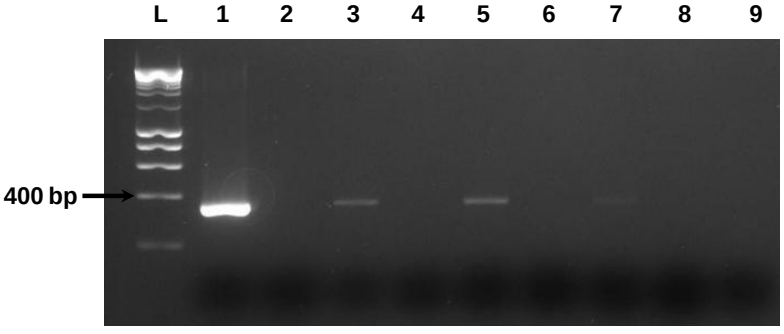
Figure 26: Comparison of three benthic populations of *Microcystis* presenting various durations of benthic life.

A: abundance of colonies, expressed as the number of colonies per mL of sediment.
B: quantification of *mcyB* transcripts.
C: proportions of potentially toxic cells.
D: microcystin cellular quotas of potentially toxic cells.

Error bars represent the standard deviations.
The letters *a*, *b* and *c* represent the results of the one way ANOVA computed for each variable; different letters represent a p value < 0.05.

Figure 27. Sybrsafe-stained 1% agarose gel of RT-PCR.

Lane L: Ladder; *lane 1*: positive PCR control with DNA from *Microcystis* strain PCC 7806; *lane 2*: negative PCR control (H_2O); *lane 3*: *Microcystis* population of 2009; *lane 4*: negative control for DNA contamination in RNA extract of the population of 2009; *lane 5*: *Microcystis* population of 2008; *lane 6*: negative control for DNA contamination in RNA extract of the population of 2008; *lane 7*: *Microcystis* population of 2003; *lane 8*: negative control for DNA contamination in RNA extract of the population of 2003; *lane 9*: negative RT control (H_2O).



consistent with the hypothesis of an involvement of MCs in the benthic life of *Microcystis*, as previously proposed (Ihle *et al.* 2005; Latour *et al.* 2007).

In our environmental populations, we recorded transcription levels of 2.8 to 12.2 transcripts per *mcyB* gene copy, which appears to be very high when compared to the findings of the only other study to have quantified *mcyB* transcription in the same way: El Semary (2010) reported from 1×10^{-9} to 1×10^{-16} transcripts per *mcyB* gene copy in axenic cultures of PCC 7806 in both the logarithmic and stationary phases. Many environmental factors and biotic interactions, which are absent under the conditions of axenic culture, may thus have a major influence on *mcyB* gene transcription in natural populations, and this could explain the high values found in our case, but further studies are now needed to fully explain this huge discrepancy and to elucidate the regulation of *mcy* gene transcription.

The high transcription levels of *mcyB* observed in our study were also found to vary in the different benthic populations we investigated. In contrast to what we had observed for MC cellular quotas, *mcyB* transcription levels were not related to the age of the populations. The age of the population did not seem to be a major factor regulating *mcyB* transcription at the time scale targeted in our study; however, more prolonged monitoring is required to confirm this hypothesis. Moreover, independently of their age, the populations could have had different viability levels that could also intervene to influence *mcyB* transcription. Some environmental factors are also known to regulate *mcyB* transcription. The main one is the light, both its intensity, and its quality (Kaebernick *et al.* 2000; El Semary 2010). However, the cyanobacteria we sampled had been buried in the sediments for a long period of time and so in total darkness, and our sampling strategy meant that they were not exposed to light. So, it is evident that neither light intensity nor light quality could explain the different transcription levels of *mcyB* gene observed in our study, which indicates that light cannot be the only factor involved in the regulation of *mcyB* transcription. Recent studies showed that iron availability, copper sulfate, hydrogen peroxide and N-phenyl-2-naphthylamine could also affect *mcy* genes transcription level (Sevilla *et al.* 2008; Qian *et al.* 2010) and so, variable concentrations of such substances in the sediments could explain our results. Zilliges *et al.* (2011) also proposed that MCs could act as part of the cellular response to oxidative stress, which is known to have various origins. Although it remains speculative, we therefore suggest that the differences between the transcription levels observed in our samples could also be due to different environmental conditions affecting the cellular

metabolism, since the samples came from different sampling sites, or from different depths within the sediments of one site.

One could surmise that the MC cellular quotas in the different populations could follow the *mcyB* transcription levels. However, in our study *mcyB* transcription levels did not seem to be linked to MC content. This surprising result could be explained by the involvement of other regulation mechanisms during MC production and/or use. Indeed, all the steps of MC production may not occur at the same time scale (Kaebernick *et al.* 2000; Dittmann *et al.* 2001), and they may be regulated independently from each other (Alifano *et al.* 1994; Tillett *et al.* 2000). Then, after having been synthesized, MCs may either be consumed by the cell, or bind to proteins, or even be released outside of the cell (Jahnichen *et al.* 2008; Zilliges *et al.* 2011).

Therefore, if we are to understand the complex processes underlying MC production we need to find a way to monitor all the production steps simultaneously, as well as the possible means of storage, use and transportation of MCs.

CONCLUSION

In this study, we have demonstrated that *Microcystis* is able to initiate MC production during its benthic phase, even after several years of benthic life. This finding is of major interest for cyanobacterial risk management. As a consequence, it appears important to pay more attention to benthic populations, and to wind-induced as well as management-induced sediment resuspension and bioturbation that may bring old colonies back into the water column (Stahl-Delbanco & Hansson 2002; Rengefors *et al.* 2004; Verspagen *et al.* 2004), and thus allow the development of a toxic bloom of *Microcystis* from old benthic cyanobacteria, even after several years without any planktonic proliferation. From an ecological point of view, this persistence and potential production of MCs for many years in the sediments also suggest a putative function of MCs in the benthic survival of *Microcystis*. Long-term monitoring of benthic populations isolated from the water column would now be helpful as part of the investigation of the change in the toxic potential of *Microcystis* as a result of aging in sediments.

AKNOWLEDGEMENTS

B.M. was supported by a Ph.D. fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work was also partly funded by Electricité de France Research and Development (EDF R & D).

We thank Pierre Souvignet and Antoine Thouvenot for their support during the field sampling, and Monika Gosh for improving the English text.

Chapitre 4 :

INFLUENCE ET VARIABILITE DU POTENTIEL TOXIQUE DE *MICROCYSTIS* LORS DES TRANSITIONS ENTRE LES PHASES BENTHIQUE ET PLANCTONIQUE DE SON CYCLE DE VIE

Introduction

Les deux études précédentes concernant des populations benthiques isolées des interactions avec la colonne d'eau nous ont permis de mettre en évidence leur grande capacité de survie en dépit de conditions environnementales à priori très défavorables. Ainsi, en conditions de survie benthique, les populations de *Microcystis* conserveraient leur structure génétique, leur potentiel toxique, et leur capacité à initier la synthèse des microcystines pendant une durée bien plus longue que les quelques mois de la phase de survie benthique hivernale classique. Il convient également de noter que contrairement aux hypothèses issues de la découverte de microcystines dans des cellules benthiques, ces toxines ne semblent en aucun cas avantager les cellules de *Microcystis* qui les produisent au cours de leur phase de vie benthique, ni être systématiquement plus concentrées dans les cellules les plus anciennes. En revanche, en raison de l'important coût énergétique supposé pour leur production, leur persistance ainsi que l'initiation de leur synthèse dans des cellules ayant survécu plus de six ans dans des conditions à priori défavorables sont des arguments en faveur de l'implication de ces molécules dans la survie benthique des cellules les produisant.

Au-delà des perspectives d'étude concernant les mécanismes permettant la survie à long terme, ainsi que le maintien du potentiel toxique dans le compartiment benthique, ces résultats soulèvent également de nouvelles questions en relation avec les autres phases du cycle de développement de *Microcystis*. Ainsi, la préservation du potentiel toxique au cours de la phase benthique reflète-t-elle l'implication des microcystines dans le recrutement benthique et/ou le développement planctonique qui suivront ? Plus précisément, existe-t-il une sélection sur la base du potentiel toxique au cours du processus de recrutement ? Et dans quelle mesure le recrutement de ces populations benthiques bien préservées peut-il influencer le potentiel toxique de la future efflorescence planctonique ?

Pour apporter des éléments de réponse à ces questions, ce chapitre intègre trois études. Dans une première partie, deux séries d'expériences *in vitro* sont présentées afin de déterminer précisément les mécanismes impliqués dans le processus de recrutement printanier, son déterminisme et l'implication de la toxicité de *Microcystis*.

Dans une seconde partie, un élargissement à l'ensemble des interactions entre les phases benthique et planctonique de *Microcystis* est proposé via une étude en milieu naturel dans

laquelle potentiel toxique et diversité de sous-populations benthiques et planctoniques de *Microcystis* sont comparés.

I – Le recrutement benthique, processus à l'origine des proliférations planctoniques

A l'heure actuelle, le déterminisme du recrutement benthique de *Microcystis* fait l'objet de deux hypothèses alternatives. Selon les auteurs, il serait gouverné soit par des processus actifs d'allègement des cellules puis de migration des colonies vers la colonne d'eau (Visser *et al.* 1995; Brunberg & Blomqvist 2003), soit par des processus passifs de remise en suspension des colonies benthiques par bioturbation ou par le brassage (Stahl-Delbanco & Hansson 2002; Verspagen *et al.* 2004).

Ce processus de recrutement benthique s'avère difficile à explorer en milieu naturel et les différentes approches conduites ont montré leurs limites dans l'interprétation des résultats. L'étude du recrutement benthique en microcosme et en conditions contrôlées apparaît alors comme une bonne alternative, en permettant notamment de pouvoir comparer l'influence des différents paramètres impliqués dans les processus actifs ou passifs.

C'est pourquoi les deux études présentées dans cette partie ont été réalisées en microcosmes.

1. Influence de différents paramètres physiques et du temps de vie benthique sur le recrutement benthique de *Microcystis*

Préambule

En dépit de sa variabilité potentielle, la durée de la phase de vie benthique de *Microcystis* n'a encore jamais été prise en compte dans le déterminisme de son recrutement. *Microcystis* ne présentant pas de forme différenciée permettant d'améliorer la survie dans les conditions benthiques défavorables, cette phase de vie benthique pourrait affecter les cellules et leur capacité de recrutement, d'où la nécessité de prendre en compte le temps de vie benthique pour mieux comprendre le déterminisme du recrutement benthique de cette cyanobactérie.

Ainsi, dans l'article présenté ci-après, le recrutement benthique de populations de *Microcystis* présentant une durée de vie benthique comprise entre quelques semaines et plusieurs années est comparé en réponse à différents stimuli physiques. L'influence des trois principaux paramètres physiques connus pour influencer le recrutement de *Microcystis*, à savoir la température, la lumière et le brassage, est comparée pour la première fois au cours d'une même expérience.

ARTICLE N° 3 :

Influence of light, sediment mixing, temperature and duration of benthic life on the benthic recruitment of *Microcystis*

Benjamin MISSON[a,b] and Delphine LATOUR[a,b].

[a] Clermont Université, Université Blaise Pascal, LMGE, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France
[b] CNRS, UMR 6023, LMGE, BP 80026, F-63171 AUBIERE Cedex, France

Running title: About the determinism of the benthic recruitment of *Microcystis*

Article en révision dans Journal of plankton research

ABSTRACT

The benthic recruitment of *Microcystis* was assessed *in vitro* in order (i) to compare the relative influence of the main abiotic factors, and (ii) to investigate the impact of the duration of the benthic life stage. Different benthic populations sampled in a deep artificial lake, with benthic life phases ranging from a few weeks to almost three years, were used to test the impact of three temperatures (4, 7 and 17°C), the absence or presence of light, and sediment mixing on *Microcystis* recruitment.

In this study, sediment mixing was the only physical factor found to promote recruitment, indicating that passive resuspension plays an essential role in the recruitment of *Microcystis*, when compared to light and temperature. Moreover, recruitment occurred from all benthic populations, including one that was nearly 3 years old. No difference in the proportion of recruited cells was observed before and after the usual overwintering period, suggesting that the annual benthic overwintering does not impair the ability of *Microcystis* to inoculate the water column in the following spring. However, in the oldest population, the proportions of recruited cells were lower, whatever the experimental conditions tested, indicating a decrease in the ability of older benthic populations of *Microcystis* to contribute to the recruitment process.

Key words: Benthic recruitment, cyanobacteria, *Microcystis*, sediment mixing, long-term persistence.

INTRODUCTION

Despite efforts to contain and treat nutrient inputs, eutrophication of aquatic ecosystems, and the cyanobacterial proliferations frequently associated with it, is still of major concern in aquatic ecology. The management of these cyanobacterial blooms has health implications if the species proliferating is able to synthesize toxins that endanger human and/or animal health. Control is a complex matter, since most cyanobacteria have an annual development cycle in which planktonic growth and a benthic resting stage alternate. This is the true of the toxic cyanobacterium *Microcystis*, which is the one most frequently encountered in freshwater ecosystems. After proliferating in the water column, where this potentially toxic cyanobacterium is able to completely dominate the phytoplankton, it is found in abundance on the sediment surface. Throughout the winter phase, part of its population overwinters vegetatively in the sediment, retaining its cellular and colonial ultrastructure, some cellular activity, and also its microcystin content (Tsujimura *et al.* 2000; Latour *et al.* 2004c, 2007; Misson *et al.* 2011).

A part of these viable colonies reinvades the pelagic zone in spring (Reynolds *et al.* 1981; Brunberg & Blomqvist 2003; Verspagen *et al.* 2005), a process known as the benthic recruitment process. Relatively little is known about this process and the factors determining it remain particularly unclear: recruitment of *Microcystis* from the sediment is regulated by both active processes, triggered by internal changes in buoyancy, and passive processes, depending on sediment mixing. According to the literature, the main factors that trigger recruitment are temperature increase and low light intensity reaching the sediment (Reynolds *et al.* 1981; Trimbee & Harris 1984; Tsujimura *et al.* 2000; Brunberg & Blomqvist 2003; Tan *et al.* 2008), anoxia and nutrient inputs being secondary factors showing some effects on *Microcystis* recruitment (Caceres & Reynolds 1984; Stahl-Delbanco *et al.* 2003; Tan *et al.* 2008). These environmental parameters, and in particular the temperature increase and the light, appear to stimulate the resumption of metabolic activity, so that the colonies regain buoyancy and actively return to the water column. Other authors suggest that a passive process, resulting from the resuspension of sedimented colonies by turbulent mixing or bioturbation, is of particular importance in the recruitment of benthic *Microcystis* (Stahl-Delbanco & Hansson 2002; Verspagen *et al.* 2004, 2005). The exact contribution of each of these processes is yet to be

determined, and in that way, a direct comparison of the main factors thought to trigger the recruitment of *Microcystis* could bring some information.

It has also been shown that benthic *Microcystis* can survive for several years in the sediment, located a few centimeters beneath the sediment surface, without an annual return to the planktonic phase, but nevertheless preserving all they need to return to growth subsequently (Latour *et al.* 2007). Even though *Microcystis* is able to survive in the sediment during longer periods than the annual resting stage of a few months, we may wonder whether it is still able to take part in the recruitment process after spending several years trapped in the sediment. Indeed, artificial reservoirs such as the Grangent reservoir (Massif Central, France) are exposed to major floods and/or anthropogenic management of the water level that could promote sediment resuspension and that of cyanobacteria buried for several years in the first few centimeters of sediment. From the perspective of water management in such ecosystems, it seems to be essential to consider the potential recruitment of both newly-sedimented *Microcystis* populations and populations that have been sedimented for several years.

As the recruitment process constitutes an important phase that influences the quantity and quality of the planktonic cyanobacterial inoculum, and thus contributes to the pelagic bloom, we conducted an experimental study under controlled conditions to improve our knowledge on in the determinism of *Microcystis* recruitment. The aims of our work were therefore (i) to investigate and compare in the same experiment the relative influence of the main factors thought to drive *Microcystis* benthic recruitment, namely the temperature, the light and sediment mixing, (ii) to find out whether a prolonged phase of benthic life could affect the recruitment rate. We therefore compared the recruitment of two benthic populations of *Microcystis* sampled in the Grangent reservoir in sediment layers of different ages: a newly-sedimented population, the same population at the end of the overwintering phase, and a third population which had sedimented almost 3 years ago.

MATERIAL AND METHODS

Study site and sampling

1. The Grangent reservoir, an artificial lake which was dammed in 1957, is located at an altitude of 420 m in the South-East of the Massif Central in France, about 15 km West of Saint-Etienne (45°27N, 4°15'E). The lake, which is confined to the narrow valley of the upstream Loire River, provides a major water reserve ($57.4x10^6$ m3). It measures 21 km in length, has a maximum depth of 50 m near the dam wall, and a surface area of 3.65 km^2. Its main functions are power generation and irrigation of the Forez plain. Stream inflows are mainly restricted to winter, with an annual average flow of 41 m^3 s^{-1}. A great deal of tourism has also developed, including the Saint-Victor-sur-Loire nautical center.

Two sampling campaigns were carried out in the deepest part of the Grangent reservoir (45m depth): (i) the first in November 2005, when three 50 cm sediment cores were collected, and the first 2 cm corresponding to the surface layer were sampled and used to investigate the recently-sedimented cyanobacterial population of the year (within the last 3 months) (ii) the second in May 2006, when three sediment of 2m long cores were collected. The dating of the sediment, previously performed using radioactive isotopes (Latour *et al.* 2007), allowed us to collect two *Microcystis* benthic populations by sampling sedimentary layers containing *Microcystis* colonies originating from the blooms of either 2003 (that had remained in the sediment for almost three years) or 2005 (preserved in the sediment over just one winter). For both campaigns, the cores were brought back to the lab and immediately opened, and the sediments samples were stored at 4°C in the dark for a few days, until the experiment began.

50 L of surface water were also sampled, filtered on 1.2-µm glass fiber filters (GF/C filters; Millipore, Billerica, MA, USA), and then stored at 4°C in darkness until processed.

Experimental settings and *in vitro* sampling

Two experiments were conducted.

The first concerned the benthic population originating from the bloom of 2005, which was sampled in November 2005. The first 2-cm of the surface layers of each core, containing benthic *Microcystis*, were pooled and homogenized before distributing into glass containers. 15 ml of this homogenized sediment were placed in 40 mL glass containers (cylinders, basal area of 6.2 cm^2),

and 20 mL of filtered lake water were added. These experimental devices were exposed in triplicate to 3 different temperatures (4°C to represent the in situ temperatures at the bottom of Grangent reservoir in winter (Latour 2002; Latour *et al.* 2004c), 7°C to represent the temperature found in spring, and 17°C to exceed the highest temperature shown to make *Microcystis* unable to regulate its buoyancy state (Visser *et al.* 1995)), with or without light (10 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, which corresponds to low light intensity observed in littoral area), and with or without mechanical mixing of the sediment (once a day for 1 min, by hand). The experiment lasted 8 days, and water samples were collected from each container on days 1, 3, 6 and 8. At each sampling date and for each container, 18 mL of the supernatant water were removed, leaving the bottom 2mL so as to collect only buoyant *Microcystis* that had just been recruited. This also allowed us to exclude possible accidental sediment mixing during sampling. The containers were then refilled with 18 mL of filtered lake water, which was added very carefully to avoid mixing the sediment when this was not appropriate, Mechanical mixing (when appropriate) was performed in each container immediately after changing the water.

The second experiment was conducted using the samples collected in May 2006. Two benthic populations of *Microcystis* originating from the blooms of 2005 (the same population as in the first experiment, but which had spent a further 6 months in the sediment) and of 2003 were collected, pooled by year and homogenized before being distributed into glass containers. The procedure described above for the first experiment was used again. However, the highest temperature of 17°C was not used here. The experiment lasted 14 days, and the sampling days were as follows: days 1, 2, 5, 7, 9, 12 and 14.

Cyanobacterial abundance and recruitment rate

Every supernatant containing recruited cyanobacteria was fixed in 1% glutaraldehyde. Rapid disruption (<1 min) of the colonial structure was produced by low-power ultrasonic vibration (20 kHz) (Reynolds & Jarowski 1978; Latour *et al.* 2007). Isolated cells were then counted in triplicate under a microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) at ×400 magnification using a Thoma counting chamber (Dominique Dutscher SAS, Brumath, France). The basal area of the microcosm and the time that had elapsed since the last sampling were then used to calculate a recruitment rate per day and per square meter.

Since the quantity of cells recruited depends on the initial abundance of benthic cells, and in order to compare recruitment between the different populations, we calculated the percentage of the initial benthic stock that had been recruited over the whole experiment, for each benthic population. To do this, the initial benthic cyanobacteria were isolated from the sediments using the method of Verspagen *et al.* (2004). 4 mL of sediment was diluted 10-fold, and silica solution was added (30% Ludox TM50 [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA], 70% diluted sediments). The mixture was then centrifuged (centrifuge 5804 R; Eppendorf, Hamburg, Germany) at 400 *g* for 20 min. 1 mL of every supernatant containing cyanobacteria was sonicated to dissociate the colonies, as previously described. Isolated cells were then counted under a microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) at ×400 magnification with a Thoma counting chamber (Dominique Dutscher SAS, Brumath, France).

Statistical analysis

All the statistical analyses were performed with XLStat 2010 (2009.4.05 version, Addinsoft, Paris, France). The level of significance was set at 5%. Differences between the experimental conditions over time were tested by repeated measures analysis of variance (ANOVA) and when an overall significant difference was found, multiple comparisons between groups were performed using Tukey's post-hoc test. The total proportions of recruited cells were compared using Mann-Whitney's test.

RESULTS

Recruitment of newly sedimented *Microcystis*

During the first experiment, the monitoring of the recruitment rate revealed variations depending on both the time and the conditions tested. Indeed, it appeared that for all the conditions tested, the recruitment rate was highest at the first sampling date (Fig. 28). Thereafter, the recruitment rate was very low under all conditions. In spite of their similar recruitment kinetics, statistical analysis highlighted significant differences between the different conditions. Indeed, recruitment was significantly higher under mixing conditions on the first day of the experiment, with average recruitment rates of 7.3 10^8 cells.d^{-1}.m^{-2} with mixing, compared to 2.0 10^8 cells.d^{-1}.m^{-2} without mixing (repeated measures ANOVA, Tukey's post hoc test, $P < 0.0001$). When the experiment as a whole is considered, the mean proportion of recruited cells was 4.1% with mixing compared to 1.4% without mixing (Table 4). Concerning the other parameters tested, *i.e.* temperature and the presence or absence of light, we recorded very similar proportions of cells recruited during the whole experiment, ranging from 2.3 to 3.3 %, without any significant differences (Table 4).

Experimental conditions	Newly sedimented	After one winter	After 3 years
Benthic initial cells (cells.mL^{-1})	1.02 10^6	1.10 10^6	4.95 10^5
With mixing (%)	4.1 ±1.6 ***	6.5 ± 1.2 **	1.9 ± 1.4 **
Without mixing (%)	1.4 ± 0.6	1.9 ± 1.6	0.5 ± 0.5
Light (%)	3.2 ± 2.2	4.7 ± 3.2	1.4 ± 1.8
Dark (%)	2.3 ± 1.2	3.7 ± 2.3	1.0 ± 0.5
4°C (%)	3.3 ± 2.5	4.9 ± 2.3	1.6 ± 1.5
7°C (%)	2.7 ± 0.9	3.5 ± 3.1	0.9 ± 0.9
17°C (%)	2.3 ± 1.7	-	-
Mean (%)	2.8 ± 1.8	4.2 ± 2.7	1.2 ± 1.2

Table 4: Initial abundance and proportions of cells recruited during the overall experiments for the different benthic populations investigated. Mean values (± SD) of microcosms replicates. Asteriscs represent a significant difference between the values corresponding to the differents conditions for one parameter within a benthic population (* for p-value < 0.05, ** for p-value < 0.01, *** for p-value < 0.001).

Fig. 28: Recruitment dynamics observed with the newly sedimented population. A: with sediment mixing. B: without sediment mixing. Values are mean (± SD) recruitment rates of microcosms replicates.

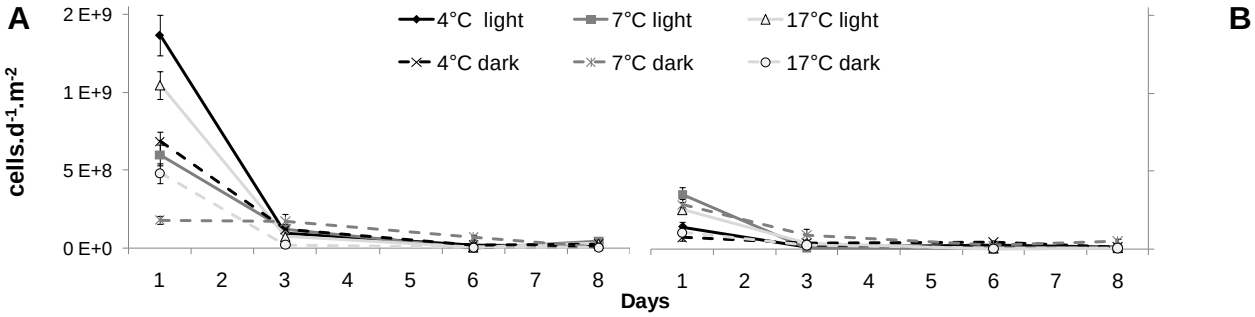
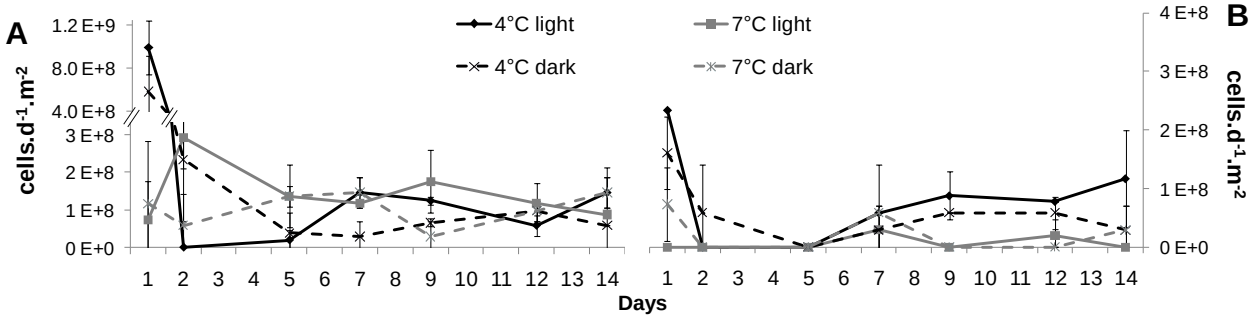


Fig. 29: Recruitment dynamics observed with a population that survived one winter in the sediment. A: with sediment mixing. B: without sediment mixing. Values are mean (± SD) recruitment rates of microcosms replicates.



Recruitment of *Microcystis* which had spent one winter in the sediment

The results of this experiment were very similar to those of the first one. Both experiments dealt with the same benthic population, but after different periods of benthic life. The percentage of benthic cells recruited were very similar (Mann-Whitney test, P = 0.3), as shown in Table 1. The second experiment revealed a similar kinetic pattern to that observed for the same benthic population just after it had sedimented (in the first experiment described above). A maximum recruitment rate was measured on the first day, followed by very low recruitment rates until the end of the experiment (Fig. 29). Similarly, sediment mixing was the only condition that significantly promoted benthic recruitment, whatever the light or temperature conditions, and for both the maximum recruitment rate on the first day (Fig. 29; repeated measures ANOVA, Tukey's post hoc test, P = 0.016) and the total proportion of benthic cells recruited during the

entire experiment (Table 4; ANOVA, Tukey's post hoc test, $P < 0.0001$). Moreover, the percentages of recruited cells recorded with or without mixing were in the same range in both experiments (Table 4). The other factors, namely the temperature and the presence or absence of light, did not seem to impact significantly on either the recruitment rates or the proportion of benthic cells recruited during the entire experiment.

Recruitment of *Microcystis* which had spent almost 3 years in the sediment

We observed very low recruitment rates from the oldest benthic population, with a quite different kinetic pattern. Indeed, higher values were once more measured on the first day of the experiment (with an average recruitment of $3.5\ 10^7$ cells.d^{-1}.m^{-2}) followed by very low recruitment rates, but on the last day, high values in the same range as on the first day were recorded (Figure 30). We found that the average percentage of benthic cells recruited during the whole experiment from this oldest population was significantly lower (Mann-Whitney test, $p = 0.001$), with only 1.2%, which is 3.5 times lower than in the population originating from the bloom of 2005 sampled after its overwintering. Similarly to what had been observed in the two previous experiments, sediment mixing appeared to be the only condition that significantly promoted recruitment, independently of temperature and light (Table 4).

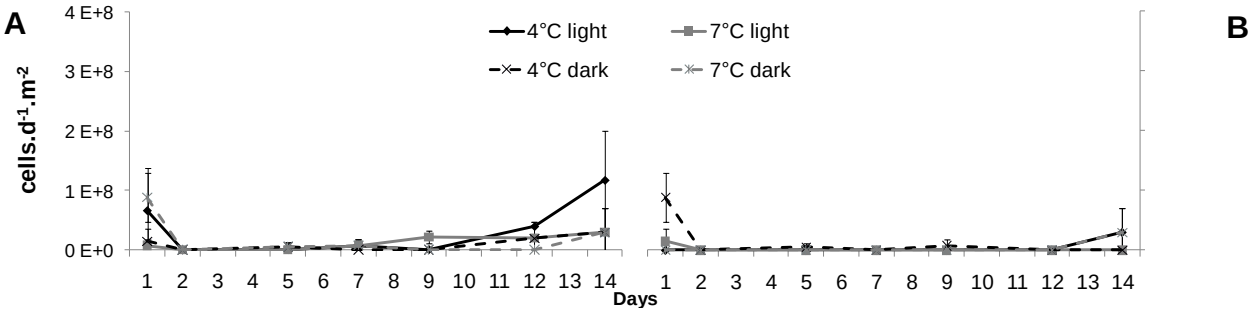


Figure 30: Recruitment dynamics observed with a population that survived 2.5 years in the sediment.
A: with sediment mixing. B: without sediment mixing.
Values are mean (± SD) recruitment rates of microcosms replicates.

DISCUSSION

In this study, we investigated the recruitment process of *Microcystis* under laboratory conditions, testing for the first time within a same experiment the relative influence of temperature, light and resuspension of sediment. Another original aspect of our work was that we looked at the effect of these abiotic parameters on benthic *Microcystis* populations of different ages, *i.e.* which had been trapped in the sediment for periods ranging from a few weeks to nearly three years. Previous studies of the recruitment process dealt with cyanobacteria located in the first few centimeters just below the sediment surface, which corresponded only to the bloom of the current year (Tsujimura *et al.* 2000; Verspagen *et al.* 2004, 2005; Ihle *et al.* 2005; Schöne *et al.* 2010). The factors involved in the recruitment of populations of different ages had never previously been compared, and it could provide interesting information about the mechanisms regulating this process. Knowing that prolonged survival in the sediments induces a loss of viability (Latour *et al.* 2007), our approach allowed us to find out whether recruitment is mainly triggered by passive mechanisms, as suggested by Verspagen *et al.* (2004), whether it is mainly triggered by some active processes, or whether it results from the combination of both active and passive mechanisms.

Influence of residence time on the benthic recruitment of *Microcystis*

The first finding of our study is that benthic *Microcystis* colonies buried in the sediment for almost 3 years are still able to contribute to the recruitment process. Although the recruitment rate of this oldest population was low, it does confirm the long-term resistance of these organisms confronted to unfavorable conditions (darkness, low temperature, and anoxic conditions), as previously suggested by the work of (Latour *et al.* 2007). This finding is of particular interest for the management of water resources, and suggests that further consideration should be given to limiting the resuspension of sediment containing overwintering cyanobacteria, so as to avoid promoting their inoculation of the water column. This long-term survival provides a certain ecological plasticity to *Microcystis*, allowing it to adapt to varied or changing environments. This ability could explain its occurrence and persistence in many freshwater systems.

The comparison of the proportions of cells recruited from the youngest population before and after its first overwintering period did not reveal any difference. This seems to indicate that the ability of *Microcystis* to inoculate the water column is well conserved over a period of a few

months corresponding to the benthic overwintering phase of its life cycle, without any loss of recruitment. On the other hand, the population trapped in the sediment for almost three years presented a far lower proportion of recruited cells, thus showing its reduced ability to participate to the benthic recruitment process. The origin of this difference remains to be determined, but the decreasing viability with increasing durations of benthic life recorded by Latour *et al.* (2007) might explain our observations.

Relative influence of the three abiotic factors tested on the benthic recruitment of *Microcystis*

In this study, the highest recruitment rates were obtained under the same experimental conditions whatever the age of the population. Indeed, our results clearly showed resuspension of sediment was the main abiotic factor enhancing the recruitment. Sediment resuspension might allow the recruitment of *Microcystis* buried in the first centimeters of sediment, whereas without sediment mixing, only *Microcystis* laying on the sediment surface can participate to the benthic recruitment. This could partly explain why the recruitment of *Microcystis* is significantly promoted by sediment resuspension. Moreover, the work of Ihle *et al.* (2005) also supports the idea that sediment resuspension could influence the recruitment process, but these authors suggested that it occurred indirectly. They suggested that the wind-induced resuspension of sediment could lead to translocation from deep to littoral areas, thus bringing *Microcystis* colonies into contact with abiotic factors that are directly involved in the recruitment, namely higher temperatures and moderate light conditions. In the same way, Schöne *et al.* (2010) have shown that light and resuspension of sediment have cumulative effects in promoting the recruitment of *Microcystis*. These authors concluded that sediment mixing facilitates *Microcystis* recruitment rather than triggering it. However, when parameters potentially involved in recruitment are unraveled and tested separately, as in our experiment, it appears that sediment resuspension could promote the recruitment of benthic *Microcystis,* without any light or temperature increase, as it has also been suggested by other authors (Stahl-Delbanco & Hansson 2002; Verspagen *et al.* 2004; Misson *et al.* 2011). Under natural conditions, sediment mixing could correspond to wind-induced resuspension during the spring overturn when the water column is unstratified, and/or to resuspension brought about by bioturbation (Stahl-Delbanco *et al.* 2003; Rengefors *et al.* 2004; Verspagen *et al.* 2004). Indeed, the resuspension of sediment can

detach sediment particles, thus increasing the buoyancy of benthic *Microcystis* colonies, and then trigger their recruitment (Verspagen *et al.* 2004).

On the other hand, in all the populations tested in our experiment, light and higher temperature did not demonstrate any significant effect on recruitment, contrary to other studies of *Microcystis* benthic recruitment (Tsujimura *et al.* 2000; Rengefors *et al.* 2004; Ihle *et al.* 2005; Verspagen *et al.* 2005; Schöne *et al.* 2010). These factors were previously thought to improve both the benthic survival and the benthic recruitment of *Microcystis,* and, as a consequence, to make this benthic recruitment more important in littoral shallow zones where the light illuminates the sediment, where the temperature can be quite high (Brunberg & Blomqvist 2002, 2003, Rengefors *et al.* 2004). Our discrepant results suggest that the factors involved in the recruitment of *Microcystis* sedimented in deep zones (45 m in this experiment) or in shallow zones might differ.

Finally, the involvement of light and almost of temperature increase was previsouly thought to be at the origin of the resumption of the metabolic activity of the benthic cells in spring, resulting in an active lightening of the cells and allowing them to migrate back to the water column (Reynolds *et al.* 1981; Trimbee & Harris 1984; Visser *et al.* 1995; Rengefors *et al.* 2004). The fact that none of these parameters influenced the recruitment of *Microcystis* in our study tends to negate the involvement of active processes in *Microcystis* recruitment. On the other hand, if *Microcystis* benthic recruitment were a simple response to passive resuspension mechanisms, we would not observe any differences between populations of different ages, and we would not have observed any recruitment without sediment mixing. Thus, from this study, it appears that the recruitment process is greatly enhanced by passive resuspension of sediment, but relies on some metabolic process. Thereafter, the benthic recruitment process of *Microcystis* may result from the combination of both active and passive processes, rather than being the result of only one of them as suggested before (Visser *et al.* 1995; Verspagen *et al.* 2004).

CONCLUSION

In short, benthic populations of *Microcystis* settled in a deep zone of the Grangent reservoir are able to participate to the recruitment process after a wide range of benthic life durations. While an overwintering of a few months did not seem to affect this recruitment ability, a several year-long benthic life time resulted in a lower recruitment. Whatever the duration of the benthic life, the only abiotic factor promoting significantly the recruitment of *Microcystis* in this experiment was sediment resuspension. From these results, we propose that the benthic recruitment of *Microcystis* in deep and dark zones is triggered, first, by passive mechanisms like sediment mixing and, second, by active mechanisms related to the physiological state of the cells. Until now, the benthic recruitment of *Microcystis* was mainly attributed to littoral areas. This study shows that recruitment can take place in deep zones, and even from old populations, thus shedding the light on the need to further consider the benthic recruitment of deep areas in a better way.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Monika Ghosh for improving the English text.

2. Implication du potentiel toxique et de la taille des colonies de *Microcystis* dans le processus de recrutement benthique

Préambule

Les conditions de recrutement optimales déterminées dans l'article précédent ont servi de base pour tester l'influence d'autres facteurs de régulation potentiels pour le recrutement benthique de *Microcystis*.

Ainsi, la recherche d'une éventuelle sélection, au cours du recrutement, sur la base du potentiel toxique et de la taille des colonies constituait le prochain objectif. L'influence du potentiel toxique de *Microcystis*, au cours de son recrutement printanier, était évoquée dans la littérature à la suite de l'observation de quotas cellulaires en microcystines plus forts en début de prolifération qu'au cours de l'efflorescence (Kardinaal & Visser 2005). En ce qui concerne la taille des colonies, Reynolds *et al.* (1981) ont émis l'hypothèse selon laquelle le recrutement benthique de *Microcystis* se ferait à partir de petites colonies, issues de la fragmentation des colonies du stock benthique. Des observations plus récentes appuient cette hypothèse, avec la dominance de petites colonies au début d'une prolifération planctonique de *Microcystis* (Kurmayer *et al.* 2003), ou encore la disparition préférentielle des petites colonies au printemps dans une population benthique (Latour 2002).

L'article suivant présente une expérience de recrutement qui a été réalisée afin de tester l'influence de ces deux paramètres sur le recrutement benthique de *Microcystis*. Les très faibles quantités de cellules recrutées à partir des sédiments de la retenue de Grangent (article précédent) ne permettant pas de réaliser l'ensemble des mesures souhaitées, j'ai utilisé pour cette nouvelle expérience des sédiments de la retenue de Villerest, plus riches en *Microcystis*.

ARTICLE N° 4 :

Involvement of microcystins and colony size in the benthic recruitment of the cyanobacterium *Microcystis* (Cyanophyceae)

Benjamin MISSON[a,b], Marion SABART[a,b], Christian AMBLARD[a,b] and Delphine LATOUR[a,b].

[a] Clermont Université, Université Blaise Pascal, LMGE, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France

[b] CNRS, UMR 6023, LMGE, BP 80026, F-63171 AUBIERE Cedex, France

Running title: Microcystins and colony size in *Microcystis* benthic recruitment

Article publié dans

Journal of phycology 47, 42-51 (2011)

ABSTRACT

The benthic recruitment of *Microcystis* (Kütz.) was simulated *in vitro* in order to characterize the colonies of *Microcystis* recruited, and to study the impact of intracellular and extracellular microcystins, and the influence of colony size on the recruitment process.

We observed recruitment dynamics consisting of a lag phase followed by a peak and then a return to low recruitment rates, mainly controlled by passive resuspension throughout the experiment, and by physiological processes during the recruitment peak. Ninety seven percent of the *Microcystis* colonies recruited were less than 160 µm in maximum length and their cells contained much greater amounts of microcystins (0.26 ± 0.14 pg eq MC LR cell^{-1}) than those in benthic colonies (0.021 ± 0.004 pg eq MC LR cell^{-1}). The microcystin content of recruited *Microcystis* varied significantly over time and was not related to changes in the proportion of potentially toxic genotypes, determined using real time PCR. On the other hand, the changes in microcystin content in the potentially toxic *Microcystis* recruited were closely and negatively correlated with recruitment dynamics, the lowest microcystin contents corresponded to high recruitment rates and the highest microcystin contents corresponded to low recruitment rates. Thus, depending on temperature and light conditions, these variations are thought to result from the selection of various subpopulations from amongst the smallest and the most toxic of the initial benthic population. Adding purified microcystin-LR to experimental treatments led to a decreased recruitment of *Microcystis* and more specifically of *mcyB* genotypes.

Key words: benthic recruitment, colony size, cyanobacteria, microcystins, *Microcystis*

INTRODUCTION

Microcystis is a widespread cyanobacterial genus that sometimes dominates phytoplankton communities and proliferates abundantly in freshwater ecosystems. Its life cycle consists of two main phases: initially *Microcystis* proliferates as plankton from late spring to early autumn, and then it sinks and joins the sediments surface for a benthic vegetative phase in which it survives the winter. In spring, some of the surviving colonies leave the sediment and inoculate the water column through a recruitment process (Takamura *et al.* 1984; Boström *et al.* 1989; Hanson *et al.* 1994; Latour 2002). The factors regulating this recruitment process have not yet been fully elucidated and may depend on several different parameters. According to some authors (Caceres & Reynolds 1984; Trimbee & Harris 1984; Brunberg & Blomqvist 2003), abiotic factors, such as temperature, light intensity reaching the sediment and anoxic conditions, seem to be involved in stimulating the resumption of the metabolic activity of the cyanobacteria, so that the colonies regain buoyancy and return to the water column. Colony size measurements of newly-established planktonic populations (Kurmayer *et al.* 2003) and of decreasing benthic populations (Latour 2002) suggest that small benthic colonies of *Microcystis* are preferentially recruited. However, the size of newly-recruited colonies needs to be investigated in order to remove the uncertainty that results from the changes of the colonies induced either by benthic survival before the recruitment in sediments, or by planktonic growth after the recruitment.

Microcystis is able to produce hepatotoxins known as microcystins (MCs). The toxic effect of MCs on various eukaryotic organisms in aquatic food-webs has been subjected to considerable investigation, and some potential functions have been suggested. Microcystins could indeed be involved in competition and predation defense, although contradictory results have been reported (Watanabe *et al.* 1992; Jang *et al.* 2004; Rantala *et al.* 2004; Babica *et al.* 2006; Guo & Xie 2006). MC production during the planktonic phase of the *Microcystis* life cycle varies according to the cyanobacterial abundance, growth rate (Orr & Jones 1998), the succession of different genotypes within the same bloom (Welker *et al.* 2003), and to various environmental factors (Izydorczyk *et al.* 2008). MC production has not yet been shown to occur during the benthic phase of the *Microcystis* life cycle, but recent investigations have demonstrated that these toxins are present in *Microcystis* cells throughout the benthic phase (Ihle *et al.* 2005; Latour *et al.*

2007), suggesting their potential implication in benthic survival during winter and/or in the recruitment process in spring. Indeed, the prolonged stability of MCs observed in sediments could result either from better survival of toxic than non-toxic cells or from benthic synthesis, but it could correspond to a requirement for benthic recruitment. This potential implication of microcystins during the cyanobacterial life cycle is reinforced by the hypothesis of Schatz *et al.* (2007), who suggest that MCs are extracellular messengers signaling cell death. Such a communication function could take place when cells lysis occurs, *i.e*. at the end of the bloom or during the transition from the sediments to the water column.

Several authors have reported unexplained slumps in benthic populations of *Microcystis* during the recruitment period, with only a minor contribution to the recruitment of *Microcystis* colonies that have left the sediments (Brunberg & Blomqvist 2002; Ihle *et al.* 2005; Latour *et al.* 2007; Rinta-Kanto *et al.* 2009), suggesting lysis as the cause of lost cells. This could result in the release of MCs into the water as a result of cell lysis during the recruitment process. This hypothesis is supported by the findings of Ihle *et al.* (2005), who found free extracellular MCs in the water during the recruitment period. If this is the case, then released MCs could influence the metabolism of the surviving *Microcystis* colonies, and thus modify the recruitment process.

The purpose of the work here was to find out whether MCs, including both the intra- and extracellular quotas as proportions of potentially microcystin-producing genotypes (*mcyB* genotypes), and colony size could be involved in the recruitment process of *Microcystis,* and thus influence the establishment of this cyanobacterium. To do this, we simulated *Microcystis* recruitment *in vitro* and to assess the influence of extracellular MCs on the recruitment process we added purified MC as a treatment and monitored the recruitment process including the proportions of *mcyB* genotypes in the recruited *Microcystis*.

MATERIALS AND METHODS

Study site and in situ sampling

The Villerest reservoir is located in the Massif Central region in France, on the upper reach of the Loire River. It is a 34km long artificial reservoir with a maximum depth of 45m. The Villerest reservoir is a hypereutrophic lake where *Microcystis* blooms occur every summer.

Sediments and surface water were sampled in February 2008, when the water temperature was 4.5°C. This was before the recruitment period, and so reflected the overall benthic population before it had been influenced by the recruitment process. Previous investigations (unpublished data) revealed the accumulation of benthic *Microcystis* colonies in the deepest parts of the lake (45°58'N, 4°00'E; 40 m deep) where sediments are in darkness at all times.

Sediments were sampled using a clamshell bucket, and were stored at 4°C and in darkness. We also sampled 60 L of surface water that was filtered through 1.2-µm pore-sized glass fiber filters and stored at 4°C in darkness.

Experimental settings and *in vitro* sampling

We filled six 1-L glass containers (cylindric, basal area of 66 cm^2) with 200 mL of homogenized sediments containing *Microcystis* colonies. Filtered (<1.2-µm) lake water (500 mL) was then added to each of the containers. For the first three containers (MC+ medium) the water contained added purified microcystin-LR (MC-LR) at a concentration of 1µg L^{-1} and for the other three containers (MC- medium, control) no toxin had been added. The purified MC-LR was purchased from Alexis Biochemicals (Enzo Life Sciences, Lausanne, Switzerland) and dissolved in 100% methanol to produce a concentration of 50 mg L^{-1}. This MC-LR was then diluted 50,000-fold in filtered lake water to yield a final solution of 1µg L^{-1} prior to mixing with the sediments; this ensured that the methanol would not have any influence on our experiment. The MC concentration of 1µg L^{-1} corresponded to the WHO guideline for drinking water, and it was a realistic concentration, which is often found in water during a *Microcystis* bloom. The microcosms were placed in darkness at 8°C. Complete manual mixing was performed for 30 seconds just after adding the water in order to mimic the natural sediment re-suspension induced by water column-wind-induced mixing or flood events. This degree of mixing was necessary to ensure proper mixing of all the sediments and dilution of the added MC-LR, and also to enhance

microcosm reproducibility. The light and temperature conditions were as close as possible to those of the hypolimnion at the sampling site in spring when recruitment occurs.

The experiment lasted 17 days during which time water samples were collected from each container on days 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 and 17. At each sampling date and for each container, all the supernatant water was discarded so as to collect only *Microcystis* that had just been recruited, and not to let the cyanobacteria grow or die in the planktonic phase during several days. In order to avoid sediment mixing during sampling, and to collect only buoyant *Microcystis*, the first 2cm of water above the sediments were not sampled. The containers were then refilled with 500 mL of filtered lake water containing MC-LR at a concentration of 1µg L^{-1} for the MC+ medium samples, or containing no added toxin for the MC- medium control samples, and mechanical mixing was performed as before.

Benthic cyanobacteria were isolated from the sediments at the beginning (day 0) and at the end of the experiment (day 17) using the Verspagen *et al.* (2004) method, in order to characterize the initial and final benthic populations of *Microcystis* (abundance, average size of colonies and MC content). For that, 4 mL of sediment were diluted 10-fold, and silica solution was added (30% Ludox (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 70% diluted sediments). The mixture was then centrifuged at 400 × g for 20 min. The pellets were dried at 60°C to determine the dry weight of sediments used. Every supernatant containing cyanobacteria was divided into two subsamples: the first was filtered across a 5-µm pore-sized mesh to catch all the cyanobacterial colonies, and the other was filtered across a 160-µm pore-sized mesh so that only the smallest colonies (<160 µm) remained in the filtrate. The *Microcystis* colonies were then gently rinsed and suspended in water before being subjected to counting, size measurement, determination of the intracellular toxins, and DNA extraction.

Cyanobacterial abundance and recruitment rates

For each water or sediment sample, aliquots of 50 mL of planktonic *Microcystis* suspension or of 2 mL of benthic *Microcystis* suspension were filtered across a 5-µm pore-sized mesh, and the colonies caught on the filter were counted under an epifluorescence microscope (×100) at 510-560 nm, according to the method of Latour *et al.* (2004c). For each sampling date, the total number of colonies of *Microcystis* sampled was extrapolated from the mean of the counts and the total volume sampled. The area of the microcosm and the time that had elapsed

since the last sampling were then used to calculate a recruitment rate per day and per square meter.

All cyanobacterial abundance data were expressed in terms of colony counts in order to obtain a better representation of the population structure in the benthic recruitment, which contained mainly *Microcystis* colonies. However, recruitment rates were expressed in terms of cellular counts, to allow comparison with previous studies of *Microcystis* recruitment. For each sample, 1 mL of *Microcystis* suspension was fixed with 1% glutaraldehyde. Rapid disruption (<1 min) of the colonial structure was produced by low-power ultrasonic vibration (20 kHz; Reynolds & Jarowski 1978; Latour *et al.* 2007). Isolated cells were then counted under a microscope (x400) with a Thoma counting chamber.

Colony size

The size of at least 200 benthic colonies or 30 planktonic colonies, randomly chosen in each sample, was measured using a microscope (×100 ; Paralux L1100A) equipped with a graduated eyepiece.

Microcystin concentration

Aliquots of 50 mL of planktonic *Microcystis* from water samples, or of 2 mL of benthic *Microcystis* suspension were filtered onto GF/C filters. The filters were stored in 75% methanol at -20°C prior to toxin extraction. Intracellular MC were then extracted by disrupting *Microcystis* cells using five 15-minute cycles of ultrasonic vibration (35 kHz). Samples were then centrifuged at 400 × g for 15 minutes, the supernatant was stored at 4°C, the pellet was suspended in 75% methanol and once again subjected to ultrasonic vibration. The two supernatants containing the toxins were then pooled before the toxin concentration was determined. Extracted MCs were stored at -20°C before analysis.

MCs were measured using the protein phosphatase 2A (PP2A) enzymatic method proposed by An & Carmichael (1994) and modified by Rivasseau *et al.* (1999). Results were combined with cell counts in order to be expressed as mass equivalents of MC-LR per cell (pg eq MC-LR $cell^{-1}$) to make it possible to compare them to other published data concerning the MC content of *Microcystis*. These results corresponded to both intracellular and bound MCs.

DNA extraction

DNA extraction was performed according to Humbert & Le Berre (2001): cyanobacterial colonies were gently disrupted by ultrasonication, and the pellet obtained after centrifuging the cell suspension for 10 min at 14 000 × g was incubated at 37 °C for 30 min in 500 µL of Tris/EDTA buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA, pH 8) and 50 µL of lysosyme (50 $mg.mL^{-1}$). Then, 50µL of 10% sodium dodecyl sulfate were added prior to incubating for 15 min at 70°C. After a phenol–chloroform extraction, and ethanol precipitation, the DNA extracted was stored at -40°C until used.

Multiplex real time PCR

The proportions of *mcyB* genotypes in the recruited subpopulations of *Microcystis* were estimated by real time quantitative PCR analysis, using the ΔCt method developed by Briand *et al.* (2008)for *Planktothrix*, and subsequently adapted for *Microcystis* (Briand *et al*. 2009; Sabart *et al.* 2009). The *mcyB* genotype subpopulation was quantified relative to the whole *Microcystis* population using two target gene regions: the intergenic spacer region within the phycocyanin operon (*PC*), and the *mcyB* gene of the microcystin gene cluster. The amplifications were carried out in multiplex in a Mastercycler ep realplex (Eppendorf) using the primers and probes described by Kurmayer & Kutzenberger (2003), with modifications of the fluorescent reporter and quencher dyes of both probes. All the reactions were performed in 20 µL volumes in 96-well plates. The multiplex reaction mix contained 10 µl of 2X Quantitect Probe PCR Kit mix (Qiagen), a 600 nM concentration of each primer (188F: 5'-GCTACTTCGACCGCGCC-3' ; 254R: 5'-TCCTACGGTTTAATTGAGACTAGCC-3') and a 300nM concentration of the TaqMan probe (5'-JOE-CCGCTGCTGTCGCCTAGTCCCTG-BHQ-1-3') for PC gene amplification, a 900nM concentration of each primer (30F: 5'-CCTACCGAGCGCTTGGG-3' ; 108R: 5'-GAAAATCCCCTAAAGATTCCTGAGT-3') and a 250nM concentration of the TaqMan probe (5'-FAM-CACCAAAGAAACACCCGAATCTGAGAGG-BHQ-1-3') for *mcyB*, and 2µl of template containing various amounts of genomic DNA. The mix was then filled to 20 µl with sterile Millipore water. Each sample was prepared in triplicate. Negative controls without DNA were included for each PCR run. For each run of samples, serial dilutions containing $1.1x10^{1}$, 1.1, $1.1x10^{-1}$, $1.1x10^{-2}$, $1.1x10^{-3}$, $1.1x10^{-4}$ and $1.1x10^{-5}$ ng of the genomic $DNA.\mu l^{-1}$ were prepared from the DNA extract of an MC-producing strain of *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806, PCC 7813, PCC 7820, PCC 7941, PCC9354, PCC 9355, PCC 9443 or

PCC 9808), to serve as external standards for the real–time PCR. The temperature cycle consisted of an initial preheating step of 15 min at 95 °C, followed by 45 cycles of 30 s at 95 °C and 1 min at 60 °C.

For the data analysis, fluorescence thresholds were set manually to 67 (relative fluorescence) for *PC* gene amplification, and to 117 for *mcyB* amplification for all the samples. The threshold cycle (C_T) number (the cycle number at which the fluorescence first exceeds the threshold) for both target genes was determined using the 8 MC-producing *Microcystis* strains as external standards, and ΔC_T was estimated as the difference between C_T for the *PC* gene and C_T for the *mcyB* gene. The mean ΔC_T was 2.63 ± 0.26, corresponding to 100% toxic cells. The relative proportion of MC-producing genotypes was calculated using the theoretical equation relating the proportion of *mcyB* genotypes to the ΔC_T: $y=3.32\log(x)-4.0145$ were y is the ΔC_T and x is the percentage of the *mcyB* genotype strains. This equation has been experimentally validated using axenic *Microcystis* strains from the PCC, as described by Briand *et al.* (2008a).

Using these proportions of *mcyB* genotypes, among the recruited cyanobacterial sub-population, we calculated the abundances of potentially toxic (*mcyB*) and non-toxic genotypes for each sampling date in each medium. We were then able to determine the cumulative amounts of potentially toxic or non-toxic colonies recruited during the whole experiment by assuming that each colony corresponded to a single genotype.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with XLStats (2009.4.05 version, Addinsoft). The level of significance was set at 5%. Normality was checked with the Shapiro-Wilk normality test, and variance homoscedasticity was assessed by Fisher's F test. Mean sizes of recruited and benthic colonies were compared using Kruskal-Wallis analysis of variance on ranks. When a significant difference was found, multiple comparisons between groups were performed by using Dunn's test. Recruitment kinetics and intracellular MC quota variations were analyzed using repeated measures ANOVA, and when an overall significant difference was found, multiple comparisons between groups were performed by using Tukey test.

The mean MC content of the overall recruited *Microcystis* population and of the initial and final benthic populations, as well as initial and final benthic abundances, benthic decrease and proportions of colonies recruited from both media, were compared using Student's t-tests, for

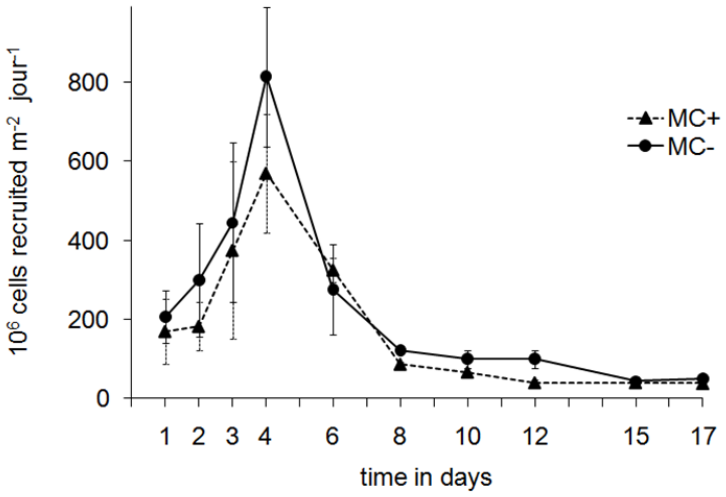
dependent or independent data, depending on the origin of the two samples being compared. When homoscedasticity was not achieved, the degree of freedom was calculated using the Welch-Satterthwaite correction. Correlations between the recruitment rates of potentially toxic *Microcystis* and their MC content were assessed using Spearman's correlation test.

Table 5. Quantitative changes of benthic *Microcystis* colonies and contribution of the benthic population to recruitment when exposed to added, free MC-LR (MC+) and in control medium (MC-).

Values are the means (±S.D.) of the three microcosms of each medium. *a*, *b*, *c* and *d* represent statistical differences.

	MC+	MC-
Mass of dry sediments used for each microcosm (gDW)	54±5.1	
Abundance of benthic colonies at initial state (colonies.gDW^{-1})	$2.04\ 10^5$±$0.07\ 10^5$	
Abundance of benthic colonies at final state (colonies.gDW^{-1})	$1.94\ 10^5$±$0.18\ 10^5$ *a*	$1.86\ 10^5$±$0.14\ 10^5$ *a*
Decrease in benthic colonies between initial and final states (%)	4.84% ± 8.66 *b*	8,76 % ± 6.78 *b*
Total cumulative quantity of recruited colonies	$4.09\ 10^4$±$0.55\ 10^4$ *c*	$5.15\ 10^4$±$1.13\ 10^4$ *c*
Proportion of benthic colonies recruited (%)	0.37% ± 0 050 *d*	0.47% ± 0.10 *d*

Figure 31 Recruitment rate dynamics of *Microcystis* cells exposed to added free MC-LR (MC+) and in control medium (MC-). Mean values (±S.D.) for the three microcosms of each medium.



RESULTS

Microcystis population's dynamics

Benthic phase

The initial quantity of benthic colonies of *Microcystis* was about 2×10^5 colonies g^{-1} of dry sediments (table 5). At the end of the experiment, this quantity had fallen by 4.8% (MC+ medium) to 8.8% (MC- medium) from the value at the beginning of the study (Table 5), but this decrease was not statistically significant (dependent samples t tests, for MC+: $t = 1.405$, $df = 2$, $p = 0.295$; for MC-: $t = 3.316$, $df = 2$, $p = 0.08$) and was the same in both media (independent samples t test, $t = 0.617$, $df = 4$, $p = 0.571$).

Planktonic phase

The total quantity of recruited *Microcystis* colonies in each medium was very low, corresponding to less than 0.5% of the initial benthic population (table 5). There was no statistical difference between the two media (independent samples t test, $t = -1.453$, $df = 4$, $p = 0.220$), even though we collected about 20% fewer *Microcystis* colonies that had been recruited in MC+ medium than in control (Table 5).

The monitoring of recruitment rates throughout the experiment highlighted similar time patterns in both media (Figure 31): at the first sampling date the recruitment rate was relatively low (about 200×10^6 cells recruited day^{-1} m^{-2}), then it rose until it peaked at day 4 with nearly 600×10^6 cells recruited day^{-1} m^{-2} in MC+ media and more than 800 10^6 cells recruited day^{-1} m^{-2} in control. From day 6 to the end, recruitment rates dropped to very low values in both media (minimum rates of 39×10^6 cells recruited day^{-1} m^{-2} in MC+ medium and of 44 $\times 10^6$ cells recruited day^{-1} m^{-2} in control). In spite of these similarities in recruitment kinetics, statistical analysis highlighted a significant difference between the two media with lower recruitment rates observed in the MC+ medium (repeated measures ANOVA, Tukey post-hoc test, $p < 0.0001$).

Recruitment rates in both media were inversely correlated to the time separating the samplings (Spearman correlation test, MC+: $\rho = -0.844$ and $p = 0.004$; MC-: $\rho = -0.744$ and $p = 0.019$).

Figure 32: Mean size (±S.D.) of benthic and recruited colonies. n=230 for initial benthic state, n=810 for each final benthic state population, and n=900 for each recruited population. *a* and *b* represent statistically significant differences.

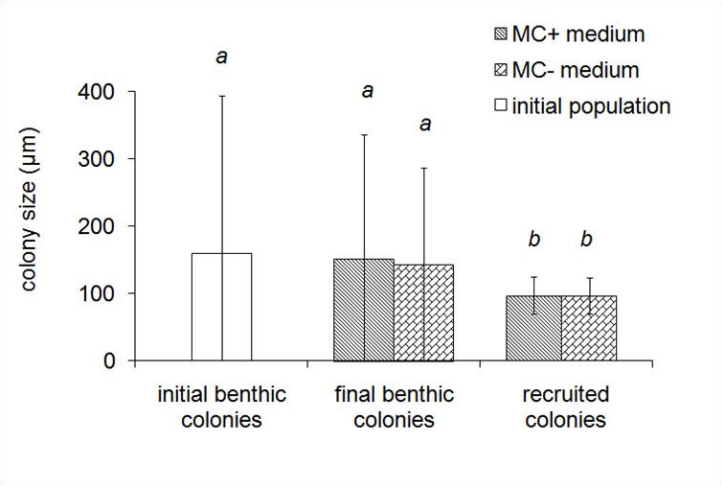


Figure 33: Time patterns of the proportions of potentially toxic genotypes (*mcyB* genotypes) in recruited *Microcystis* colonies exposed to added free MC-LR (MC+) or to control medium (MC-).

Mean values (±S.D.) for the three microcosms of each medium.

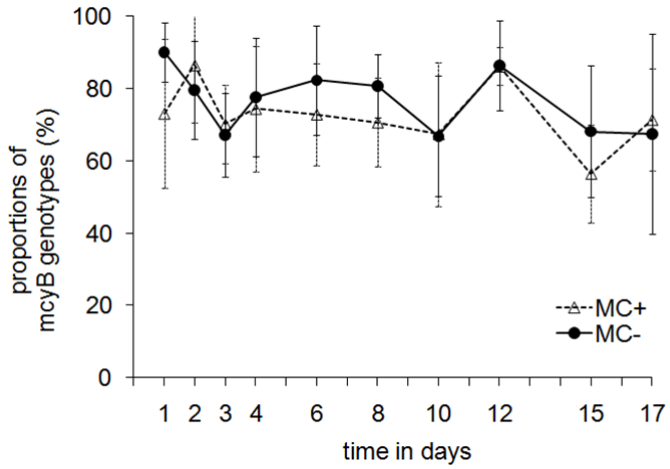


Table 6. Cumulated amounts of potentially toxic (*mcyB* genotypes) and non toxic (non-*mcyB* genotypes) recruited *Microcystis* colonies exposed to added free MC-LR (MC+) or to control medium (MC-).

Values are the means (±S.D.) of the three microcosms of each medium. [a], [b], [c]: statistical differences (ANOVA, P<0.05).

mcyB genotypes		non-*mcyB* genotypes	
MC+	MC-	MC+	MC-
$2.95\ 10^4 \pm 0.42\ 10^4 a$	$3.97\ 10^4 \pm 0.88\ 10^4 a$	$1.09\ 10^4 \pm 0.15\ 10^4 b$	$1.16\ 10^4 \pm 0.27\ 10^4 b$

Microcystis colony size

Benthic cyanobacteria

Benthic colonies of *Microcystis* did not show any statistically significant size difference between the beginning (mean size: 159 µm) and the end (mean size: 151 µm in MC+ medium, 141 µm in control) of this experiment, in either medium (Figure 32, Kruskal-Wallis test, K = 3.232, df = 2, p = 0.199).

Recruited cyanobacteria

The average colony size of the recruited sub-populations of *Microcystis* was smaller than that of benthic colonies in both media (Kruskal-Wallis test, K = 46.089, df = 2, p<0.0001; Dunn's post-hoc test, p<0.05) and was comprised between 93 and 106µm (figure 32). No change in size was observed in recruited sub-populations of *Microcystis* during this experiment. Nor was there any significant difference in the mean size of recruited colonies between the two media or between any of the sampling dates (Kruskal-Wallis test, K = 18.395, df = 19, p = 0.496).

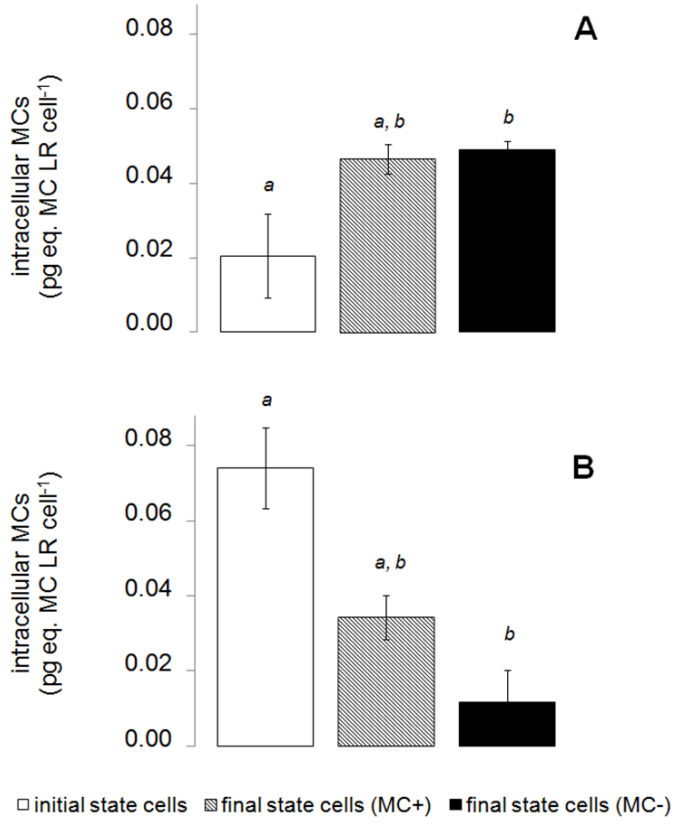
Among these recruited sub-populations, 97.4% (MC+ medium) and 96.9% (control) of the colonies measured less than 160µm.

Potentially microcystin-producing genotypes

The proportions of *mcyB* genotypes in recruited sub-populations ranged between about 55and 90% (figure 33). The proportions of *mcyB* genotypes in MC+ medium appeared to be lower than in control (repeated measures ANOVA, Tukey post-hoc test, p = 0.013).

From these results in the recruited cyanobacterial sub-population, we calculated specific recruitment rates of *Microcystis* with the *mcyB* genotype, and the abundances of *mcyB* and non-toxic genotypes recruited at each sampling date in each medium. We were then able to determine the cumulative number of potentially toxic or non-toxic colonies recruited during the whole experiment (Table 6). We found that the mean recruitment of *mcyB* genotypes appeared to have been reduced by 25.7% by adding MC-LR, whereas that of non-toxic *Microcystis* seemed to be less affected, with a reduction by only 6.4%. However, these differences of recruitment between the two media were not statistically significant (independent samples t test for *mcyB* genotypes: t = -1.813, df = 4, p = 0.144; for non-toxic genotypes: t = -0.418, df = 4, p = 0.697).

Figure 34: Intracellular microcystin quotas for either (A) the overall benthic population or (B) benthic colonies measuring less than 160µm, exposed to added free MC-LR (MC+) or in control medium (MC-). Mean values (±S.D.) for the three microcosms of each medium. *a* and *b* represent significant statistical differences.



Microcystin concentrations

Benthic cyanobacteria

Our results revealed a considerable difference in the mean intracellular MC contents of benthic cyanobacteria between the initial and the final state (Figure 34). Indeed, at the beginning of the experiment, benthic cells of *Microcystis* had an average intracellular MC concentration (0.021 ± 0.004 pg eq MC LR cell^{-1}) that was lower than that found at the end of the experiment, when mean MC quotas of benthic cells were about 0.048 pg eq MC LR cell^{-1} in both media. However, this difference was only statistically significant in the control medium (dependent samples t test, for MC+ medium: t = -3.006, df = 2, p = 0.095; for MC- medium: t = -4.973, df = 2, p = 0.038). By multiplying these mean quotas by the abundance of *Microcystis* cells per gram of dry sediments, we obtained the total mass of intracellular MCs per gram of dry sediments for both initial and final state of both media. Assuming that the sediment quantity was the same at the beginning and at the end of the experiment, we calculated the total mass of intracellular MCs in the microcosms at the beginning and at the end of the experiment. It then appeared that total intracellular MC amount in the sediments had significantly increased from 101 µg at the initial state to 296 µg in MC+ medium (dependent samples t test, t = -5.748, df = 2, p = 0.029) and 336µg in control (dependent samples t test, t = -7.967, df = 2, p = 0.015). The slight difference observed between the two treatments at the end of the experiment was not significant (independent samples t test, t = -2.252, df = 4, p = 0.087).

If we focus on benthic *Microcystis* colonies measuring less than 160 µm, the changes observed were different. First, at the beginning of the experiment, intracellular MCs quotas were significantly higher in the cells of these smaller colonies than in the overall population (dependent samples T test, t = -12.774, df = 2, p = 0.006), with a mean value of 0.074 ± 0.011 pg eq MC LR cell^{-1} (Figure 34). Then, in contrast to what was observed in the total population, MCs were less concentrated in final state than in initial state. However, this difference was once again only significant in control (dependent samples t tests, for MC+ medium: t = 4.153, df = 2, p = 0.053; for MC- medium: t = 16.595, df = 2, p = 0.004). The same calculation as for the overall benthic population was then applied to the small-sized (<160 µm) subpopulation, and the total quantity of toxins in the recruited subpopulation was also investigated. This indicated that the recruitment could only account for 2.04% (MC+ medium) or 2.18% (control) of the decrease in toxin in this small-sized subpopulation.

Figure 35: Comparison of mean microcystin content in benthic *Microcystis* cells in the initial state and recruited cells exposed to added free MC-LR or in control medium. Mean values (±S.D.) for the three microcosms of each medium. *a, b* represent significant statistical differences (Student's t test, $p<0.01$)

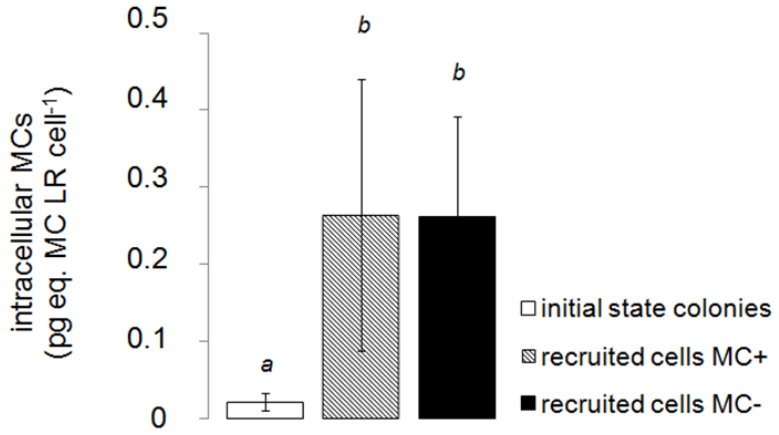
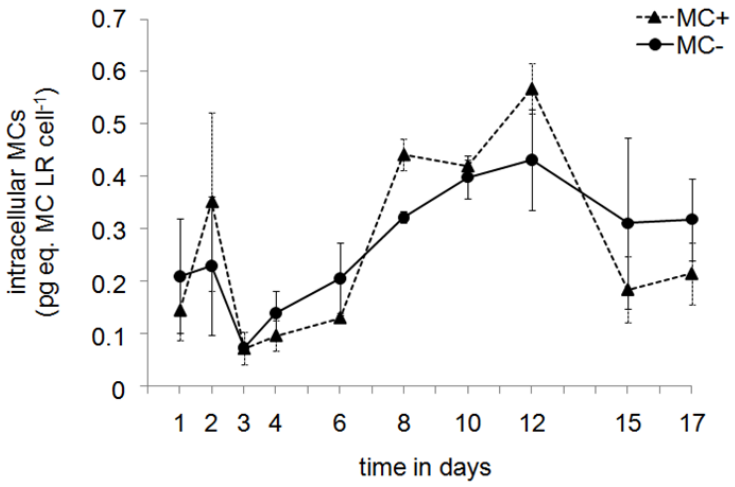


Figure 36. MCs cellular quota variations of *Microcystis* exposed to added free MC-LR (MC+) and in control medium (MC-). Mean values (±S.D.) for the three microcosms of each medium.



Recruited cyanobacteria

Mean MC cellular quotas of recruited *Microcystis* in both media were about 0.26 pg eq MC LR cell^{-1} (Figure 35), which was much higher than those of the overall initial state benthic population or of the initial benthic population measuring less than 160 µm (dependent samples t-tests, for the overall population: in MC+ medium: t = -13.426, df = 2, p = 0.006, and in MC- medium: t = -26.443, df = 2, p = 0.001; for the subpopulation smaller than 160µm: in MC+ medium: t = -9.634, df = 2, p = 0.011; and in MC- medium: t = -18.683, df = 2, p = 0.003). Moreover, these MC contents varied over time (figure 36) and these variations were very similar for the two media (repeated measures ANOVA, Tukey post-hoc test, p = 0.983). This pattern was not linked to the changes in proportions of *mcyB* genotypes (Pearson correlation test, for MC+: r = 0.381, p = 0.277 ; for MC-: r = -0.011, p = 0.975).

Using the proportion of *mcyB* genotypes, we calculated corrected MC contents for *Microcystis* cells recruited at each date and in both media by considering only *Microcystis* with *mcyB* genotype as potential MC carriers. The pattern of these corrected MC contents was as follows : they were quite high in the first two days of our experiment, then they dropped to low values from day 3 to day 6 before increasing and reaching high values that were maintained until the end of the experiment (Figure 37). The superimposition of this pattern and the recruitment rate dynamics of *mcyB* genotypes highlighted a strong inverse and significant relationship (confirmed by Spearman correlation test, for MC+: ρ = -0.648, p = 0.049; for MC-: ρ = -0.830, p = 0.006) between the quantity of potentially toxic *Microcystis* recruited and their MC content in both media (Figure 37).

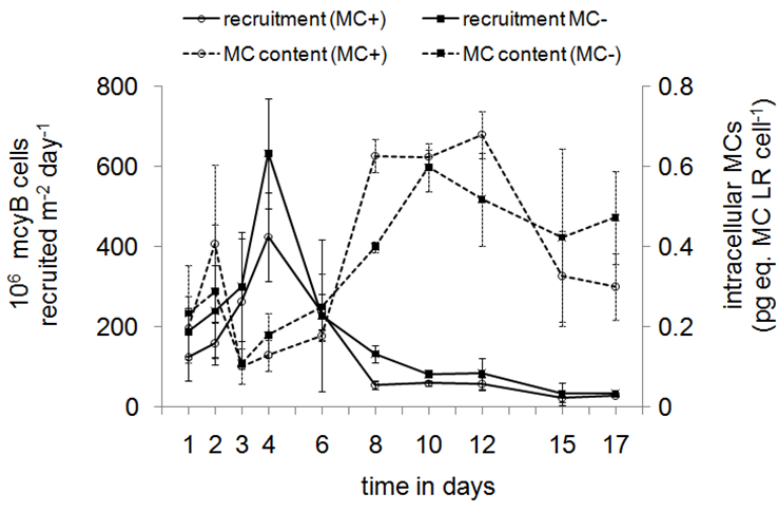


Figure 37: Recruitment dynamics (black line) and microcystin content (dash line) of recruited *mcyB* genotypes *Microcystis* cells in both MC+ medium (white circles) and control medium (black squares). Mean values (±S.D.) for the three microcosms of each medium.

DISCUSSION

As far as we are aware, this study is the first *in vitro* experiment to investigate the link between recruited *Microcystis,* their colony size, the proportion of potentially MC-producing cells present and their MC content during the benthic recruitment process by a direct comparison of recruited *Microcystis* and the initial benthic population. *In situ* studies face considerable difficulties in attempting to compare benthic and recruited *Microcystis* originating from the same initial population because of horizontal transport within the water column, and natural benthic heterogeneity. An *in vitro* study is helpful, because it makes it easier to track the fate of benthic *Microcystis* colonies after their recruitment. Rengefors *et al.* (2004) conducted a similar *in vitro* experiment, and reported far lower recruitment rates than this study, with a maximum of about 6×10^6 cells of *Microcystis botrys* recruited per m^2 day^{-1}, *i. e.* only about one hundredth of what we found. This difference could be attributable to lower initial benthic abundance, but the authors did not report this. With regard to *in situ* benthic recruitment, Brunberg & Blomqvist (2003) also reported lower recruitment rates of about 9×10^6 cells m^{-2} during August, and indeed they recorded far lower benthic abundances, with a maximum of 3.2×10^9 cells m^{-2} before recruitment, whereas in our study we had about 9.8×10^{12} cells m^{-2} at the beginning of the experiment.

In addition to these high recruitment rates, the comparison of benthic and recruited *Microcystis* allowed us to advance important features of *Microcystis* recruitment.

Differences in microcystin content

Our results clearly show that recruited *Microcystis* contain more MCs than the initial benthic population. Even if these cellular quotas seemed to be rather high, with an average value of 0.28 pg $cell^{-1}$, they were similar to those reported in previous studies, either for benthic cells (0.3 pg $cell^{-1}$ for *Microcystis* colonies isolated from surface sediments by Latour *et al.* (2007), and from 0.020 to 0.105 pg $cell^{-1}$ for benthic *Microcystis* colonies studied by Ihle *et al.* (2005)), or for planktonic colonies (Kurmayer *et al.* 2003 reported concentrations ranging from almost 0 to about 0.150 pg $cell^{-1}$ in planktonic colonies of various sizes).

The difference between benthic and recruited colonies could be the result of the synthesis of MCs in the planktonic phase just after the recruitment, or in the sediment just before the recruitment. The increase in total intracellular MC in the sediment observed between the beginning and the end of this experiment tends to support that latter hypothesis, but final mean

MC cellular quotas in the sediment are still much lower than in recruited cyanobacteria. Thus, we consider this difference in toxicity between benthic and recruited colonies to result from preferential selection of the most toxic colonies during the recruitment process. This is in agreement with the decrease in MC cellular quotas of small benthic colonies of *Microcystis* between the beginning and the end of the experiment, which could correspond to the recruitment of the most toxic cyanobacteria, then decreasing the mean MC cellular quotas of remaining ones.

During our experiment, the MC cellular quotas of recruited *Microcystis* exhibited a time pattern that cannot be explained by variations in the proportions of *mcyB* genotypes. Since the ratio of *mcyB* genotypes to the number of PC genotypes in toxic strains is unity (Kurmayer & Kutzenberger 2003), we assume that the MC contents and the proportions of potentially toxic genotypes in recruited subpopulations evolved independently. The lack of correlation between MC content and the occurrence of the *mcyB* gene could be explained by the presence of an incomplete *mcyB* operon, leading to an overestimation of the proportion of potential MC-producer genotypes, as previously suggested by Hotto *et al.* (2008). However, even allowing for possible overestimation, the dynamics of *mcyB* genotypes was too different from those of the MC content to be responsible for the changes in MC cellular quotas. Thus, differences in MC content recorded in the recruited subpopulations and between recruited and benthic *Microcystis* cells could be the result of physiological changes, leading to the regulation of MC synthesis. Indeed, since Long *et al.* (2001) reported a maximum MC-producing rate equivalent to 0.156 pg $cell^{-1}$ day^{-1} of MC-LR, we cannot rule out the possibility of *de novo* synthesis in the recruited colonies of our experiment, the difference between benthic and planktonic cells being about 0.239 eq. pg MC-LR $cell^{-1}$. However, the maximum production rate recorded by Long *et al.* (2001) corresponded to a maximum growth rate obtained in light and with a temperature of 26 °C, favorable conditions for cyanobacterial growth. Temperature and light conditions were far less favorable in our experiment, which was carried out in darkness at 8 °C, thus making such a high level of synthesis unlikely. Moreover, light and temperature, which are two important factors known to influence *Microcystis* growth rate and MC production (Izydorczyk *et al.* 2008; Deblois & Juneau 2010), were the same for both the benthic and planktonic colonies, so there was no reason to believe that MC synthesis would be greater in recruited than in benthic cells. Therefore, we consider MC content differences between recruited subpopulations to be the result of selection of benthic subpopulations with differing MC contents (but still more toxic than

benthic ones), rather than the result of various rates of MC production. The reason for the selection of such different subpopulations during this experiment is unclear, and calls for further investigation. However, recruitment rate dynamics may provide part of the explanation.

Time pattern of recruitment rates

The negative correlation between the interval of two sampling dates and the recruitment rates indicate that recruitment was almost entirely the result of the resuspension of *Microcystis* colonies by periodic artificial mixing. This is consistent with previous *in situ* and *in vitro* studies showing the importance of sediment mixing for *Microcystis* recruitment in shallow areas (Brunberg & Blomqvist 2003; Rengefors *et al.* 2004; Verspagen *et al.* 2004; Ihle *et al.* 2005). The basal recruitment rate, which remained fairly constant throughout the experiment, was associated with high MC cellular quotas in recruited *Microcystis*, thus supporting the hypothesis that MCs are involved in a passive recruitment process of this type.

Furthermore, recruitment rates increased over time from the beginning of the experiment until the 4th sampling day whereas the intervals between the samplings were the same. For this reason we suggest that the recruitment peak could be the result of the recruitment of a different benthic subpopulation that leaves the sediments independently of the mixing events. The lag time of 4 days between the beginning of our experiment and the recruitment peak seems to indicate the resumption of an active physiological process after an acclimatization time following the increase in temperature from 4 to 8 °C; the new subpopulation could therefore have left the sediments while becoming lighter, by consuming heavy carbon reserves (*e.g.* Deacon & Walsby 1990; Visser *et al.* 1995; Verspagen *et al.* 2004). The low MC contents of recruited cells that were observed during the recruitment peak support our hypothesis of the recruitment of a different subpopulation, which can exit the sediment and be less toxic than passively recruited cyanobacteria.

Influence of the colony size on *Microcystis* recruitment

Even though high MC content seems to be helpful in the recruitment process, the increase in mean MC content of the overall benthic population of *Microcystis* suggests that it is not sufficient in itself, since many toxic colonies were not recruited during our experiment. *Microcystis* recruitment must then also be related to other intrinsic parameters, which could include the size of the colonies. Indeed, MC synthesis in the sediments, supported by the rise of

total intracellular MCs of benthic cells between the beginning and the end of the experiment, seemed to be specific to colonies measuring more than 160 µm. In addition, our study highlights the preferential recruitment of small *Microcystis* colonies with 97% of recruited colonies measuring less than 160 µm, and with a smaller mean size than those in the initial benthic population. This result is in agreement with the hypothesis of Reynolds *et al.* (1981), who suggested that small colonies are involved in the recruitment phase, and also with the work of Latour (2002) and Kurmayer *et al.* (2003) who reported a greater decrease of small benthic colonies than of larger colonies during the recruitment period, and the relative dominance of small colonies during early planktonic proliferation respectively. The small-sized colonies of *Microcystis* could thus be at an advantage during the recruitment process.

However in this experiment, the small size of a colony did not seem to be sufficient to ensure its recruitment, since small colonies were still present in the sediments at the end of the experiment. Several authors have shown that some benthic colonies of *Microcystis* could remain buoyant during the benthic phase of the annual life cycle (after their isolation from the sediment; Tsujimura *et al.* 2000; Verspagen *et al.* 2004), thus enabling their recruitment. With our experimental design, we assume that we collected all the buoyant benthic colonies. These buoyant benthic colonies are also smaller and more toxic than the mean of the benthic population, which leads us to hypothesize that the size and the cellular quotas of *Microcystis* colonies may both be important factors in regulating the recruitment of this cyanobacterium from the sediments. In the same way, Sabart (2009) showed, *in situ*, that smaller colonies of *Microcystis* (<50 µm) in the water column had higher MC contents than larger ones and were better adapted to cope with unfavorable conditions for growth. This finding combined with our data suggests that these small colonies with higher MC content play an important role in the annual life cycle of *Microcystis* and in population sustainability.

Influence of added purified MCs

We now turn to the question of whether the higher MC cellular quotas observed in recruited toxic *Microcystis* could be an advantage during the recruitment process or in the early stages of planktonic growth. The toxicity of these cells in the water after their recruitment could be advantageous regarding predation limitation and competition with other planktonic species (Jang *et al.* 2004; Rantala *et al.* 2004; Babica *et al.* 2006; Guo & Xie 2006), and could also act as

an extracellular messenger (Schatz *et al.* 2007). However, the role of MCs in competition implies the leakage of the toxins in the water, and MCs are in fact found in the water mainly when cell lysis occur (Watanabe *et al.* 1992). Furthermore, concomitantly to the recruitment process, Ihle *et al.* (2005) also found free extracellular MCs in the water, thus supporting the hypothesis of a competitive advantage for the surviving *Microcystis*. This is the situation we wanted to reproduce by adding purified MC-LR to the microcosms in order to investigate the influence of free extracellular toxins on *Microcystis* recruitment. Schatz *et al.* (2007) showed that adding from 10 to 50 µg L^{-1} of purified MC-LR to a *Microcystis* culture could lead to cell lysis and to increased MC production in surviving cells. Neither of these effects was observed in our study, but we used a much smaller MC-LR concentration of 1 µg L^{-1}. Despite this, the use of this small concentration of MC-LR allowed us to highlight a set of tendencies in the recruitment process as a result of adding MCs. First, the addition of MC-LR tended to decrease both recruitment rates and the disappearance of benthic *Microcystis* colonies. Moreover, the limitation of the recruitment tended to be specific to MC producers, as the decrease of recruited *Microcystis* in MC+ medium was far greater for the *mcyB* subpopulation than for the non-toxic subpopulation. All these findings support the hypothesis of an extracellular messenger role proposed for the microcystins by Schatz *et al.* (2007), but further studies are needed to confirm this hypothesis.

CONCLUSION

In this experiment, we observed the selection of various benthic subpopulations of *Microcystis* as a result of the recruitment process. Though all recruited *Microcystis* were not potentially toxic, the mean cellular MC content was still higher in recruited than in benthic subpopulations, and recruited colonies were smaller than benthic ones. This suggests that both intracellular MC content and colony size could be major intrinsic regulators of *Microcystis* benthic recruitment, the function of MCs probably being assumed by other molecules in non-toxic cells. However, the reason for this selection during the recruitment of small and very toxic colonies among the benthic toxic population during recruitment remains unclear.

Assuming that to be recruited, *Microcystis* colonies have to get lighter or to reduce their density so as to increase their buoyancy, and since recruited *Microcystis* are smaller and, when toxic, contain much more MC than the mean benthic value, we suggest that these two parameters could reflect greater lightening of the colonies during their resuspension. Verspagen *et al.* (2004) proposed that the resuspension of benthic *Microcystis* by water mixing could eliminate sediment particles attached to the colonies, thus allowing them to recover sufficient buoyancy to remain in the water column. Moreover, these authors showed differences in mucilage composition that lead to differing sediment particle aggregation (Verspagen *et al.* 2006). Zilliges *et al.* (2008) reported increased aggregation between cultured *Microcystis* cells in a microcystin-deficient mutant, which suggests that the composition of *Microcystis* mucilage and its stickiness may vary depending on the toxicity, or more generally depending on the genotype of the strains. We therefore propose that the small size and the presence of high amounts of MCs in recruited *Microcystis* could be an indicator of enhanced buoyancy of the colonies as a result of the decreased stickiness of their mucilage, which in turn would favour the detachment of adhering particles and promote their recruitment. Further investigations are now needed to confirm these observations *in situ* and to shed light on the fate of newly recruited *Microcystis* colonies in the water column.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank François Enault for his help on the statistical analysis, and Monika Ghosh for improving the English text. The comments of the three anonymous reviewers were greatly appreciated.

II - Influence des interactions eau-sédiments sur la diversité génétique et le potentiel toxique des populations benthiques et planctoniques de *Microcystis*

Préambule

Le recrutement préférentiel des cellules les plus riches en microcystine parmi la sous-population benthique potentiellement toxique, démontré dans l'article précédent, est en faveur de l'implication probable des microcystines dans le recrutement des cellules capables de les produire. Il apparaît alors nécessaire de vérifier si cette situation est retrouvée en milieu naturel, mais aussi de compléter cette étude par l'analyse des proportions de cellules potentiellement toxiques dans les compartiments benthique et planctonique.

De plus, si la phase de vie benthique peut potentiellement conditionner une efflorescence planctonique via le recrutement benthique, la réciproque est également vraie, via la sédimentation. Néanmoins, l'influence de ces interactions entre la phase planctonique et la phase benthique sur l'évolution du potentiel toxique et de la diversité génétique des populations naturelles de *Microcystis* présentes dans chaque compartiment n'a pas encore été décrite.

Dans ce contexte, la dernière étude présentée dans ce manuscrit a consisté en un suivi temporel d'une sous-population benthique située en surface des sédiments et de la sous-population planctonique se développant immédiatement au-dessus. Au cours de ce suivi, une attention particulière a été portée à l'évolution du potentiel toxique et de la diversité génétique dans ces deux compartiments. Cette approche a été choisie dans le but de caractériser autant que possible les interactions pouvant intervenir tout au long d'une prolifération planctonique, et d'étudier leur influence sur la dynamique des deux sous-populations.

ARTICLE N° 5 :

Shifts in the genotypic composition and the toxicity of benthic and planktonic populations of *Microcystis* can be induced by benthic-pelagic transfers and horizontal transports

Benjamin MISSON[a,b], Marion SABART[a,b], Emilie, DUFFAUD[a,b], Christian AMBLARD[a,b] and Delphine LATOUR[a,b].

[a] Clermont Université, Université Blaise Pascal, LMGE, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France
[b] CNRS, UMR 6023, LMGE, BP 80026, F-63171 AUBIERE Cedex, France

Running title: Influence of benthic-pelagic transfers and horizontal transports

Article en préparation

INTRODUCTION

Cyanobacterial blooms are of ecological and sanitary concern, mainly because of the various toxic compounds which can be produced by cyanobacteria. *Microcystis* is one of the most widespread cyanobacterial genera, and represents a serious threat for recreational uses and drinking water catchment because it is able to synthesize microcystin (MC), a potent hepatotoxin: (Carmichael 1992, Codd et al. 2005). The biological function of the MC remains unclear, and yet the prediction of the toxicity of *Microcystis* blooms is beyond our reach in spite of the numerous studies dealing with MC production by toxic cells (*e.g.* Kaebernick *et al.* 2000; Oh *et al.* 2000; Wiedner *et al.* 2003; Downing *et al.* 2005a). Globally, the variability of microcystin production within *Microcystis* blooms is thought to be the result of, on one hand, various MC production rates, which would mainly be related to the growth rate of the cells, and, on the other hand, the succession of various genotypes, potentially toxic or non-toxic, within a bloom (Kardinaal & Visser 2005). Now, although fitness-related differences between toxic and non-toxic cells have been supposed (Kardinaal *et al.* 2007a; Briand *et al.* 2009), the factors driving this succession are yet to be determined.

The planktonic proliferations of *Microcystis* are known to be influenced by the benthic life stage of this meroplanktonic cyanobacterium. Indeed, the benthic and the planktonic phase of *Microcystis* are linked through the benthic recruitment and the sedimentation processes (Reynolds *et al.* 1981; Takamura *et al.* 1984). Recent findings seem to indicate that such interactions may actually not be restricted to the spring recruitment and the autumnal sedimentation. Indeed, Verspagen *et al.* (2005) proposed, from abundance measurements in both compartments and by using recruitment and sedimentation traps, that interactions between the planktonic and the benthic phases occurred all along the planktonic proliferation period, and were maximal during the summer months. Now, the benthic recruitment process has recently been proved to potentially condition the planktonic proliferation through the preferential selection of toxic *Microcystis* (Schöne *et al.* 2010; Misson *et al.* 2011). In parallel, the sedimentation of particulate MCs during a bloom has been observed and proposed as a major destination for these toxins (Wörmer *et al.* 2011), although the direct link with the sedimentation of *Microcystis* colonies has not been proved. More generally, no data is available concerning the evolution of the genetic diversity during the interactions between the benthic and the planktonic phases. In order

to better understand the driving forces of the major overturns in both genotypic diversity and toxic potential during *Microcystis* blooms, a better knowledge on the extent to which such a benthic-pelagic interactions can affect the dynamics of both the genetic diversity and the toxic potential of a population of *Microcystis* is necessary.

This is why we monitored in parallel the benthic and the planktonic subpopulations of *Microcystis* in the Grangent reservoir (France) during the whole duration of a planktonic proliferation, from early summer to late autumn. The dynamics of cell concentrations and of toxic potential (*i.e.* both the proportions of potentially toxic cells and the MC cellular quotas) were examined in both compartments. The genotypic diversity of 16S-23S rRNA ITS was also assessed in both sub-populations in order to better qualify and quantify the interactions that could be observed.

MATERIAL AND METHODS

Site description

The Grangent reservoir is located in the East of the Massif Central (France), measures 21 km in length and presents a maximal depth of 50 m near the dam wall. This artificial freshwater lake is well known for its late summer blooms of *Microcystis*, which are regularly observed since the 1980's, and which are known to sediment massively in the deepest parts of the reservoir.

The sampling site was settled back from the Loire riverbed (45°26'57" N, 04°15'40" E), where the maximal depth was 22 m. Sediment and water samplings were carried out from June to November 2009. The samplings consisted in 20 L of surface water (sampled at -0.5 m) and in sediment coring (with a UWITEC corer, UWITEC devices, Mondsee, Austria).

Processing the samples

Surface water was filtrated on a 25 µm nylon mesh in order to concentrate *Microcystis* colonies, which were then suspended in a determined volume of water. Aliquot of 1.5 mL of this suspension was filtered on 0.2 µm polycarbonate filters (GTTP filters, Millipore) and stored at -20°C prior to DNA extraction. Other 960 µL of the same suspension were fixed with 40 µL of 25% glutaraldehyde (1% final) for future cell enumeration. Finally, 500 µL aliquots were diluted in 1.5 mL of 100% methanol (75% final) and stored at -20°C prior to microcystin extraction.

The core opening was performed in the lab. The sediment was sampled from 0 to 2cm under the sediment surface, it was homogenized and 8 mL were diluted in 90 mL of water and 45 mL of Ludox TM 50 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). *Microcystis* colonies were then extracted by centrifuging as previously described (Misson *et al.* 2011). They were collected in the supernatant, concentrated and gently rinsed on a 25µm nylon mesh. *Microcystis* colonies thereafter freed from the mineral matter were finally suspended in a determined volume of water. After that, the same protocol as described for planktonic *Microcystis* was used for fixation and storage.

Microcystis cell enumeration

The 1mL aliquots of glutaraldehyde-fixed *Microcystis* colonies were submitted to low-power ultrasonic vibration (20 kHz) in order to dissociate the colonial structures (Reynolds & Jarowski 1978; Latour *et al.* 2007). Isolated cells were then enumerated by using a Thoma

counting chamber under a microscope at x400 magnifications (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Nucleic acids extraction and cloning-sequencing of the ITS

DNA was extracted from the filtered aliquots by a chemical lysis and a phenol-chloroform-based extraction, as described by (Humbert & Le 2001). Purified DNA was then stored in water at -20°C until future analysis.

To improve our understanding of the benthic-pelagic coupling within the population of *Microcystis*, we focused our cloning-sequencing on the beginning and the end of the planktonic proliferation, when the benthic-planktonic interactions are supposed to be the highest. The 16S-23S ITS region was amplified from these extracted DNA by PCR, using the forward primer 5'-TGTAAAACGACGGCCAGTCCATGGAAG(CT)TGGTCA(CT)G-3' and the reverse primer 5'-CTCTGTGTGCCTAGGTATCC-3'. The fragment size of the amplified sequence (around 360 bp) was checked by electrophoresis on a 1% agarose gel, prior to clone them into pGEM-T vector system II (Promega, Charbonnières, France). The presence of the complete sequence in white colonies was assessed by PCR on colony and electrophoresis as described earlier. From 38 to 48 randomly chosen and checked white colonies were then sequenced by GATC Biotech (Mulhouse, France).

Estimation of the proportions of potentially toxic cells

The proportions of *mcyB*+ cells were estimated by performing multiplex quantitative PCR on DNA extracted as described above. The quantification was based on the ΔCt method adapted for *Microcystis* (Briand *et al*. 2009), as described previously (Misson *et al.* 2011). For the data analysis, fluorescence thresholds were set manually to 51 (relative fluorescence) for PC gene amplification, and to 44 for mcyB amplification for all the samples. The Ct number for both the target genes was determined using 8 MC-producing *Microcystis* strains (PCC 7806, PCC 7813, PCC 7820, PCC 7941, PCC9354, PCC 9355, PCC 9443 and PCC 9808) as external standards, and ΔCt was estimated as the difference between Ct for the PC gene and Ct for the *mcyB* gene. The mean ΔCt was 4.17 ± 0.45, corresponding to 100% toxic cells. The relative proportion of *mcyB*+ genotypes was calculated using the theoretical equation relating the proportion of *mcyB*+ genotypes to the ΔCt: $y = 3.32 \log(x) - 2.4727$, where y is the ΔCt and x is the percentage of the

mcyB+ genotype strains. This equation has been experimentally validated using axenic *Microcystis* strains from the PCC, as described by (Briand *et al*. 2009).

Intracellular microcystin quantification

The 2 mL aliquots of *Microcystis* suspension stored in 75% MeOH were used for a double MC extraction by ultrasonic vibration, as previously described (Misson *et al.* 2011).

Extracted MCs were quantified by protein phosphatase 2a inhibition assays as proposed by An & Carmichael (1994) and modified by Rivasseau *et al.* (1999). Cell counts and proportions of *mcyB*+ cells were then used to calculate the specific MC content of *mcyB*+ cells, which will further be expressed as femtograms of equivalent MC-LR per cell (fg eq MC-LR.cell^{-1}).

Data analysis

Analyses of variance (ANOVA), and the corresponding Tukey's post-hoc tests were performed for abundance, proportions of *mcyB*+ cells and MC cellular quotas data with XLSTAT (version 2010.3.03, Addinsoft, Paris, France).

The ITS sequences were aligned using Genedoc (v2.7.000, (Nicholas & H.B. 1997)), and rarefaction curves for each sample were constructed using Past (v2.08; Hammer *et al.* 2001). Gene diversity, nucleotide diversity, Shannon indexes and Chaos 1 indexes were calculated with EstimateS (v8.0; Colwell 2006). Phylogenetic relationships between the cloned sequences were studied by using TCS (v1.21; Clement *et al.* 2000). Hierarchical clustering analysis (HCA) was performed between the sequence libraries of each sample, by establishing a Euclidian distance matrix and constructing the corresponding dendrogram with the Ward method thanks to XLSTAT.

RESULTS

Microcystis population dynamics

The concentration of benthic *Microcystis* cells at the sediment surface (0-2 cm) was low at the beginning of the survey (0.09 x 10^6 cells.mL^{-1} recorded on June 8th). A three hundred fold increase in benthic cells concentration was observed between June 15th and July 15th, with a concentration of about 31 x 10^6 cells.ml^{-1} reached on July 15th. After that, the high sedimentation rate (on average 2.2 cm per month) led to the fast burying of the colonies (checked by cells concentration in the underlying sediment layer, data not shown), so that the benthic cells concentration at the sediment surface dropped until September to reach about 4.3 x 10^6 cells.mL^{-1}. Then it remained quite constant during the fall (figure 38a).

The first significant growth planktonic of *Microcystis* was observed in June, with 0.87 x 10^6 cell.L^{-1} counted on June 15th. A punctual increase was recorded on June 29th, and the maximal concentration of 21 x 10^6 cell.L^{-1} was observed on August 24th. Then we observed a sharp decrease to less than 0.73 x 10^6 cell.L^{-1}in early October (figure 38a).

Genetic diversity

From abundance data, we decided to perform genetic diversity analyses in both the benthic and the planktonic compartments between June 15th and July 15th, and during the planktonic decrease, from August 24th to November 3rd.

From the 479 ITS sequences obtained, we recorded 183 different genotypes by considering that sequences sharing 100% identity belonged to the same genotype. The mean genotypic diversity measured by the Shannon index, the mean potential richness estimated by Chao 1 index, the mean gene diversity and the mean nucleotide diversity were similar in the sediment and in the water (Table 7). The phylogenetic relationships between the genotypes did not highlight any genetic differentiation, depending either on the origin of the sequences (*i.e.* the plankton or the benthos) or on the date on which they were present (figure 39). In the same way, by considering their respective genotypic composition, benthic and planktonic sub-populations could hardly be distinguished from each other (figure 40).

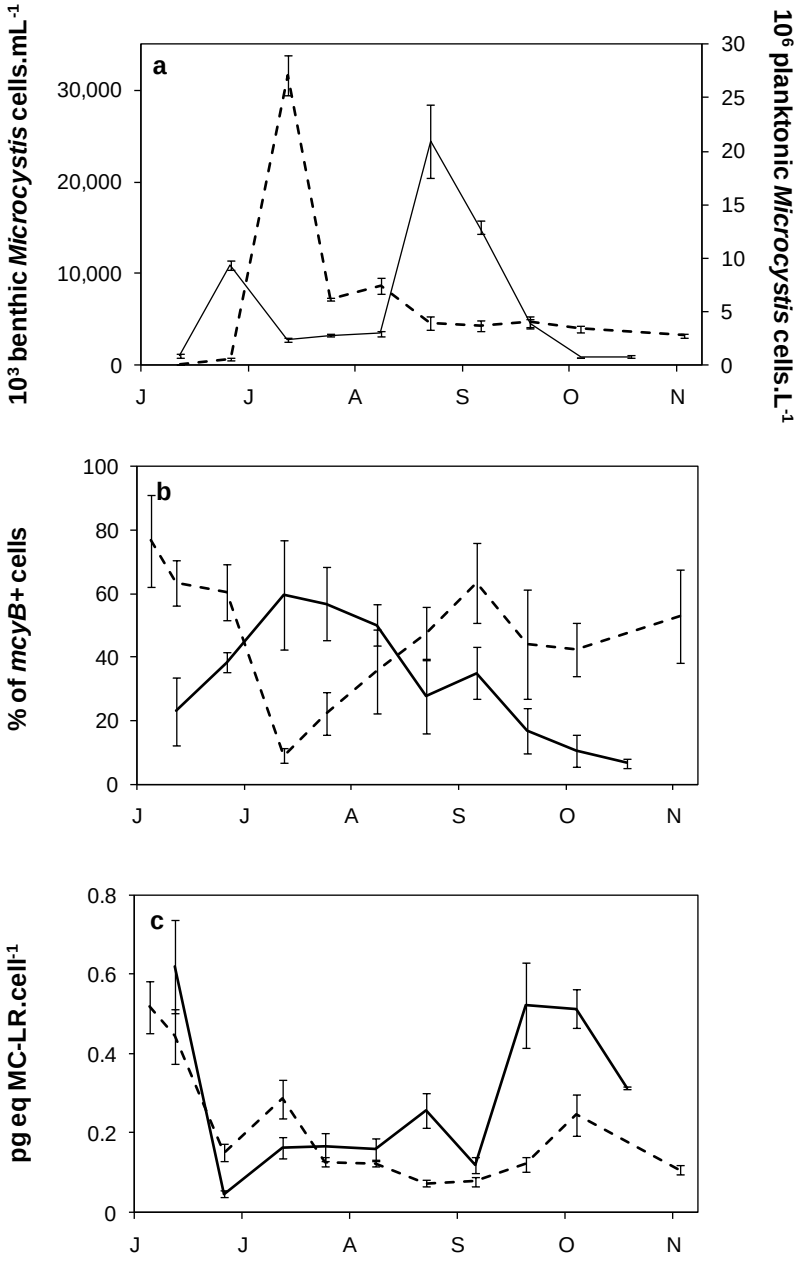
Moreover, the genotypic composition of each sub-population was characterized by great temporal changes, especially during the growth phase of the planktonic sub-population. As

demonstrated by the rarefaction curves (figure 41) and the potential richness, our clone libraries were incomplete at varying degrees. For this reason, future interpretations on genotypic composition variations will only focus on the 8 most abundant genotypes (*i.e.* each representing more than 10% of the sequences in at least one sample).

Table 7. Gene and nucleotide diversity recorded in benthic and planktonic samples. The gene diversity and the nucleotide diversity were estimated using the population genetic software ARLEQUIN version3.1 (Excoffier et al., 2005). The Shannon index Chao1 estimator were calculated for each sample using EstimateS 8.0 (Colwell, 2006). Asterisks represent statistical differences between mean values of benthic and planktonic sub-populations: *** for $p < 0.001$, ** for $p < 0.01$, * for $p < 0.05$.

Samples	Number of sequences	Number of genotypes	Gene diversity	Nucleotide diversity	Shannon Index	Chao 1 index
Sediment						
06/15	42	18	0.91 ± 0.03	0.030 ± 0.015	2.5	29 (21 - 62)
06/29	38	25	0.97 ± 0.01	0.050 ± 0.025	3.1	48 (32 – 98)
07/15	46	20	0.81 ± 0.06	0.029 ± 0.015	2.3	33 (24 – 68)
09/07	46	30	0.98 ± 0.01	0.050 ± 0.025	3.3	72 (44 – 158)
10/05	39	22	0.95 ± 0.02	0.047 ± 0.024	2.9	40 (27 – 87)
11/03	48	21	0.92 ± 0.02	0.050 ± 0.025	2.8	27 (22 – 45)
Mean	**43.2 ± 4.1**	**22.7 ± 4.3**	**0.92 ± 0.06**	**0.043 ± 0.010**	**2.8 ± 0.4**	**41.4 ± 16.8**
Water						
06/15	46	17	0.66 ± 0.08	0.016 ± 0.009	1.8	37 (22 – 90)
06/29	40	18	0.89 ± 0.04	0.045 ± 0.023	2.4	57 (28 – 169)
07/15	44	18	0.80 ± 0.06	0.034 ± 0.017	2.2	29 (21 – 62)
08/24	45	15	0.89 ± 0.02	0.026 ± 0.013	2.4	18 (15 – 30)
09/21	45	20	0.93 ± 0.02	0.043 ± 0.022	2.7	34 (23 – 62)
Mean	**44.0 ± 2.3**	**17.6 ± 4.3**	**0.83 ± 0.11**	**0.033 ± 0.012**	**2.3 ± 0.3 ***	**34.8 ± 14.4**

Figure 38: Temporal variations in *Microcystis* cells concentrations (a), proportions of potentially toxic cells (b), and MC content of potentially toxic cells (c) in the sediment (dashed lines) and in the water (solid lines).



Among these 8 dominant genotypes, five were found in both planktonic and benthic samples (they will so further be called "ubiquitous genotypes" UG1 to UG5; figure 40). The planktonic early growth period was characterized by the dominance of the same ubiquitous genotypes in both compartments. Indeed, UG1 was always present in significant proportions in the water from June 15th to August 24th, and it slightly dominated the benthic sub-population on June 29th. UG2 and UG4 also appeared to be major benthic genotypes on June 15th and major planktonic genotypes two weeks later on June 29th (figure 40). The closeness of the two sub-populations from September to November, as highlighted by the HCA, corresponded to similar and relatively high proportions of UG2, UG3 and UG4 in all the corresponding samples (figure 40).

Two other dominant genotypes were only encountered in the sediment and will further be called "benthic genotypes" BG1 and BG2. BG1 was present in every benthic sample, except on July 15th. BG2 was largely dominant on July 15th, when the major peak of benthic cells concentration was recorded, but it was never encountered in any other sample (figure 40).

The last remaining dominant genotype was exclusively observed in the water and will further be called "planktonic genotype" (PG). It was more precisely observed in only one sample, when the planktonic cell concentration was maximal, on August 24th (figure 40).

Proportions of mcyB+ cells

In the sediment, the proportion of *mcyB*+ cells varied between 9 and 77%, with first a period of high values (above 60%) from June 8th to June 29th. Then a significant decrease was recorded on July 15th (one way ANOVA, Tukey post-hoc tests, $P < 0.05$; figure 38b) to reach the lowest value of 9%, concomitantly to the peak in benthic cell abundance. From July 15th to September 7th, the proportions of *mcyB*+ cells increased to come back to high values, maintaining around 50% until the end of the survey (one way ANOVA, Tukey post-hoc tests, $P > 0.05$; figure 38b).

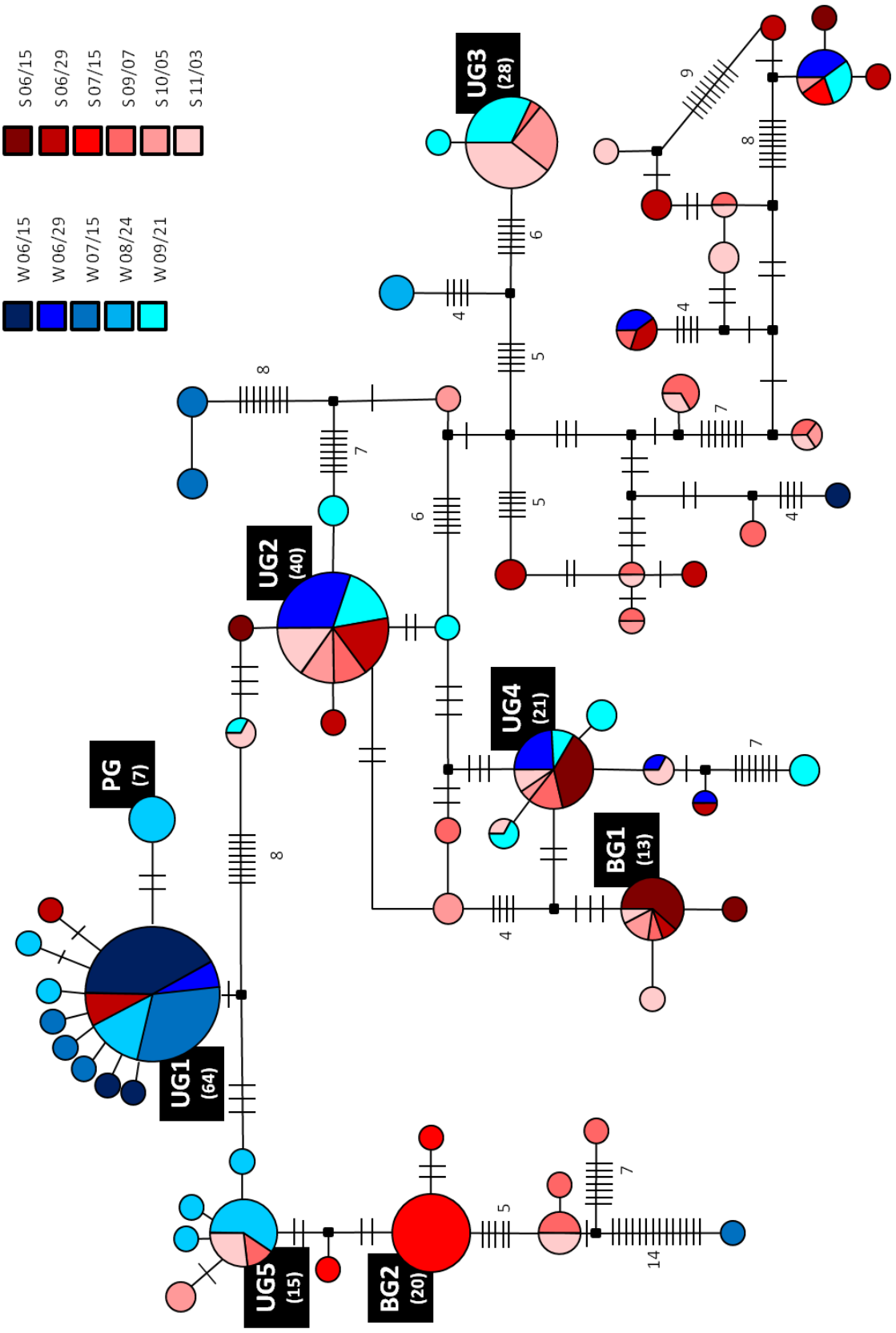


Figure 39. Phylogenetic relationships between ITS genotypes collected in the water and/or in the sediment of Lake Grangent.

Maximum parsimony network performed using the TCS v1.21 program (Clement et al., 2000) on the *Microcystis* ITS sequences found at least twice in our samples. The names of the major genotypes are indicated inside black squares, with the number of sequences obtained for each of them into brackets. The size of the circles is proportional to the number of sequences in each genotype. The sampling date and the origin of the sequence (W for water samples and S for sediment samples) are color-coded as indicated in the legend. The number of nucleotide differences between two genotypes is the sum of steps on the shortest connecting path, summing cross-hatches, intervening genotypes and junction nodes (small squares).

UG 1-5: Ubiquitous genotypes, BG 1-2: Benthic genotypes, PG: Planktonic genotype.

The planktonic sub-population exhibited proportions of *mcyB*+ cells within a similar range, from 22 to 60 %. During the planktonic growth period (i.e. from June 15th to August 24th), these proportions appeared to evolve in the opposite way than in the sediment, with a rapid and wide increase between June 15th and July 15th, and then a slow but regular decrease (one way ANOVA, Tukey post-hoc tests, $P < 0.05$; figure 38b). After that, during the decrease of planktonic abundance, the proportions of *mcyB*+ cells in the water evolved very similarly to what observed in the sediment.

Microcystin cellular quotas

The MC cellular content of *mcyB*+ benthic *Microcystis* greatly varied during our survey. It was first high in early June, maintaining around 0.5 pg eq MC-LR.cell^{-1} (figure 38c). Then it dropped to significantly lower values (one way ANOVA, Tukey post-hoc tests, $P < 10^{-4}$) when the abundance of benthic cells increased and the genotypic composition varied for the first time, with about 0.15 pg eq MC-LR.cell^{-1} recorded on June 29th.From this date, it remained at similar levels until the end of the monitoring (one way ANOVA, Tukey post-hoc tests, $P > 0.05$; figure 38c).

In the planktonic phase, the MC cellular quotas of *mcyB*+ cells exhibited a similar pattern of variation, with the highest values being observed on June 15th (0.62 pg eq MC-LR.cell^{-1}). It was then followed by a sudden and significant decrease (one way ANOVA, Tukey post-hoc test, $P < 10^{-4}$) to the lowest value of the planktonic survey, with only 0.46 pg eq MC-LR.cell^{-1} recorded on June 29th (figure 38c). This decrease occurred in parallel to the increase in the proportion of *mcyB*+ cells, to the increase in the concentration of planktonic cells and to the changes in the genotypic composition recorded (figure 38 and 40). Then, MC cellular quotas of *mcyB*+ cells remained low until early September, before to increase significantly (one way ANOVA, Tukey post-hoc tests, $P < 10^{-4}$).

Figure 40: Temporal changes in the proportions of ITS genotypes in (a) the planktonic subpopulation and (b) the benthic subpopulation.

Dominant genotypes (*i.e.* representing more than 10% of the population in at least one sample) are colored, minor genotypes (*i.e.* < 10% of the population in every samples) encountered in several samples are filled with patterns. Minor unique genotypes (*i.e.* encountered in only one sample) are not displayed. Changes in cell abundances are represented by the dashed black line (right axis)

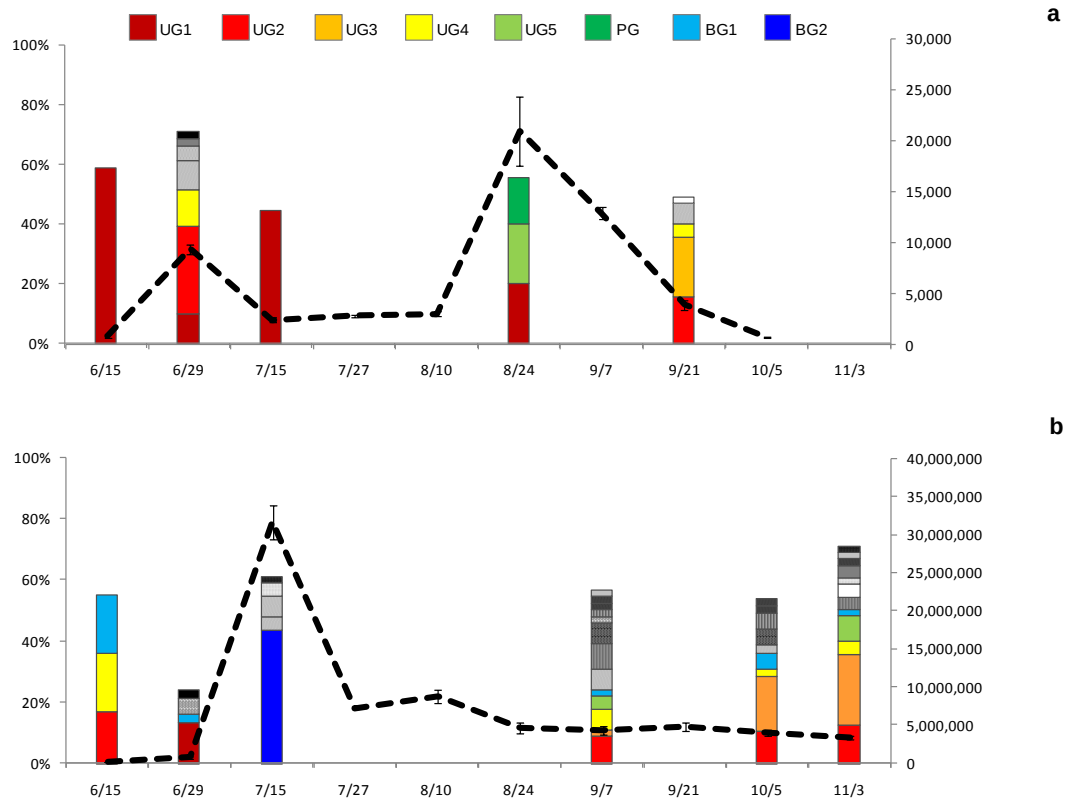
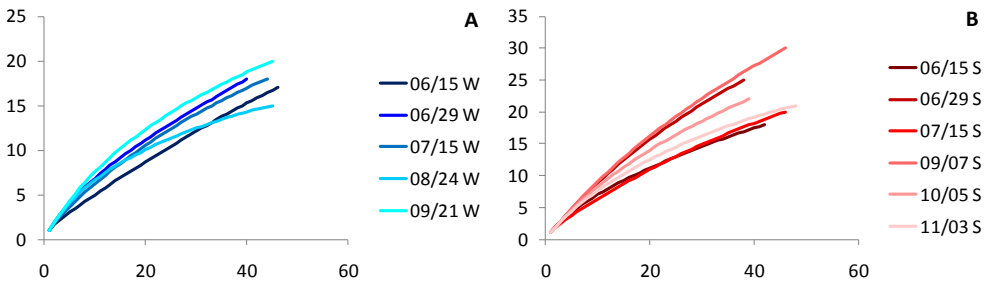


Figure 41: Rarefaction curves obtained for each sample using the PAST software v1.68 (Hammer et al., 2001).



DISCUSSION

Genotypic diversity and population's dynamics of *Microcystis*

To our knowledge, this study is actually the first to compare the genotypic composition of a benthic and a planktonic sub-population of *Microcystis*, over a planktonic proliferation. Only a few studies dealt with *Microcystis* genetic diversity in the sediment, and they were either punctual (Humbert *et al.* 2005; Rinta-Kanto *et al.* 2009) or based on methods of lower resolution like fingerprinting (Kim *et al.* 2010). Our results tend to confirm that there might not be any ecotype (benthic vs. planktonic) in the *Microcystis* population of the Grangent reservoir as previously proposed by Humbert *et al.* (2005), since 5 over 8 dominant genotypes encountered in this study were common to both compartments. However, more extensive studies are needed to test this hypothesis with more accuracy. More recently, Kim *et al.* (2010) observed a remarkable stability of the genotypic composition of the benthic population of a shallow part of a Korean reservoir, even though the planktonic subpopulation presented important variations. On the contrary, during our survey we observed high variations of genotypic composition in the sediment, as well as in the water. This observation, associated with the presence of most of the dominant genotypes in both compartments, points out the importance of benthic-planktonic interactions on the dynamics of *Microcystis* populations, even in quite deep zones (*i.e.* more than 20m in our case).

According to the annual life cycle of *Microcystis*, such benthic-pelagic coupling results from either benthic recruitment or sedimentation processes, which are thought to occur mainly in spring and fall respectively. During the planktonic proliferation we studied, benthic-pelagic interactions were particularly visible through *Microcystis* genotypic structure variation during the early planktonic growth and the planktonic collapse periods. Indeed, the genotypic composition data allowed us to show that sedimentation and recruitment processes could intervene throughout summer. Firstly, during the planktonic early growth period, the recruitment process was illustrated by the transfer of two dominant genotypes (UG2 and UG4) from the benthic compartment to the planktonic compartment within two weeks. In parallel, some sedimentation was also observed during this early planktonic growth period with the arrival, in the benthic compartment, of the previously dominating genotype of the planktonic phase (UG1). Secondly, similar benthic-planktonic interactions have been observed during the planktonic collapse period: the observation of new benthic genotypes, among which we found one that dominated in the

water at the maximal abundance (UG5), suggests the sedimentation of planktonic *Microcystis*. However, it was surprising to see that two of the main dominant planktonic genotypes, encountered at the maximal planktonic abundance, did not seem to sediment whereas they were no longer encountered in the water during the planktonic collapse. Thereafter, we assume during the autumnal collapse of *Microcystis* blooms, some genetic selection leads to both quantitative and qualitative losses during the transition between the planktonic summer bloom and the benthic autumnal sedimented sub-population. Such a selection could be related to enhanced survival of some genotypes to autumnal abiotic conditions, to viral lysis or to predation, which factors have been proposed to be involved in *Microcystis* blooms collapses (Takamura *et al.* 1984; Visser *et al.* 1995; Yoshida *et al.* 2008a).

In parallel to these periods of benthic-pelagic transfers, our data also support the involvement of horizontal transport processes in the shifts recorded in the genotypic structures, as proposed in previous studies dealing with the diversity of cyanobacterial blooms (Hotto *et al.* 2007; Briand *et al*. 2009). Moreover, our results show that both the planktonic and the benthic compartments could be affected. Indeed, at the beginning of our survey, we observed different genotypes dominating the planktonic and the benthic sub-populations. In the same way, but in a lesser extent, two other genotypes (PG and UG5) were observed for the first time in the water, when the planktonic sub-population reached its maximal abundance. Because of these odd genotypes, we can rule out the idea of a local recruitment and we assume that the presence in the water of unique genotypes which were not previously encountered in the sediment is rather the result of horizontal transport from elsewhere in the reservoir. However, we cannot exclude that all those planktonic dominant genotypes were also minor benthic genotypes, which were not detected in the sediment because of their low frequency, but still recruited. Now if these genotypes were better adapted to planktonic conditions, they could have been positively selected and have grown rapidly to dominate the planktonic sub-population. On the other hand, the dominance of these planktonic genotypes could also result from some planktonic recruitment, based on the persistence in the water, all along the winter, of undetected small colonies or isolated cells of *Microcystis* (Latour 2002; Verspagen *et al.* 2005), thus allowing a rapid planktonic growth as soon as the environmental conditions improve in spring.

Horizontal transports were also involved in the turnover of the benthic sub-population, as suggested by the massive arrival on the sediment surface of the genotype BG2 on July. Indeed,

this genotype had never been encountered before at our sampling station, and as a benthic growth was unlikely in such great proportion, it must have been brought by water currents. Now it remains speculative whether this genotype corresponded to the sedimentation of planktonic *Microcystis* which could have developed elsewhere in the lake and then sedimented and sunk while being transported to our sampling site, or whether this new genotype corresponded to benthic colonies located elsewhere in the lake and brought by sediment transport.

Thereafter, horizontal transports have modified the local benthic-planktonic interactions by allowing the transfer of *Microcystis* from the water in one place of the lake, to the sediment elsewhere, and *vice versa*. However, as demonstrated by the complex distribution of some genotypes (UG2, UG3 and UG4) in the sediment and/or the water at various distant sampling dates, the respective part of each process in the ebb and flow of the different genotypes remains speculative.

Then, our observations of benthic-pelagic coupling and horizontal transfers all along the planktonic proliferation period confirm, through genetic investigations, the previous hypothesis formulated by Verspagen *et al.* (2005): recruitment and sedimentation processes are not restricted to spring and fall respectively. Thus, the annual development cycle of *Microcystis* appears to be much more complex than described in the early 80's (Reynolds *et al.* 1981; Takamura *et al.* 1984): although the existence of an alternation between a benthic and a planktonic life stage makes no doubt, these two phases may not temporally distinct but rather perpetually interacting as soon as some planktonic colonies can be found. Moreover, on the basis of our results, it seems probable that only a part of the population could be concerned by such benthic-planktonic exchanges.

Influence of benthic-pelagic coupling on *Microcystis* toxic potential evolution

During our survey, *Microcystis* toxic potential presented marked and rapid shifts. The planktonic proportions of potentially toxic cells were in a quite low range for the Grangent reservoir with a maximum of about 60 %, when compared with previous studies which recorded up to more than 90 % (Briand *et al*. 2009; Sabart *et al.* 2010). Concerning benthic *Microcystis*, no previous data were published about the proportions of potentially toxic benthic cells in this reservoir, but the few data available for benthic sub-populations of other lakes present far lower values than us (Rantala *et al.* 2006; Kim *et al.* 2010). The work of Kim *et al.* (2010) is the only

one previous temporal survey of the evolution of both benthic and planktonic proportions of potentially toxic *Microcystis*. During their one year long survey they did not observe any particular change in the sediment, with values maintaining fewer than 20%, whereas the recorded high variations in the water with values rising up to 70%. Thereafter, our study brings new information on the toxic potential of *Microcystis*, showing first that the potential of benthic population can be high and higher than in the planktonic phase with more than 70% of *mcyB*+ cells, and second that it can greatly and quickly vary. This variability between different lakes seems to indicate that there is no general rule concerning the selection of toxic or non-toxic benthic *Microcystis*, and promotes the idea of specific local conditions of selection that could lead to very different situations depending on the lake.

Concerning MC cellular quotas, they were globally in the same order of magnitude than reported in previous studies on benthic or planktonic *Microcystis* (*e.g.* Ihle *et al.* 2005; Latour *et al.* 2007; Sabart *et al.* 2010), and within a range extending from a few tens to a few hundreds of fg per cell. Beyond this global range, we recorded major and fast changes in MC cellular contents in both compartments.

The comparison of the dynamics of the proportions of potentially toxic cells and their MC cellular quotas in each compartment highlighted important discrepancies, with major and independent variations of these two parameters when genotypic turnovers occurred. Indeed, we observed major changes in genotypic compositions which resulted in major shifts in MC cellular quotas, without any particular change in the proportions of potentially toxic cells (*e.g.* in both compartments between June 15th and June 29th). The reciprocal situation was also observed, with a significant variation of the proportion of *mcyB*+ cells as a consequence of a major change of genotypic composition, without any significant change in the MC cellular quotas (*e.g.* in the sediment between June 29th and July 15th). These results are in agreement with the observation of various MC production capacities among toxic strains (Rohrlack *et al.* 2001; Carrillo *et al.* 2003), and proves that a succession of such genotypes also occurs during planktonic proliferations of *Microcystis*, in parallel to the succession of toxic and non toxic strains (Welker *et al.* 2003; Kardinaal *et al.* 2007a).

On the other hand, we demonstrated through the parallel monitoring of *Microcystis* abundance, genotypic diversity and toxic potential in both the benthic and the planktonic compartments that these important and fast changes of both MC content and *mcyB*+ cells

proportion coincided with the rapid succession of various dominant genotypes related to recruitment and sedimentation processes. Previous studies have already shown that turnovers in a planktonic sub-population could lead to major changes in its toxic potential (Briand *et al*. 2009; Bozarth *et al.* 2010; Sabart *et al.* 2010), this study now sheds the light on the potential influence of benthic-pelagic transfers in such shifts and demonstrates that the benthic sub-population is also affected.

In spite of this relation between benthic-planktonic interactions and some variations of toxic potential, our data do not show any particular influence of the toxic potential of *Microcystis* on the recruitment and sedimentation processes. Indeed, as described above, several genotype transfers did not affect the proportions of potentially toxic cells. The putative recruitment we observed happened in parallel to sedimentation, thus preventing us to highlight any specific information about this process. Concerning the sedimentation process, no toxic-potential-related selection was observed during the planktonic collapse period, during which the proportions of potentially toxic cells in the sediment remained quite stable around 50%. Hence, from this study, it seems that the sedimentation of *Microcystis* populations does not rely on their potential to synthesize MCs.

CONCLUSION

In this study, we monitored for the first time the evolution of the toxic potential and of the genotypic diversity of interacting benthic and planktonic sub-populations of *Microcystis*. These two sub-populations were shown to interact throughout the entire duration of the planktonic phase of *Microcystis*. Such interactions, coupled with water-current-related horizontal transports, were associated to a great versatility of both of the subpopulations in terms of abundance and almost of their genotypic composition, which could nearly be completely renewed within two weeks. In the same way, on the basis of our results, the evolution of both the proportions of potentially toxic cells and MC cellular quotas were greatly affected by the benthic-pelagic transfers. These results suggest that future monitoring of *Microcystis* blooms, and more especially of their genetic diversity or their toxic potential in relation with environmental parameters, should pay more attention to benthic-planktonic interactions and to horizontal transport. Moreover, they provide original insights about *Microcystis* development cycle by showing that the benthic and the planktonic phases may not be temporally distinct, and only connected in spring and autumn, but may rather potentially be in continuous interaction.

AKNOWLEDGEMENTS

B.M. was supported by a Ph.D. fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work was also partly funded by Electricité de France Research and Development (EDF R & D).

We thank Pierre Souvignet and Antoine Thouvenot for their support during the field sampling,

Chapitre 5 :

DISCUSSION GENERALE

I – Rappel des objectifs et originalité des approches utilisées

Dans un contexte général de recherches sur le déterminisme des proliférations de *Microcystis* et de leur toxicité, les travaux réalisés dans le cadre de ma thèse ont permis d'apporter de nouveaux éléments relatifs aux sources de variabilité du potentiel toxique de cette cyanobactérie en milieu naturel. La prise en compte de la phase de vie benthique de *Microcystis*, partie peu connue de son cycle de développement, nous a permis d'apporter des éléments de réponses aux questions posées en introduction.

Le premier objectif de ce travail de thèse était de caractériser le potentiel toxique de *Microcystis* au cours de sa phase de vie benthique. Pour cela, l'étude des concentrations en microcystines intracellulaires et des proportions de cellules potentiellement toxiques a été couplée au suivi de deux autres paramètres. D'une part, nous avons étudié la structure génétique des populations benthiques, afin de prendre la mesure de son influence sur la variabilité du potentiel toxique. D'autre part, la recherche et la quantification des ARNm du gène *mcyB* a constitué une approche pertinente pour étudier à la fois la viabilité des cellules benthiques et leur capacité à initier la synthèse des microcystines. De plus, la considération de différentes populations benthiques d'âge variable, nous a permis d'étudier l'influence du temps de vie benthique et de différents biotopes (au contact de la colonne d'eau ou en profondeur dans les sédiments) sur la variabilité de la structure génétique et du potentiel toxique des populations de *Microcystis* au cours de sa phase de vie benthique.

Le second objectif consistait à étudier l'implication du potentiel toxique de *Microcystis* dans les transitions entre ses phases de vie benthique et planctonique. A ce sujet, un suivi parallèle des sous-populations benthique et planctonique d'un site lacustre a constitué une approche *in situ* pertinente. Ce suivi est venu compléter une approche *in vitro* consistant en la reconstitution du recrutement benthique dans des conditions spécifiques permettant de mettre en évidence les facteurs déclencheurs de ce processus, et d'étudier la part des microcystines dans son déroulement.

Enfin, le dernier objectif visait à étudier et comparer l'influence de la structuration génétique et du potentiel toxique des populations de *Microcystis* lors des interactions entre les compartiments benthique et planctonique. Dans la continuité des expérimentations *in vitro* sur le recrutement benthique, nous avons alors comparé, en milieu naturel, la diversité génétique et le

potentiel toxique de populations de *Microcystis* en surface de la colonne d'eau et en surface des sédiments, tout au long d'une saison de croissance planctonique. Cette approche avait pour but d'acquérir des connaissances sur l'influence des interactions entre les compartiments benthique et planctonique sur le potentiel toxique de *Microcystis*, à l'échelle de la population dans son ensemble. De plus, le couplage entre l'étude du potentiel toxique et la structure génétique a permis d'étudier l'influence relative de ces deux paramètres sur leurs dynamiques respectives.

Ces différentes approches nous ont apporté un ensemble d'éléments novateurs vis-à-vis de l'écologie de *Microcystis*, et permettent une meilleure compréhension de la structuration génétique et de la variabilité du potentiel toxique des populations à l'échelle de l'ensemble du cycle de développement.

II – Caractérisation et dynamique des populations benthiques de *Microcystis*.

1. Comparaison du potentiel toxique de populations benthiques de *Microcystis* issues de blooms différents

Trois populations benthiques différentes de *Microcystis* ont été suivies dans le temps. Ces trois populations présentaient des durées de vie benthique variables, et étaient localisées dans différents environnements (table 8).

Table 8. Caractéristiques du potentiel toxique des différentes populations benthiques considérées.
Proportions de cellules *mcyB*+ et quotas cellulaires en microcystines : moyennes issues des valeurs présentées dans les articles 1, 2 et 5. Transcription du gène *mcyB* présentée dans l'article 2.
a, ***b*** et ***c*** représentent les résultats des analyses statistiques

Temps écoulé depuis la sédimentation des colonies	**Localisation dans les sédiments**	**Proportions moyennes de cellules *mcyB*+** (%)	**Quotas moyens en microcystine des cellules *mcyB*+** (fg eq. MC-LR.cell^{-1})	**Transcription du gène *mcyB*** (copies d'ARN par copie de gène *mcyB*)
Juste après sédimentation	Interface eau-sédiments	47,0 (± 19,6) ***a***	207 (± 151) ***a***	non mesurée
De 0 à 1,5 ans	De 0 à 126 cm sous l'interface eau-sédiments	54,1 (± 10,2) ***a***	130 (± 126) ***a, b***	12,2 (± 3,5) ***a***
De 4,5 à 6,5 ans	De 67 à 231 cm sous l'interface eau-sédiments	30,1 (± 13,8) ***b***	69,1 (± 47,2) ***b***	5,1 (± 0,7) ***b***

Pour l'ensemble de ces populations, nous avons pu observer la cohabitation de cellules potentiellement productrices de microcystines et de cellules ne possédant pas les gènes de microcystine. Les proportions relatives de ces deux sous-populations diffèrent entre les différentes populations considérées (table 8), avec cependant des pourcentages de cellules potentiellement toxiques toujours plus élevés que ceux trouvés dans la littérature (Rinta-Kanto *et al.* 2009; Kim *et al.* 2010). Les quotas cellulaires en microcystine sont également différents dans les trois populations étudiées (table 8), et se situent dans une gamme de valeur similaire aux observations rapportées dans la littérature (10 à 1000 fg/cell). Globalement, la localisation dans le

compartiment benthique (interface eau-sédiments ou sédiments profonds) ne semble pas affecter le potentiel toxique des populations benthiques de *Microcystis*. En revanche, plus la durée de vie benthique s'allonge, plus la population s'enfonce dans les sédiments, et plus les quotas cellulaires en microcystine diminuent (table 8).

La persistance à long terme dans les sédiments de proportions importantes de cellules ne possédant pas les gènes de microcystine suggère que les génotypes potentiellement toxiques ne sont pas mieux adaptés à la vie benthique. En revanche, la présence de microcystines et le maintien de la transcription du gène *mcyB* dans des cellules piégées depuis plusieurs années dans les sédiments suggèrent une implication des microcystines dans le fonctionnement des cellules benthiques capables de les produire. L'analyse de la littérature nous a permis de constater que les microcystines semblent intervenir notamment dans la réponse des cellules à un stress oxydatif, en protégeant des structures ou des molécules fondamentales pour le fonctionnement cellulaire (Alexova *et al.* 2011; Zilliges *et al.* 2011). Une telle implication dans le compartiment benthique pourrait apporter un bénéfice suffisant pour compenser l'importante dépense énergétique associée à la synthèse non ribosomale des microcystines dans les cellules. La transcription des gènes *mcy* dans les conditions benthiques défavorables à la croissance des cellules pourrait enfin signifier que la biosynthèse des microcystines est initiée de manière constitutive, tant que les cellules de *Microcystis* sont viables.

Par ailleurs, la viabilité de cellules benthiques enfouies en profondeur dans les sédiments pendant plusieurs années soulève la question des ressources énergétiques utilisées par *Microcystis* dans cet environnement. En effet, l'absence de lumière ne permet pas à cet organisme autotrophe de réaliser la photosynthèse, et sa survie dans les sédiments profonds repose donc soit sur d'importantes réserves internes, soit sur un métabolisme hétérotrophe. *Microcystis* possède la capacité d'incorporer de la leucine à partir du milieu extérieur (Kamjunke & Jahnichen 2000), suggérant qu'elle pourrait posséder des capacités d'hétérotrophie. De telles capacités expliqueraient alors la survie de *Microcystis* à une période d'obscurité prolongée dans les sédiments, bien que la présence d'un équipement physiologique pour l'utilisation de la matière organique absorbée pour la croissance reste à mettre en évidence pour confirmer cette hypothèse (Vincent & Goldman 1980; Amblard 1991).

2. Facteurs impliqués dans les variations de potentiel toxique et de structure génétique des populations benthiques de *Microcystis*

La structure génétique des populations benthiques de *Microcystis* peut présenter une importante variabilité temporelle. Cette variabilité n'est toutefois pas aussi importante dans toutes les populations benthiques. En effet, seules les populations situées en surface des sédiments présentent des variations significatives de composition génotypique, en réponse aux interactions avec la colonne d'eau (*i.e.* recrutement benthique, sédimentation et transports horizontaux). A l'inverse, pour les populations enfouies en profondeur dans les sédiments et donc isolées des interactions avec la colonne d'eau, l'évolution temporelle génétique apparaît très réduite. Les interactions avec la colonne d'eau apparaissent alors comme un facteur déterminant la variabilité génétique des populations benthiques de *Microcystis*. Chacune de ces interactions correspond à un apport ou une perte de génotypes, et modifie la structure génétique de la population concernée. Le confinement des colonies en profondeur dans les sédiments, zone caractérisée par un faible niveau de perturbations, limiterait la succession de différents génotypes aux seuls processus de croissance et de mortalité. Or, ces deux processus semblent fortement restreints dans les sédiments profonds défavorables à la croissance de *Microcystis*, et où l'abondance coloniale ne varie que faiblement. L'ensemble de ces facteurs expliquerait alors la stabilité de la structure génétique observée. En revanche, en surface des sédiments, le niveau plus élevé de perturbations, via les interactions répétées avec la colonne d'eau, favoriserait le maintien d'une plus forte variabilité génétique, par de fréquents apports ou pertes de génotypes.

Par ailleurs, le potentiel toxique d'une population de *Microcystis* peut également varier au cours de sa phase de vie benthique. L'étude de populations localisées en surface des sédiments ou enfouies en profondeur dans les sédiments a permis de révéler que plusieurs facteurs étaient à l'origine de ces variations de potentiel toxique. En surface des sédiments, la cinétique du potentiel toxique d'une population est grandement liée à la variabilité de sa structure génétique. En effet, le recrutement, la sédimentation et le transport horizontal de colonies de *Microcystis* favorisent la succession de différents génotypes. Cette succession semble se répercuter sur le potentiel toxique de la population, en entraînant des changements brutaux de proportions de cellules potentiellement toxiques et des quotas cellulaires en microcystine. Dans les populations benthiques enfouies en profondeur dans les sédiments, et donc isolées des interactions avec la colonne d'eau, le potentiel toxique varie également. Les quotas cellulaires en microcystine des cellules potentiellement toxiques semblent varier notamment de manière importante durant les

premiers mois de vie benthique, sans variation importante de la structure génétique des populations. Ceci suggère qu'une même cellule de *Microcystis* puisse voir son contenu en microcystine varier lors de sa phase de vie benthique. L'initiation de synthèse des microcystines, révélée par la présence d'ARNm *mcyB,* rend alors probable l'implication d'une régulation du taux de synthèse de ces toxines dans cette variabilité benthique temporelle.

Après plusieurs années de vie benthique, les quotas cellulaires en microcystine montrent une tendance significative à la diminution au cours du temps. Cette diminution pourrait résulter d'une plus faible synthèse des microcystines, perturbant alors l'équilibre entre production et utilisation de ces molécules par les cellules (Jahnichen *et al.* 2008). Le faible niveau de transcription du gène *mcyB,* mesuré dans la population benthique la plus ancienne, appuie cette hypothèse en suggérant une diminution de production des microcystines. De plus, il a été démontré précédemment qu'après un temps de vie benthique prolongée, les colonies de *Microcystis* perdent peu à peu leurs cellules (Latour *et al.* 2007). La perte progressive de l'intégrité membranaire des cellules benthiques anciennes pourrait alors favoriser la libération de leurs microcystines intracellulaires dans le milieu, induisant aussi une baisse progressive des quotas cellulaires mesurée.

III – Variabilité du potentiel toxique et de la structuration génétique des populations de *Microcystis* lors des transitions entre les phases de vie benthique et planctonique

1. Le recrutement benthique

Le suivi de diversité génotypique de *Microcystis*, réalisé en parallèle en surface de la colonne d'eau et en surface des sédiments, montre que le processus de recrutement semble occasionner une certaine sélection génétique, indépendante du potentiel toxique de *Microcystis*. En effet, la différence de composition génotypique et les transferts de génotypes entre les sous-populations planctonique et benthique, observés au début de la phase de croissance planctonique, nous a permis de constater que tous les génotypes de *Microcystis* n'étaient pas concernés avec la même intensité par le processus de recrutement benthique. Cette sélection génétique lors du recrutement benthique s'ajoute alors à l'influence des transports horizontaux depuis d'autre site de croissance planctonique, et au processus de recrutement planctonique dans le déterminisme de la structure génétique des efflorescences de *Microcystis*.

D'après l'expérience de recrutement benthique qui a été conduite *in vitro*, parmi la sous-population potentiellement toxique initiale, des cellules contenant plus de microcystines que la moyenne du stock benthique initial sont préférentiellement recrutées. A l'échelle individuelle, ces résultats suggèrent une implication des microcystines dans le recrutement benthique des cellules capables de les produire, en réduisant, par exemple, le pouvoir collant de leur mucilage (Zilliges *et al.* 2008), et en facilitant ainsi le décollement, lors de leur remise en suspension, des particules minérales et organiques collées aux colonies. A l'échelle de la population, le recrutement de cellules non productrices de microcystine indique que la fonction des microcystines dans le recrutement benthique peut être assurée par d'autres molécules, expliquant ainsi que le processus de recrutement sélectionne certains génotypes indépendamment de leur potentiel toxique. Dans la littérature, l'hypothèse d'un avantage des cellules potentiellement productrices de microcystine lors du recrutement benthique a été proposée récemment (Schöne *et al.* 2010). Cependant, les résultats de Schöne *et al.* (2010) reposent sur les proportions de différents morphotypes de *Microcystis* recrutés au cours d'une expérience *in vitro*, la sélection observée pourrait donc reposer sur d'autres paramètres que le potentiel toxique des colonies. D'autre part, une même souche de *Microcystis* peut présenter une plasticité phénotypique suffisante pour être classée

alternativement dans différents morphotypes. En l'absence de comparaison directe des proportions de colonies de *Microcystis* potentiellement toxiques entre les sous-populations benthiques et recrutées, la sélection des colonies potentiellement toxiques proposée par Schöne *et al.* (2010) doit donc être considérée avec précautions.

Le recrutement benthique sélectif de certains génotypes peut donc conditionner l'établissement d'une population planctonique de *Microcystis* en termes de structure génétique et de potentiel toxique.

2. La sédimentation

La comparaison des séquences de l'ITS 16S-23S de *Microcystis* en surface des sédiments et dans la zone euphotique de la colonne d'eau nous a permis de montrer la sédimentation de génotypes planctoniques au tout début de la période de croissance planctonique estivale. Cette observation confirme que ce processus n'est pas restreint à la période de déclin automnal des efflorescences (Verspagen *et al.* 2005), et qu'il peut potentiellement influencer le devenir d'une sous-population planctonique tout au long de son développement.

Un processus de sélection génétique intervient en période de sédimentation des colonies planctoniques de *Microcystis*, puisque tous les génotypes planctoniques ne sédimentent pas. La sélection des génotypes les mieux adaptés aux conditions environnementales planctoniques, en période de sédimentation, pourrait résulter d'une mortalité accrue de certains génotypes, soit en réponse au refroidissement et au mélange de la colonne d'eau, soit suite à des phénomènes de lyse virale qui peuvent cibler des génotypes particuliers (Takamura *et al.* 1984; Watanabe *et al.* 1992; Yoshida *et al.* 2008c). Au cours des différents épisodes de sédimentation que nous avons observés, cette sélection génotypique était associée alternativement à une sédimentation préférentielle de génotypes toxiques ou non toxiques de *Microcystis*. Ceci suggère que la sélection génétique observée lors de ce processus ne repose pas directement sur le potentiel toxique de *Microcystis*, expliquant alors que celui-ci soit affecté de manière variable au cours des différentes périodes de sédimentation.

IV – Influence des interactions eau-sédiments sur la dynamique des proliférations planctoniques de *Microcystis*

Plusieurs études ont déjà décrit l'évolution du potentiel toxique de *Microcystis* au cours de sa phase de croissance planctonique (*e.g.* Welker *et al.* 2003; Kardinaal & Visser 2005; Kardinaal *et al.* 2007a; Briand *et al*. 2009; Sabart *et al.* 2010). Ainsi, dans l'eau, le potentiel toxique de *Microcystis* varie, d'une part, en fonction de la variabilité de production des microcystines par les cellules en réponse aux conditions environnementales, et, d'autre part, suite à la succession de différents génotypes de *Microcystis* au potentiel toxique variable (Kardinaal & Visser 2005). Cependant, si le déterminisme de la synthèse des microcystines est relativement bien documenté, ce n'est pas le cas de la succession des différentes génotypes dans une population. La prise en compte systématique de la phase de vie benthique au cours de mes travaux de thèse a contribué à une meilleure vision d'ensemble de l'évolution du potentiel toxique de *Microcystis* au cours de son cycle de développement.

Dans une prolifération planctonique de *Microcystis*, nous avons pu observer une importante variabilité de structure génétique, conformément à ce qui avait été observé lors d'études précédentes (Hotto *et al.* 2007; Briand *et al*. 2009; Sabart *et al.* 2009; Bozarth *et al.* 2010; Tanabe & Watanabe 2011). Le suivi en parallèle des compartiments benthique et planctonique a révélé l'importance des échanges de colonies entre les deux compartiments et a confirmé l'implication des phénomènes de transport horizontaux, tout au long de la période estivale, dans la variabilité de structure génétique de *Microcystis* dans la colonne d'eau en un point donné (Hotto *et al.* 2007; Briand *et al*. 2009). Comme pour les populations benthiques, chacun de ces transferts correspond à un apport ou à une perte de génotypes, et modifie la composition génotypique de la sous-population planctonique. Ces échanges de génotypes fréquents assurent le maintien d'une diversité génétique élevée, en interférant avec la cinétique de croissance des différents génotypes qui, elle, conduit naturellement à la réduction de la diversité génétique par exclusion compétitive (Hardin 1960; Reynolds 1995). Or, ces échanges de génotypes interviennent préférentiellement lorsqu'une perturbation physique, vent ou chute des températures, occasionne le brassage de la masse d'eau et des sédiments, et permet un transfert de génotypes entre des sites planctoniques ou entre les sédiments et l'eau. Ce brassage n'est pas favorable au développement de *Microcystis*, dont la croissance est plus forte dans une colonne d'eau stable et stratifiée. Ainsi, le désavantage lié à la dégradation des conditions de croissance

pour *Microcystis* est en partie compensé par l'apport de génotypes présents dans les sédiments ou qui augmentent la capacité adaptative de la sous-population planctonique aux conditions environnementales changeantes.

Les successions génotypiques occasionnées par ces transferts peuvent par ailleurs être associées à d'importantes variations de proportions de cellules potentiellement toxiques et de quotas cellulaires en microcystine en surface de la colonne d'eau. En conséquence, comme pour la population benthique localisée en surface des sédiments, les interactions eau-sédiments et les phénomènes de transport apparaissent comme des facteurs importants dans l'évolution du potentiel toxique des populations planctoniques de *Microcystis*, sans que le potentiel toxique ne serve de support aux processus de sélection.

Au cours du suivi planctonique, nous n'avons pas observé les tendances générales rapportées dans la littérature. En effet, les quotas cellulaires en microcystine n'étaient pas inversement proportionnels à l'abondance cellulaire de *Microcystis*, et les proportions de cellules potentiellement toxiques n'étaient pas plus faibles au maximum d'abondance qu'en début et fin de prolifération comme avaient pu l'observer d'autres auteurs (Kardinaal & Visser 2005; Briand *et al*. 2009; Sabart *et al.* 2010). Les conditions particulières de la réalisation de nos travaux peuvent en partie expliquer cette différence. En effet, la station Liz du réservoir de Grangent présente une plus faible profondeur (25 m maximum) par rapport à la profondeur maximale de cet écosystème (50m). De plus, le réservoir de Grangent est un lac de barrage situé sur un grand fleuve, avec par conséquent un écoulement permanent de l'eau, même s'il est faible (temps de résidence de l'eau dans le réservoir de Grangent : 35 jours). Enfin, l'année du suivi, la saison estivale a été marquée par des conditions climatiques instables, avec de fréquents orages et des températures atmosphériques très variables et globalement faibles. Ces conditions climatiques défavorables à la croissance de *Microcystis* ont limité la prolifération planctonique, avec une abondance qui s'est révélée environ dix fois plus faible que lors des efflorescences étudiées précédemment dans le même réservoir (Briand *et al*. 2009; Sabart *et al.* 2010). L'ensemble de ces facteurs a ainsi pu favoriser une importante instabilité de la masse d'eau, et exposer davantage la prolifération planctonique à l'influence des transferts de génotypes.

Chapitre 6 :

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

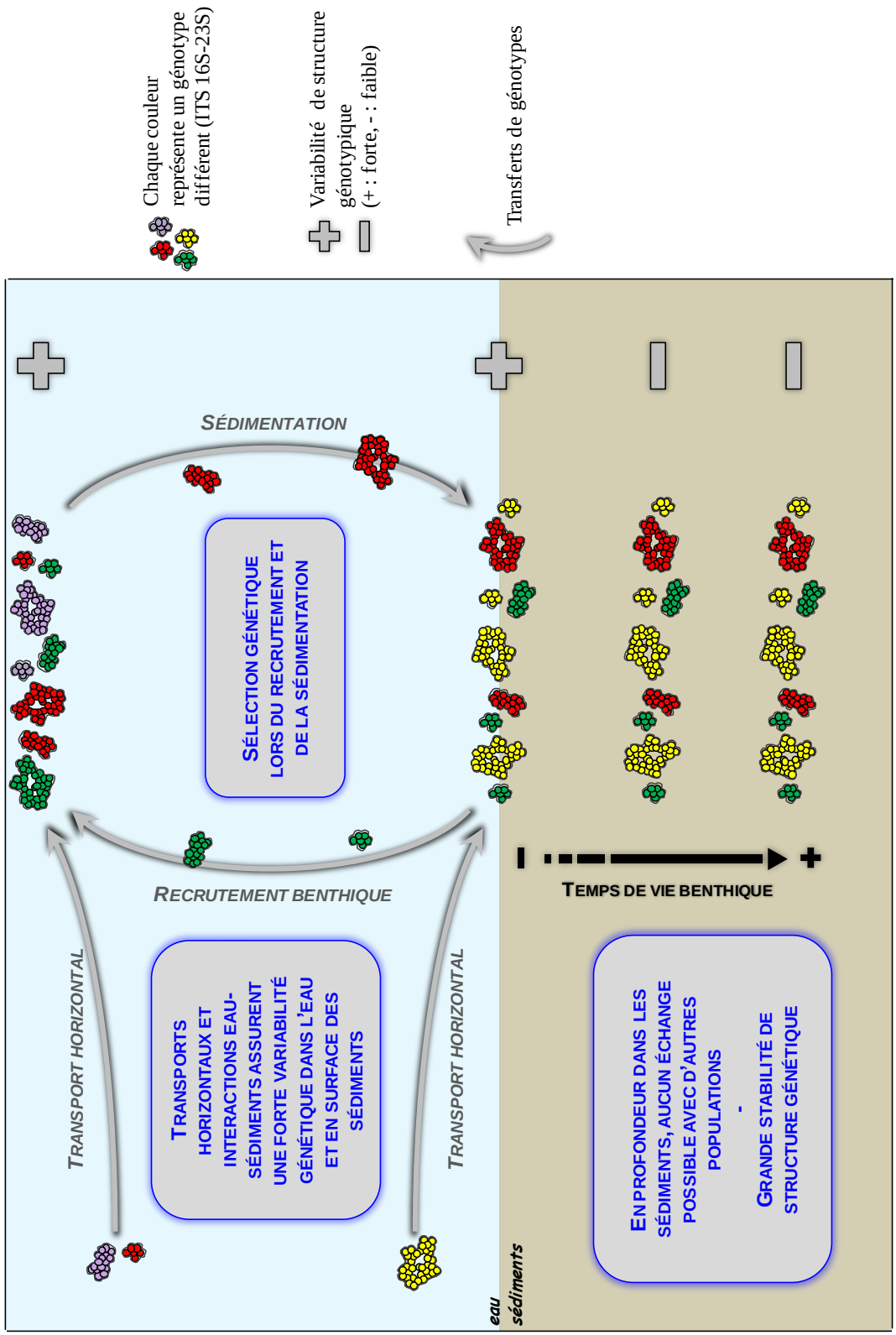


Figure 42 : Variabilité génotypique de *Microcystis* au cours de son cycle de développement.

I – Conclusion : variabilité de la structure génétique et du potentiel toxique des populations de *Microcystis* à l'échelle de son cycle de développement

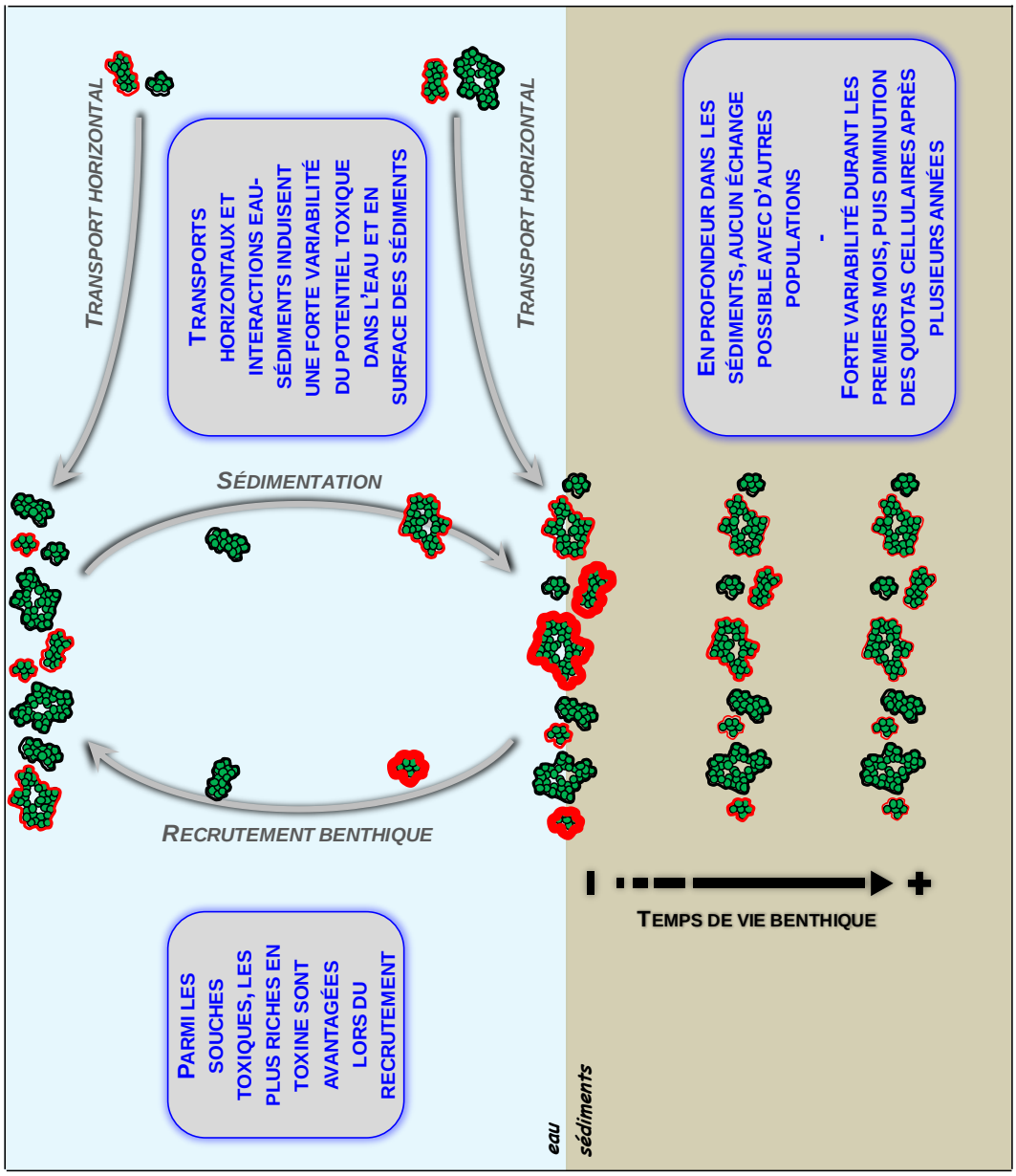
En considérant le cycle de développement de *Microcystis* dans son ensemble, il apparaît que l'essentiel de la variabilité génétique des populations de cette cyanobactérie est liée à la phase de vie planctonique, la phase benthique correspondant plutôt à une période de stabilité (figure 42). Les transferts de colonies, par transport horizontal, recrutement ou sédimentation, apparaissent alors comme un facteur important dans la variabilité de la diversité génétique des populations de *Microcystis* (figure 42). Ces transferts viennent s'ajouter aux conséquences de la compétition et de la prédation, déjà connues pour affecter la diversité génétique de *Microcystis* au cours de sa phase de croissance planctonique en entraînant la sélection des génotypes les mieux adaptés (Briand *et al*. 2009; Van Gremberghe *et al.* 2009). Dans les sédiments, en raison, d'une part, du maintien des abondances coloniales observées, et, d'autre part, des conditions défavorables à la croissance (absence de lumière notamment), l'intervention de processus de sélection génétique liés à la capacité adaptative des différents génotypes paraît limitée, comme le démontre la grande stabilité de la structure génétique observée pour les populations enfouies en profondeur (figure 42). Les apports et les pertes de colonies benthiques par le recrutement et la sédimentation, ou encore par les processus de transport horizontal, pourraient alors être les principaux facteurs de variations significatives de la diversité génétique benthique de *Microcystis*. Concernant les populations planctoniques de *Microcystis*, le recrutement benthique et la sédimentation devraient dorénavant être considérés comme des processus clefs dans le déterminisme des successions génotypiques, au même titre que la croissance et la mortalité.

L'ensemble de ces résultats sur la variabilité génétique de *Microcystis* met en évidence une certaine plasticité écologique de *Microcystis* en réponse aux conditions environnementales variables. Cette plasticité peut se manifester par des transferts répétés entre eau et sédiments en période estivale, comme le suggèrent les interactions observées entre ces deux compartiments tout au long de la phase de vie planctonique. Ces interactions répétées pourraient permettre une reprise de croissance rapide suite à un aléa climatique, ou encore expliquer la pérennité de certaines efflorescences de *Microcystis* en région tropicale (Wicks & Thiel 1990; Prakash *et al.* 2009). La phase de vie benthique semble également présenter une durée très variable : elle peut se prolonger pendant plusieurs années lorsque les conditions ne permettent pas le recrutement benthique ou la reprise de croissance planctonique. Enfin, d'après la littérature, le recrutement

benthique semble débuter à des dates variables (*e.g*. Fallon & Brock 1980; Reynolds & Wiseman 1982; Verspagen *et al.* 2004, 2005). Une telle plasticité écologique permettrait alors à *Microcystis* de s'adapter à des conditions environnementales défavorables en survivant malgré une durée variable des différentes phases de son cycle de vie. Le cycle de développement annuel de *Microcystis* décrit par Reynolds *et al.* (1981) en région tempérée pourrait en fait s'étendre sur un période variable selon les aléas climatiques, et non pas systématiquement correspondre aux successions saisonnières annuelles.

Nous avons pu constater que le potentiel toxique de *Microcystis* pouvait aussi bien varier durant sa phase de vie benthique qu'au cours de sa phase de vie planctonique (figure 43). Cette variabilité est apparue fortement liée à l'évolution de la structure génétique des populations, en particulier dans l'eau et en surface des sédiments. L'étude des populations benthiques profondes a permis de montrer que le potentiel toxique des populations benthiques pouvait tout de même évoluer indépendamment des variations de structure génétique. Si les microcystines semblent impliquées dans la survie benthique et le recrutement benthique des cellules capables de les produire, la nature exacte de leur rôle reste à définir. De plus, des cellules non toxiques survivent également en conditions benthiques et participent au recrutement. A l'échelle du cycle de développement, aucune étape ne semble favoriser la sélection des cellules productrices de microcystine (figure 43), expliquant le maintien des cellules non productrices de microcystines dans les écosystèmes. Cette absence d'avantage sélectif des génotypes toxiques pourrait s'expliquer par la production d'autres métabolites accomplissant les mêmes fonctions cellulaires dans les cellules non toxiques (Alexova *et al.* 2011; Zilliges *et al.* 2011). Cette dernière hypothèse suggère que les microcystines sont bien des métabolites secondaires, puisqu'elles ne sont pas présentes dans toutes les cellules, et que leur fonction semble pouvoir être remplie par d'autres molécules dans les cellules non toxiques. Orr & Jones (1998) proposaient que les microcystines soient considérées comme des métabolites primaires en s'appuyant sur leur production corrélée positivement au taux de croissance des cellules, alors que les métabolites secondaires seraient essentiellement synthétisés en phase stationnaire. Néanmoins, un métabolite primaire est défini

Figure 43 : Variabilité du potentiel toxique de *Microcystis* au cours de son cycle de développement.



comme une molécule issue du métabolisme et nécessaire à l'accomplissement des fonctions vitales de l'organisme. Or, les différentes fonctions hypothétiques attribuées aux microcystines (limitation de la prédation et de la compétition, résistance à différents stress biotiques et abiotiques) sont liées à l'adaptation de *Microcystis* aux variations de son environnement, et pas au métabolisme basal incompressible des cellules. Les taux de croissance similaires mesurés entre des souches sauvages toxiques et leurs homologues mutés spécifiquement sur un gène du cluster *mcy* constituent la meilleure preuve du caractère « secondaire » de cette molécule pour *Microcystis* (Kardinaal & Visser 2005). Ainsi, à la manière des métabolites secondaires des plantes supérieures, le rôle écologique des microcystines réside probablement plus dans la réponse aux différents facteurs de stress environnementaux que dans le fonctionnement de base des cellules.

II - Perspectives d'étude

Ce travail de thèse ouvre un certain nombre de perspectives qui s'inscrivent dans la continuité directe des résultats obtenus, notamment en ce qui concerne la caractérisation des voies métaboliques employées par *Microcystis* pour survivre dans les sédiments, et la part relative des interactions eau-sédiments et des phénomènes de transport dans la dynamique des populations. A une échelle plus large, ces recherches ouvrent également des perspectives quant à la fonction écologique des microcystines, et aux conséquences écologiques de leur présence dans les réseaux trophiques aquatiques.

1. Caractériser les voies métaboliques utilisées par les cellules benthiques de *Microcystis* pour leur survie à long-terme

La présence de transcrits *mcyB* atteste de la survie de *Microcystis* à l'obscurité totale pendant plusieurs années. Ceci suggère la capacité de cette cyanobactérie à adopter un métabolisme hétérotrophe strict. *Microcystis* possède la capacité à assimiler des acides aminés présents dans son environnement (Kamjunke & Jahnichen 2000), ce qui a conduit certains auteurs à penser que cette cyanobactérie pourrait être mixotrophe (Burkholder *et al.* 2008). Néanmoins, l'utilisation des acides aminés pour la production d'énergie et le maintien de la cellule reste encore à démontrer. L'ajout de glucose, marqué avec un isotope stable ou radioactif du carbone, à un échantillon de sédiments contenant des *Microcystis*, pourrait constituer une approche pertinente pour tester la présence d'un métabolisme hétérotrophe chez cette cyanobactérie. L'analyse des cellules par autoradiographie, ou encore l'analyse isotopique de composés spécifiquement produits par *Microcystis*, permettrait alors de confirmer les capacités d'hétérotrophie de *Microcystis*.

Les microcystines sont un exemple de composé produit spécifiquement par *Microcystis* dans le milieu benthique. L'utilisation de ces molécules comme marqueur d'un métabolisme hétérotrophe dans un échantillon de sédiments contenant des *Microcystis*, ou dans une culture exposée à des conditions environnementales proches, permettrait alors de poursuivre nos travaux en recherchant l'origine des microcystines benthiques. En effet, la présence de microcystine

marquée confirmerait à la fois la capacité de *Microcystis* à utiliser un métabolisme hétérotrophe, et la possibilité de synthèse *de novo* de ces toxines dans les cellules benthiques.

Par ailleurs, la transcription du gène *mcyB* mesurée dans le cadre de cette thèse ne renseigne que sur la viabilité de certaines cellules benthiques et sur l'initiation de la synthèse de cette molécule. Afin de mieux caractériser l'activité de *Microcystis* dans le milieu benthique et mieux comprendre les différences d'activité transcriptionnelle observées, il serait judicieux d'étudier l'expression d'autres gènes fonctionnels et de la comparer avec la transcription de différents gènes de ménage dont le niveau d'expression est le plus stable possible. Ainsi, l'analyse de la transcription des gènes de vésicules à gaz pourrait apporter des indications quant à la régulation de la densité des cellules, notamment en période de recrutement. Dans le même contexte, l'étude de la transcription des gènes codant pour les voies métaboliques dégradant les réserves glucidiques internes pourrait se révéler informative.

2. Evaluer la part relative des interactions eau-sédiments et des phénomènes de transport dans la dynamique des populations de *Microcystis*

Pour améliorer notre compréhension de la dynamique des populations de *Microcystis*, il apparaît primordial de mieux quantifier l'importance du lien entre les phases benthique et planctonique. En effet, si le suivi parallèle des deux compartiments réalisé au cours de cette thèse a mis en évidence des échanges de génotypes, il n'a pas permis de suivre les conséquences de ces échanges sur la dynamique des populations benthiques et planctoniques de *Microcystis*, notamment en raison de l'intervention de transports horizontaux. Or ces travaux ont permis de démontrer que ces transferts de génotypes sont directement impliqués dans l'évolution du potentiel toxique des populations de *Microcystis*.

Pour visualiser les conséquences des transferts de génotypes sur le potentiel toxique des populations, il paraît primordial de pouvoir dissocier l'influence respective des transferts strictement planctoniques et des transferts entre eau et sédiments. Pour cela, l'hétérogénéité horizontale au sein d'une même prolifération planctonique (Hotto *et al.* 2007; Briand *et al*. 2009; Tanabe & Watanabe 2011) met en évidence la nécessité de considérer plusieurs stations de prélèvement dans chaque écosystème étudié, afin de suivre les transports des différents génotypes par le brassage et les courants (Hotto *et al.* 2007; Wu *et al.* 2009; Pobel *et al.* 2011). Etudier les transferts de génotypes entre l'eau et les sédiments lors d'une efflorescence massive permettrait

également de confirmer leur influence, sachant que la variabilité de composition génotypique dans le plan horizontal semble plus réduite en cas de forte abondance de *Microcystis* (Briand *et al*. 2009).

Ensuite, considérer l'intégralité de la colonne d'eau, et non plus seulement la zone euphotique, permettrait d'étudier la structuration des populations planctoniques selon un gradient vertical de paramètres physico-chimiques. En effet, les différences de valeur optimale d'intensité lumineuse pour différentes souches de *Microcystis*, et l'observation de certaines souches dépourvues de vésicules à gaz, laissent envisager une répartition hétérogène de différentes génotypes de *Microcystis* dans la colonne d'eau. De plus, une telle étude permettrait de préciser les éventuels transferts de génotypes planctoniques entre la surface et la profondeur. Par ailleurs, la comparaison d'écosystèmes stratifiés et non stratifiés permettrait d'évaluer dans quelle mesure la thermocline peut influencer la structuration verticale planctonique, ainsi que les échanges eau-sédiments.

Enfin, il serait nécessaire d'étudier la distribution horizontale des différents génotypes en surface des sédiments. En effet, ce paramètre n'a jusqu'alors jamais été étudié, bien qu'il puisse à lui seul expliquer l'hétérogénéité planctonique horizontale déjà décrite (Hotto *et al.* 2007; Briand *et al*. 2009; Tanabe & Watanabe 2011). Sa prise en compte, en parallèle de la distribution verticale, constituerait alors une approche pertinente pour déterminer si l'hétérogénéité horizontale observée dans l'eau provient de phénomènes de transports horizontaux et/ou verticaux, de différentes conditions locales de croissance, ou bien d'une hétérogénéité horizontale du stock benthique dont l'efflorescence planctonique est issue.

Ainsi, la prise en compte de la variabilité horizontale et verticale des facteurs environnementaux, couplée avec le suivi des conditions climatiques et des mouvements de masse d'eau, constituerait une meilleure approche pour étudier l'influence des phénomènes de transport et des interactions entre les compartiments benthique et planctonique dans le déterminisme de la structure génétique et du potentiel toxique des efflorescences.

3. Considérer l'ensemble des étapes de la voie de biosynthèse et l'utilisation des microcystines par la cellule pour progresser dans la compréhension du déterminisme de leur production

Jusqu'à présent, la majorité des études sur la régulation des quotas cellulaires en microcystine n'a considéré que les quotas cellulaires, en faisant abstraction des différentes étapes de la voie de biosynthèse. Néanmoins, comme le suggère la non-correspondance entre les niveaux de transcription de *mcyB* et les quotas cellulaires en microcystine observée au cours de nos travaux et dans une étude antérieure (Kaebernick *et al.* 2000), les différentes étapes de cette voie de biosynthèse pourraient être régulées indépendamment, et en réponse à différents facteurs (Kaebernick *et al.* 2000). De plus, les microcystines peuvent être utilisées par les cellules (Jahnichen *et al.* 2008; Zilliges *et al.* 2011), biaisant alors leur quantification et/ou l'estimation des taux de production.

Afin de mieux discerner l'importance des divers facteurs connus pour influencer la production de microcystine, il serait donc nécessaire d'étudier dans une même expérience l'ensemble des étapes de la voie de biosynthèse ainsi que le devenir des microcystines. Ainsi, comparer dans des cultures l'influence de diverses conditions de croissance et de divers facteurs de stress sur la transcription des gènes *mcy*, la production des enzymes du complexe enzymatique, et la quantification des microcystines intracellulaires libres et liées permettrait d'identifier la (ou les) étape(s) sensible(s) aux variations de conditions environnementales, et de progresser dans la compréhension de la (ou des) fonction(s) écologique(s) de la microcystine.

Enfin, la réalisation de cette étude sur les différents genres cyanobactériens capables de synthétiser des microcystines permettrait d'acquérir une vision plus globale du rôle écologique de la microcystine.

4. Etudier les interactions entre les cyanobactéries toxiques et les communautés aquatiques, et l'impact des cyanotoxines sur le fonctionnement des réseaux trophiques

Récemment, il a été démontré que les interactions entre *Microcystis* et ses prédateurs potentiels pouvaient influencer les successions génotypiques des populations de cette cyanobactérie (Van Gremberghe *et al.* 2009). Or, nous avons démontré, dans le cadre de cette thèse, que la succession de différents génotypes dans une population benthique ou planctonique de *Microcystis* pouvait fortement affecter son potentiel toxique. Pour compléter les résultats de

nos travaux, l'étude des interactions entre les cyanobactéries productrices de microcystines et les autres communautés, notamment microbiennes, permettrait donc de considérer une autre source potentielle de variabilité du potentiel toxique des populations cyanobactériennes. En effet, l'influence des interactions entre, d'une part, les cyanobactéries et, d'autre part, les bactéries, les champignons parasites, et les compétiteurs et prédateurs microbiens, sur le potentiel toxique des populations de cyanobactéries n'a encore jamais été étudiée, alors que les processus de lyse, de prédation et de compétition qui en résultent sont susceptibles d'affecter la structure des populations de cyanobactéries toxiques.

Par ailleurs, l'impact de la présence de cyanotoxines sur les autres organismes présents dans le milieu a, jusqu'à présent, été étudié sur une espèce particulière, ou sur un niveau trophique particulier. Cependant, lorsqu'un niveau trophique, ou même un seul taxon décline dans le milieu en raison des toxines synthétisées par les cyanobactéries, c'est toute la structure du réseau trophique qui peut être affectée. Dans ce contexte, il paraît important d'étudier l'influence des cyanotoxines sur la dynamique des différentes communautés microbiennes dans le cadre du fonctionnement des réseaux trophiques. Cet impact pourrait ainsi se traduire par la modification de la structure des réseaux trophiques aquatiques, et, à terme, par l'altération des transferts de matière entre niveaux trophiques, et entre écosystèmes proches.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alexova, R., Fujii, M., Birch, D., Cheng, J., Waite, T. D., Ferrari, B. C. and Neilan, B. A. (2011). Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. *Environmental Microbiology* no-no

Alifano, P., Bruni, C. B. and Carlomagno, M. S. (1994). Control of mRNA processing and decay in prokaryotes. *Genetica* 94:157-172

Amblard, C. (1991). Carbon heterotrophic activity of microalgae and cyanobacteria - Ecological significance. *Année Biologique* 30:6-107

An, J.andCarmichael, W. W. (1994). Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon* 32:1495-1507

Babica, P., Blaha, L .and Marsalek, B. (2006). Exploring the natural role of microcystins - A review of effects on photoautotrophic organisms. *Journal of Phycology* 42:9-20

Bailly, J., Fraissinet-Tachet, L., Verner, M.-C., Debaud, J.-C., Lemaire, M., Wesolowski-Louvel, M. and Marmeisse, R. (2007). Soil eukaryotic functional diversity, a metatranscriptomic approach. *ISME Journal* 1:632-642

Barco, M., Lawton, L. A., Rivera, J. and Caixach, J. (2005). Optimization of intracellular microcystin extraction for their subsequent analysis by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1074:23-30

Beron, L. E. (1990). Features of the limnological behavior of Salto Grandes Reservoir (Argentina Uruguay). *Ecological Modelling* 52:87-102

Berthon, J. L., Devaux, J., Aleya, L., Giraudet, H. and Restituito, F. (1996). Impact of eutrophication in Grangent reservoir (Loire, France) : Study of the nutrient loads, the dynamics of phytoplancton populations and phyto-zooplancton relations in 1990-1991. *Hydroécologie appliquée* 8:99-125

Boström, B., Pettersson, A.-K. and Ahlgren, I. (1989). Seasonal dynamics of a cyanobacteria-dominated microbial community in surface sediments of a shallow, eutrophic lake. *Aquatic Sciences* 51:153-178

Bourrelly, P. (1970). *Les algues d'eau douce*, t. III, *Algues bleues et rouges*, Boubée, Paris : 512p.

Boyer, S. L., Flechtner, V. R. and Johansen, J. R. (2001). Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution* 18:1057-1069

Bozarth, C. S., Schwartz, A. D., Shepardson, J. W., Colwell, F. S. and Dreher, T. W. (2010). Population turnover in a *Microcystis* bloom results in predominantly non-toxigenic variants late in the season. *Applied and Environmental Microbiology* 67:5207-5213.

Briand, E., Escoffier, N., Straub, C., Sabart, M., Quiblier, C. and Humbert, J.-F. (2009). Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a bloom-forming *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) population. *The ISME Journal* 3:419-429

Briand, E., Gugger, M., Francois, J. C., Bernard, C., Humbert, J. F. and Quiblier, C. (2008). Temporal variations in the dynamics of potentially microcystin-producing strains in a bloom-forming *Planktothrix agardhii* (cyanobacterium) population. *Applied and Environmental Microbiology* 74:3839-3848

Brunberg, A.-K. and Blomqvist, P. (2002). Benthic overwintering of *Microcystis* colonies under different environmental conditions. *Journal of Plankton Research* 24:1247-1252

Brunberg, A.-K. and Blomqvist, P. (2003). Recruitment of *Microcystis* (Cyanophyceae) from lake sediments: the importance of littoral inocula. *Journal of Phycology* 39:58-63

Burkholder, J. M., Glibert, P. M. and Skelton, H. M. (2008). Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae* 8:77-93

Caceres, O. and Reynolds, C. S. (1984). Some effects of artificially-enhanced anoxia on the growth of *Microcystis aeruginosa* Kutz. emend. Elenkin, with special reference to the initiation of its annual growth cycle in lakes. *Archiv Fur Hydrobiologie* 99:379-397

Carmichael, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72:445-459

Carmichael, W. W., Beasley, V., Bunner, D. L., Eloff, J. N., Falconer, I., Gorham, P., Harada, K.-I., Krishnamurthy, T., Min-Juan, Y., Moore, R. E., Rinehart, K., Runnegar, M., Skulberg, O. M. and Watanabe, M. (1988). Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon* 26:971-973

Carrillo, E., Ferrero, L. M., Alonso-Andicoberry, C., Basanta, A., Martin, A., Lopez-Rodas, V. and Costas, E. (2003). Interstrain variability in toxin production in populations of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* from water-supply reservoirs of Andalusia and lagoons of Donana National Park (southern Spain). *Phycologia* 42:269-274

Chen, W., Peng, L., Wan, N. and Song, L. (2009). Mechanism study on the frequent variations of cell-bound microcystins in cyanobacterial blooms in Lake Taihu: Implications for water quality monitoring and assessments. *Chemosphere* 77:1585-1593.

Christiansen, G., Fastner, J., Erhard, M., Borner, T. and Dittmann, E. (2003). Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: Genes, evolution, and manipulation. *Journal of Bacteriology* 185:564-572

Clement, M., Posada, D. and Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9:1657-1659

Codd, G. A. and Bell, S. G. (1985). Eutrophication and toxic cyanobacteria in freshwaters. *Journal of Water Pollution Control* 84:225-232

Codd, G. A., Lindsay, J., Young, F. M., Morrison, L. F. and Metcalf, J. S. (2005). Harmful cyanobacteria. In Huisman, J., Matthijs, H. C. P. and Visser, P. (eds), *Harmful cyanobacteria*, Springer, Dordrecht, the Netherlands, pp. 1-23.

Colwell, R. K. (2006). Estimates: statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 8 [WWW document]. Persistent URL: http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates.

Davis, T. W., Berry, D. L., Boyer, G. L. and Gobler, C. J. (2009). The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae* 8:715-725

Deacon, C. and Walsby, A. E. (1990). Gas vesicle formation in the dark, and in light of different irradiances, by the cyanobacterium *Microcystis* sp. *European Journal of Phycology* 25:133-139

Deblois, C. P. and Juneau, P. (2010). Relationship between photosynthetic processes and microcystin in *Microcystis aeruginosa* grown under different photon irradiances. *Harmful Algae* 9:18-24.

Demott, W. R. and Moxter, F. (1991). Foraging on cyanobacteria by copepods - Responses to chemical defenses and resource abundance. *Ecology* 72:1820-1834

Dittmann, E., Erhard, M., Kaebernick, M., Scheler, C., Neilan, B. A., Von Döhren, H. and Börner, T. (2001). Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Microbiology* 147:3113-3119

Dittmann, E., Neilan, B., Erhard, M., Von Dohren, H. and Borner, 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 – 787

Downing, T. G., Meyer, C., Gehringer, M. M. and Van De Venter, M. (2005a). Microcystin content of *Microcystis aeruginosa* is modulated by nitrogen uptake rate relative to specific growth rate or carbon fixation rate. *Environmental Toxicology* 20:257-262

Downing, T. G., Sember, C. S., Gehringer, M. M. and Leukes, W. (2005b). Medium N : P ratios and specific growth rate comodulate microcystin and protein content in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 and *M.aeruginosa* UV027. *Microbial Ecology* 49:468-473

El Semary, N. A. (2010). Investigating factors affecting growth and cellular mcyB transcripts of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 using real-time PCR. *Annals of Microbiology* 60:181-188

Elser, J. J. (1999). The pathway to noxious cyanobacteria blooms in lakes: the food web as the final turn. *Freshwater Biology* 42:537-543

Eriksson, J. E., Grönberg, L., Nygård, S., Slotte, J. P. and Meriluoto, J. a. O. (1990). Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1025:60-66

Falconer, I. R. (2005). Is there a human health hazard from microcystins in the drinking water supply? *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* 33:64-71

Falconer, I. R., Beresford, A. M. and Runnegar, M. T. C. (1983). Evidence of liver-damage by toxin from a bloom of the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Medical Journal of Australia* 1:511-514

Falconer, I. R. and Yeung, D. S. K. (1992). Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell-proteins. *Chemico-Biological Interactions* 81:181-196

Fallon, R. D. and Brock, T. D. (1980). Planktonic blue-green-algae - production, sedimentation, and decomposition in Lake Mendota, Wisconsin. *Limnology and Oceanography* 25:72-88

Fallon, R. D. and Brock, T. D. (1981). Overwintering of *Microcystis* in Lake Mendota. *Freshwater Biology* 11:217-226

Fastner, J., Erhard, M., Carmichael, W. W., Sun, F., Rinehart, K. L., Ronicke, H. and Chorus, I. (1999). Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the genera *Microcystis* and *Planktothrix* from German freshwaters. *Archiv Fur Hydrobiologie* 145:147-163

Fastner, J., Erhard, M. and Von Dohren, H. (2001). Determination of Oligopeptide Diversity within a Natural Population of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) by Typing Single Colonies by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology.* 67:5069-5076

Fewer, D., Rouhiainen, L., Jokela, J., Wahlsten, M., Laakso, K., Wang, H. and Sivonen, K. (2007). Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. *BMC Evolutionary Biology* 7:183

Frangeul, L., Quillardet, P., Castets, A. M., Humbert, J. F., Matthijs, H. C., Cortez, D., Tolonen, A., Zhang, C. C., Gribaldo, S., Kehr, J. C., Zilliges, Y., Ziemert, N., Becker, S., Talla, E., Latifi, A., Billault, A., Lepelletier, A., Dittmann, E., Bouchier, C. and Tandeau De Marsac, N. (2008). Highly plastic genome of *Microcystis aeruginosa* PCC7806, a ubiquitous toxic freshwater cyanobacterium. *Bmc Genomics* 9:274-274

Ganf, G. G. (1974). Diurnal mixing and vertical distribution of phytoplankton in a shallow equatorial lake (Lake George, Uganda). *Journal of Ecology* 62:611-629

Ganf, G. G., Oliver, R. L. and Walsby, A. E. (1989). Optical properties of gas vacuolate cells and colonies of *Microcystis* in relation to light attenuation in a turbid, stratified reservoir (Mount Bold reservoir, South-Australia). *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 40:595-611

Guo, N. and Xie, P. (2006). Development of tolerance against toxic *Microcystis* aeruginosa in three cladocerans and the ecological implications. *Environmental Pollution* 143:513-518

Ha, K., Takamura, N. and Jang, M.-H. (2009). Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to phytoplanktivorous and omnivorous fish at different kairomone concentrations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 5:761-765

Hammer, Ø., Harper, D. a. T. and Ryan, P. D. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4:9 pp

Hanson, L. A., Rudstam, L. G., Johnson, T. B., Soranno, P. and Allen, Y. (1994). Patterns in algal recruitment from sediment to water in a dimictic, eutrophic lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51:2825-2833

Hardin, G. (1960). Competitive exclusion principle. *Science* 131:1292-1297

Hesse, K. and Kohl, J. G. (2001). Effects of light and nutrient supply on growth and microcystin content of different strains of *Microcystis aeruginosa*. *p. 152-158.* In I. Chorus (ed.), *Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences.* Springer-Verlag KG, Berlin, Germany..

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994). Group 11. Oxygenic phototrophic bacteria, p. 377-425. in W. W. Henrys W.R.,(ed.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition,* Baltimore, USA.

Hotto, A. M., Satchwell, M. F., Berry, D. L., Gobler, C. J. and Boyer, G. L. (2008). Spatial and temporal diversity of microcystins and microcystin-producing genotypes in Oneida Lake, NY. *Harmful Algae* 7:671-681

Hotto, A. M., Satchwell, M. F. and Boyer, G. L. (2007). Molecular characterization of potential microcystin-producing cyanobacteria in lake Ontario embayments and nearshore waters. *Applied and Environmental Microbiology* 73:4570-4578

Hughes, E. O., Gorham, P. R. and Zehnder, A. (1958). Toxicity of a unialgal culture of *Microcystis aeruginosa*. *Canadian Journal of Microbiology* 4:225-236

Huisman, J., Jonker, R. R., Zonneveld, C. and Weissing, F. J. (1999). Competition for light between phytoplankton species: experimental tests of mechanistic theory. *Ecology*, 80:211-222.

Humbert, J. F., Duris-Latour, D., Le Berre, B., Giraudet, H. and Salencon, M. J. (2005). Genetic diversity in *Microcystis* populations of a French storage reservoir assessed by sequencing of the 16S-23S rRNA intergenic spacer. *Microbial Ecology* 49:308-314

Humbert, J. F. and Le Berre, B. (2001). Genetic diversity in two species of freshwater cyanobacteria, *Planktothrix* (Oscillatoria) *rubescens* and *P. agardhii*. *Archiv Für Hydrobiologie - Algological Studies* 150-2:197-206

Humble, A. V., Gadd, G. M. and Codd, G. A. (1997). Binding of copper and zinc to three cyanobacterial microcystins quantified by differential pulse polarography. *Water Research* 31:1679-1686

Ihle, T., Jähnichen, S. and Benndorf, J. (2005). Wax and wane of *Microcystis* (Cyanophyceae) and microcystins in lake sediments: a case study in Quitzdorf Reservoir (Germany). *Journal of Phycology* 41:479-488

Izydorczyk, K., Jurczak, T., Wojtal-Frankiewicz, A., Skowron, A., Mankiewicz-Boczek, J. and Tarczynska, M. (2008). Influence of abiotic and biotic factors on microcystin content in *Microcystis aeruginosa* cells in a eutrophic temperate reservoir. *Journal of Plankton Research* 30:393-400

Jahnichen, S., Ihle, T. and Petzoldt, T. (2008). Variability of microcystin cell quota: A small model explains dynamics and equilibria. *Limnologica* 38:339-349

Jang, M.-H., Ha, K., Joo, G.-J. and Takamura, N. (2003). Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. *Freshwater Biology* 48:1540-1550

Jang, M. H., Ha, K., Jung, J. M., Lee, Y. J. and Takamura, N. (2006). Increased microcystin production of *Microcystis aeruginosa* by indirect exposure of nontoxic cyanobacteria: Potential role in the development of *Microcystis* bloom. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 76:957-962

Jang, M. H., Ha, K., Lucas, M. C., Joo, G. J. and Takamura, N. (2004). Changes in microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to phytoplanktivorous and omnivorous fish. *Aquatic Toxicology* 68:51-59

Jang, M. H., Ha, K. and Takamura, N. (2007a). Reciprocal allelopathic responses between toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and duckweed (*Lemna japonica*). *Toxicon* 49:727-733

Jang, M. H., Ha, K. and Takamura, N. (2008). Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to different stages of herbivorous zooplankton. *Toxicon* 51:882-889

Jang, M. H., Jung, J. M. and Takamura, N. (2007b). Changes in microcystin production in cyanobacteria exposed to zooplankton at different population densities and infochemical concentrations. *Limnology and Oceanography* 52:1454-1466

Janse, I., Kardinaal, W. E. A., Meima, M., Fastner, J., Visser, P. M. and Zwart, G. (2004). Toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the

basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 70:3979-3987

Janse, I., Meima, M., Kardinaal, W. E. A. and Zwart, G. (2003). High-resolution differentiation of Cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69:6634-43

Jungmann, D., Ludwichowski, K. U., Faltin, V. and Benndorf, J. (1996). A field study to investigate environmental factors that could effect microcystin synthesis of a *Microcystis* population in the Bautzen reservoir. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* 81:493-501

Kaebernick, M., Dittmann, E., Borner, T. and Neilan, B. A. (2002). Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. *Applied and Environmental Microbiology* 68:449-455

Kaebernick, M. and Neilan, B. A. (2001). Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology* 35:1-9

Kaebernick, M., Neilan, B. A., Borner, T. and Dittmann, E. (2000). Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology* 66:3387-3392

Kamjunke, N. and Jahnichen, S. (2000). Leucine incorporation by *Microcystis aeruginosa*. *Limnology and Oceanography* 45:741-743

Kardinaal, W. E. A., Janse, I., Agterveld, M. K., Meima, M., Snoek, J., Mur, L. R., Huisman, J., Zwart, G. and Visser, P. M. (2007a). *Microcystis* genotype succession in relation to microcystin concentrations in freshwater lakes. *Aquatic Microbial Ecology* 48:1-12

Kardinaal, W. E. A., Tonk, L., Janse, I., Hol, S., Slot, P., Huisman, J. and Visser, P. M. (2007b). Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. *Applied and Environmental Microbiology* 73:2939-2946

Kardinaal, W. E. A. and Visser, P. M. (2005). Dynamics of cyanobacterial toxins: source of variability in microcystin concentrations. In Huisman, J., Matthijs, H. C. P. and Visser, P. (eds), *Harmful cyanobacteria*, Springer, Dordrecht, the Netherlands, pp. 41-63.

Kehr, J. C., Zilliges, Y., Springer, A., Disney, M. D., Ratner, D. D., Bouchier, C., Seeberger, P. H., De Marsac, N. T. and Dittmann, E. (2006). A mannan binding lectin is involved in cell-cell attachment in a toxic strain of *Microcystis aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 59:893-906

Kim, S.-G., Joung, S.-H., Ahn, C.-Y., Ko, S.-R., Boo, S. M. and Oh, H.-M. (2010). Annual variation of *Microcystis* genotypes and their potential toxicity in water and sediment from a eutrophic reservoir. *FEMS Microbiology Ecology* 74:93-102.

Komarek, J. (1991). A review of water-bloom forming *Microcystis* species, with regard to populations from Japan. *Archiv Fur Hydrobiologie* Suppl. 92:115-127

Kondo, R., Yoshida, T., Yuki, Y. and Hiroishi, S. (2000). DNA-DNA reassociation among a bloom-forming cyanobacterial genus, *Microcystis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:767-770

Kononen, K. (2001). Eutrophication, harmful algal blooms and species diversity in phytoplankton communities examples from the Baltic Sea. *Ambio* 30:184-189

Kromkamp, J. C.and Mur, L. R. (1984). Buoyant density changes in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* due to changes in the cellular carbohydrate content. *Fems Microbiology Letters* 25:105-109

Kurmayer, R., Christiansen, G. and Chorus, I. (2003). The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis sp* and determines its microcystin net production in Lake Wannsee. *Applied and Environmental Microbiology* 69:787-795

Kurmayer, R., Dittmann, E., Fastner, J. and Chorus (2002). Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microbial Ecology* 43:107 – 118

Kurmayer, R. and Kutzenberger, T. (2003). Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis sp*. *Applied and Environmental Microbiology* 69:6723-6730

Landsberg, J. H. (2002). The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fisheries Science* 10:113-390

Latifi, A., Ruiz, M. and Zhang, C.-C. (2009). Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 33:258-278

Latour, D. (2002). Vie planctonique et vie benthique de la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa* sur la retenue de Grangent (Loire). *Thèse de doctorat*, Université Jean Monnet

Latour, D. and Giraudet, H. (2004). Factors influencing the spatio-ternporal distribution of benthic *Microcystis aeruginosa* colonies (Cyanobacteria) in the hypertrophic Grangent Reservoir (Loire, France). *Comptes Rendus Biologies* 327:753-761

Latour, D., Giraudet, H. and Berthon, J. L. (2002). Impact of an epilimnic artificial mixing experiment against growth of cyanobacteria in the hypertrophic reservoir of Grangent (France). *Revue des Sciences de l'eau* 15:289-299

Latour, D., Giraudet, H. and Berthon, J. L. (2004a). Frequency of dividing cells and viability of *Microcystis aeruginosa* in sediment of a eutrophic reservoir. *Aquatic Microbial Ecology* 36:117-122

Latour, D., Giraudet, H. and Salencon, M. J. (2004b). Sampling method of colonial cyanobacteria in lake. The case study of *Microcystis aeruginosa* on the reservoir of Grangent (Loire, France). *Comptes Rendus Biologies* 327:105-113

Latour, D., Sabido, O., Salencon, M. J. and Giraudet, H. (2004c). Dynamics and metabolic activity of the benthic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the Grangent reservoir (France). *Journal of Plankton Research* 26:719-726

Latour, D., Salencon, M. J., Reyss, J. L. and Giraudet, H. (2007). Sedimentary imprint of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) blooms in Grangent reservoir (Loire, France). *Journal of Phycology* 43:417-425

Lehman, P. W., Boyer, G., Hall, C., Waller, S. and 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. and 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

Loisel, P., Hamelin, J., Godon, J.-J., Haegeman, B. and Harmand, J. (2009). A method for measuring the biological biodiversity of a sample. *European Patent* EP20553401:

Long, B. M., Jones, G. J. and Orr, P. T. (2001). Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Applied and Environmental Microbiology* 67:278-283

Lukac, M. and Aegerter, R. (1993). Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* 31:293-305

Lyck, S., Gjolme, N. and Utkilen, H. (1996). Iron starvation increases toxicity of *Microcystis aeruginosa* CYA 228/1 (Chroococcales, Cyanophyceae). *Phycologia* 35:120-124

Lyra, C., Suomalainen, S., Gugger, M., Vezie, C., Sundman, P., Paulin, L. and Sivonen, K. (2001). Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:513-526

Mackintosh, C., Beattie, K., Klumpp, S., Cohen, P. and Codd, G. (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 - 192

Misson, B., Sabart, M., Amblard, C. and Latour, D. (2011). Involvement of microcystins and colony size in the benthic recruitment of the cyanobacterium *Microcystis* (Cyanophyceae). *Journal of Phycology* 47:42-51

Mitrovic, S. M., Allis, O., Furey, A. and James, K. J. (2005). Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chladophora fracta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61:345-352

Moezelaar, R. and Stal, L. J. (1997). A comparison of fermentation in the cyanobacterium *Microcystis* PCC7806 grown under a light/dark cycle and continuous light. *European Journal of Phycology* 32:373-378

Mur, L. R., Skulberg, O. M. and Utkilen, H. (1999). Cyanobacteria in the environment. In Chorus I. and Bartram J. (eds), *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*, Spon, London, UK, pp. 12-24.

Murphy, T. P., Irvine, K., Guo, J., Davies, J., Murkin, H., Charlton, M. and Watson, S. B. (2003). New microcystin concerns in the lower great lakes. *Water Quality Research Journal of Canada* 38:127-140

Neilan, B. A., Jacobs, D., Del Dot, T., Blackall, L. L., Hawkins, P. R., Cox, P. T. and Goodman, A. E. (1997). rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International journal of systematic bacteriology.* 47:693-697

Nicholas, K. B. and Nicholas, H.B. (1997). Genedoc: a tool for editing and annoting multiple sequence alignments. Distributed by the author [WWW document]. URL http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html.

Nishiwakimatsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, W. W. and Fujiki, H. (1992). Liver-tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-lr. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 118:420-424

Nishizawa, T., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K. and Shirai, M. (1999). Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis spp*. *Journal of Biochemistry* 126:520-529

Nishizawa, T., Ueda, A., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K., Ochi, K. and Shirai, M. (2000). Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. *Journal of Biochemistry* 127:779-789

Oh, H. M., Lee, S. J., Jang, M. H. and Yoon, B. D. (2000). Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat. *Applied and Environmental Microbiology* 66:176-179

Oliver, R. L., Thomas, R. H., Reynolds, C. S. and Walsby, A. E. (1985). The sedimentation of buoyant *Microcystis* colonies caused by precipitation with an iron-containing colloid. *Proceedings of the Royal Society of London B* 223:511-528

Orr, P. T. and Jones, G. J. (1998). Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and Oceanography* 43:1604-1614

Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Matsumoto, S. and Watanabe, M. M. (2000). Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. *The Journal of general and applied microbiology* 46:39-50

Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. and Watanabe, M. M. (1998). 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. *FEMS Microbiol. Lett.* 164:119-124

Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. and Watanabe, M. M. (1999). Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* 172:15-21

Otsuka, S., Suda, S., Shibata, S., Oyaizu, H., Matsumoto, S. and Watanabe, M. M. (2001). A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kutzing ex Lemmermann 1907 under the Rules of the Bacteriological Code. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:873-879

Ou, D. Y., Song, L. R., Gan, N. Q. and Chen, W. (2005). Effects of microcystins on and toxin degradation by *Poterioochromonas sp*. *Environmental Toxicology* 20:373-380

Park, H. D., Iwami, C., Watanabe, M. F., Harada, K., Okino, T. and Hayashi, H. (1998). Temporal variabilities of the concentrations of intra- and extracellular microcystin and toxic *Microcystis* species in a hypertrophic lake, Lake Suwa, Japan (1991-1994). *Environmental Toxicology and Water Quality* 13:61-72

Pearson, L. A., Hisbergues, M., Borner, T., Dittmann, E. and Neilan, B. A. (2004). Inactivation of an ABC transporter gene, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Applied and environmental microbiology* 70:6370-6378

Pobel, D., Robin, J. and Humbert, J. F. (2011). Influence of sampling strategies on the monitoring of cyanobacteria in shallow lakes: Lessons from a case study in France. *Water Research* 45:1005-1014

Prakash, S., Lawton, L. A. and Edwards, C. (2009). Stability of toxigenic *Microcystis* blooms. *Harmful Algae* 8:377-384

Qian, H., Yu, S., Sun, Z., Xie, X., Liu, W. and Fu, Z. (2010). Effects of copper sulfate, hydrogen peroxide and N-phenyl-2-naphthylamine on oxidative stress and the expression of genes involved photosynthesis and microcystin disposition in *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology* 99:405-412

Rabergh, C. M. I., Bylund, G. and Eriksson, J. E. (1991). Histopathological effects of microcystin-lr, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green-alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (Cyprinus-carpio L.). *Aquatic Toxicology* 20:131-145

Rabouille, S. and Salencon, M. J. (2005). Vertical migration of the cyanobacterium *Microcystis* in stratified lakes analysed with the YOYO model. II-Influence of mixing, thermal stratification and colony diameter on the biomass production. *Aquatic Microbial Ecology* 39:281-292

Rabouille, S., Thebault, J. M. and Salencon, M. J. (2003). Simulation of carbon reserve dynamics in *Microcystis* and its influence on vertical migration with Yoyo model. *Comptes Rendus Biologie* 326:349-361

Rantala, A., Fewer, D., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Borner, T. and Sivonen, K. (2004). Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceeding of the Natural Academy of Sciences of the USA* 101:568 – 573

Rantala, A., Rajaniemi-Wacklin, P., Lyr, C., Lepistö, L., Rintala, J., Mankiewicz-Boczek, J. and Sivonen, K. (2006). Detection of microcystin-producting cyanobacteria in Finnish Lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (*mcyE*) PCR and associations with environmental factors. *Applied and environmental microbiology*. 72:6101-6110

Rapala, J., Erkomaa, K., Kukkonen, J., Sivonen, K. and Lahti, K. (2002). Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay - Comparison of methods. *Analytica Chimica Acta* 466:213-231

Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C. and Niemela, S. I. (1997). Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena spp.* as a function of growth stimuli. *Applied and Environmental Microbiology* 63:2206-2212

Rengefors, K., Gustafsson, S. and Stahl-Delbanco, A. (2004). Factors regulating the recruitment of cyanobacterial and eukaryotic phytoplankton from littoral and profundal sediments. *Aquatic Microbial Ecology* 36:213-226

Reynolds, C. S. (1973). Growth and buoyancy of *Microcystis aeruginosa* Kütz Emend Elenkin in a shallow eutrophic lake *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 184:29-50

Reynolds, C. S. (1995). The Intermediate Disturbance Hypothesis and its applicability to planktonic communities: Comments on the views of Padisak and Wilson. *New Zealand Journal of Ecology* 19:219-225

Reynolds, C. S. (1997). *Vegetation processes in the pelagic: a model for ecosystem theory*. Ecology Institute, Oldendorf, Germany.

Reynolds, C. S. and Jaworski, G. H. M. (1978). Enumeration of natural *Microcystis* populations. *British Phycological ournal.* 13:269-277

Reynolds, C. S., Jaworski, G. H. M., Cmeich, H. A. and Leedale, G. F. (1981). On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* Kutz. emend. Elenkin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 293:419-477

Reynolds, C. S. and Rogers, D. A. (1976). Seasonal variations in the vertical distribution and buoyancy of *Microcystis aeruginosa* Kutz emend. Elenkin in Rostherne Mere, England. *Hydrobiologia* 48:17-23

Reynolds, C. S. and Wiseman, S. W. (1982). Sinking losses of phytoplankton in closed limnetic systems. *Journal of Plankton Research* 4:489-522

Rinta-Kanto, J. M., Ouellette, A. J. A., Boyer, G. L., Twiss, M. R., Bridgeman, T. B. and Wilhelm, S. W. (2005). Quantification of toxic *Microcystis spp.* during the 2003 and 2004 blooms in western Lake Erie using quantitative real-time PCR. *Environmental Science & Technology* 39:4198-4205

Rinta-Kanto, J. M., Saxton, M. A., Debruyn, J. M., Smith, J. L., Marvin, C. H., Krieger, K. A., Sayler, G. S., Boyer, G. L. and Wilhelm, S. W. (2009). The diversity and distribution of toxigenic *Microcystis* spp. in present day and archived pelagic and sediment samples from Lake Erie. *Harmful Algae* 8:385-394

Rivasseau, C., Racaud, P., Deguin, A. and Hennion, M. C. (1999). Development of a bioanalytical phosphatase inhibition test for the monitoring of microcystins in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta* 394:243-257

Robarts, R. D. and Zohary, T. (1987). Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth-rates of bloom-forming cyanobacteria. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21:391-399

Rohrlack, T., Henning, M. and Kohl, J. G. (2001). Isolation and characterisation of colony-forming *Microcystis aeruginosa* strains. *In I. Chorus (ed.), Cyanotoxins-occurrence, causes, consequences. Springer-Verlag, Berlin, Germany.* 152-158

Rojas, M., Nuñez, M. T. and Zambrano, F. (1990). Inhibitory effect of a toxic peptide isolated from a waterbloom of *Microcystis* sp. (cyanobacteria) on iron uptake by rabbit reticulocytes. *Toxicon* 28:1325-1332

Rondel, C., Arfi, R., Corbin, D., Le Bihan, F., Ndour, E. H. and Lazzaro, X. (2008). A cyanobacterial bloom prevents fish trophic cascades. *Freshwater Biology* 53:637-651

Ross, C., Santiago-Vázquez, L. and Paul, V. (2006). Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology* 78:66-73

Rouhiainen, L., Vakkilainen, T., Lumbye-Siemer, B., Buikema, W., Haselkorn, R. and Sivonen, K. (2004). Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium Anabaena strain 90. *Applied and Environmental Microbiology* 70:686 – 692

Sabart, M. (2009). Variations spatiotemporelles dans la dynamique, la diversité génétique et le potentiel toxique de populations de *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) dans plusieurs écosystèmes aquatiques du centre de la France. *Thèse de doctorat*, Université de Savoie, 161 p.

Sabart, M., Pobel, D., Briand, E., Combourieu, B., Salencon, M. J., Humbert, J. F. and 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* 76:4750-4759

Sabart, M., Pobel, D., Latour, D., Robin, J., Salençon, M. J. and Humbert, J. F. (2009). Spatiotemporal changes in the genetic diversity in French bloom-forming populations of the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Microbiology Reports* 1:263–272

Schatz, D., Keren, Y., Vardi, A., Sukenik, A., Carmeli, S., Borner, T., Dittmann, E. and Kaplan, A. (2007). Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environmental Microbiology* 9:965-970

Schöne, K., Jähnichen, S., Ihle, T., Ludwig, F. and Benndorf, J. (2010). Arriving in better shape: Benthic *Microcystis* as inoculum for pelagic growth. *Harmful Algae* 9:494-503

Sedmak, B. and Elersek, T. (2005). Microcystins induce morphological and physiological changes in selected representative phytoplanktons. *Microbial Ecology* 50:298-305

Sedmak, B. and Kosi, G. (1998). The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation. *Journal of Plankton Research* 20:691-708

Sen, B., Hamelin, J., Bru-Adan, V., Godon, J. J. and Chandra, T. S. (2008). Structural divergence of bacterial communities from functionally similar laboratory-scale vermicomposts assessed by PCR-CE-SSCP. *Journal of Applied Microbiology* 105:2123-2132

Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M. T., Fillat, M. F. and Peleato, M. L. (2008). Iron availability affects mcyD expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environmental Microbiology* 10:2476-2483

Sheridan, G. E. C., Masters, C. I., Shallcross, J. A. and Mackey, B. M. (1998). Detection of mRNA by reverse transcription PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Applied and Environmental Microbiology* 64:1313-1318

Shi, L., Carmichael, W. W. and Kennelly, P. J. (1999). Cyanobacterial PPP family protein phosphatases possess multifunctional capabilities and are resistant to microcystin-LR. Journal of biological chemistry 274:10039-10046

Shi, L., Carmichael, W. W. and Miller, I. (1995). Immunogold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells. *Archives of Microbiology* 163:7-15

Singh, D. P., Tyagi, M. B., Kumar, A. and Thakur, J. K. (2001). Antialgal activity of a hepatotoxin-producing cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 17:15-22

Sivonen, K. and Jones, G. (1999). Cyanobacterial toxins. In Chorus I. and Bartram J. (eds), *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*, Spon, London, UK, pp. 41 – 111

Smith, V. H. (2003). Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems - A global problem. *Environmental Science and Pollution Research* 10:126-139

Stahl-Delbanco, A. and Hansson, L. A. (2002). Effects of bioturbation on recruitment of algal cells from the "seed bank" of lake sediments. *Limnology and Oceanography* 47:1836-1843

Stahl-Delbanco, A., Hansson, L.-A. and Gyllstrom, M. (2003). Recruitment of resting stages may induce blooms of *Microcystis* at low N:P ratios. *Journal of Plankton Research* 25:1099-1106

Straub, C., Quillardet, P., Vergalli, J., De Marsac, N. T. and Humbert, J.-F. (2011). A day in the life of *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806 as revealed by a transcriptomic analysis. *Plos One* 6:e16208

Takamura, N., Yasuno, M. and Sugahara, K. (1984). Overwintering of *Microcystis aeruginosa* Kutz. in a shallow lake. *Journal of Plankton Research* 6:1019-1029

Tan, X., Kong, F. X., Cao, H. S., Yu, Y. and Zhang, M. (2008). Recruitment of bloom-forming cyanobacteria and its driving factors. *African Journal of Biotechnology* 7:4726-4731

Tanabe, Y. and Watanabe, M. M. (2011). Local expansion of a panmictic lineage of water bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Plos One* 6(2): e17085. doi:10.1371/journal.pone.0017085

Thomas, R. H. and Walsby, A. E. (1985). Buoyancy regulation in a strain of *Microcystis*. *Journal of General Microbiology* 131:799-809

Thomas, R. H. and Walsby, A. E. (1986). The effect of temperature on recovery of buoyancy by *Microcystis*. *Journal of General Microbiology* 132:1665-1672

Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., Von Dohren, H., Borner, T. and Neilan, B. (2000). Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis* aeruginosa PCC 7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chemistry and Biology* 7:753 – 764

Tonk, L., Bosch, K., Visser, P. M. and Huisman, J. (2007). Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Microbial Ecology* 46:117-123

Trimbee, A. M. and Harris, G. P. (1984). Phytoplankton population dynamics of a small reservoir: effect of intermittent mixing on phytoplankton succession and the growth of blue-green algae. *Journal of Plankton Research* 6:699-713

Tsujimura, S., Tsukada, H., Nakahara, H., Nakajima, T. and Nishino, M. (2000). Seasonal variations of *Microcystis* populations in sediments of Lake Biwa, Japan. *Hydrobiologia* 434:183-192

Utkilen, H. and Gjolme, N. (1992). Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. *Applied and Environmental Microbiology* 58:1321-1325

Utkilen, H. and Gjolme, N. (1995). Iron stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 61:797-800

Van De Waal, D. B., Verspagen, J. M. H., Finke, J. F., Vournazou, V., Immers, A. K., Kardinaal, W. E. A., Tonk, L., Becker, S., Van Donk, E., Visser, P. M. and Huisman, J. (2011). Reversal in competitive dominance of a toxic versus non-toxic cyanobacterium in response to rising CO2. *ISME Journal* 5:1438-1450

Van De Waal, D. B., Verspagen, J. M. H., Lurling, M., Van Donk, E., Visser, P. M. and Huisman, J. (2009). The ecological stoichiometry of toxins produced by harmful cyanobacteria: an experimental test of the carbon-nutrient balance hypothesis. *Ecology letters* 12:1326-1335

Van Gremberghe, I., Vanormelingen, P., Vanelslander, B., Van Der Gucht, K., D'hondt, S., De Meester, L. and Vyverman, W. (2009). Genotype-dependent interactions among sympatric *Microcystis* strains mediated by *Daphnia* grazing. *Oikos* 118:1647-1658

Vanderwesthuizen, A. J. and Eloff, J. N. (1985). Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Planta* 163:55-59

Vardi, A., Schatz, D., Beeri, K., Motro, U., Sukenik, A., Levine, A. and Kaplan, A. (2002). Dinoflagellate-cyanobacterium communication may determine the composition of phytoplankton assemblage in a mesotrophic lake. *Current Biology* 12:1767-1772

Verspagen, J. M. H. (2006). Benthic-pelagic coupling in the population dynamics of the cyanobacterium *Microcystis*. *Ph.D. thesis*, Universiteit Utrecht, 159p.

Verspagen, J. M. H., Snelder, E., Visser, P. M., Huisman, J., Mur, L. R. and Ibelings, B. W. (2004a). Recruitment of benthic *Microcystis* (Cyanophyceae) to the water column: internal buoyancy changes or resuspension? *Journal of Phycology* 40:260-270

Verspagen, J. M. H., Snelder, E., Visser, P. M., Johnk, K. D., Ibelings, B. W., Mur, L. R. and Huisman, J. (2005). Benthic-pelagic coupling in the population dynamics of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. *Freshwater Biology* 50:854-867

Verspagen, J. M. H., Visser, P. M. and Huisman, J. (2006). Aggregation with clay causes sedimentation of the buoyant cyanobacteria *Microcystis* spp. *Aquatic Microbial Ecology* 44:165-174

Vezie, C., Rapala, J., Vaitomaa, J., Seitsonen, J. and Sivonen, K. (2002). Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microbial Ecology* 43:443-454

Via-Ordorika, L., Fastner, J., Kurmayer, R., Hisbergues, M., Dittmann, E., Komarek, J., Erhard, M. and Chorus, I. (2004). Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in European freshwater bodies: detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies. *Systematic and Applied Microbiology* 27:592-602

Vincent, W. F. and Goldman, C. R. (1980). Evidence for algal heterotrophy in Lake Tahoe, California-Nevada. *Limnology and Oceanography* 25:89-99

Visser, P. M., Ibelings, B. W. and Mur, L. R. (1995). Autumnal sedimentation of *Microcystis spp.* as result of an increase in carbohydrate ballast at reduced temperature. *Journal of Plankton Research* 17:919-933

Walsby, A. E. (1994). Gas Vesicles. *Microbiological Reviews* 58:94-144

Walsby, A. E. and Mcallister, G. K. (1987). Buoyancy regulation by *Microcystis* in lake Okaro. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21:521-524

Watanabe, M. (1994). Water bloom-forming blue-green algae (Mizu no hana wo tsukuru ranso). *in M. F. Watanabe, Harada, K. and Fujiki, H., University of Tokyo press, Tokyo*, 25-54.

Watanabe, M. (1996). Isolation, cultivation, and classification of bloom-forming *Microcystis* in Japan. . in M. F. Watanabe, Harada, K., Carmichael, W.W. and Fujiki, H., *Toxic* Microcystis, CRC press, Boca Raton, USA, p. 13-34.

Watanabe, M. F. and Oishi, S. (1980). Toxicities of *Microcystis aeruginosa* collected from some lakes, reservoirs, ponds and moat in Tokyo and adjacent region. *Journal of Limnology*, 41:5-9.

Watanabe, M. F. and Oishi, S. (1985). Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology.* 49:1342-1344

Watanabe, M. F., Tsuji, K., Watanabe, Y., Harada, K.-I. and Suzuki, M. (1992). Release of heptapeptide toxin (microcystin) during the decomposition process of *Microcystis aeruginosa*. *Natural Toxins* 1:48-53

Welker, M. and Von Döhren, H. (2006). Cyanobacterial peptides - Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 30:530-563

Welker, M., Von Dohren, H., Tauscher, H., Steinberg, C. E. W. and Erhard, M. (2003a). Toxic *Microcystis* in shallow lake Muggelsee (Germany) - dynamics, distribution, diversity. *Archiv Fur Hydrobiologie* 157:227-248

Wicks, R. J. and Thiel, P. G. (1990). Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floatong scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertrophic African reservoir. *Environmental Science & Technology* 24:1413-1418

Wiedner, C., Visser, P. M., Fastner, J., Metcalf, J. S., Codd, G. A. and Mur, L. R. (2003). Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology* 69:1475-1481

Wilson, A. E., Sarnelle, O. and Tillmanns, A. R. (2006a). Effects of cyanobacterial toxicity and morphology on the population growth of freshwater zooplankton: Meta-analyses of laboratory experiments. *Limnology and Oceanography* 51:1915-1924

Wörmer, L., Cirés, S. and Quesada, A. (2011). Importance of natural sedimentation in the fate of microcystins. *Chemosphere* 82:1141-1146

Wu, X., Kong, F., Chen, Y., Qian, X., Zhang, L., Yu, Y., Zhang, M. and Xing, P. (2009). Horizontal distribution and transport processes of bloom-forming *Microcystis* in a large shallow lake (Taihu, China). *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters* 40:8-15:

Yoshida, T., Nagasaki, K., Takashima, Y., Shirai, Y., Tomaru, Y., Takao, Y., Sakamoto, S., Hiroishi, S. and Ogata, H. (2008c). Ma-LMM01 infecting toxic *Microcystis aeruginosa* illuminates diverse cyanophage genom strategies. *Journal of Bacteriology* 190:1762-1772

Yoshida, M., Yoshida, T., Kashima, A., Takashima, Y., Hosoda, N., Nagasaki, K. and Hiroishi, S. (2008a). Ecological dynamics of the toxic bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and its cyanophages in freshwater. *Applied and Environmental Microbiology* 74:3269-3273

Yoshida, M., Yoshida, T., Satomi, M., Takashima, Y., Hosoda, N. and Hiroishi, S. (2008b). Intra-specific phenotypic and genotypic variation in toxic cyanobacterial *Microcystis* strains. *Journal of Applied Microbiology* 105:407-415

Yoshida, M., Yoshida, T., Takashima, Y., Hosoda, N. and Hiroishi, S. (2007). Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations is

correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. *FEMS Microbiology Letters* 266:49-53

Young, F. M., Thomson, C., Metcalf, J. S., Lucocq, J. M. and Codd, G. A. (2005). Immunogold localisation of microcystins in cryosectioned cells of *Microcystis*. *Journal of Structural Biology* 151:208-214

Zilliges, Y., Kehr, J.-C., Meissner, S., Ishida, K., Mikkat, S., Hagemann, M., Kaplan, A., Börner, T. and Dittmann, E. (2011). The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. *Plos One* 6:e17615

Zilliges, Y., Kehr, J. C., Mikkat, S., Bouchier, C., De Marsac, N. T., Borner, T. and Dittmann, E. (2008). An extracellular glycoprotein is implicated in cell-cell contacts in the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Journal of Bacteriology* 190:2871-2879

Zohary, T. (1985). Hyperscums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertrophic lake (Hartbeespoort dam, South-Africa). *Journal of Plankton Research* 7:399-409